

USO DA METODOLOGIA DE MARCADORES MOLECULARES PARA TIPIFICAR OS ISOLADOS PADRÕES BRASILEIROS

Vitor Henrique Gonçalves Lopes (PIBIC/CNPq/UEM), Ana Cláudia da Silva Mendonça; Carlos Alexandre Zanutto; William Mário de Carvalho Nunes (Orientador), e-mail: gvitorhenrique@gmail.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: Tristeza do citros, Análise molecular, Virologia.

Resumo:

Para a laranja se tornar a fruta cítrica mais produzida no mundo passou por grandes problemas de ordem fitossanitária que dentre todas as patologias encontradas nessa cultura, pode-se destacar a Tristeza dos citros que ocorre até os dias atuais. No entanto, por muito tempo esse vírus atacou a atividade citrícola no Brasil e começou então a ter uma importância econômica e social, fazendo-se necessário erradicar grandes pomares comerciais na década de 40. O citrus tristeza virus (CTV) é considerado o maior vírus de planta já descoberto pertencente à família Closteroviridae e ao gênero Closterovirus, o qual se limita ao floema, ocorrendo em cepas e se diferenciando em sintomas leves e severos. Deste modo, os isolados de CTV são uma combinação de haplótipos que ocorrem em seis diferentes cepas (clados). A pesquisa teve por objetivo realizar um teste de metodologia com Múltiplos Marcadores Moleculares (MMM), para caracterizar os isolados de CTV presentes aqui no Brasil (Forte Rolândia, CS-1, Pera-IAC, Barão B e Capão Bonito) e verificar se apresentam as características fracas ou fortes. Usou-se as técnicas moleculares e estatísticas, concluindo através de um dendograma, que isolados severos são muito distintos entre si e os isolados fracos são os que mais se aproximam de isolados fortes por serem geneticamente semelhantes mesmo não pertencendo ao mesmo braço no dendograma realizado através do UPGMA.

Introdução

Desde quando começou ter expressão econômica em meados dos anos de 1930 nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, a cultura do citros passou a ser acometida por problemas de ordem fitossanitária, que dentre todas as patologias encontrada nessa cultura pode-se destacar a tristeza do citros, uma doença viral causada pelo patógeno *Citrus tristeza virus* (CTV), pertencente à família Closteroviridae e ao gênero Closterovirus ao qual se limita ao floema devido as suas partículas filamentosas e flexuosas com comprimento de 2000 nm, sendo considerado o maior vírus de planta já descoberto. O *Citrus tristeza virus* (CTV) acarreta problemas na maioria das regiões produtoras de citros em todo o mundo (Moreno et al., 2008). Esse

vírus por estar limitado ao floema, ocorre em cepas que diferenciam seus sintomas em leves e severos, justamente por cada cepa possuir características diferentes (LEE; KEREMANE, 2013). Em termos filogenéticos os isolados de CTV ocorrem em seis grupos diferentes, denominados clados (cepas). Desse modo, os isolados de CTV são combinações de um ou mais haplótipos que se diferem em suas propriedades biológicas, característica importante para o aumento da diversidade genética, estimulando assim o poder de aumentar eventos de recombinação, e dentro da gama dos isolados tem-se os fracos com características protetivas (Pera IAC e CS-1) e isolados severos com alto índice de prejudicar as variedades de laranja doce (Capão Bonito, Barão B e Forte Rolândia) À vista disso, a pesquisa tinha por propósito executar um teste de metodologia a fim de caracterizar os cinco diferentes isolados, Capão Bonito, Barão B, Pera IAC, CS1 e Forte Rolândia e verificar se portam de características fortes ou fracas, utilizando a técnica de Marcadores Moleculares.

Materiais e métodos

Coleta de material em casa de vegetação e extração de estirpes virais

O presente trabalho foi realizado com mudas produzidas em casa de vegetação contendo os isolados virais protetivos e severos de *Citrus Tristeza vírus* (CTV) estes que são referência no Brasil. As mudas contendo o isolado protetivo Pera-IAC e os severos Barão B e Capão Bonito foram obtidas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC), já as mudas contendo o isolado protetivo CS-1 e o severo Forte Rolândia são oriundas do Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e vale ressaltar que todas mudas passava por adubação e podas regularmente.

Foram coletadas de 5 a 10 folhas totalmente expandida das mudas de cada isolado e assim as folhas foram lavadas e higienizadas em álcool 70%. Posteriormente, com uma tesoura esterilizada retirou-se as nervuras centrais que foram colocadas em freezer. Com o auxílio de um almofariz, pistilo e nitrogênio líquido as nervuras centrais foram maceradas até se obter um pó fino, em seguida foram armazenados, com sua respectiva identificação, em microtubos de 2mL e colocados em freezer.

Para a extração das estirpes virais, utilizou-se do reagente Trizol para se obter o RNA total viral e seguiu-se o protocolo estabelecido pelo fabricante (Invitrogen) manuseando essa etapa sempre com materiais assépticos.

cDNA

A partir da extração do RNA total, é realizado o cDNA uma fita complementar de DNA sintetizado com base no RNA viral. Para realizar essa técnica molecular é necessária uma alíquota de 3 microlitros de RNA já extraído e um mix contendo duas enzimas principais RNaseOUT e Transcriptase Reversa, além dos reagentes 5x Buffer, DNTP e DTT. Com isso, a reação foi levada ao termociclador por duas horas à 37°C, semelhante ao procedimento estabelecido por SAMBROOK et al. (1989) sendo seguidamente armazenadas em ultracongeladores.

Reação RT-PCR e marcadores moleculares

A RT-PCR consiste em multiplicar exponencialmente as fitas de DNA sintetizadas a partir da técnica de cDNA. Dessa maneira é utilizado uma alíquota das fitas de DNA obtidas juntamente com um mix contendo T10x, MgCl, DNTP, a enzima Taq Polimerase, água Mq e dois primers o 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"), toda a reação é levada para o termociclador realizando 41 ciclos, sendo 1 de 39°C por 60 segundos, 39 ciclos de 94°C, 50°C e 72°C por 40 segundos cada temperatura e o último a 72°C por 10 minutos. Para os múltiplos marcadores moleculares empregou-se 11 primers diferentes, sendo feito um ciclo de 95°C por 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 30s, 56°C ou 58°C por 1 min, 72°C por 1 min. E por fim um ciclo de 72°C por 7 minutos.

Análise estatística

Com os perfis eletroforéticos obtidos através da reação de RT-PCR dos 11 primers foi elaborada uma matriz binária e analisada no programa Genes. As distâncias genéticas entre os isolados foi aferida através do coeficiente de Jaccard e as distâncias genéticas das matrizes foi empregue para realizar análises de agrupamento, tendo como fundamento o método dos grupos de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA).

Resultados e Discussão

Perante os resultados, a maioria dos primers amplificaram amostras que continham mais de um tipo de genótipo. No entanto de acordo com a matriz binária de ausência e presença dos isolados Brasileiros, como os fracos (PERA-IAC e CS-1) e os fortes (Barão B, Forte Rolândia e Capão Bonito) correlacionando com a matriz binária dos isolados VT, T36, T30 e T32, (isolados bases) retirada também do trabalho de Hilf et al. (2005) efetuou uma análise de distância genética como mostra a Figura 01. Desse modo, observa-se que a partir dos resultados da metodologia dos Múltiplos Marcadores Moleculares encontramos dois grupos, um composto só do isolado T36 considerado o mais distinto entre os isolados Brasileiros conforme a análise. Já o outro grupo compõe o restante dos isolados em que os mais próximos são o T30 e o VT.

Conforme Corazza et al., (2012) os isolados Pera IAC, Barão B e Capão Bonito se manteve similar geneticamente ao compreendido nesta pesquisa, assim sendo, os isolados foram muito semelhantes, no entanto não houve um agrupamento em um mesmo braços dentro do dendograma, em que o isolado protetivo era o que mais se aproximava dos isolados fortes, já os isolados fortes eram os mais opostos entre eles, porém neste caso o isolado CS-1 e Forte Rolândia não foram testados.

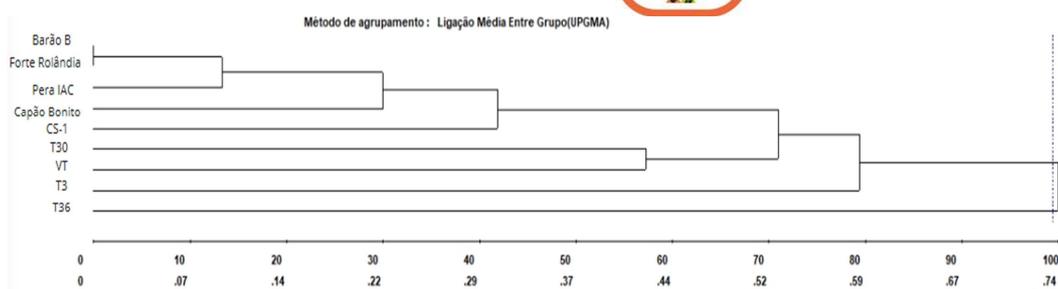


Figura 1 – Dendrograma representativo de agrupamento dos isolados do vírus da tristeza do citros (CTV) Brasileiros tipificados pela literatura e isolados usados como padrão para o desenvolvimento da metodologia de múltiplos marcadores moleculares submetidos a análises pelos MMM (Coeficiente de Jaccard).

Conclusões

Considerando os resultados obtidos, para classificar os isolados com base na técnica de Múltiplos Marcadores Moleculares (MMM) foi identificado dois grupos, um composto de um isolado base T36 que se difere de todos os isolados brasileiros já tipificados e o outro que compõe o restante dos isolados, em que os mais próximos são o VT e T30 perante a matriz binária. Ainda, temos que os isolados severos são muito diferentes entre si e os isolados protetivos (fracos) são os que mais se aproximavam dos isolados severos por serem geneticamente semelhantes, no entanto não ficaram no mesmo braço do dendrograma.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Referências

- CORAZZA, Maria Júlia et al. Comparison of Citrus tristeza virus (CTV) isolates by RFLP analysis of the coat protein nucleotide sequences and by the severity of the symptoms. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 179-184, 2012.
- HILF, Mark E.; MAVRODIEVA, Vessela A.; GARNSEY, Stephen M. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. **Phytopathology**, v. 95, n. 8, p. 909-917, 2005.
- LEE, Richard F.; KEREMANE, Manjunath. Mild strain cross protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 259, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.