

MÚLTIPLOS MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDO DO *Citrus* *tristeza virus* EM PLANTAS INTERENXERTADAS

Nathan Victor Botta (PIBIC/CNPq/FA/UEM), William Mário Nunes de Carvalho (Orientador), e-mail: wmcnunes@uem.br

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

Ciências Agrárias I - Agronomia

Palavras-chave: citricultura, tristeza dos citros, interenxerto.

Resumo:

A tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), é uma das principais doenças que afetam as plantas cítricas. Os danos causados por esta doença variam de acordo com a severidade do isolado viral, e também do hospedeiro. Portanto, o objetivo do trabalho foi detectar a variabilidade genética do CTV através da técnica de Múltiplos Marcadores Moleculares (MMM) e avaliar a influência do interenxerto em diferentes genótipos de citros. Foram utilizados cinco genótipos interenxertados, as amostras foram coletadas nas alturas de 5 cm e 20 cm. Após confirmar a presença do vírus, foi realizada amplificação por primers de referência pela técnica de MMM e elaborado um dendrograma de dissimilaridade. Os haplótipos amplificados apresentaram variabilidade entre os genótipos e entre as alturas. Exceto o T36K17, todos os genótipos amplificaram um conjunto de primers dos haplótipos T36, T30, VT e T3. O dendrograma apresentou dissimilaridade entre os genótipos e as alturas.

Introdução

A citricultura é um ramo das frutíferas que possui maior relevância para o setor agrônomo do país, por ter espécies de interesse econômico. Além da expressiva produção do setor, esta é considerada baixa frente ao alto potencial do Brasil em produzir citros, limitado por fatores edafoclimáticos e problemas fitossanitários, em especial a tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), uma das doenças que mais afetam as plantas cítricas (MENEHINI, 1946; BAR-JOSEPH et al., 1989). O CTV pertence à família *Closteroviridae* e ao gênero *Closterovirus*, e é limitado ao floema. Este vírus possui como material genético uma molécula de RNA fita simples (BAR-JOSEPH et al., 1989).

Sabe-se que o CTV ocorre em cepas que se diferenciam em sintomas fracos e fortes, no qual existem seis grupos diferentes de acordo com a análise filogenética dos isolados de CTV. É importante destacar que o isolado de CTV é formado por combinações de um ou mais haplótipos que se diferenciam geneticamente entre si (BAR-JOSEPH et al., 2002), característica importante para o aumento da

diversidade genética, e que culmina na possibilidade de haver recombinações (WENG et al., 2007). Por isso, o objetivo do trabalho foi detectar a variabilidade genética do *Citros tristeza virus* através da técnica de Múltiplos Marcadores Moleculares (MMM) em um pomar comercial e avaliar a influência do interenxerto em diferentes genótipos de citros quanto à susceptibilidade ao vírus.

Materiais e Métodos

As plantas utilizadas para o trabalho estão localizadas em um pomar comercial no município de Terra Rica no Paraná, no qual foram estabelecidas em 2009 com o porta-enxerto *Citrumelo swingle* e a copa Pêra IAC. No entanto, devido a incompatibilidade entre estas duas variedades, foram utilizados diferentes interenxertos em duas alturas diferentes: 5 e 20 cm. Foram utilizados cinco diferentes interenxertos: Laranja Natal, Tangerina Sunki Maravilha, Laranja Hamlin, Laranja Iapar-73 e Laranja Westin. Foram selecionadas três plantas aleatórias de cada interenxerto, e foram coletadas folhas e ramos novos e folhas totalmente expandidas de cada altura (5 e 20 cm). Os materiais foram lavados com água destilada e álcool 70%, e triturados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Após, as amostras foram armazenadas a - 20°C.

A extração de RNA total das plantas foi realizada utilizando o extrato vegetal triturado e o reagente Trizol, seguindo as recomendações e instruções dispostas pelo fabricante. Posteriormente, foi realizada a técnica de cDNA para sintetizar uma fita molde de DNA a partir do RNA total extraído e após foi utilizada a técnica de *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) para multiplicar as fitas de DNA exponencialmente. As amostras que apresentaram resultados positivos na RT-PCR foram utilizadas para a análise pela técnica de múltiplos marcadores moleculares. Essa técnica consiste na amplificação da PCR através de 11 primers de referência, sendo eles: T36CP, T36-5', T36K17, T36POL, T30-5', T30K17, T30POL, VT-5', VTK17, VTPOL e T3K17. A partir da amplificação dos primers de referência, elaborou-se um dendrograma de dissimilaridade, resultado da análise de distâncias genéticas no coeficiente de Jaccard através do programa Genes. Os resultados da reação de RT-PCR foram submetidos à análise de variância, seguido pelo teste de médias Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software Sisvar® versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

Resultados e Discussão

A partir da amplificação pela técnica de múltiplos marcadores moleculares, obteve-se os resultados apresentados na tabela 1. Na maioria das amostras houve a presença de mais de um haplótipo. Segundo Satyanarayana et al., (2001), os genótipos do T30 estão mais associados a sintomas leves e o genótipo VT a sintomas severos. Apesar de haver presença da maioria dos haplótipos, o que resultaria em plantas com sintomas severos, de acordo com Souza et al., (2002), a existência de vários haplótipos não significa necessariamente o desenvolvimento da doença.

Tabela 1. Amplificação dos marcadores moleculares para as alturas de 5 e 20 cm.

| Amostras | Alt | T36 | | | T30 | | | VT | | | T3 |
|------------------|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|
| | | CP | 5' | K17 | 5' | K17 | POL | 5' | K17 | POL | K17 |
| Laranja Natal | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Laranja Natal | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Natal | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tangerina S. M. | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tangerina S. M. | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tangerina S. M. | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 5 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Laranja Westin | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Laranja Westin | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Westin | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Laranja Natal | 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Natal | 20 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Natal | 20 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Tangerina S. M. | 20 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| Tangerina S. M. | 20 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Tangerina S. M. | 20 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Hamlin | 20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Iapar 73 | 20 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Laranja Westin | 20 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Laranja Westin | 20 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Laranja Westin | 20 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

O dendrograma de dissimilaridade mostrou que para a altura de 5 cm (Figura 01) a Laranja Hamlin está no mesmo braço filogenético da Westin e Iapar, o que nos retrata uma maior dissimilaridade entre esses grupos, ou seja, mesmo havendo uma mistura de genótipos elas se mostraram diferentes entre si. A maior similaridade se encontra com os genótipos Laranja Westin e Laranja Natal, mostrando maior proximidade entre estes genótipos.

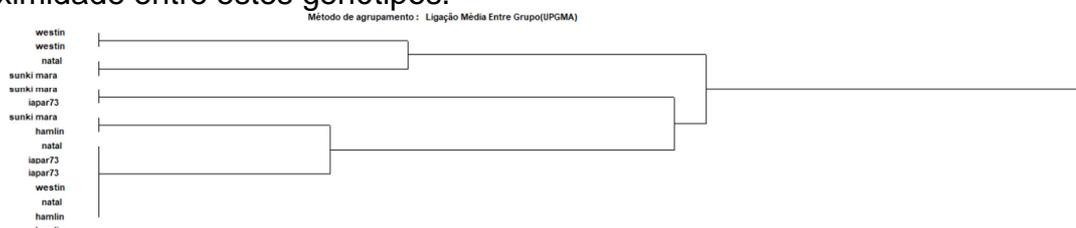


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade, resultado da análise de múltiplos marcadores moleculares de plantas interenxertadas a uma distância de 5 cm.

Na altura de 20 cm (Figura 02), a Laranja Westin se tornou a mais distinta dos grupos existentes. Os genótipos Laranja Iapar 73, Sunki Maravilha e Laranja Natal são as que possuem características mais semelhantes entre si. Nesta altura a Laranja Hamlin não apresentou dissimilaridade com os demais genótipos em comparação a altura de 5 cm.

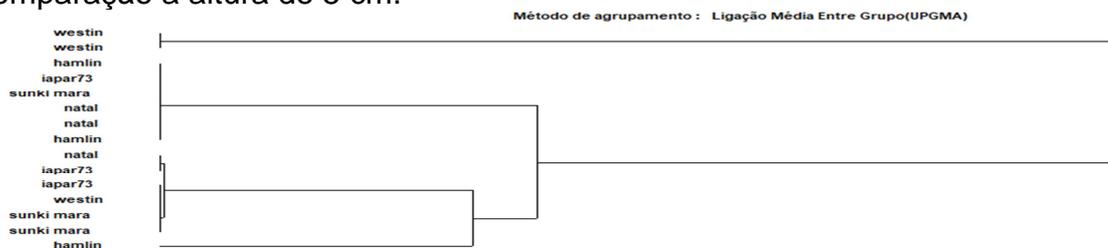


Figura 2. Dendrograma de dissimilaridade resultado das análises de múltiplos marcadores moleculares de plantas interenxertadas a uma distância de 20 cm.

A partir dos resultados, pode-se observar que há mistura de genótipos entre as plantas, porém não foi realizada uma análise juntamente com os isolados fracos e

severos para saber quais plantas apresentam uma dissimilaridade maior e comprovar se estes dados filogenéticos são notados em campo.

Conclusões

Os conjuntos de haplótipos, amplificados pelos diversos primers apresentaram variabilidade entre os genótipos de citros e também entre as alturas estudadas. Exceto para o primer T36K17, todos os genótipos estudados amplificaram um conjunto de primers dos haplótipos T36, T30, VT e T3. Neste trabalho não foi possível observar a correlação entre os haplótipos amplificados e a presença e/ou ausência de sintomas leves e severos em campo. O dendrograma também confirmou uma mistura de genótipos entre as plantas, apresentando dissimilaridade entre os cinco genótipos e entre as alturas de 5 cm e 20 cm.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa contemplada.

Referências

BAR-JOSEPH, M.; CHE, X.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; AYLLÓN, M. A.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, O. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* molecular research. In: **Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. Riverside, CA. p.1-7, 2002.

BAR-JOSEPH, Moshe; MARCUS, Ruth; LEE, Richard F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual review of phytopathology**, v.27, n. 1, p. 291-316, 1989.

FERREIRA D.F. (2008) SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. Revista **Symposium** 6(2):36-41.

SATYANARAYANA T., Bar-Joseph M., Mawassi M., Albiach-Martí M.R., Ayllón M.A., Gowda S., Hilf M.E., Moreno P., Garnsey S.M., Dawson W.O. Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. **Virology**. 2001 Feb 1;280(1):87-96. doi: 10.1006/viro.2000.0759. PMID: 11162822.

SOUZA, A. A. et al. Stability of the mild protective 'PIAC' isolate of Citrus tristeza virus. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 2002.

WENG, Ziming et al. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. **PLoS One**, v. 2, n. 9, p. e917, 2007.