



## DETECÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS EM PLANTAS ARMADILHAS DE LARANJA ‘PÊRA’ LIVRE DE VÍRUS

*Larissa Siqueira Soares<sup>2</sup>, Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani<sup>1</sup>; Paula Thais Requena Nocchi<sup>2</sup>; Diego Henrique Pereira Catani<sup>2</sup>; Carlos Alexandre Zanutto<sup>3</sup>; William Mário de Carvalho Nunes<sup>4</sup>*

**RESUMO:** A investigação do período entre o tempo em que ocorre a infecção pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) e sua detecção na planta em condição natural de campo têm sido pouco relatadas. Com isso, este estudo teve o objetivo de analisar a eficiência das técnicas de “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) e imunocaptura seguida da reação da polimerase em cadeia (IC-RT-PCR) na determinação do tempo necessário para que a infecção sistêmica pelo CTV possa ser detectada nas condições naturais de campo. Desta forma, plantas armadilhas de laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* L.), livres de vírus, foram instaladas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, com cinco repetições por pomar. O material vegetal foi coletado e analisado periodicamente por ELISA e IC-RT-PCR. Os resultados demonstraram que, em condições naturais de campo, a detecção do vírus através de ELISA ocorreu entre sete a oito meses após o plantio das mudas, enquanto que, por IC-RT-PCR, o CTV foi detectado quatro meses após o plantio, nas plantas da região Norte. No entanto, não foi observada a discriminação de isolados severos nos testes de ELISA através dos anticorpos monoclonais específicos para o Complexo ‘Capão Bonito’. A técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na determinação do tempo mínimo em que a infecção sistêmica pelo CTV ocorre nas condições naturais de campo, enquanto que a técnica de ELISA revelou-se mais eficiente quanto a amplitude e repetitividade.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Citrus tristeza virus*, ELISA, IC-RT-PCR.

### 1. INTRODUÇÃO

A tristeza, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), é considerada uma das mais destrutivas doenças que atingiram a cultura no último século. O CTV ocorre como um complexo de isolados que diferem nos sintomas induzidos nos diferentes hospedeiros tendo a capacidade de infectar praticamente todas as espécies, variedades e híbridos do gênero *Citrus*, sendo transmitido via enxertia e de forma semipersistente por diferentes espécies de afídeos (LEE et al., 1994).

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas visando detectar e caracterizar isolados de CTV nos seus diferentes hospedeiros. Com o intuito de ampliar estes estudos foram analisadas a eficiência das técnicas de “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) e

<sup>1</sup> Doutoranda do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES. alineorb@hotmail.com

<sup>2</sup> Mestrandos do curso de pós-graduação em agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CAPES, CNPq. paizinhos\_larissa@hotmail.com

<sup>3</sup> Eng. Agrônomo, Doutor. Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. cazanutto@uem.br.

<sup>4</sup> Orientador, Professor Doutor do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM. william.nunes@pq.cnpq.br

imunocaptura seguida de reação da polimerase em cadeia (IC-RT-PCR) na detecção de CTV, avaliando o espaço de tempo necessário de exposição para que plantas livres de vírus sejam infectadas pelo CTV, em condições naturais de campo, em três pomares comerciais do Estado do Paraná.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado como plantas armadilha para o CTV foram quinze mudas de laranja 'Pêra', enxertadas em porta-enxerto de limão 'Cravo' e livres de vírus pela técnica de microenxertia. O primeiro experimento foi instalado no campo em três pomares comerciais de laranja 'Pêra', sendo um localizado na região Norte e dois na região Noroeste do Estado do Paraná, com cinco repetições por pomar, distribuídas aleatoriamente entre as árvores adultas. Folhas e ramos jovens coletados das plantas livres de vírus (controle negativo), das quinze plantas armadilhas, de plantas adultas de laranja 'Pêra' pertencentes aos pomares e localizadas ao redor das plantas armadilha (controles positivos), foram coletados a cada três meses, totalizando oito amostragens. A nervura principal das folhas e as cascas dos ramos foram retiradas com auxílio de estilete, liofilizadas e utilizadas para a avaliação da infecção por CTV através de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). A análise de ELISA foi realizada na versão "Sandwich" de duplo anticorpo, segundo a metodologia descrita por Clark et al. (1986) e os anticorpos utilizados foram os monoclonais 30g-02, 37g-11, 39-07 e IC-04-12 e o anticorpo policlonal PCA 1006/Br (STACH-MACHADO et al., 2002).

Um segundo experimento, também constituído de quinze mudas de laranja 'Pêra' em porta-enxerto de limão 'Cravo' livres de vírus, foi instalado nos mesmos pomares comerciais e avaliados por IC-RT-PCR. A primeira avaliação por IC-RT-PCR foi realizada antes do plantio para a certificação da sanidade das plântulas. Foi também realizada com cinco repetições por pomar, plantadas aleatoriamente entre as plantas adultas de laranja 'Pêra' dos mesmos pomares comerciais. Folhas e ramos jovens das quinze plantas armadilha do segundo experimento foram coletados a cada mês, totalizando cinco amostragens. O material (nervuras de folhas e cascas de ramos) foi liofilizado e utilizado para a detecção de CTV por IC-RT-PCR. Para avaliação de caneluras, segmentos de ramos foram coletados das plantas armadilhas do primeiro experimento, após dois anos do plantio. Posteriormente, as cascas foram removidas e observadas a presença ou ausência deste sintoma. Foram, então, atribuídas notas de 1 a 5, seguindo a escala de notas diagramática de Meissner-Filho et al. (2002).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações feitas por ELISA, utilizando como primeiro anticorpo o policlonal 1006/BR e como segundo anticorpo os monoclonais 30g-02, 37g-11, 39-07 e IC-04-12, como as mudas estavam muito pequenas e com pouco material (folhas) disponível para as avaliações sorológicas, a primeira coleta foi realizada três meses após o plantio. Na primeira avaliação, todas as amostras apresentaram valores de A405 (absorbância 405nm) inferiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo, com todos os monoclonais utilizados, revelando-se negativas à infecção pelo CTV.

A segunda coleta foi realizada sete meses após o plantio, durante a primavera, quando as plantas estavam mais desenvolvidas, com brotações novas, e colonizadas por pulgões, principalmente, as que foram plantadas no pomar da região Norte do Estado. Nessa ocasião, os títulos obtidos com o anticorpo monoclonal 30g-02 foram superiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo, revelando a presença do vírus nos

tecidos de todas as plantas armadilhas. Apenas duas plantas de cada um dos ensaios com os monoclonais IC-04-12, 37g-11 e 39-07 apresentaram-se, ainda, negativas. A maioria das amostras positivas apresentou valores de A405 ainda bastante baixos, em comparação com os controles positivo, variando de 0,122 a 0,174 com o monoclonal 30g-02, de 0,095 a 0,136 com o monoclonal IC-04-12, de 0,103 a 0,151 com o monoclonal 37g-11 e de 1,22 a 0,218 com o monoclonal 39-07.

Na coleta realizada dez meses após o plantio, todas as plantas apresentaram valores de A405 superiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo com todos os monoclonais utilizados. Nas condições naturais de campo, no Brasil, onde a tristeza é endêmica, os resultados do presente estudo demonstraram que a infecção pelo CTV foi detectada nas plantas armadilhas pela sensibilidade do método ELISA, aproximadamente, oito meses após o plantio. Valores crescentes e, muitas vezes, expressivos de absorvância, foram observados com os anticorpos 30g-02, IC-04-12 e 37g-11 nas plantas estabelecidas no pomar de Rolândia (região Norte do Paraná). Resultados semelhantes com estes monoclonais foram registrados apenas na planta 13 do pomar do município de Alto Paraná, localizado na região Noroeste do Estado. As demais plantas da região Noroeste apresentaram pequeno aumento nos títulos, sendo que algumas mantiveram valores muito próximos aos iniciais. Estes resultados podem estar associados à observação da presença ocasional de pulgões nos pomares da região Noroeste, em contraste com sua maior frequência e quantidade na região Norte.

Na detecção de CTV através de IC-RT-PCR e extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR, a primeira avaliação nas plantas armadilhas do segundo experimento, realizada antes de serem levadas ao campo, confirmou a sanidade das mesmas quanto ao CTV. Os resultados obtidos nas coletas realizadas no primeiro, segundo e terceiro mês após o plantio, demonstraram que todas as plantas instaladas nos três pomares comerciais ainda apresentavam-se livre de vírus, pela sensibilidade desta técnica.

No perfil eletroforético dos produtos da PCR das amostras coletadas aos quatro meses após o plantio, foi possível observar a presença de um fragmento de aproximadamente 670 pb, correspondente ao gene da proteína do capsídeo do CTV (SEKIYA et al., 1991), no “bulk” das amostras da propriedade da região Norte do Estado, confirmando a presença de partículas virais nestas plantas. No entanto, nenhum fragmento foi observado no perfil eletroforético referente ao “bulk” das amostras das propriedades da região Noroeste do Estado do Paraná, mesmo após várias repetições da técnica. Estes resultados podem não significar, porém, a ausência do vírus nos tecidos das plantas, mas sim que sua concentração era muito baixa para ser detectada pelo anticorpo policlonal de captura ou para ser transcrita e amplificada pelas enzimas transcriptase reversa e Taq polimerase.

Estes estudos demonstraram que a técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na detecção do CTV nas plantas armadilhas da região Norte do Estado, uma vez que as partículas virais foram detectadas quatro meses após o plantio por este método. Porém, o fato do CTV ter sido detectado por ELISA em todas as plantas armadilhas, de ambas as regiões do Estado, sete a oito meses após o plantio, demonstra que a ausência do fragmento correspondente a amplificação do GCP nos perfis eletroforéticos dos bulks das amostras da região Noroeste pode ser devido aos problemas da sensibilidade da técnica aos tecidos destas plantas.

A sintomatologia da tristeza foi avaliada após dois anos da instalação do experimento através da observação da presença de caneluras nos ramos das plantas armadilhas. Os valores atribuídos aos ramos das plantas indicaram que apenas a planta nove, instalada no pomar da região Norte do Estado, apresentou este sintoma. De acordo

com a escala diagramática de Meissner-Filho et al. (2002), a intensidade de canelura apresentada por esta planta está no nível 4, sugerindo a infecção por haplótipos severos de CTV. Este resultado vem fortalecer a hipótese de que o monoclonal 39-07 não está discriminando os isolados severos de CTV nas condições paranaenses.

#### 4. CONCLUSÕES

As análises dos resultados do diagnóstico do CTV por ELISA, IC-RT-PCR e sintomatologia indicaram que através da técnica de ELISA, a detecção do CTV nas plantas armadilhas, instaladas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado, ocorreu entre sete e oito meses após o plantio. A presença do CTV nas plantas armadilhas da região Norte foi detectada pela técnica de IC-RT-PCR quatro meses após o plantio, mas o CTV não foi detectado nas plantas da região Noroeste do Estado através da técnica de IC-RT-PCR.

A análise da sintomatologia observada nas plantas armadilhas, dois anos após a instalação do experimento, revelou caneluras em uma das plantas da região Norte, sugerindo a presença de isolados severos de CTV nesta região.

#### 5. REFERÊNCIAS

CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. *Methods Enzymol*, n.118, p.742-766, 1986.

LEE, R. F.; BAKER, P. S.; ROCHA - PENÃ, M. A. The Citrus tristeza virus (CTV), and Introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central america and Caribbean. *Internacional Institute of Biological Control Berks, UK*, 197p. 1994.

MEISSNER-FILHO, P.E; SOARES-FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C; DIAMANTINO, E.; DIAMANTINO, M.S.A.. Reação de porta-enxertos híbridos ao Citrus tristeza virus. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, n.3, p.312-315, 2002.

SEKIYA, M.E.; LAWRENCE, S.D.; McCAFFERY, M.; CLINE, K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* n. 72, p. 1013-1020, 1991.

STACH-MACHADO, D.R.; PERONI, L.A.; DIAS, L.C.F.; CAPORRINO, M.C.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Characterization of monoclonal antibodies for identification of the severe strain of 'Capão Bonito' Citrus tristeza virus. In: *Proc. 15th Conf. IOCV*, p.165-171, 2002.