

Identificação de isolados de *Citrus tristeza virus* (CTV) protetivos para *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Ana Paula Gonçalves¹, Karina Silva dos Santos², Camila de Cassia Silva³,
Tanara Garcia de Novaes⁴, Rúbia de Oliveira Molina⁵

Bolsista CNPq/PIBIC. Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina-PR; ²Bolsista Fundação Araucária. Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina-PR; ³Doutoranda PGA., Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá-PR; ⁴Agente Ciência de Tecnologia. Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina-PR; ⁵Pesquisadora. Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina-PR.

Autor para correspondência: Rúbia de Oliveira Molina (rubiamolina@iapar.br).

Data de chegada: 19/02/2017. Aceito para publicação em: 20/06/2017.

10.1590/0100-5405/172270

RESUMO

Gonçalves, A.P.; Santos, K.S.; Silva, C.C.; Novaes, T.G.; Molina, R.O. Identificação de isolados de *Citrus tristeza virus* (CTV) protetivos para *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.1, p.17-22, 2018.

O *Citrus tristeza virus* (CTV) causa significativas perdas na produtividade de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] e seu controle tem sido realizado principalmente com a premunização. O trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade de isolados fortes e fracos de CTV provenientes de plantas de citros inoculadas e mantidas em casa de vegetação e amostras de campo, coletadas em pomar comercial situado no município de Rolândia, PR. Para a determinação da variabilidade e diversidade genética dos isolados foi realizada avaliação dos sintomas e empregadas as técnicas de RT-PCR e RFLP, utilizando os oligonucleotídeos específicos HCP1/HCP2 e posterior sequenciamento dos fragmentos amplificados. Na avaliação de canelura, os isolados mantidos em casa de vegetação induziram sintomas leves, com exceção do isolado severo

Capão Bonito. Os sintomas mais severos ocorreram em amostras situadas no campo. De acordo com as análises multivariadas os isolados de CTV tendem a se agrupar conforme a severidade dos sintomas e condições ambientais as quais foram expostas formando agrupamentos distintos entre amostras provenientes do campo e casa de vegetação. O dendrograma gerado a partir do sequenciamento dos isolados e as análises multivariadas revelaram que o isolado proveniente da amostra “Forte Arapongas” apresentou maior similaridade com o controle padrão forte proveniente de Capão Bonito. Os isolados identificados como fracos e provenientes das amostras Pêra IAC e Rolândia 5 apresentaram maior similaridade. Pode-se aferir que plantas hospedeiras mantidas em campo possuem maior variabilidade de isolados.

Palavras-chave: Citros. Caneluras. Diversidade genética. Isolados fraco. Isolados forte.

ABSTRACT

Gonçalves, A.P.; Santos, K.S.; Silva, C.C.; Novaes, T.G.; Molina, R.O. Identification of protective isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV) for *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. *Summa Phytopathologica*, v.44, n.1, p.17-22, 2018.

Citrus tristeza virus (CTV) causes significant yield losses to sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] and its control has been carried out especially with premunization. The aim of this study was to analyze the variability of severe and mild CTV isolates from citrus plants inoculated and kept in a greenhouse and field samples collected from a commercial orchard located in the city of Rolândia, Paraná State (PR). To determine the variability and the genetic diversity of isolates, symptoms were evaluated and the techniques RT-PCR and RFLP were employed, using the specific oligonucleotides HCP1 / HCP2 and subsequent sequencing of the amplified fragments. In the evaluation of stem pitting, the isolates kept in greenhouse induced mild symptoms, except for the

severe isolate Capão Bonito. The most severe symptoms occurred in samples located in the field. The multivariate analyses showed that CTV isolates tend to cluster according to the severity of symptoms and the environmental conditions to which they were exposed, forming distinct groupings among samples from the field and the greenhouse. The dendrogram generated from the sequencing of isolates and the multivariate analyses revealed that the isolate from the sample “Forte Arapongas” presented greater similarity with the severe pattern control from Capão Bonito. The isolates identified as mild and from the samples Pêra IAC and Rolândia 5 presented greater similarity. Host plants maintained in the field can be considered to have more variability of isolates.

Keywords: Citrus, stem pitting, genetic diversity, mild isolate, severe isolate.

Espécies de citros são cultivadas há quase dois mil anos, sendo consideradas nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e arquipélago Malaio. A citricultura brasileira é a maior do mundo sendo responsável, nos anos de 2015/2016, por 34,91% da produção mundial de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] (25). No entanto, os pomares de citros estão sujeitos a fatores fitossanitários limitantes e, entre estes, se destaca a Tristeza dos Citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), que causa o rápido declínio das plantas afetadas (15).

O CTV pertence ao gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae*,

possui partículas longas e filamentosas de simetria helicoidal com cerca de 2000 nm de comprimento e 10 a 12 nm de largura e genoma constituído por um ssRNA (+) (4). Tem sua replicação restrita às células do floema e pode ser facilmente transmitido por união de tecido, tal como enxertia por borbulha. Na natureza, é transmitido por diferentes espécies de afídeos de maneira semi-persistente, destacando a espécie *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (13) como o vetor mais eficiente do CTV (15).

O CTV tornou-se um grande problema para o desenvolvimento

da citricultura brasileira entre as décadas de 1930 e 1940, dizimando cerca de dez milhões de plantas provenientes de mudas enxertadas em laranja 'Azeda' [*Citrus aurantium* (L.) Osbeck], porta-enxerto intolerante ao vírus. Os danos causados por isolados do CTV estão associados aos sintomas de caneluras (depressões no lenho de ramos, galhos e troncos), atrofiamento da planta, clorose foliar e má formação de frutos. A conformação defeituosa, com albedo espesso, acarretará a elevação da acidez e baixo teor de suco afetando a qualidade do fruto (22).

Uma das medidas de controle mais promissoras ainda é a técnica de premunização, que consiste na inoculação prévia das mudas de citros mantidas em viveiros com uma estirpe de CTV que induzirá sintomas fracos e irá conferir proteção contra a infecção de estirpes severas no pomar (15).

No estado do Paraná têm sido constatadas alterações na ação protetiva do CTV em decorrência da identificação de estirpes severas (5, 7, 26). Este fato é de grande interesse uma vez que a implantação da citricultura no noroeste do Estado do Paraná, que ocorreu em meados de 1989, tem sido importante para o desenvolvimento da fruticultura paranaense. Dessa forma, a técnica de premunização ainda tem sido decisiva para o seu sucesso (2, 24).

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade de isolados de CTV, mantidos em casa de vegetação e coletados em pomares, que induzem sintomas brandos e severos em citros visando à seleção de isolados promissores para futuros programas de premunização.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do trabalho foram analisadas amostras de plantas de laranja doce (*C. sinensis*) inoculadas com isolados de CTV que, de acordo com a severidade dos sintomas induzidos, foram classificadas como fortes e fracos. Estes isolados foram obtidos a partir da coleção de plantas de citros pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), mantidas em casa de vegetação na Estação Experimental de Londrina, PR. Amostras provenientes de campo, com sintomas típicos aos induzidos pelo CTV foram obtidas de pomar comercial de citros situado no município de Rolândia, PR (Latitude 23° 18' 35" S e Longitude 51° 22' 09" W).

Para a classificação dos isolados de CTV amostrados foi utilizado como padrão severo (forte) o isolado de Capão Bonito, e como padrão brando (fraco) foi utilizado o isolado protetivo 'Pêra IAC', ambos oriundos do Centro de Citricultura Sylvio Moreira pertencente à Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (CCSM/APTA).

As avaliações e classificação da severidade dos sintomas de caneluras foram obtidas de acordo com escala de notas de 0 a 5 (6). Onde 0= nenhuma canelura, 1= raras caneluras superficiais, 2= um número moderado de caneluras, 3= um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte, 4= muitas caneluras superficiais e algumas profundas e 5= superfície inteiramente coberta de caneluras superficiais ou profundas. Para as análises das amostras provenientes de casa de vegetação, foram coletados ramos circulares lignificados de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento. Para as análises das amostras provenientes do pomar comercial foi realizada a retirada do súber (casca) das plantas de citros, em forma retangular, conhecida como 'abertura de janela', nas dimensões de 10 cm de comprimento x 5 cm de largura (20).

Para a detecção e caracterização molecular dos isolados de CTV,

folhas sintomáticas foram submetidas à extração de RNA total com TRIzol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

A detecção do CTV nas amostras de citros foi realizada por 'Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)' utilizando os pares de oligonucleotídeos específico HCP1/HCP2 (5'-ATGGACGACGAAACAAAGAA-3'/5'-TCAACGTGTGTTGAATTTCC-3'), que amplificam segmento de aproximadamente 670 pares de bases (pb), correspondente ao tamanho do gene da capa proteica (GCP) do CTV. O produto resultante da amplificação de RNA, via RT-PCR, foi aplicado em gel de agarose e submetido a eletroforese. Para a visualização dos fragmentos, após eletroforese, o gel foi corado com SYBR Safe e analisado em fotodocumentador L-PIX Molecular Imaging (Loccus).

Para caracterizar os isolados de CTV foi utilizada a técnica de 'Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)'. Os produtos obtidos a partir da amplificação em RT-PCR foram submetidos ao processo de digestão utilizando as enzimas *Hinf I*, isolada de *Haemophilus influenzae* Rf e *Rsa I*, isolada de *Rhodospseudomonas sphaeroides*, seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen), com posterior incubação a 37°C por 4 horas. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 8% e submetidos a eletroforese por 3 horas, a 200V e 12°C. Para a constatação da digestão, o gel foi corado com nitrato de prata.

Os padrões e a presença de bandas evidenciadas pelo processo de digestão, utilizando *Hinf I* e *Rsa I*, foram registrados como ausência "0" ou presença "1". Estes dados foram utilizados para a construção da matriz binária quando somente as bandas reprodutíveis foram consideradas positivas. A matriz de semelhança foi calculada usando o coeficiente "Dice" e um dendrograma foi construído pelo método "UPGMA" (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) por meio do software "R" utilizando os pacotes *ade4* para gerar uma matriz de similaridade por meio da função *dist.binary* e *stats*, para a função *hclust*, a qual aplica o método de ligação (10). A árvore foi gerada por análise de *Bootstrap* (1000 repetições).

Para a realização do sequenciamento das amostras de CTV, os fragmentos amplificados por RT-PCR foram transformados por meio de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* DH10B. Para a reação de ligação e transformação foi utilizado o vetor do kit TOPO TA® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

Após clonagem, as amostras foram submetidas ao sequenciamento. Para a reação, utilizou-se 400ng de c-DNA obtido a partir do miniprep. A reação de sequenciamento foi realizada em um volume de 20 µL, utilizando 2 µL de Big Dye (Ready Reaction Premix – Applied Biosystems), 2 µL de tampão (BigDye Sequencing Buffer – Applied Biosystems) e 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos a 3,2 pmols (M13F/M13R) separadamente, produto de PCR amplificado e água ultrapura para completar o volume. A reação foi efetuada em termociclador (MJ Research PTC-100), utilizando o seguinte programa: desnaturação a 96°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto, e finalmente uma extensão a 60°C por 4 minutos. Os fragmentos amplificados foram precipitados seguindo recomendação do fabricante (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos dos isolados de CTV foram obtidas utilizando o sequenciador ABI3130xl pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina – Londrina, PR.

As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no *GenBank* utilizando "BLAST Search" e avaliadas através do programa "DNA Baser v3". As sequências consenso e as depositadas

no *GenBank* foram alinhadas utilizando o programa “Multialin e Clustal W” que permitiu determinar a identidade dos isolados de CTV. As sequências foram analisadas utilizando o programa “MEGA 6” pelo método Tamura 3-parameter com 1000 *Bootstrap*, para gerar um dendrograma que permitiu analisar a diversidade dos isolados amostrados (23).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados de CTV obtidos de plantas de citros mantidas em casa de vegetação e previamente identificados pelo do CCSM/APTA desenvolveram sintomas severos, sendo que o isolado 5, classificado como Forte Arapongas, induziu sintomas mais severos nas mudas de laranja “Pêra” inoculadas. Os isolados fracos 217 e Pêra IAC (amostras 3 e 14, respectivamente) não induziram sintomas nas mudas de laranja “Pêra” inoculadas (Tabela 1).

O fato das plantas de citros, que serviram como fonte de inóculo, serem mantidas em casa de vegetação onde é comum as temperaturas internas atingirem entre as 12 às 14 h médias próximas a 50 °C (11) pode explicar o padrão de severidade dos sintomas nas mudas inoculadas. A condição ambiental pode causar um efeito nas plantas refletindo na multiplicação do vírus nos tecidos vegetais, tendo em vista que estações mais frias ou quentes do ano interferem no comportamento de severidade do isolado.

Algumas plantas mesmo estando expostas as mesmas condições de temperatura, apresentaram sintomas mais severos de canelura. Cowell et al. e Dodds et al. (8 e 9), realizaram estudos de titulação de estirpes de CTV durante o inverno e verão no campo e sob condições controladas. Com isso, verificaram que nem todos os estirpes de CTV são afetados pela temperatura mais elevada, isso porque temperaturas altas inibem a replicação do vírus, mas mantém os processos de degradação.

Nas amostras obtidas em pomar comercial situado em Rolândia-PR, também foi possível observar sintomas severos em 67% das amostras, sendo as amostras 52 e 54 (Rolândia 6 e Rolândia 8, respectivamente), aquelas que apresentaram maiores notas quanto a indução de caneluras.

As demais amostras induziram sintomas intermediários e apenas a amostra 51 (Rolândia 5) não desenvolveu sintomas nas mudas de citros (Tabela 1). Estudos sobre a severidade do CTV, em pomares localizados em Rolândia-PR., já haviam constatado a presença de isolados que causavam sintomas de moderado a severo em plantas de citros (5).

O fato das plantas provenientes do pomar apresentar sintomas de caneluras mais severos pode ser explicado pelo motivo destas se encontrarem em condições de campo, o que podem favorecer o aumento do número de visitas de afídeos vetores e, conseqüentemente, a inoculação de variantes mais severas de CTV provenientes de pomares de citros adjacentes propiciando a ocorrência de quebra de proteção, ou seja, variantes severos que são capazes de infectar plantas contendo o isolado protetivo (22).

Com a utilização da técnica de RT-PCR, foi constatada a presença do CTV em todas as amostras analisadas, com exceção da amostra 4 utilizada como controle negativo do experimento.

No processo de digestão utilizando as enzimas de restrição (*Rsa I* e *Hinf I*), foi possível observar maior número de fragmentos quando se utilizou a enzima *Rsa I*.

O isolado Pêra IAC (amostra 14), considerado um isolado fraco, apresentou um menor número de fragmentos em relação ao isolado forte proveniente do pomar situado em Rolândia (amostra 15), considerado severo. Quando essas amostras foram amplificadas e digeridas com a enzima *Hinf I*, não foram observadas diferenças nos perfis eletroforéticos. Somente foram observadas diferenças entre os perfis das amostras coletadas em casa de vegetação e aquelas coletadas no pomar comercial de Rolândia-PR, quando digeridas com a enzima *Rsa I*.

A diferença do número de clivagens, quando são utilizadas as enzimas *Hinf I* e *Rsa I* é comum. Roy et al. (17), obtiveram uma melhor discriminação entre os seus isolados quando utilizaram a enzima *Hinf I*, já Corazza-Nunes et al. (5), conseguiram resultados melhores com a utilização da enzima *Rsa I*.

Para as amostras de campo (infectadas naturalmente) foram observadas diferenças no padrão de bandas, quando comparadas às amostras coletadas do BAG-IAPAR. Zanutto et al. (26), estudando isolados de diferentes regiões do estado do Paraná, observaram que os

Tabela 1. Avaliação dos sintomas de canelura em amostras de plantas de mantidas em casa de vegetação (BAG - IAPAR – Londrina) e de pomar comercial situado em Rolândia-PR.

Amostras	Isolados	Planta indicadora	Sintomas		Local/Exp.
			Declínio	Canelura/nota	
1	Capão Bonito**	Pêra IAC	+	2	CV*** -Londrina
3	217*	Pêra Bianchi	-	0	CV - Londrina
4	Controle Negativo	Pêra IAC	-	0	CV - Londrina
5	Fort. Arapongas**	Pêra IAC	+	4	CV - Londrina
8	Forte Rolândia**	Pêra IAC	-	2	CV - Londrina
14	Pêra IAC*	Pêra IAC	-	0	CV - Londrina
15	Forte Rolândia	Pêra IAC	-	0	CV - Londrina
48	Rolândia 2	Pêra Bianchi	+	1	PC**** Rolândia
49	Rolândia 3	Pêra Bianchi	-	1	PC - Rolândia
51	Rolândia 5	Pêra Bianchi	-	0	PC - Rolândia
52	Rolândia 6	Pêra Bianchi	+	4	PC - Rolândia
53	Rolândia 7	Pêra Bianchi	+	2	PC - Rolândia
54	Rolândia 8	Pêra Bianchi	+	5	PC - Rolândia

Legendas: *isolado fraco; **isolado forte; ***CV (casa de vegetação); **** PC (pomar comercial).

perfis eletroforéticos, gerados pelas enzimas *Hinf I* e *Rsa I*, indicaram que os isolados de CTV são constituídos por um complexo de vários haplótipos, onde as bandas geradas nos géis de poli-acrilamida dão referência a presença do número de haplótipos.

A análise multivariada gerada a partir do RFLP permitiu associar a natureza molecular dos isolados com os resultados obtidos a partir da avaliação sintomatológica.

De acordo com a análise multivariada (Figura 1), foi possível estabelecer que os isolados de CTV formaram dois grupos distintos. O grupo externo foi formado pelo controle negativo do experimento (amostra 4), livre de CTV, portanto, não apresentou nenhuma formação de banda no RFLP. O primeiro grupo foi composto por amostras provenientes de casa de vegetação e no segundo grupo, houve um agrupamento de todas as amostras provenientes do pomar comercial de Rolândia. Nesse grupo houve uma proximidade entre as amostras 53 e 54, isolado Rolândia 7 e Rolândia 8 respectivamente, que apresentaram sintomas severos de CTV e presença de declínio na planta.

Outro agrupamento formado foi entre amostras do pomar comercial de Rolândia-PR e amostras de casa de vegetação, amostra 52 e 5, com maior grau de similaridade com o isolado forte de CTV Capão Bonito (amostra 1). Esse fato ocorreu devido à presença de sintomas severos de CTV, gerando uma maior presença de bandas na análise multivariada. Essas amostras também apresentam presença de declínio nas plantas (Figura 1).

De forma geral, foi constatado que os isolados de CTV tendem a se agrupar conforme condição as quais foram expostas (casa de vegetação e campo). Dessa forma, as amostras que apresentaram sintomas mais fracos de canelura apresentaram, também, uma menor quantidade de fragmentos no gel de RFLP. Segundo Souza et al. (21), a técnica de RFLP permite avaliar a estabilidade de isolados protetivos de CTV em plantas premunizadas ou detectar a presença de isolados severos que por ventura infectaram as mudas de citros já premunizadas após o seu plantio no campo. Estas enzimas de restrição são capazes de clivar as ligações do seguimento dos nucleotídeos GCP. Dessa forma, a avaliação do grau de severidade das caneluras associadas aos resultados de RFLP que apresentam maior número de clivagem é possível relatar a presença do isolado forte de CTV.

Para verificar a variabilidade genética e a similaridade dos isolados de CTV provenientes do campo e da casa de vegetação, foram selecionados isolados com base na avaliação de canelura para realizar o sequenciamento. Dessa forma, foram selecionados os isolados 3 e 5 (217 e Forte Arapongas, respectivamente), provenientes de casa de

vegetação e que apresentavam sintomas fraco e forte na avaliação de canelura. Da mesma forma, foram selecionados os isolados do Pomar comercial situado em Rolândia-PR apresentando sintomas fraco e forte de canelura, amostras 51 e 52 (Rolândia 5 e Rolândia 6, respectivamente). Também foram utilizados padrões fraco e forte de CTV, Pêra IAC (amostra 14) e Capão Bonito (amostra 1), respectivamente, além da sequência de dois isolados depositados no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) e que foram utilizados como referência, cujos números de acesso são: EU 579362.1 e JQ 339729.1 (12, 16).

O dendrograma gerado por meio da análise do sequenciamento evidenciou a formação de dois grupos (Figura 2). Um formado pelas amostras 51 e 14 (isolados Rolândia 5 e Pêra IAC, respectivamente), com 95,08% de similaridade, e que durante a avaliação de sintomas se caracterizaram por não induzir sintomas.

Outro grupamento distinto foi formado pelos isolados provenientes do *GenBank* (similaridade de 99,85%) e a amostra 52 (isolado Rolândia 6) com similaridade acima de 99%. Isso pode ser explicado pelo fato dessa amostra apresentar sintomas severos de canelura e comportamento de isolado forte de CTV (declínio), e os isolados utilizados como referência serem fortes.

O isolado Forte Arapongas (amostra 5) apresentou 97,32% de similaridade com o isolado forte “padrão” proveniente de Capão Bonito (amostra 1) e na avaliação de canelura ambos apresentaram sintomas severos de CTV. O isolado 217 (amostra 3), apesar de não apresentar sintomas de canelura, apresentou maior similaridade com o isolado severo Capão Bonito, (99%) (Figura 2).

Quando foi avaliada a diversidade genética a partir da sequência de nucleotídeos dos isolados fortes e fracos, esta oscilou de 91,82 a 99,85%, sendo os isolados utilizados como referência aqueles que apresentam maior similaridade e os isolados provenientes do Pomar comercial de Rolândia (amostras 51 e 52) os que também apresentam maior diversidade genética (Tabela 2). Porém, o isolado proveniente da amostra 51, por não induzir sintomas de caneluras nas plantas de citros desafiadas, mostrou-se os mais indicados para programas que visam a seleção de isolados de CTV atenuados para a implementação de premunização de citros.

Os dados obtidos estão de acordo com as informações da literatura que consideram o CTV como uma estrutura complexa com variantes de sequências altamente divergentes (3), ao mesmo tempo ser geneticamente estáveis em alguns hospedeiros (14).

Como os hospedeiros avaliados são plantas perenes de vida longa,

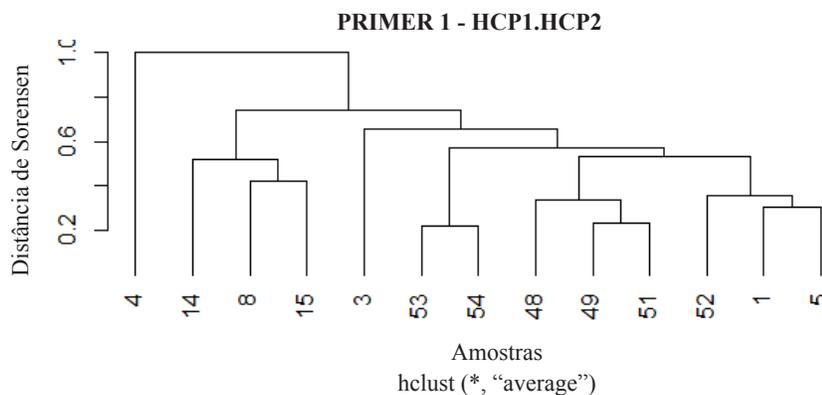


Figura 1. Dendrograma gerado a partir da matriz binária com base na ausência e presença de bandas em amostras de laranjeiras ‘Pêra Bianchi’ mantidas em Londrina sob condições de casa de vegetação (amostras 01, 03, 04, 05, 08, 14 e 15) e sob condições de campo em Rolândia-PR (48, 49, 51, 52, 53 e 54).

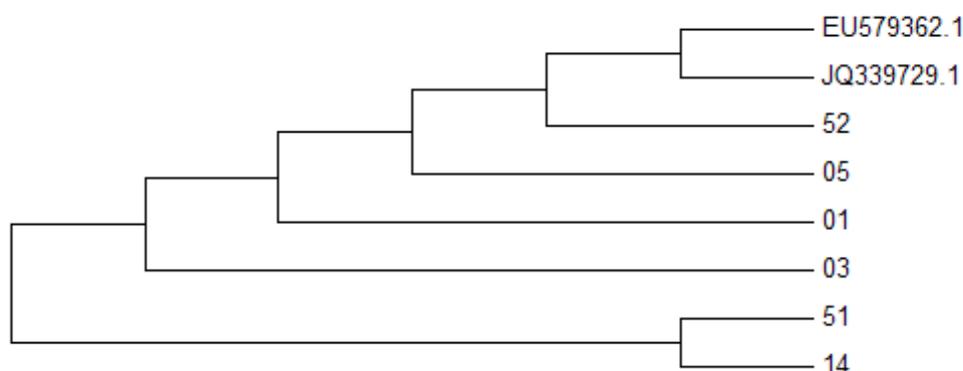


Figura 2. Dendrograma gerado pelo programa MEGA 6, a partir da similaridade das sequências de nucleotídeos do gene da capa proteica de isolados do CTV, obtidos de laranjeiras ‘Pêra Bianchi’ mantidas em Londrina sob condições de casa de vegetação (01, 03, 05 e 14) e sob condições de campo em Rolândia-PR (51 e 52).

Tabela 2. Identidade de nucleotídeos dos isolados de CTV obtidos de laranjeiras ‘Pêra Bianchi’ mantidas em Londrina sob condições de casa de vegetação (01, 03, 05 e 14) e sob condições de campo em Rolândia-PR (51 e 52) oscilando de 91,82 a 99,85%.

AMOSTRA	EU579362.1	JQ339729.1	3	5	51	52	14	1
EU579362.1								
JQ339729.1	99.85							
3	98.61	98.46						
5	99.26	99.11	98.92					
51	92.11	91.96	95.84	92.86				
52	99.4	99.26	98.46	98.96	91.82			
14	96.87	96.72	98.31	97.62	95.08	96.57		
1	96.88	96.73	99.08	97.32	93.75	96.88	96.13	

pode ter ocorrido uma maior diversidade genética entre esses isolados, fato possivelmente ocorrente devido às repetidas inoculações do vírus por afídeos que podem ter transmitido variantes de CTV divergentes, aumentando, assim, a diversidade genética viral na planta hospedeira (3). Distribuição desigual de variantes de CTV dentro de plantas infectadas e a sua segregação genética ou seleção aleatória durante a aquisição ou transmissão pelo pulgão podem ser fatores adicionais que contribuem para mudanças populacionais do CTV no campo (18).

Dessa forma, pode haver a ocorrência de isolados de CTV que consistem, basicamente, de um genótipo principal ou variantes relacionadas geneticamente e suas quasiespécies, mas outros podem ser constituídos por genótipos diferentes que são reconhecidos como estirpes, podendo variar na patogenicidade induzida no hospedeiro (1). A existência de múltiplas estirpes também pode ser responsável por uma ampla faixa gama de fenótipos, principalmente quando há infecções múltiplas de variáveis de CTV em uma mesma planta de citros hospedeira (19).

Os isolados caracterizados como estirpes fortes de CTV foram semelhantes entre si e com o padrão de isolado severo de Capão Bonito.

Resultados idênticos foram obtidos nas análises dos isolados classificados como fracos, que apresentaram semelhança entre si e com o padrão de isolado fraco Pêra IAC. Plantas hospedeiras mantidas em condições de campo possuem uma maior variabilidade de isolados de CTV.

O isolado Rolândia 5 (amostra 51) apresenta potencial protetivo para CTV.

REFERÊNCIAS

- Albiach-Martí, M.R. Molecular Virology and Pathogenicity of *Citrus tristeza virus*. In: Garcia, M.L.; Romanowski, V. (Ed.). **Viral genomes: molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions**. Rijeka: In Tech, 2012. cap.14, p.275-302.
- Auler, P.A.M.; Fiori-Tutida, A.C.G.; Tazima, Z.H. Comportamento da laranjeira- ‘Valência’ sobre seis porta-enxertos no noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p.229-234, 2008.
- Ayllón, M.A.; Rubio, L.; Sentandreu, V.; Moya, A.; Guerri, J.; Moreno, P. Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. **Virus Genes**, Norwell, v.32, n.2, p.119-128, 2006.
- Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.M.; Gonçalves, D. The *Closteroviruses*: a distinct group of elongated plant virus. **Advances Virus Research**, Nova York, v.25, p.93-168, 1979.
- Corazza, M.J.; Zanutto, C.A.; Zanineli-Ré, M.L. Müller, G.W.; Nunes, W.M.C. 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**, Brasília, DF, v.37, n.3, p.179-184, 2012.
- Corazza-Nunes, M.J.; Machado, M.A.; Stach-Machado, D.R.; Nunes, W.M.C.; Carvalho, A.S.; Müller, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of Citrus Active Germplasm Bank. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.322-327, 2006.
- Costa, A.T.; Nunes, W.M.C.; Zanutto, C.A.; Müller, G.W. Stability of *Citrus tristeza virus* protective isolates in field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, p.693-700, 2010.
- Cowell, S.J.; Harper, S.J.; Dawson, W.O. Some like it hot: *Citrus tristeza virus* strains react differently to elevated temperature. **Archives of Virology**, Heidelberg, v.161, p. 1-4, 2016.

9. Dodds, J.A.; Jordan, R.L.; Roistacher, C.N.; Jarupati, T. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, p.442-447, 1987.
10. Jaciani, F.J.; Ferro, J.A.; Ferro, M.I.T.; Vernière, C.; Pruvost, O.; Belasque Jr. J. Genetic Diversity of a Brazilian Strain Collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the Type III Effector Protein Genes. **Plant Disease**, Saint Paul, v.96, p.193-203, 2012.
11. Levitt, J. **Responses of plants to environmental stresses**. New York: Academic Press, 1972. 697p.
12. Licciardello, G.; Raspagliesi, D.; Bar-Joseph, M.; Catara, A. Characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. **Journal of Virological Methods**, Hong Kong, v.181, p.139-147, 2012.
13. Meneghini, M. Sobre la naturaleza y transmissibilidad de la doencia “Tristeza” de los citros. **O Biológico**, São Paulo, v.12, p.285-287, 1946.
14. Moreno, P.; Ambrós, S.; Albiachi-Martí, M.R.; Guerri, J.; Peñan, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v.9, n.2, p.251-262, 2008.
15. Müller, G.W.; Targon, M.L.P.N.; Carvalho, S.A.; Souza, A.A.; Rodrigues, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Junior, J. **Citros**. Cordeirópolis: Instituto Agronômico; Fundag, 2005. cap.19, p. 567-604.
16. Nolasco, G.; Santos, C.; Silva, G.; Fonseca, F. Development of an asymmetric PCR-ELISA typing method for *Citrus tristeza virus* based on the coat protein gene. **Journal of Virological Methods**, Hong Kong, v.155, p.97-108, 2009.
17. Roy, A.; Ramachandran, P.; Brlansky, R.H. Grouping and comparison of Indian *Citrus tristeza virus* based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. **Archives of Virology**, Heildberg, v.148, p.707-722, 2001.
18. Sambade, A.; Ambrós, S.; López, C.; Ruiz-Ruiz, S.; Hermoso De Mendonza, A.; Flores, R.; Guerri, J.; Moreno, P. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. **Archives of Virology**, Heildberg, v.152, p.1115-1126, 2007.
19. Scott, K.A.; Hlela, Q.; Zablocki, O.; Read, D.; Van Vuuren, S.; Pietersen, G. Genotype composition of population of grapefruit-cross-protecting *Citrus tristeza virus* strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. **Archives of Virology**, Heildberg, v.158, p.27-37, 2012.
20. Silva, S.R. **Caracterização fitossanitária e seleção de Limeiras ácidas ‘Tahiti’ clone quebra-galho candidatas a matrizes**. 2007. 170f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
21. Souza, A.A.; Targon, M.L.P.N.; Santos, F.A.; Müller, G.W.; Machado, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.503-516, 2001.
22. Souza, A.A.; Müller, G.W. A imunização no controle da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.27, n.1, p.57-70, 2006.
23. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, n.30, p. 2725-2729, 2013.
24. Tazima, Z.H.; Auler, P.A.M.; Neves, C.S.V.J.; Yada, I.F.U.; Leite Júnior, R.P. Comportamento de clones de laranja-‘Valência’ na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.4, p.970-974, 2008.
25. United States Department of Agriculture – USDA. **Citrus**: World Markets and Trade. 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2016.
26. Zanutto, C.A.; Corazza, M.J.; Nunes, W.M.C.; Müller, G.W. Evaluation of the protective capacity of new mild *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates selected for a preimmunization program. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.70, p.116-124, 2013.