

## **INTERAÇÃO *Citrus tristeza virus* E VETOR *Toxoptera citricida*: AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO POR ÚNICO AFÍDEO**

Ana Claudia da Silva Mendonça (PIBIC/FA/Uem), Angélica Albuquerque Tomilheiro Frias; Carlos Alexandre Zanutto; William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: anac\_mendonca@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias /Maringá, PR.

5.01.00.00-9 Agronomia /5.01.02.00-1 Fitossanidade

**Palavras-chave:** *Citrus sinensis* L. Osbeck; eficácia da transmissão; doença de citrus;

### **Resumo:**

A citricultura brasileira é mundialmente muito importante, sendo uma atividade essencial para o agronegócio. Entretanto, a produtividade ainda é baixa devido a incidência de pragas e doenças, dentre estas a tristeza dos citros, é considerada mundialmente uma das mais importantes viroses que atingiram a cultura nos últimos 90 anos. A transmissão do vírus da tristeza pode ser efetuada por sete diferentes espécies de afídeos, nas condições brasileiras apenas a transmissão pelo pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirkaldy é rápida e eficiente. Neste trabalho foi avaliada a eficiência de transmissão de três estirpes virais pelo vetor em condições parcialmente controladas (casa de vegetação). A comprovação da infecção das plantas pelo CTV foi obtida por meio de Reação em cadeia polimerase (PCR).

### **Introdução**

A citricultura é ameaçada por diversas doenças que atingem a cultura, sendo estas causadas por diversos fitopatógenos, como fungos, vírus, viroides, bactérias, nematoides, os quais acometem a produção e a qualidade de frutos (ZANUTTO, 2009). Dentre estes, destaca-se a tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus*, que nas condições brasileiras dissemina-se por meio da propagação de borbulhas infectadas e, principalmente, através do seu inseto vetor, o pulgão preto *Toxoptera citricida* K. (BATISTA et al., 2008). Dessa forma, a tristeza dos citros representa uma ameaça para citricultura devido sua natureza endêmica, a alta taxa de variação do vírus e presença universal do vetor *Toxoptera citricida* (ZANUTTO, 2009). Baseando-se no exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a

eficácia da transmissão do vírus *Citrus tristeza virus* por meio do seu vetor *Toxoptera citricida* em condições de casa de vegetação.

## Materiais e métodos

### *Implantação do experimento*

O experimento foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram mantidas plantas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja Pêra (*Citrus sinensis* L. Osbeck) livres de vírus enxertadas sobre limão cravo em condições parcialmente controladas em casa de vegetação.

### *Isolados de CTV e Transmissão afidial*

Foram utilizados três isolados do *Citrus tristeza virus*, sendo dois isolados fracos (CS1 e PIAC), e um forte (Forte Rolândia), coletados no estado do Paraná e mantidos em mudas de laranja Pera em condição de casa de vegetação do NBA. Colônias de *Toxoptera citricida* k. Foram coletadas a campo em pomares das regiões Norte e Noroeste do estado do Paraná. As colônias de pulgões foram coletas e armazenadas no interior de caixas de isopor contendo gelo seco. Colônias com cerca de 50 pulgões foram transferidas e mantidas em plantas de limão cravo (*Citrus limonia* O.) livres de vírus no interior de gaiolas anti-afidicas em casa de vegetação durante 48 horas para a efetiva limpeza dos insetos. Posteriormente, após a limpeza, colônias compostas por cerca de 30 pulgões foram transferidas para plantas contendo os isolados PIAC, CS1 e Forte Rolândia para aquisição dos respectivos isolados pelo vetor, sendo mantidas nestas por igual período de 48 horas seguindo protocolo descrito por Velazquez-Monreal et al. (2009). Após aquisição dos isolados, pulgões individuais foram transferidos para plantas de laranja pera livres de vírus (*C. sinensis* L.) totalizando 72 plantas inoculadas, sendo 24 plantas para cada isolado. Ao término do período de transmissão (48hs), os pulgões foram eliminados com o uso de inseticida e as plantas monitoradas para se comprovar a colonização pelo CTV por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR). As análises moleculares foram realizadas de 90 a 260 dias. Para a realização das análises as plantas foram divididas em 9 blocos com 8 plantas cada.

### *Extração e Reação da polimerase em cadeia (PCR)*

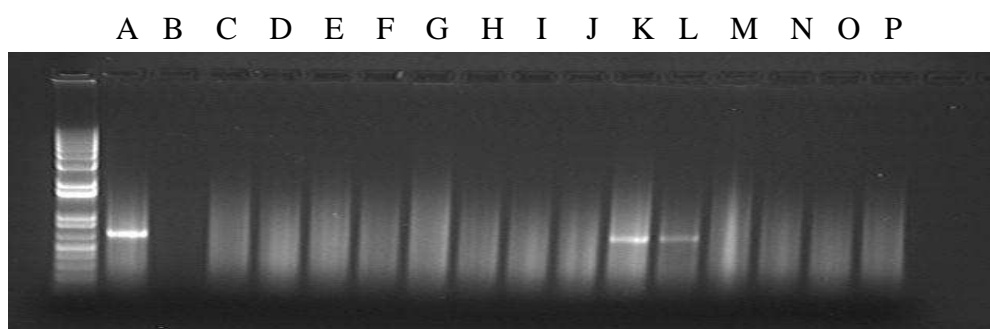
Para efetuar o isolamento do RNA total dos isolados de CTV de cada uma das amostras, foram utilizados 100 mg de folhas e nervuras central das plantas. Os tecidos foram submetidos à trituração em almofariz com nitrogênio líquido e o pó resultante foi ressuscitado com 1,5 mL do reagente Trizol (Life Technologies), prosseguindo com o protocolo de extração segundo as recomendações do fabricante.

O RNA total extraído dos isolados de CTV serviu de molde para as reações de transcriptase reversa para se obter o DNA complementar (cDNA). Alíquotas da primeira fita de cDNA foram utilizadas na amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) por PCR (reação da polimerase em cadeia) através dos primers CN-119 (5"AGA TCT ACC ATG GAC GAC GAA ACA AAG 3") e CN-120 (5" GAA TTC GCG GCC GCT CAA CGT GTG TTA AAT TTC C 3"). Os produtos das reações de ampliações foram analisados em gel de agarose a 1,0% de acordo com o procedimento descrito por SAMBROOK et al. (1989), com algumas modificações.

### Resultados e Discussão

O vírus da tristeza faz parte da família *Closteroviridae* e gênero *Closterovirus*. Esse gênero é composto por vírus transmitidos somente por afídeos de maneira semipersistente ZANUTTO (2009). É um vírus limitado ao floema que tem partículas virais longas, flexuosas e filamentosas de aproximadamente 10-12 nm de diâmetro e 2.000 nm de comprimento. Para que ocorra a transmissão do CTV deve haver a introdução direta nos tecidos do floema pelo pulgão, entrando nos elementos da seiva e se movendo na direção dos açúcares para as partes em crescimento da planta (LAINO et al., 2016).

No presente estudo, a presença do vírus da tristeza dos citros foi detectada aos 200 dias após inoculação afidial em dois blocos, sendo um inoculado com o vírus CS1 e o outro com o protetivo PIAC. A taxa de transmissão dos isolados de CTV por meio de um único pulgão foi baixa, sendo que a transmissão do CS1 foi de 0,08% e 0,04% para PIAC, enquanto não houve transmissão detectada do vírus Forte Rolândia em nenhuma das análises realizadas até os 260 dias. Esses resultados corroboram com ZANUTTO (2009) que detectaram a presença após 180 dias após inoculação com único vetor.



**Figura 1** – Gel de agarose 1% mostrando produto de amplificação por PCR do gene do capsídeo do CTV provenientes de plantas inoculadas com isolados PIAC (A), CS1 (K; L) e Forte Rolândia (M) por único pulgão *Toxoptera citricida*, 200 dias após inoculação.

Embora houvesse uma probabilidade maior de transmissibilidade para isolados severos, diferenças entre transmissão por isolados fracos não

foram estatisticamente significativas. Estudos sugerem que a quantidade de partículas virais adquiridas pelo pulgão durante a alimentação pode influenciar na taxa de transmissão, sendo esta uma possível explicação para o comportamento epidemiológico do CTV em regiões onde as epidemias anuais são causadas por pulgões virulíferos migrantes. Além disso, vários trabalhos relatam a correlação entre o número de partículas virais necessárias para uma infecção efetiva e o comportamento do pulgão nos processos de aquisição e inoculação do vírus.

Dessa forma, resultados indicam que há diferenças na eficácia de transmissão entre isolados fortes e fracos de CTV por único afídeo de *Toxoptera citricida* em mudas de laranja Pera (*Citrus sinensis*).

## Conclusões

Por meio dos dados obtidos, evidenciou-se que há diferenças na eficácia de transmissão entre isolados fortes e fracos de *Citrus tristeza virus* por um único afídeo de *Toxoptera citricida* em mudas de Laranja Pera (*Citrus sinensis*).

## Agradecimentos

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## Referências

BATISTA, L.; BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F. **Comparative epidemiology of citrus triteza in Cuba and citrus sudden death in Brazil.** Tropical Plant Pathology. v.33, n.5, p.348-355, 2008

LAINO, P.; RUSSO, M. P.; GUARDO, M.; REFORGIATO-RECUPERO, G.; VALE, G.; CATTIVELLI, L.; MOLITERNI, V. M. C. **Rootstock–scion interaction affecting citrus response to CTV infection: a proteomic view.** Physiologia Plantarum, v.156, p. 444-467, 2016.

LIN, Y.; BRLANSKY, R.H.; POWELL, C.A. **Inefficient Transmission of Citrus Virus from Grapefruit by Single Brow Citrus Aphids.** Hortscience v37(6), p936-939, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

ZANUTTO, C.A. **Capacidade protetiva de novos isolados fracos de citrus tristeza virus para utilização em programa de pré-imunização de laranja ‘pêra’.** Maringá Tese (Doutorado)-Universidade Estadual de Maringá, 2009.