

NOTAS CIENTÍFICAS

Caracterização biológica e molecular de isolados do *Citrus tristeza virus* com potencial para utilização em programas de pré-imunização

Alessandra Tenório Costa, William Mário de Carvalho Nunes, Maria Júlia Corazza, Carlos Alexandre Zanutto, Gerd Walter Müller

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - Universidade Estadual de Maringá – NBA/UEM. 87020-900 Maringá, PR, Brazil.

Autor para correspondência: Willian Mario de Carvalho Nunes (wmcnunes@uem.br)

Data de chegada: 07/03/2008. Aceito para publicação em: 22/09/2009.

1574

RESUMO

Costa, A.T.; Nunes, W.M.C.; Corazza, M.J.; Zanutto, C.A.; Muller, G.W. Caracterização Biológica e Molecular de Isolados do *Citrus tristeza virus* com potencial para utilização em programas de pré-imunização. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.81-82, 2010.

O experimento teve como objetivo caracterizar biológica e molecularmente os isolados de CTV, obtidos de árvores de laranja Pera em pomares das regiões Norte e Noroeste do Paraná, visando selecionar isolados fracos do *Citrus tristeza virus* com capacidade protetiva para pré-imunização. Os resultados apontaram sintomas

fracos a moderados de caneluras e revelaram similaridade genética da maioria dos isolados analisados e o isolado fraco controle, sugerindo que as plantas selecionadas estão infectadas por haplótipos fracos de CTV, com potencial para serem utilizadas como plantas matrizes.

Palavras-chave adicionais: *Citrus tristeza virus*, pré-imunização, caracterização biológica.

ABSTRACT

Costa, A.T.; Nunes, W.M.C.; Corazza, M.J.; Zanutto, C.A.; Muller, G.W. Biological and molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates with potential to use in cross-protection programs. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.81-82, 2010.

A cross-protection program citrus tristeza disease, caused by *Citrus tristeza virus* (CTV) has been developed in the Parana State, to obtain Pera orange mother plants. Thus, 20 plants were selected in the orange commercial fields of the North and Northwest region. Comparisons between mild and severe recognized isolates were

made. The results showed mild-to-moderate stem pitting symptoms and the great majority of the isolates grouped up with the mild control isolate. These results suggest that the plants selected were infected by CTV mild haplotypes showing that they have mother plant potential.

Keywords: *Citrus tristeza virus*, cross-protection, biological characterization

No Brasil, o programa de pré-imunização contra o *Citrus tristeza virus* (CTV), agente causal da tristeza do citros, foi responsável em conjunto com a adoção de outras medidas de controle pela recuperação dos pomares brasileiros (3).

No Paraná, estudos baseados no diagnóstico imunológico e análise SSCP (single strand conformational polymorphism), análise RFLP (restriction fragment length polymorphism) associada à sintomatologia, revelaram a ocorrência de isolados severos de CTV (isolado Rolândia) em pomares de laranja Pera da região Norte do Estado (7). Assim, um programa de pré-imunização foi instalado visando à obtenção de plantas matrizes de laranja Pera pré-imunizadas com isolados fracos do vírus, uma vez que é arriscado para a citricultura paranaense continuar baseando-se em clones oriundo de outros Estados.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar biológica e molecularmente os isolados de CTV, obtidos de árvores em pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado, estabelecendo comparações com isolados reconhecidamente fracos e severos do vírus. Para isso vinte plantas de laranja Pera [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], enxertadas sobre limão Cravo (*C. limonia* Osb.) aparentemente sem sintomas de

tristeza foram selecionadas.

Para a indexação biológica foi utilizado como indicadora limão Galego [*C. aurantiifolia*]. Durante essa avaliação foram observados os sintomas de palidez, suberificação das nervuras, enrolamento das folhas, canelura e crescimento da indicadora. A severidade do CTV e o crescimento das plantas indicadoras foram caracterizadas conforme Carvalho et al. (1), e aos sintomas de canelura foram atribuídos valores baseando-se na escala diagramática utilizada por Meissner-Filho et al. (2). Para a caracterização molecular foram utilizadas as técnicas de SSCP e RFLP conforme Valverde et al. (6), Sambrook et al. (5) e Rubio et al., (4). Os dados foram analisados pela análise de componentes principais e construído um dendrograma por UPGMA.

Os resultados da caracterização biológica nas indicadoras encontram-se resumidos na Tabela 1. Na avaliação quanto à sintomatologia de clorose e caneluras os resultados mostraram reações fracas de clorose e sintomas fracos a moderados de caneluras em todas as indicadoras inoculadas com as borbulhas das plantas selecionadas (Tabela 1).

Na análise de RFLP verificou-se grupos polimórficos a partir das

Tabela 1: Resultados dos testes de indexação biológica para tristeza dos citros das plantas selecionadas em pomares da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná e controles utilizados.

Nº de Ordem	Cultivares	Municípios/ Regiões	Clorose	Canelura	Crescimento da indicadora
1	'Pêra'	Nova Esperança/ NO	+	1,0	2,5
2	'Pêra'	Nova Esperança/ NO	+	1,0	3,5
3	'Pêra'	Nova Esperança/ NO	+	1,0	3,5
4	'Pêra'	Nova Esperança/ NO	+	1,0	4,0
5	'Pêra'	Nova Esperança/ NO	+	1,0	4,0
6	'Pêra'	Cruzeiro do Sul/ NO	+	1,0	3,5
7	'Pêra'	Cruzeiro do Sul/ NO	+	1,0	2,5
8	'Pêra'	Cruzeiro do Sul/ NO	+	1,0	4,0
9	'Pêra'	Cruzeiro do Sul/ NO	+	2,0	3,0
10	'Pêra'	Cruzeiro do Sul/ NO	+	1,0	3,5
11	'Pêra'	Prado Ferreira/ N	+	2,0	3,0
12	'Pêra'	Prado Ferreira/ N	+	1,0	2,0
13	'Pêra'	Prado Ferreira/ N	+	1,0	3,0
14	'Pêra'	Prado Ferreira/ N	+	1,0	3,0
15	'Pêra'	Prado Ferreira/ N	+	1,0	3,0
16	'Pêra'	Arapongas/ N	+	1,0	3,0
17	'Pêra'	Arapongas/ N	+	1,0	2,5
18	'Pêra'	Arapongas/ N	+	1,0	3,0
19	'Pêra'	Arapongas/ N	+	2,0	2,5
20	'Pêra'	Arapongas/ N	+	1,0	3,0
21	'Pêra IAC'	Controle Fraco	+	1,0	3,0
22	'Capão Bonito'	Controle Forte	+++	5,0	2,0
23	'Barão B'	Controle Forte	+++	4,0	2,0
24	'Rolândia'	Controle Forte	+++	4,0	2,0
G	'Galego'	Controle Sadio	+	0,0	2,0
G50	'Galego 50'	Controle Fraco	+	1,0	5,0

bandas geradas pela digestão com ambas as enzimas Hinf I e Rsa I. A digestão por estas enzimas geraram vários fragmentos, entretanto, um maior número de sítios de restrição foi observado para a enzima Rsa I. Já na análise de SSCP os perfis eletroforéticos apresentaram mais de duas bandas, indicando, que os isolados são constituídos por mais de um haplótipo de CTV.

O dendrograma gerado com base nas bandas polimórficas obtidas nessas análises revelou a formação de três grupos. O grupo 1 é formado apenas pelo isolado 'Rolândia' que divergiu de todos os demais. O grupo 2 é formado pelos isolados utilizados como controles fortes 'Capão Bonito' e 'Barão B' e pelos isolados 6 e 8 da região Noroeste. A similaridade genética apresentada por estes isolados em relação aos isolados fortes controles sugere que essas plantas podem vir a expressar sintomas severos. O grupo 3 é formado por isolados de ambas as regiões Norte e Noroeste, juntamente com o isolado 'Pêra IAC' utilizado como controle fraco (Figura 1).

Um diagrama de ordenação foi construído pela análise de componentes principais. No diagrama para este conjunto de dados 35,4% da variância total foi explicada pelos dois primeiros componentes (componente um responsável por 22,2% da variância e o componente

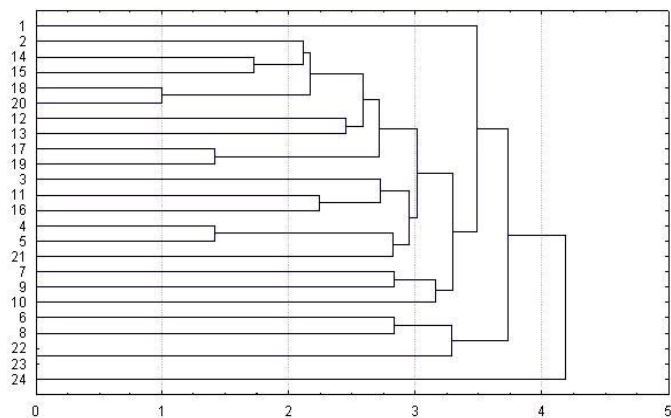


Figura 1. Dendrograma de agrupamento (UPGMA) dos 20 isolados de CTV das plantas selecionadas determinado por RFLP e SSCP. Controle fraco amostra = 21 isolado 'Pêra IAC'; Controles fortes amostras: 22 = isolado 'Capão Bonito', 23 = isolado 'Barão B' e 24 = isolado 'Rolândia'.

dois por 13,2%). Verificou-se o agrupamento entre os isolados das plantas selecionadas com o isolado 'Pêra IAC' controle fraco demonstrando a proximidade genética existente, de maneira semelhante à verificada no dendrograma (dados não apresentados).

Diante desses resultados podemos concluir que as plantas selecionadas estão infectadas por haplótipos fracos de CTV apontando potencialidade para serem utilizadas como plantas matrizes. Essa potencialidade será confirmada em uma próxima etapa através de testes de avaliação do desempenho dessas plantas a campo, acompanhada de novas análises moleculares para a verificação da estabilidade do complexo viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvalho, S.A.; Machado, M.A.; Baptista, C.R.; Muller, G.W.; Silverio, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.79-84, 1997.
- Meissner-Filho, P.E.; Soares-Filho, W.S.; Velame, K.V.C.; Diamantino, E.; Diamantino, M.S.A.. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.312-315, 2002.
- Müller, G.W.; Targon, M.L.N.; Machado, M.A. Trinta anos de uso do clone pré- imunizado Pêra IAC na citricultura paulista. **Laranjanja**, Cordeirópolis, v.20, p.399-408, 1999.
- Rubio, L.; Ayllón, M.A.; Guerri, J.; Pappu, H.; Niblett, C.; Moreno, P. Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, London, v.129, p.479-489, 1996.
- Sambrook, J.; Fritsh, J.; Manatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.1886.
- Valverde, R.A.; Nameth, S.T.; Jordan, R.L. Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.255-258, 1990.
- Zaninelli-Ré, M.L.Z. **Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná pela sintomatologia da tristeza e análise de RFLP do gene do capsídeo**. 2004. 57 f. Dissertação (Mestrado/ Agronomia) Universidade Estadual de Maringá, Maringá.