

OBTENÇÃO DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO *Citrus tristeza vírus* COM O REAGENTE TRIZOL APARTIR DO *Toxoptera citricida* Kirkaldy infectado.

Gabriela Bissoli Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Ana Claudia da Silva Mendonça, 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: Tristeza do citros, citricultura, afídeos.

Resumo

A citricultura brasileira se destaca em questões socioeconômicas, lidera mundialmente a produção de citros, sendo também o principal exportador de suco de laranja, no entanto o alto potencial produtivo ainda não foi atingido. Atualmente a citricultura sofre com diversos problemas fitossanitários, o que diminui a produção nacional, entre eles a tristeza dos citros a qual é uma virose que ataca essa cultura desde 1937, onde teve seu primeiro relato no Vale do Paraíba. O *Citrus tristeza vírus* é transmitido pelo vetor *Toxoptera citricida* Kirkaldy, esse afídeo é o mais eficiente na transmissão do vírus de forma semipersistente. O objetivo deste trabalho foi de obter um protocolo de extração do CTV a partir do vetor, com o reagente trizol. Para que fosse possível a detecção da amostra extraída foi utilizada a transcriptase reversa para que fosse realizada a síntese da primeira fita de cDNA, posteriormente foi realizada uma PCR (reação da polimerase em cadeia) através dos primers CN-119 e CN-120 a metodologia utilizada nos procedimentos foi descrita por SAMBROOK et al. (1989), em seguida as amostras foram analisadas em gel de agarose a 1,0%, os resultados obtidos foi negativo em todas as amostras, não sendo possível a detecção.

Introdução

O pulgão preto, é o vetor da doença viral mais importantes para a citricultura, possuindo maior eficiência na transmissão do *Citrus tristeza vírus* quando comparado com os outros afídeos capazes de transmitir a doença, sendo assim a presença desse vetor gera danos significativos para a produção. O *Toxoptera citricida* é pertencente ao filo Arthropoda, da ordem Hemiptera, tem dimensões de 1,5 a 2,4 mm, coloração marrom escuro quando ninfa e preto brilhante quando na sua fase adulta (HALBERT e BROWN, 1996).

Em razão da reprodução partenogênica do pulgão somado com condições ambientais favoráveis, seu crescimento exponencial é considerado rápido, outro fator que ajuda na disseminação de vírus em relação ao *Toxoptera citricida* é a sua

transmissão do tipo semipersistente, o tempo de alimentação necessário para a aquisição do vírus é entre 5 a 10 minutos podendo assim transmitir o vírus de uma planta infectada para um planta sadia (COSTA et al., 1951).

Os sintomas da tristeza dos citros é a diminuição do tamanho de frutos e da própria planta. De acordo com o exposto acima, o trabalho tem como objetivo conseguir um protocolo de extração do RNA viral a partir do inseto vetor, o pulgão preto, com isso, complementar e auxiliar futuros trabalhos com as estirpes virais do *Citrus tristeza vírus*.

Materiais e métodos

Implantação do experimento

Para a realização do experimento foram utilizadas mudas de laranja Pera contendo o isolado protetivo Pera IAC as plantas foram mantidas em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Aquisição do vírus pelo vetor

Para a aquisição dos pulgões, uma média de 80 afídeos foram coletados nos pomares da região do Norte do Paraná. Posteriormente os afídeos foram colocados para se alimentar em plantas com a presença do isolado viral Pera IAC dentro de gaiolas anti-afídeas, o tempo de alimentação foi de 48 horas seguindo o protocolo de Velazquez-monreal et al. (2009).

Extração do RNA total e Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Para a extração do RNA total dos pulgões foi realizado a maceração dos pulgões em nitrogênio líquido, o procedimento foi realizado em microtúbulos de 1,5 µL com o auxílio de um pistilo. Posteriormente foi adicionado o reagente Trizol (Life Technologies), e prosseguindo com o protocolo de extração segundo as recomendações do fabricante.

O RNA viral extraído foi utilizado nas reações de transcriptase reversa a fim de se realizar a síntese da primeira fita de cDNA. A reação foi realizada em termociclador seguindo o procedimento descrito por SAMBROOK et al. (1989). 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 amplificações 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 CTV pode ser transmitido por várias espécies de afídeos, o *Toxoptera citricida* é considerado o de maior eficiência (YOKOMI et al., 1994), por isso foi selecionado

essa espécie. Em busca de um protocolo de extração foi realizado testes com diferentes concentrações dos reagentes presentes no protocolo de extração, houveram também mudanças no preparo das amostras, que passaram de maceração em nitrogênio para maceração de Trizol e posteriormente foram utilizados só parte do inseto levando em consideração a forma de alimentação ser semipersistente. Foram realizados testes em amostras contendo de 1 a 30 insetos, houveram ainda alterações ligadas a temperatura do procedimento do cDNA e no primer utilizado.

O trabalho desenvolvido por Atallah et al, 2015 obteve sucesso na extração de afídeos utilizando outras técnicas de extração. Ademais o artigo citado utilizou RT-PCR para a detecção mostrando que seria possível uma detecção por esse meio, sendo assim concluímos que o reagente Trizol não eficaz para o caso abordado por esse trabalho.

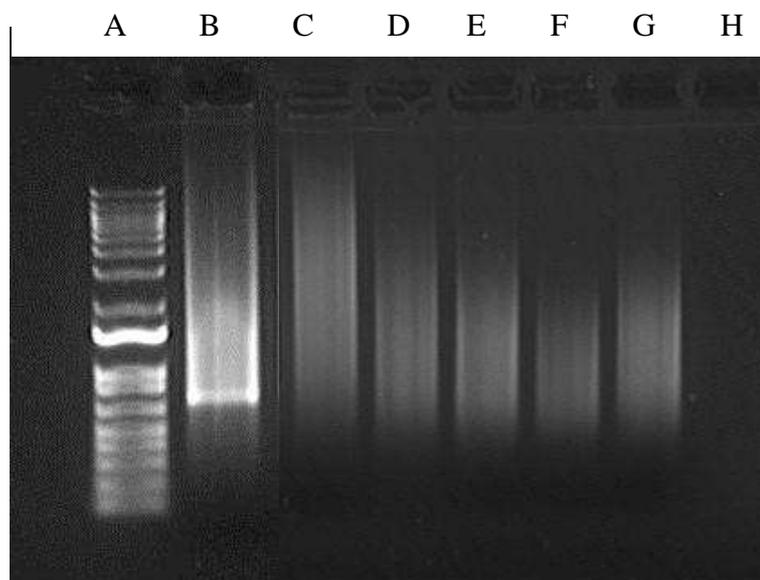


Figura 1 – Gel de agarose 1% mostrando produto de amplificação por PCR do gene do capsídeo do CTV proveniente da planta inoculada com isolado CS-1. Na foto temos, ladder (A), isolado CS-1 controle positivo (B), controle negativo (C), amostras negativas do vetor (D,E,F,G,H).

Conclusões

Não foi possível a detecção do RNA viral por meio de Reação da polimerase em cadeia (PCR), quando a extração do RNA Total foi realizada a partir do reagente Trizol.

Agradecimentos

Agradeço aos integrantes do NBA por toda a paciência e o ensinamento que tive e à fundação araucária pela concessão da bolsa.

Referências

COSTA, A.S.; GRANT, T.J. **Studies on transmission of the tristeza virus by the vector, *Aphis citricidus***. *Phytopathology*, v.41, n.2, 1951.

HALBERT, S.E.; BROWN, L.G. **Toxoptera citricida, brown citrus aphid- Identification, biology and management strategies**. *Entomology*, n.374, p.1-6, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. 1989. *Virology*, 208, 1995.

YOKOMI, R K. **The Brown citrus Aphid and Citrus tristeza virus**. *Citrograph*,v.6, p.14-18, 1994

ATALLAH, O O.; KANG, S H.; , EL-MOHTAR, C A.; A 5' -proximal region of the Citrus tristeza virus genome encoding two leader proteases is involved in virus superinfection exclusion. **Elsevier**, Gainesville, *Virology*, 489, (2016) 108–115. 2015.