

ANÁLISE DE ESTABILIDADE DO ISOLADO VIRAL PROTETIVO DE *Citrus tristeza vírus* PERA-IAC EM PLANTAS COM DIFERENTES INTER-ENXERTO

Vitor Henrique Gonçalves Lopes (PIBIC/FA/Uem), Ana Cláudia 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, SSCP, citricultura.

Resumo

A laranja é a principal fruta cítrica produzida no mundo, sendo que a citricultura brasileira possui grande importância econômica e expressão mundial. Nativa do continente asiático, as plantas de citros desde o estabelecimento no estado do Rio de Janeiro e São Paulo passou a ter importância econômica para o país, surgindo doenças da ordem fitossanitárias devido à produção em larga escala, a tristeza dos citros é a principal patologia viral causada na cultura do citros, o *Citrus tristeza vírus* (CTV), esse vírus disseminou pomares brasileiros na década de 40, a partir do descobrimento da doença as táticas de controle se basearam no uso de porta-enxertos tolerantes e a pré-imunização de copas suscetíveis. Sendo que a medida mais promissora é a 'premunização', uma técnica que se baseia no estabelecimento de uma estirpe fraca do vírus da tristeza na planta, que possui como função impedir o estabelecimento de outra estirpe do mesmo vírus. O trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade de isolados protetivos de plantas em condição de campo em comparação com plantas matrizes, para isso é necessário a extração das estirpes virais, cDNA, RT-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*), concluindo que o vírus está presente na planta, porém os resultados se mostraram inconclusivos em relação a estabilidade do mesmo, devido a pandemia do novo Coronavírus (COVID-19).

Introdução

A citricultura é originária dos países asiáticos, sua chegada no Brasil ocorreu por volta de 1530 no estado da Bahia, porém de imediato a cultura não se adaptou. Anos mais tarde, quando as plantas de citros foram levadas para o estado do Rio de Janeiro e São Paulo devido às condições climáticas

favoráveis, resultando em uma vasta produção a cultura passou a ter importância econômica (DONADIO et al., 2005). Desse modo, com o aumento de áreas para desenvolvimento da citricultura e devido a susceptibilidade das plantas de citros, surgiu dificuldades como o aparecimento de doenças causadas por diversos patógenos, afetando de forma negativa a produção, a qualidade e produção desses frutos (Vargas et al., 2013). Entre essas doenças, destaca-se o vírus da tristeza dos citros, principal doença viral que ataca a cultura de citros. O CTV (Citrus tristeza vírus), é pertencente a família Closteroviridae, ao gênero Closterovirus, e ao grupo IV ((+)ssRNA), considerado o maior vírus de planta e se limita ao floema. Sua disseminação pode se dar por afídeos, o pulgão preto *Toxoptera citricida Kirkaldy* ou, por borbulhas contaminadas (Herrera-Isidrón et al., 2009). Os principais sintomas dessa doença viral são amarelecimento de pé franco, caneluras, declínio rápido e redução do tamanho da planta e frutos. Diante disso, o trabalho teve o propósito verificar a estabilidade do complexo viral nas plantas pré-imunizadas e comparar padrões eletroforéticos a partir da técnica de SSCP com padrões dos controles conhecidamente fracos e fortes.

Materiais e métodos

Descrição do experimento e coleta a campo

O trabalho foi conduzido em um pomar comercial localizado na fazenda Nova Manhã, cidade de Terra Rica – PR, implantado em agosto de 2009. O plantio continha diferentes inter-enxertos que foram levados ao campo de maneira casualizada. Todas as plantas continham o isolado protetivo PERA-IAC, copa da variedade Laranja PERA-IAC (*Citrus sinensis* L. Osb.) e enxerto variedade Laranja SWINGLE (*Citrus paradisi* X *Poncirus trifoliata*), diferenciando-se apenas em inter-enxertos, com duas alturas, 5 e 20 centímetros. Nesse estudo foram empregados três diferentes inter-enxertos: Laranja Azeda (*Citrus aurantium*); Sunki maravilha (*Citrus sunki maravilha*) e; Limão Cravo Nova América (*Citrus reticulata*). Para coleta a campo, foram selecionadas quatro plantas ao acaso de cada inter-enxerto de diferentes alturas, foram coletados ramos com folhas desenvolvidas, que seguidamente foram embaladas em sacos plásticos, identificados e refrigerados para posteriormente efetuar análises moleculares no Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA) localizado no Centro Técnico de Irrigação (CTI) pertencente a Universidade Estadual de Maringá.

Extração das estirpes virais

As nervuras centrais das folhas coletadas foram maceradas com o auxílio de um pistilo, em nitrogênio líquido a fim de se obter um pó fino, posteriormente armazenadas em tubos de 2 ml em freezer -20°C. O reagente Trizol foi utilizado para a extração do RNA total, seguindo-se o protocolo estabelecido

pelo fabricante (Invitrogen). Com o RNA total viral extraído, foi obtido o cDNA, sintetizando assim a fita molde de DNA a partir do RNA viral, as enzimas utilizadas foram, a RNaseOUT e Transcriptase Reversa, a reação foi levada ao termociclador por duas horas à 37°C, semelhante ao procedimento descrito por SAMBROOK et al. (1989).

Reação RT-PCR (Polymerase Chain Reaction)

Uma alíquota da primeira fita de DNA sintetizada a partir do RNA na técnica de cDNA é utilizada para que se tenha uma amplificação do gene da proteína (GCP) por PCR (reação da polimerase em cadeia) por intermédio de dois primers, CN-119 (5"AGA TCT ACC ATG GAC GAC GAA ACA AAG 3") CN-120 (5" GAA TTC GCG GCC GCT CAA CGT GTG TTA AAT TTC C 3") a reação utiliza a enzima, a Taq polimerase.

Os produtos, resultado da RT-PCR foram revelados e analisados em gel de agarose a 1,0 % juntamente com um marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder Plus como padrão, conforme a metodologia descrita por SAMBROOK et al. (1989), no entanto com algumas modificações.

Análise SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)

A técnica de SSCP segue o protocolo adaptado por Corazza-Nunes et al. (2001), que consiste no aproveitamento da amplificação da RT-PCR, adicionando um volume proporcional de solução desnaturante (95% de formamida, 2mM de EDTA e 0,05% de azul bromofenol). A desnaturação ocorreu à 95°C por 10 minutos no termociclador, em seguida as amostras foram colocadas em gelo para cessar a desnaturação e adicionadas em gel não desnaturante de poliacrilamida 10% afim de separar seus fragmentos. A corrida foi realizada por 16 horas, à uma temperatura de 25°C com uma corrente de 200W em uma cuba vertical.

Os géis foram corados através de uma solução de nitrato de prata, baseando-se na metodologia utilizada por Beidler et al. (1982), sendo revelado e analisado por meio de um fotodocumentador.

Resultados e Discussão

O *Citrus tristeza virus* (CTV) é formado por uma combinação de haplótipos, que se difere em suas propriedades biológicas. Com isso, para identificar a estrutura populacional dos isolados de CTV e estimar sua variabilidade genética entre isolados é necessário fazer uso da técnica SSCP, e assim, detectando a diferença de um nucleotídeo de DNA fita-simples devido à uma mudança existente no padrão de migração eletroforética (MORENO et al., 2008). Diante disso, no presente trabalho, foi possível detectar a presença do vírus da tristeza do citros nas plantas alvo de estudo como mostra na Figura 1.

Após a obtenção da reação de PCR positiva, foi permissível progredir para a técnica de SSCP, na qual não foi possível a obtenção de resultados conclusivos, devido ao fechamento dos laboratórios devido a pandemia causada pelo novo Coronavírus (COVID-19), não sendo possível atingir o objetivo proposto inicialmente.

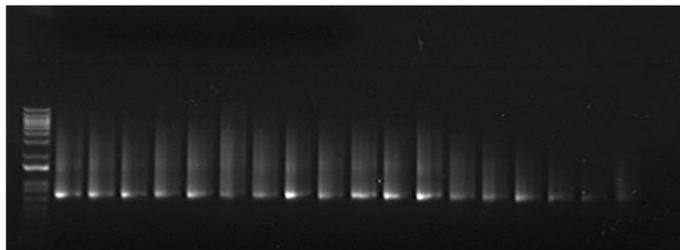


Figura 1 – Produtos da amplificação por PCR do gene da proteína do capsídeo de isolados de CTV, revelados em gel de agarose a 1%.

Conclusões

Perante aos dados obtidos parcialmente, foi possível detectar a presença do vírus da Tristeza nas plantas foco do trabalho. Porém, os dados são inconclusivos em relação ao objetivo proposto no início já que a pandemia do novo Coronavírus (COVID-19), não permitiu o avanço da pesquisa devido às recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Agradecimentos

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de Iniciação Científica, e todos os envolvidos para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Referências

- DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 1-18, 2005.
- HERRERA-ISIDRÓN, L.; OCHOA-SÁNCHEZ, J.C.; RIVERABUSTAMANTE, R.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. **Virology Journal**, v.6, n.116, 2009.
- 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.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Vargas R.G., Gonçalves-Zuliani, A.M.O.; Croce Filho, J.; Carvalho, S.A.; Nocchi, P.T.R.; Nunes, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de

29º Encontro Anual de Iniciação Científica
9º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



29 a 31 de outubro de 2020

Citrus spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 39, n. 4, p. 235-241, 2013.