



## AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RFLP

Larissa Siqueira Soares<sup>1</sup>, Karina Silva dos Santos<sup>2</sup>, Camila de Cássia da Silva<sup>3</sup>, Tanara Garcia de Novaes<sup>4</sup>,  
Rubia de Oliveira Molina<sup>5</sup>, William Mário de Carvalho Nunes<sup>6</sup>

**RESUMO:** A tristeza dos citros, é considerada uma das mais importantes viroses que atingiram a cultura nos últimos 90 anos. Diante da importância econômica da exportação dos produtos cítricos brasileiros, se faz necessário medidas de controle contra essa virose. No Brasil, foi adotado o uso de porta-enxertos tolerantes em substituição à laranja Azeda (*Citrus aurantium* L.), o que não se mostrou completamente viável para algumas espécies de citros, especialmente laranja Pêra. Diante desse fato, estudos sobre a proteção cruzada ou pré-imunização com isolados fracos do vírus passaram a ser conduzidos no país. Com isso, iniciou-se em 2003, um programa de pré-imunização visando obter um isolado do CTV que oferecesse proteção efetiva e duradoura às plantas de laranja Pêra, superior àquela oferecida pelo isolado Pêra IAC. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar isolados do vírus da tristeza dos citros na região norte e noroeste do Paraná através da técnica de RFLP.

**PALAVRAS-CHAVE:** CTV; Pré-Imunização; Técnicas Moleculares.

### 1 INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que atingem a citricultura, podemos destacar a Tristeza dos Citros, virose esta, que se disseminou entre as regiões produtoras do mundo devido a propagação de material infectado (FUNDECITRUS, 2013), causando no Brasil a perda de milhares de árvores (Koller, 1994). Esta doença é ocasionada por um vírus de RNA do gênero *Closterovirus*, com tamanho aproximado de 12x2000 nm, o que o torna o maior vírus de planta já detectado até os dias atuais (GARNSEY; LEE, 1989). Os sintomas mais característicos da doença são: presença de caneluras (depressões no lenho), atrofiamento da planta, folhas com aspectos de clorose (semelhante a deficiência de nutrientes) e frutos reduzidos (BORDIGNON et al., 2003a). Contudo, os sintomas causados pela tristeza, variam de acordo com a espécie copa e porta-enxerto, assim como com a severidade do isolado do vírus e condições climáticas locais (BENNET e COSTA, 1949). Após uma série de pesquisas, o problema da tristeza no Brasil foi parcialmente resolvido com duas técnicas: a utilização do limão 'Cravo' (*Citrus limonia* (L.) Osb.) como porta-enxerto tolerante e a pré-imunização de copas suscetíveis (Muller; Costa 1991). Entretanto, têm sido observadas plantas pré-imunizadas apresentando sintomas severos de tristeza em vários pomares comerciais do país, causando preocupação, pois contribui para a redução da produtividade dos pomares no país (DIAS, 2002).

Dessa maneira, é arriscado o Paraná basear a sua citricultura em material oriundo de fora, pois alguns estudos têm demonstrado que os melhores resultados têm sido obtidos para uma determinada região, quando os isolados protetivos do CTV são selecionados na região em questão. Diante disso, o objetivo deste trabalho é caracterizar molecularmente os isolados de CTV por meio das técnicas de extração, RT-PCR, RFLP.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

O material para a análise de RFLP, foi coletado na região Norte e Noroeste do Paraná, constituído de casca de ramos e das nervuras centrais de folhas. Os mesmos foram acondicionados em sacos individuais, previamente etiquetados, e congelados até o momento de uso. Inicialmente, foi feito o isolamento do RNA total do vírus por meio de ciclos de extração, utilizando o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). O RNA viral serviu de molde para a síntese da primeira fita de cDNA, realizada em termociclador a uma temperatura de 37°C por duas horas. A técnica de RT (Transcriptase Reversa) consiste na obtenção de um cDNA (DNA complementar), onde é utilizada a enzima transcriptase reversa, que sintetiza

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista CNPQ. soares\_lari@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduanda do curso de Agronomia da Unifil; PIBIC/Fundação Araucária; Laboratório de Virologia/ IAPAR; Londrina – Paraná.

<sup>3</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista Capes. silva.camila@live.com

<sup>4</sup> Agente de Ciência e Tecnologia; Laboratório de Virologia/IAPAR; Londrina – Paraná.

<sup>5</sup> Co-orientadora, Pesquisadora Doutora do Laboratório de Virologia/IAPAR; Londrina – Paraná. rubiamolina@iapar.br

<sup>6</sup> Orientador; Professor Doutor do Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada – NBA/UEM, Maringá – Paraná. Bolsista de produtividade do CNPq. wmcnunes@uem.br



DNA a partir de RNA. O cDNA é utilizado, posteriormente, na análise do gene da capa proteica, com par de *primers* específicos, na amplificação por PCR. Para que tal amplificação ocorra, é necessária a presença de uma enzima (Taq DNA polimerase) que reconhece apenas molde de DNA. Por esse motivo, deve ser sintetizado o cDNA (SOUZA *et al.*, 2001). A amplificação do gene da proteína do capsídeo viral (GCP) por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction) foi conduzida utilizando-se dois primers específicos: PM85 E PM86. Os produtos da amplificação do GCP dos isolados de CTV foram digeridos pela enzimas de restrição Rsa I, de acordo com as instruções do fabricante. Após a incubação a 37°C por 4 horas, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese, em gel não desnaturante de poliacrilamida a 8%. A corrida foi realizada a 90 V por 6 horas a 12°C. O gel foi corado com nitrato de prata segundo o procedimento descrito por Beidler *et al.* (1982). Para a análise dos dados RFLP, os fragmentos obtidos nos géis foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência de bandas. A variabilidade genética entre os isolados de CTV das plantas selecionadas foi avaliada através da análise de componentes principais (PCA - Principal Components Analysis), um método estatístico multivariado, no qual se empregou a matriz de dados binários, utilizando o programa Canoco For Windows 4.5. A partir dessa matriz, também foi gerado uma árvore de divergência genética com base na distância euclidiana, adotando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages) para agrupamento.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A enzima de restrição utilizada, Hinf I, apresentou sítios de restrição no gene da proteína do capsídeo de todos os isolados de CTV analisados, gerando grupos polimórficos entre os mesmos, como observado por Roy *et al.* (2003) e Valle *et al.* (2000). Pela visualização do gel observou-se que a digestão por essa enzima geraram vários fragmentos. Com base nas bandas polimórficas obtidas pela análise RFLP do gene da capa proteica foi calculada a distância genética entre os isolados selecionados. A árvore gerado pelo coeficiente de dissimilaridade genética revelou a formação de cinco grupos. O grupo 1 é formado pelas isolados 02 e 03, com 45% dissimilaridade (Figura 1). O grupo 2 é formado pelos isolados 10 e 11 apresentando 50% dissimilaridade (Figura 1). O grupo 3, apresentou 51% dissimilaridade entre os isolados 12 e 14. (Figura 1). O grupo 4, onde consta os isolados 07, 08, 09 a dissimilaridade apresentada foi de 64% (Figura 1). Já o grupo 5, foi o que apresentou o maior grau de dissimilaridade entre os isolados 05 e 06, com 66% (Figura 1). De acordo com a análise podemos observar, que nenhum dos isolados se agruparam com as amostras 15 (Controle Forte/Capão Bonito) e nenhum agrupamento ocorreu com o isolado 16 (Controle Fraco/Pera IAC). Contudo, podemos observar a pequena dissimilaridade de 20% ocorrida entre esses dois isolados (Figura 1).

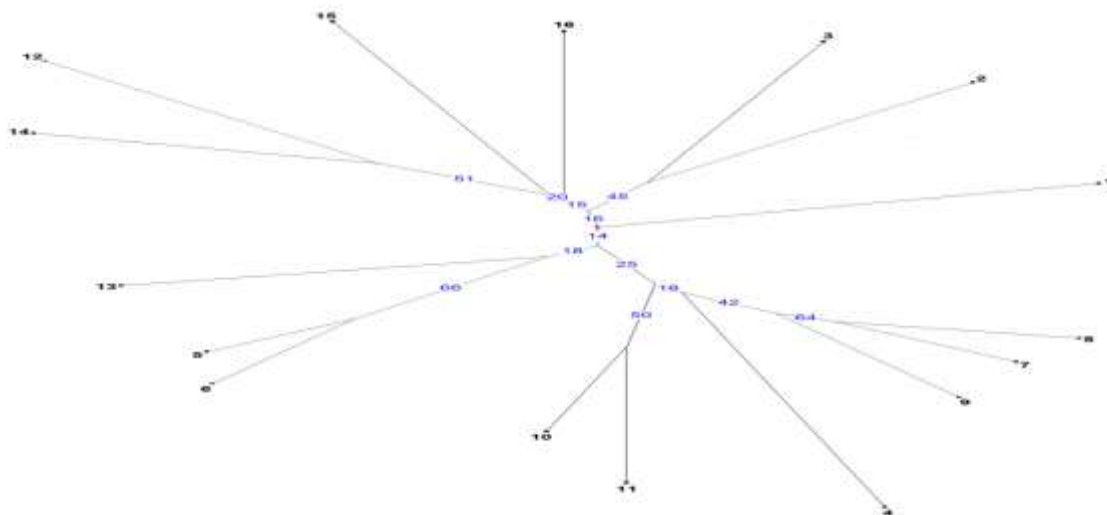


Figura 1 – Árvore obtida, mostrando a dissimilaridade genética de 16 isolados identificados pela técnica de RFLP.

### 4 CONCLUSÃO

A enzima Hinf I, mostrou eficácia. Motivo este, por apresentar sítios de restrição no gene da proteína do capsídeo de todos os isolados de CTV analisados, gerando grupos polimórficos entre os isolados. Porém



estudos futuros, precisam ser realizados. Sendo eles a técnica de sequenciamento desses isolados, para uma comparação mais precisa.

## **REFERÊNCIAS**

BENNETT, C.W. e COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. *Journal of Agricultural Research*, v.78, n.8, p.207-237, 1949

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*, v.62, nº3, p.345-355, 2003a.

DIAS, L.C.F. Caracterização imunoquímica dos anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citros do complexo Capão Bonito. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2002.

FUNDECITRUS. Disponível em: [www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br). Acesso em 10 de maio de 2015

GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Tristeza. In: Whiteside, J.O.; GARNSEY, S.M; TIMMER, L.W. *Compendium of citrus diseases*, St. Paul, p. 48-50, 1989.

KOLLER, O.C. *Citricultura:laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre. Editora Rígel. 1994.

MULLER, G. W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGASS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A.S. *Citricultura brasileira*. São Paulo: Fundação Cargill, 1991. P. 735-762.

ROY, A.; RAMACHANDRAN, P.; BRLANSKY, R.H. Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Archives of Virology*. v.148, p.707-722, 2003

SOUZA, A. A.; TARGON, M. L. P. N.; DOS SANTOS, F. A.; MÜLLER, G. W.; MACHADO, M. A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. *Laranja*, v.22, nº2, p. 503-516, 2001.

VALLE, V.G.R.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; TEOFILSO SOBRINHO, J.; LEE, R.F. Characterization of citrus tristeza virus isolates by RFLP analysis of the coat protein gene. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.25, p.175-181, 2000.