

INTERAÇÃO *Citrus tristeza vírus* E VETOR *Toxoptera citricida*: AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO DE ISOLADOS

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

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 tristeza vírus*, *Toxoptera citricida*, citricultura.

Resumo:

Dentro do agronegócio a citricultura se destaca como sendo um setor com alto potencial de expansão e competitividade. Problemas fitossanitários como vírus e viróides podem ocasionar problemas produtivos e econômicos, devido ao difícil controle e facilidade de transmissão. Cerca de 50% das patologias de plantas são causadas por vírus. No Brasil o *Citrus tristeza vírus* (CTV) é transmitido de maneira rápida e eficiente apenas pelo pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirkaldy. O pulgão possui transmissão do tipo semi-persistente e necessita se alimentar de plantas infectadas pelo vírus para a aquisição. Neste trabalho foi avaliada a eficiência de transmissão do CTV e analisado o padrão eletroforético do vírus quando se realizou a transmissão por um único afídeo.

Introdução

Na África do Sul ocorreu o primeiro relato da tristeza dos citros, mas ainda não se sabia qual era a causa da doença (BORDIGNON et al., 2003). Em 1946 um experimento com pulgão preto dos citros *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) conduzidos por Meneghini revelou que a doença era causada por um vírus. O *Citrus tristeza vírus* possui partículas longas, flexuosas e filamentosas de 10-12 nm de diâmetro e 2.000 nm de comprimento. Trata-se de um Closterovirus pertencente à família *Closteroviridae* que causa uma doença conhecida como tristeza dos citros e se limita ao floema das plantas (FEBRES et al., 1996). Os principais sintomas ocasionados pelo CTV são caneluras, amarelecimento do pé franco, diminuição do tamanho dos frutos e planta, além de declínio rápido. O CTV é composto por um complexo viral que se relaciona imunologicamente com dois ou mais haplótipos geneticamente diferentes. Assim o objetivo deste trabalho é observar a

eficiência de transmissão do vírus por um único afídeo vetor e verificar as diferenças no padrão eletroforético dos isolados transmitidos via *Vetor* em relação ao padrão da planta onde o pulgão fez a aquisição do vírus.

Materiais e métodos

Implantação do experimento

O experimento foi realizado Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para o desenvolvimento do presente estudo utilizou-se uma casa de vegetação, em condições parcialmente controladas.

Isolados de CTV e transmissão afidial

Três isolados do *Citrus tristeza vírus* foram utilizados para a elaboração do estudo, sendo eles dois isolados fracos (CS1 e PIAC), e um forte (Forte Rolândia).

As colônias de pulgões foram coletadas no Norte e Noroeste do Paraná e armazenadas no interior de caixas de isopor contendo gelo seco a fim de garantir a viabilidade dos afídeos durante o transporte até o NBA. 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-afídeas 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 infectada com uma estirpe viral os isolados são PIAC, CS1 ou Forte Rolândia para aquisição dos respectivos isolados pelo vetor *Toxoptera citricida*, sendo mantidas nestas por igual período de 48 horas seguindo protocolo descrito por Velazquez-monreal et al. (2009). Após aquisição dos isolados, afídeos individuais foram transferidos para plantas de laranja Pera livres de vírus 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 de Reação em cadeia polimerase (PCR).

Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction)

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 ressuspenso 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.

Análise SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

A metodologia utilizada foi descrita por Corazza-Nunes et al. (2001). Que consiste em utilizar a alíquotas do produto da amplificação do GCP, adicionando um volume igual de solução desnaturante (95% de formamida, 2mM de EDTA e 0,05% azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas imediatamente no gelo. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 10%. A corrida foi feita a 200V por 16 horas a 25°C. As colorações dos géis foram realizadas com um solução de nitrato de prata.

Resultados e Discussão

Uma combinação de haplótipos é o que forma um isolado de CTV, os haplótipos se diferem em suas propriedades biológicas. Para caracterizar a estrutura populacional de isolados de CTV e estimar a diversidade genética entre e dentre os isolados usa-se a técnica de SSCP, que detecta a diferença de um nucleotídeo no DNA fita-simples devido à mudança no padrão de migração eletroforética. (MORENO et al., 2008).

No presente estudo, a detecção da presença do vírus ocorreu aos 200 dias após a inoculação nas plantas que foram inoculadas com os vírus fracos (CS1 e PIAC), as avaliações foram realizadas até os 260 dias e não foi detectada a presença do vírus Forte Rolândia. Após realizar a análise do gel não desnaturante de poliacrilamida, foi observado que ocorreu mudanças no padrão de bandas encontradas nas plantas infectadas com apenas um pulgão se como demonstra a figura 1 a seguir.

O item A da figura mostra que o padrão de polimorfismo do isolado CS1 possui a presença de cinco bandas (três superiores e duas inferiores) enquanto o padrão encontrado após a inoculação no Item D possui apenas três bandas superiores. Pode-se observar mudanças nos padrões de bandas de polimorfismo também para o protetivo PIAC que possui três bandas (uma superior e duas inferiores) e após a inoculação apresentou duas bandas (uma superior e uma inferior).

Com isso podemos observar que esses dados corroboram com os encontrados por MORRENO et al., 2008 citado anteriormente, pois ocorreu mudanças nos padrões de migração das base entre os isolados. Ademais se pode observar que os pulgões são capazes de disseminar apenas um subsolado e não todo o complexo viral, já que ocorreram mudanças no padrão após a inoculação.

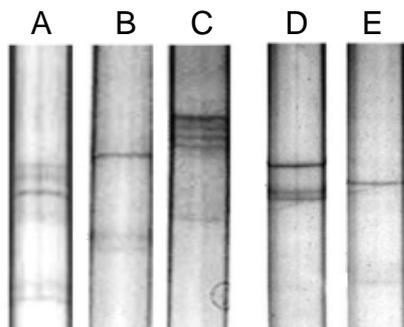


Figura 1 – Gel não desnaturante de poliacrilamida 10% de padrões de polimorfismo de isolados e sub isolados de CTV. Padrões de SSCP identificados em plantas de citros infectadas com os isolados de CTV: Padrões de SSCP de CS1(A), PIAC (B) e Forte Rolândia (C). Padrões de SSCP identificados em plantas de citros infectadasde com um único pulgão: subisolado CS1 (D) e subisolado PIAC (E).

Conclusões

Por meio dos dados obtidos, evidenciou-se que há diferenças no padrão de polimorfismo entes os isolados e entres os subsolados obtidos após a inoculação com apenas um pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida*).

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. **A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos**. *Bragantia*, Campinas, v. 62, n.3, p.345-355, 2003.
- FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one of *Citrus tristeza virus* particles. **Phytopathology**. v.86, n.12, p.1331-1335, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of *Citrus tristeza virus* (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.11-16, 2001.
- MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n.2, p.251-268, 2008.