

BIANCA PIERINA CARRARO

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS
NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ ATRAVÉS DE SOROLOGIA E SSCP
DO GENE DO CAPSÍDEO**

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2002**

BIANCA PIERINA CARRARO

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS
NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ ATRAVÉS DE SOROLOGIA E SSCP
DO GENE DO CAPSÍDEO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
FEVEREIRO – 2002**

BIANCA PIERINA CARRARO

**AVALIAÇÃO DE ISOLADOS DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS
NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ ATRAVÉS DE SOROLOGIA E SSCP
DO GENE DO CAPSÍDEO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2002.

Prof^a Dr^a Maria Júlia Corazza-Nunes

Dr. Marcos Antonio Machado

Prof^a Dr^a Dagmar Ruth Stach-Machado

Prof. Dr. William Mário C. Nunes
Orientador

Aos meus pais, Ivo Marcos e Maria Eugenia,
Aos meus irmãos, César Felipe e Ana Carolina,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes, pela orientação, dedicação, amizade e oportunidade que me deu para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade concedida para a efetivação deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

Aos professores e colegas do laboratório de fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio e incentivo para que este trabalho fosse levado a termo.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira, nas pessoas do diretor, Dr. Joaquim Teófilo Sobrinho, e do Dr. Marcos Antônio Machado, coordenador do laboratório de biotecnologia em citros, onde parte deste trabalho foi realizada.

Aos pesquisadores e demais colegas do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, pelo auxílio e sugestões no experimento de laboratório.

À Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), na pessoa da Prof^a Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado, onde uma parte do trabalho foi realizada.

À Prof^a Dra. Maria Júlia Corazza-Nunes, pela co-orientação, amizade e auxílio em todas as fases deste trabalho.

Aos amigos Márcia, Ana, Cláudia, Marcos, Marquinho, Reinaldo, Gisele, Rúbia, Leandro, Carlos Alexandre, Érica e Francisco, pela contribuição e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

BIANCA PIERINA CARRARO, filha de Maria Eugenia Carraro e Ivo Marcos Carraro, nasceu em Viçosa, no Estado de Minas Gerais, aos 23 dias do mês de maio de 1978.

Graduou-se em Ciências Biológicas em fevereiro de 2000, pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Em março de 2000, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A tristeza dos citros.....	3
2.1.1. Histórico.....	3
2.1.2. Etiologia.....	4
2.1.3. Transmissão.....	4
2.1.4. Ciclo de hospedeiros e sintomatologia.....	5
2.1.5. Controle.....	7
2.1.6. Identificação.....	9
2.1.7. Caracterização molecular dos isolados do vírus da tristeza dos citros	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Material vegetal.....	12
3.2. Obtenção das amostras.....	13
3.3. Indexação imunológica	13
3.3.1. Anticorpo de captura policlonal x anticorpo de detecção monoclonal (método de captura 1)	14
3.3.2. Anticorpo de captura monoclonal x anticorpo de detecção policlonal (método de captura 2).....	14
3.4. Caracterização molecular.....	15
3.4.2. Síntese da primeira fita de cDNA	16
3.4.3. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) através da PCR	16
3.4.4. Purificação do gene da capa protéica.....	17
3.4.5. SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)	17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Avaliação sorológica dos isolados de CTV da região norte do Estado do Paraná.....	19
4.2. Caracterização molecular.....	23
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
APÊNDICE.....	32

RESUMO

CARRARO, Bianca Pierina, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2002. **Avaliação de Isolados do Vírus da Tristeza dos Citros (CTV) na Região Norte do Paraná Através de Sorologia e SSCP do Gene do Capsídeo.** Professor Orientador: William Mário de Carvalho Nunes. Professora Conselheira: Maria Júlia Corazza-Nunes.

A avaliação de isolados do vírus da tristeza dos citros (CTV) da região norte do Paraná foi realizada por meio de sorologia com diferentes anticorpos monoclonais, e análise SSCP do gene da proteína do capsídeo do vírus. Os resultados da avaliação sorológica revelaram que o método de combinação de anticorpos com monoclonal de captura versus policlonal de detecção foi mais eficiente, tanto na detecção como na diferenciação dos isolados. Na análise dos padrões SSCP, observou-se a ocorrência de quatro a seis bandas, sugerindo que cada complexo é constituído por uma mistura de duas a três estirpes de CTV. Verificou-se que as amostras apresentaram um perfil eletroforético semelhante ao das duas amostras coletadas no Estado de São Paulo, correspondentes aos isolados obtidos de plantas inoculadas com estirpes severas do complexo “Capão Bonito”. Além desse fato, valores significativos de absorbância (A_{405}) foram obtidos nessas amostras com todos os monoclonais específicos utilizados em DASI-ELISA, indicando que essas plantas podem estar infectadas por estirpes severas de CTV. Os pomares cítricos das regiões norte, noroeste e oeste do Paraná são bastante recentes e constituídos principalmente de mudas oriundas do Estado de São Paulo, formadas a partir de material pré-imunizado com o isolado 1743/82, denominado clone “Pêra IAC”, que tem controlado satisfatoriamente os danos induzidos pelo CTV no Brasil por mais de três décadas. No entanto, estudos recentes realizados em pomares do Estado de São Paulo revelaram que árvores com cerca de 3 a 4 anos, formadas a partir desse material pré-

imunizado, vêm apresentando sintomas severos do vírus. Fato semelhante pode estar ocorrendo nos pomares de laranja-pêra da região norte do Paraná.

ABSTRACT

CARRARO, Bianca Pierina, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, February 2002. **An evaluation of presence of strains of Citrus Tristeza Virus (CTV) in the Northern region of Paraná State through serology and SSCP analysis of the coat protein gene.** Adviser: William Mário de Carvalho Nunes. Committee Member: Maria Júlia Corazza-Nunes.

The evaluation of strains of citrus tristeza virus (CTV) in the Northern region of Paraná was realized through serology using different monoclonal antibodies and SSCP (Single-strand conformation polymorphism) analysis of the coat protein gene of CTV. The results of serological analysis showed that the combination of capture monoclonal X detection polyclonal was more efficient for detection as well as for differentiating CTV strains. SSCP analysis shown the presence of four to six bands in each electrophoretic profile, suggesting that each virus complex is a mix of two to three CTV strains. Some samples showed electrophoretic profiles very close of the two samples collected in São Paulo State which actually corresponded to strains recorded from plants inoculated with severe strains of the “Capão Bonito” CTV complex. In addition, a significant level of absorbance was recorded at 405 nm for all samples when DAS-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) using specific monoclonal antibodies were used. These data suggest that the samples are infected by severe strains of CTV. The orchards of Northern, Northwest and West regions of Paraná State are recent and mainly formed by scions from São Paulo State, formed by preimmunized material with the 1743/82 strain, named “Pêra IAC” clone, that have been controlled successfully the loss by CTV in Brazil for more than three decades. Although, recent studies did in orchards of São Paulo State showed that trees with ages about three to four years, formed by these preimmunized material, have been shown severe symptoms of CTV. Similar fact could be occur in orchards of “Pêra” sweet orange of Northern region of Paraná.

1. INTRODUÇÃO

A citricultura representa uma das principais atividades agroindustriais do mundo, na qual o Brasil se destaca como maior produtor. A cultura, principalmente de laranja, apresenta uma área de aproximadamente um milhão de hectares com uma produção de 18 milhões de toneladas anuais (IBGE, 2000, citado na Agriannual, 2001). Dos Estados produtores destacam-se Sergipe, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia e, especialmente, São Paulo, cuja produção representa 82% do total produzido no país (Amaro e Maia, 1997).

No Paraná, face à ocorrência do “cancro cítrico” nas regiões norte, noroeste e oeste do Estado, a citricultura permaneceu interdita por três décadas, ficando restrita à região do Alto Ribeira (Morimoto, 1990). O desenvolvimento de pesquisas, principalmente com relação ao controle da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, agente causal do cancro cítrico, aliado ao apoio governamental, tem possibilitado a liberação e o incremento da citricultura paranaense que vem apresentando, a partir da década de 80, uma evolução positiva na área de plantio, produção e exploração industrial de suco concentrado.

O grande desenvolvimento desse segmento da agroindústria brasileira deve-se muito mais à expansão da área de plantio do que ao aumento de produtividade. Dentre os problemas fitossanitários e horticulturais que se refletem na baixa produtividade, destaca-se a ocorrência de várias doenças.

A tristeza, causada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV), é a virose de maior importância econômica na cultura, afetando-a em escala mundial.

Em países onde o CTV e seu vetor, o pulgão preto (*Toxoptera citricidus* Kirk), são endêmicos, como no Brasil, os danos causados por isolados severos do vírus têm sido controlados por meio de porta-enxertos tolerantes e pela proteção cruzada com estirpes fracas protetivas (Müller e Costa, 1968, 1977; Costa e Müller, 1980). Atualmente, cerca de 80 milhões de plantas de laranja-pêra,

originadas de clones pré-imunizados com um único isolado protetivo, o 1743/82, têm assegurado a capacidade de proteção ao longo de trinta anos, não só em São Paulo, como em outros Estados (Costa e Müller, 1980).

Alguns pomares, principalmente da região sudoeste paulista, apresentaram alta incidência de plantas, clones de “Pêra IAC”, afetadas por estirpes severas do vírus denominadas de variante “Capão Bonito”. Esses fatos indicaram a necessidade da identificação de material mais tolerante, e de novos e melhores isolados para os programas de pré-imunização, não apenas em laranja-pêra, mas em outras variedades e espécies cítricas suscetíveis ao CTV (Müller et al., 1999).

No entanto, devido à ampla diversidade biológica do CTV, qualquer programa de controle requer procedimentos eficazes para a identificação e caracterização de isolados do vírus. Nesse sentido, as técnicas moleculares e sorológicas apresentam-se como ferramentas valiosas.

No Paraná, assim como em outros Estados, a implantação dos pomares foi realizada principalmente a partir de mudas oriundas do Estado de São Paulo, sem um controle fitossanitário rígido. Além disto, estudos minuciosos e acurados com relação à tristeza não têm sido realizados nos parques citrícolas paranaenses. Frente a essa realidade, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de:

- Avaliar a diversidade existente entre os isolados do vírus da tristeza dos citros (CTV) na região norte do Paraná;
- Estabelecer comparações entre os isolados do vírus da tristeza dos citros na região norte do Paraná com isolados severos de São Paulo;
- Testar métodos de combinação de anticorpos em DASI-ELISA;
- Verificar a eficiência de anticorpos monoclonais específicos para isolados do vírus da tristeza dos citros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A tristeza dos citros

2.1.1. Histórico

O vírus da tristeza dos citros (CTV), agente etiológico da tristeza dos citros, teve origem no Oriente, provavelmente na China, e foi disseminado pelo mundo através do transporte de material vegetativo contaminado. A tristeza foi registrada pela primeira vez no início do século XX, na Austrália e na África do Sul, quando se observou que plantas de laranja doce (*Citrus sinensis* Osb.) enxertadas em laranja azeda (*Citrus aurantium* L.) não se desenvolviam (Bar-Joseph et al., 1989). Árvores enxertadas em laranja azeda foram aniquiladas ou tornadas improdutivas na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil durante as décadas de 1930 e 1940 e, posteriormente, na Venezuela na década de 1980 (Müller e Costa, 1993; Bar-Joseph et al., 1989). O fracasso das tentativas em se enxertar laranja doce em laranja azeda foi atribuído à incompatibilidade entre copa e porta-enxerto (Bar-Joseph et al., 1989). Epidemias de tristeza também atingiram a Espanha e a Flórida na década de 1950 e Israel em 1970 (Bar-Joseph et al., 1989; Rocha-Penã et al., 1995).

No Brasil, vários pomares de laranja-pêra enxertados em porta-enxertos tolerantes ao vírus da tristeza foram severamente afetados pela doença no final da década de 1950. O plantio dessa variedade foi desaconselhado no Estado de São Paulo, e sugerida a substituição por outras cultivares com características semelhantes. Como a laranja-pêra é muito apreciada nos mercados interno e externo, considerou-se a necessidade de se desenvolverem métodos para a continuação do plantio dessa qualidade. Assim, foi efetuado, no início da década de 1960, um programa de pré-imunização ou proteção cruzada por meio de

estirpes fracas protetivas do vírus da tristeza dos citros na seção de Virologia do Instituto Agrônômico de Campinas (Müller et al., 1999).

2.1.2. Etiologia

Os vírus pertencentes à família *Closteroviridae* caracterizam-se por possuírem partículas alongadas e flexuosas de simetria helicoidal. O vírus da tristeza dos citros (CTV), membro dessa família, apresenta um tamanho que pode variar entre 700 e 2000nm de comprimento e de 10 a 12nm de diâmetro (Dolja et al., 1994) e está limitado ao floema das plantas infectadas (Bar-Joseph et al., 1989). Os vírions de CTV são heterodímeros e consistem de dois fragmentos: um maior, de aproximadamente 2000nm e encapsulado pela proteína p25 e outro menor, com aproximadamente 75-85nm, encapsulado pela proteína p27 (Febres et al., 1996).

O CTV possui o genoma constituído por RNA de fita simples (ssRNA) com senso positivo e não apresenta cauda poli-A na extremidade 3'. Seu peso molecular é de aproximadamente $6,5 \times 10^3$ kDa, que corresponde a 20.000 nucleotídeos, podendo ser considerado o maior genoma detectado entre os vírus de plantas (Bar-Joseph et al., 1989; Sekiya et al., 1991). Os vírions são encontrados principalmente no floema das plantas infectadas, em que a infectividade está associada somente às partículas inteiras (Müller e Costa, 1991).

2.1.3. Transmissão

O vírus da tristeza dos citros pode ser transmitido por enxertia, borbulhas, garfos e pedaços de folhas e raízes quando for estabelecida a união vascular entre os tecidos doadores e receptores. Os afídeos são os principais vetores e disseminam a doença facilmente pelos pomares (Müller e Costa, 1993).

A transmissão por afídeos ocorre de maneira semipersistente, com um período de aquisição e inoculação de pelo menos 30 minutos (Dolja et al., 1994). Os afídeos podem permanecer inoculativos por 24 até 48 horas após o período de aquisição (Bar-Joseph et al., 1989) e a eficiência da transmissão pode variar de acordo com a espécie do afídeo, o isolado do vírus e a planta hospedeira (Müller e Costa, 1993).

O CTV pode ser transmitido por sete espécies de afídeos: *Toxoptera aurantii*, *T. citricidus*, *Aphis gossypi*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Myzus persicae*, *Dactynotus jacaе*, sendo que o *Toxoptera citricidus* se apresenta como o mais eficiente (Dolja et al., 1994).

2.1.4. Ciclo de hospedeiros e sintomatologia

Os principais hospedeiros do vírus da tristeza dos citros pertencem à família Rutáceas e ao gênero *Citrus*, com exceção de algumas espécies de maracujá (*Passiflora*) que não são Rutáceas (Müller e Costa, 1993; Bar-Joseph et al., 1989).

A reação das diferentes espécies, híbridos e variedades de *Citrus* à infecção por CTV apresenta uma variação considerável. Plantas como *Poncirus trifoliata* e seus híbridos são resistentes ao CTV (Bar-Joseph et al., 1989); tangerinas apresentam-se tolerantes; laranjas doces e limão-cravo (*C. limonia* Osb.) podem sofrer danos quando infectados por estirpes severas do vírus; limas ácidas, pomelos e algumas variedades de laranjas doces, como a “Pêra”, são suscetíveis à tristeza (Müller e Costa, 1993).

A sintomatologia da tristeza está relacionada com a estirpe do vírus, condições ambientais e com as variedades cítricas utilizadas (Powell et al., 1992; Roistacher e Moreno, 1991).

Laranja doce (*C. sinensis* L. Osb) enxertada em laranja azeda (*C. aurantium* L.) é a indicadora de isolados do vírus que induzem declínio rápido. No campo, as árvores podem apresentar declínio rápido ou gradual de

acordo com a ocorrência de necrose do floema na região da enxertia. Quando borbulhas infectadas com isolados indutores de declínio rápido são enxertadas em plântulas de laranja azeda, as árvores resultantes apresentam nanismo e raramente produzem frutos em condições de mercado (Rocha-Peña et al., 1995).

Em combinações de citros suscetíveis ao vírus sobre porta-enxerto de laranja azeda podem-se observar sintomas caracterizados pelo bronzeamento das folhas e amarelecimento das nervuras principais, declínio rápido das plantas, brotamento de folhas pequenas e cloróticas, seca gradativa dos galhos, necrose dos tubos crivados da laranja azeda, podridão das radículas e morte da planta (Müller e Costa, 1993). Plantas de laranja azeda podem determinar a presença de isolados que causam o amarelecimento de plântulas, sendo que estes induzem sintomas como clorose e atrofia em plantas indicadoras de laranja azeda, lima ácida e pomelo. A reação de amarelecimento de plântulas pode evidenciar a presença de isolados que causam declínio ou caneluras (Rocha-Peña et al., 1995).

O limão galego é considerado um indicador sensível ao CTV e apresenta sintomas como clareamento de nervuras, acanoamento de folhas, nanismo e caneluras. No entanto, esses sintomas não refletem necessariamente a severidade do isolado em outras espécies e variedades de citros (Rocha-Peña et al., 1995).

O sintoma de caneluras (“stem pitting”) caracteriza-se por apresentar depressões rasas e alongadas no lenho dos troncos e ramos, impregnados por uma substância marrom. As plantas atingidas produzem safras pobres e a maioria dos frutos é miúda, de cor verde pálida, com formação defeituosa, elevada acidez e baixo teor de suco. São os vulgarmente chamados “coquinhos” (Müller e Costa, 1993). O amarelecimento de pé franco (“seedling yellow”) é observado em mudas de pé franco de pomelos, laranja azeda, limão verdadeiro e limão galego, quando inoculados por união de tecidos ou por grande número de afídeos virulíferos coletados de plantas afetadas por estirpes severas do vírus da tristeza. Os sintomas característicos são: parada drástica no crescimento, amarelecimento das folhas e formação de folhas pequenas e retorcidas (Müller e Costa, 1993).

As plantas infectadas pelo complexo “Capão Bonito” do vírus da tristeza dos citros (CTV-CB) caracterizam-se por apresentar redução no crescimento,

brotos axilares curtos, galhos quebradiços quando flexionados, folhas menores que o normal e com sintomas de deficiência de nutrientes, frutos menores, secos e com sementes malformadas. Quando retirada a casca dos ramos, observam-se caneluras severas, diferentes das encontradas em plantas de laranja doce presentes em outras regiões. Essas caneluras são mais numerosas, curtas e superficiais, podendo ser observadas pontuações escuras no lenho, produzidas por impregnações de goma, quando os ramos são cortados no sentido longitudinal (Müller e Costa, 1993).

2.1.5. Controle

Em países nos quais a tristeza não está amplamente disseminada, não há ocorrência do vetor mais eficiente, *T. citricidus*, e onde se utilizam porta-enxertos intolerantes, como é o caso dos Estados Unidos, Espanha e Israel, plantas de limão galego ou outras indicadoras e técnicas sorológicas são utilizadas na detecção do vírus. Uma vez constatada sua presença, as plantas são substituídas individualmente nos pomares pelo replantio com outras espécies ou variedades tolerantes (Müller e Costa, 1991).

O vírus da tristeza se tornou endêmico no Brasil, Argentina e Peru devido à existência do vetor *T. citricidus*, altamente eficiente. Desta forma as medidas de controle devem ser planejadas considerando-se sempre sua presença. Como medida de controle, nesses países, foi realizado o replantio com plantas enxertadas em porta-enxertos tolerantes (Müller e Costa, 1991). No entanto, observações posteriores, efetuadas em pomares comerciais, revelaram que copas de algumas variedades de laranja doce, limas ácidas e pomelos, não se desenvolviam satisfatoriamente, mesmo quando enxertadas em porta-enxertos tolerantes (Rezende e Müller, 1995).

Trabalhos realizados no começo da década de cinquenta demonstraram que estirpes fracas do vírus da tristeza dos citros eram capazes de impedir a manifestação de sintomas causados por estirpes severas. Assim, foi desenvolvido

um programa de pesquisa para o controle da doença por meio da técnica da pré-imunização ou proteção cruzada. Esta técnica consiste em promover a infecção de clones nucleares sadios de laranja-pêra, com isolados fracos do vírus da tristeza que possam oferecer proteção contra os severos, levando a um controle das manifestações da doença (Müller et al., 1999; Rezende e Müller, 1995). De 45 acessos de plantas-elite, originalmente selecionadas e testadas, dois foram considerados satisfatórios para a laranja-pêra, dois para o limão galego e um para o pomelo. Dos isolados obtidos para laranja-pêra, um, designado 1743/82 no registro de acessos de potenciais isolados fracos de tristeza, se destacou e tem mantido a proteção ao longo de trinta anos em São Paulo e em outros Estados. As alterações na severidade dos sintomas têm sido praticamente ausentes desde que foram distribuídas as primeiras plantas de laranja-pêra pré-imunizadas em 1968. No entanto, plantas com sintomas severos de tristeza têm sido observadas nos últimos anos em alguns pomares, principalmente na região do sudoeste paulista no município de Capão Bonito (Müller et al., 1999).

De acordo com Müller et al. (1999) e Rezende e Müller (1995), este fato pode ser atribuído à mistura de vírus resultantes da contaminação de porta-enxerto pelo complexo normal do vírus em condições de viveiro, e casos de intensificação de sintomas podem estar relacionados à quebra da proteção ou a proteção incompleta.

O sucesso da utilização da pré-imunização no controle da tristeza não está restrita ao Brasil. Na Austrália, a pré-imunização tem sido empregada para o controle da doença em plantas de pomelo, com resultados bastante satisfatórios. No Japão, o plantio de pomelo Hassaku (*C. Hassaku* Hoat e Tan), em Hiroshima, só tem sido possível graças à proteção cruzada com o isolado fraco protetivo do vírus denominado HM-55. Há referência ainda de que a tristeza vem sendo controlada eficientemente por pré-imunização na Índia e Israel (Rezende e Müller, 1995).

Van Vuuren et al. (1993) relataram os resultados experimentais, usando nove isolados do vírus para a proteção contra o "stem pitting" (caneluras) em pomelos na África do Sul.

2.1.6. Identificação

O procedimento comum para identificar o vírus da tristeza consiste na inoculação por enxertia de plântulas de limão galego com gemas da planta a testar. Pode-se também utilizar o teste de dupla enxertia, enxertando-se a planta indicadora limão-galego em porta-enxerto vigoroso (Müller e Costa, 1993; Roistacher e Moreno, 1991).

Técnicas sorológicas, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), que se baseiam na utilização de anticorpos marcados por imunofluorescência, radioatividade ou enzimas, têm sido bastante aplicadas na identificação de patógenos por ser um método rápido e indicado para testar um grande número de amostras (Almeida, 1995; Müller e Costa, 1993).

A grande diversidade sorológica que ocorre entre os isolados de CTV tem sido caracterizada por imunodiagnósticos com anticorpos monoclonais e policlonais. Os anticorpos monoclonais podem reconhecer um único sítio antigênico na proteína do capsídeo do vírus, possibilitando a identificação de isolados específicos, ou atuar como universais reagindo com vários isolados.

O monoclonal MCA-13 foi desenvolvido a partir do isolado T-36 que induz declínio em plantas cítricas na Flórida. Esse anticorpo reage apenas com isolados severos da Flórida que causam declínio, mas não discrimina os isolados que causam caneluras (Permar e Garnsey, 1991; Nikolaeva et al., 1998).

Cambra et al. (1993) avaliaram a diversidade de epitopos de isolados do vírus da tristeza dos citros na Espanha e verificaram que os monoclonais 3DF1 e 3CA5 reagiram com um grande número de estirpes, independentemente dos sintomas induzidos no hospedeiro. Estes monoclonais têm sido utilizados como “universais” (Powell et al., 1992). Nas condições da Espanha, o monoclonal MCA-13 não reagiu com isolados que induzem declínio em laranja azeda.

Anticorpos monoclonais específicos para estirpes severas brasileiras do complexo “Capão Bonito” foram produzidos por Stach-Machado et al. (1998) a partir de proteínas recombinantes codificadas pelo gene do capsídeo de isolados severos do CTV presentes em laranja-pêra.

2.1.7. Caracterização molecular dos isolados do vírus da tristeza dos citros

A caracterização molecular de isolados de CTV em plantas cítricas tem sido realizada através da análise do dsRNA (double-strand RNA) de plantas infectadas (Nickel et al., 1996; Moreno et al., 1996); análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene da proteína do capsídeo do vírus (Valle et al., 2000; Gillings et al., 1993, 1996); seqüenciamento do gene da capa protéica do CTV de diferentes isolados (Targon et al., 2000); e pela análise de polimorfismo conformacional de fita simples do DNA (SSCP) (Rubio et al., 1996).

O método SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) é baseado no princípio de que a fita simples de DNA, em condição não desnaturante, apresenta uma conformação linear determinada por interações intramoleculares. A molécula de DNA, contendo alguma mutação, mesmo que seja por uma única base, terá uma estrutura secundária diferente, resultando na mudança de sua mobilidade durante a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. O método é capaz de distinguir estirpes virais cujos produtos da reação RT-PCR apresentam igual mobilidade em gel de agarose.

Rubio et al. (1996) afirmam que a técnica de SSCP pode ser utilizada para identificar e diferenciar isolados de CTV baseada na comparação de vários genes ou regiões do genoma. É um método rápido, barato e pode reduzir a quantidade de seqüenciamentos necessários para comparações acuradas.

O procedimento de SSCP foi utilizado por Febres et al. (1995) para identificar diferenças nas seqüências de ácidos nucleicos entre isolados do CTV. As análises foram feitas com os genes da p27 e da p23 do vírus, tendo sido detectadas diferenças nos dois genes entre os isolados utilizados. Isolados fracos produziram um mesmo padrão, diferente do padrão produzido por isolados causadores de caneluras.

A caracterização de isolados de CTV em variedades de laranja doce, inicialmente sadias, foi realizada por Souza et al. (2000a), após três anos no campo, empregando a técnica de SSCP. Os autores detectaram uma mistura de

estirpes do vírus em todas as plantas estudadas, tendo os isolados coletados no segundo ano do experimento mostrado bastante diferença nos padrões SSCP entre variedades e clones. Os padrões dos isolados coletados no terceiro ano foram menos complexos do que aqueles observados depois de dois anos. Somente dois isolados se mantiveram estáveis com padrões similares de SSCP entre o segundo e o terceiro ano. Dependendo da estabilidade e da capacidade protetiva, esses isolados poderão ser usados em programas de pré-imunização.

Souza et al. (2000b) avaliaram as mudanças ocorridas em isolados fracos protetivos de CTV em laranja doce cv. “Pêra”, usando RFLP e SSCP do gene da proteína do capsídeo. As análises SSCP revelaram padrões complexos e diferentes em quase todos os isolados de CTV, mostrando que pode ter havido quebra da proteção.

Corazza-Nunes et al. (2001) avaliaram complexos do vírus da tristeza dos citros em pomelos “Marsh Seedless” pré-imunizados e observaram pela sintomatologia de caneluras, produção, diâmetro do fruto e desenvolvimento vegetativo, a quebra da proteção cruzada nos quatro isolados protetivos utilizados. A análise dos padrões SSCP mostrou a ocorrência de mais de duas bandas em cada perfil eletroforético, sugerindo uma mistura complexa de estirpes do CTV em cada planta. Diferentes padrões de bandas foram observados entre plantas inoculadas com o mesmo isolado, indicando que diferentes complexos de estirpes estabeleceram-se durante os anos do experimento. Correlações entre padrões de bandas e severidade sugeriram que isolados de algumas plantas podem ser usados em programas de pré-imunização em pomelos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

O material utilizado neste trabalho foi coletado de plantas sintomáticas em propriedades agrícolas da região norte do Paraná, no município de Rolândia e no município de Nova América da Colina, região de Cornélio Procópio, Paraná. Dois isolados da variante “Capão Bonito” foram gentilmente cedidos pelo Dr. Gerd Walter Müller, pesquisador do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Cordeirópolis, São Paulo. A variedade de *Citrus sinensis* analisada foi a “Pêra”. (Quadro 1).

As plantas apresentam idade de sete anos, no Sítio Progresso, em Rolândia, três anos no Sítio Nossa Senhora Aparecida e seis anos no Sítio Oshima, situados em Nova América da Colina (Cornélio Procópio).

Quadro 1 – Locais da coleta das amostras de citros (*C. sinensis* L. Osb) para avaliação, pelo teste ELISA, do vírus da tristeza dos citros (CTV)

Amostra	Local	Município
1-SP-Rol	Sítio Progresso	Rolândia – PR
2-SP-Rol	Sítio Progresso	Rolândia – PR
3-SP-Rol	Sítio Progresso	Rolândia – PR
4-SP-Rol	Sítio Progresso	Rolândia – PR
5-SP-Rol	Sítio Progresso	Rolândia – PR
6-NSA-NAC	Sítio Nossa Sra. Aparecida	Nova América da Colina-PR
7-NSA-NAC	Sítio Nossa Sra. Aparecida	Nova América da Colina-PR
8-NSA-NAC	Sítio Nossa Sra. Aparecida	Nova América da Colina-PR
9-SO-NAC	Sítio Oshima	Nova América da Colina-PR
10-SO-NAC	Sítio Oshima	Nova América da Colina-PR
11-SO-NAC	Sítio Oshima	Nova América da Colina-PR
12-CB-CCSM	Centro de Citricultura Sylvio Moreira	Cordeirópolis-SP
13-CB-CCSM	Centro de Citricultura Sylvio Moreira	Cordeirópolis-SP

3.2. Obtenção das amostras

Ramos jovens e folhas foram colhidas dos quadrantes norte, sul, leste e oeste das plantas e com auxílio de um bisturi foram retiradas cascas dos ramos e as nervuras principais das folhas compondo uma única amostra. Esse material foi liofilizado e mantido em freezer a -20° C.

3.3. Indexação imunológica

A detecção do vírus da tristeza dos citros (CTV) foi determinada por meio de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) na versão “Sandwich” de duplo anticorpo, segundo a metodologia descrita por Clark et al. (1986).

As amostras liofilizadas foram pesadas (0,5 g), trituradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e ressuspendidas em 5 ml de tampão de extração (PBS-Tween 2% PVP (polivinilpirrolidona)). Para obtenção do sobrenadante, as amostras foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 minutos.

Para a avaliação sorológica foi utilizado o anticorpo policlonal PCA 1006/Br (diluição: 1:1000), produzido em coelho, e os anticorpos monoclonais 30G02 e 37G11, produzidos a partir das proteínas recombinantes CB-104 e CB-22 do capsídeo viral de estirpes severas do complexo “Capão Bonito”, 39-08, produzido pela proteína CB-104, e IC-04-08, produzido pela proteína CB-22.

Vários ensaios foram realizados testando-se combinações de anticorpos de cobertura (captura) e de detecção. As proteínas CB-22 e CB-104 foram utilizadas como controle positivo e extratos de plantas sadias como controle negativo. Valores de absorvância menores que três vezes o valor do controle negativo foram desconsiderados.

3.3.1. Anticorpo de captura policlonal x anticorpo de detecção monoclonal (método de captura 1)

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl/poço do anticorpo policlonal PCA 1006/Br em tampão carbonato 0,2 M pH 9,6 e incubadas por 12 horas a 4° C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço de tampão PBS com 2% de leite em pó desnatado e incubadas durante 1 hora a 37° C. Foi feita a lavagem das placas três vezes com uma solução de PBS + 0.05% Tween 20 (PBST). Após a lavagem, foram adicionados 100 µl/poço da solução de extração contendo 0,5 g da amostra em 5 ml de 2% PVP (polivinilpirrolidona) diluído em tampão PBST, os controles positivos (proteínas CB-22 e CB-104), e o controle negativo (amostra sadia). A incubação foi realizada por 12 horas a 4° C e as placas foram lavadas quatro vezes com tampão PBST. Como segundo anticorpo, foram adicionados 100 µl/poço dos anticorpos monoclonais 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08, na diluição 1:1.000. As placas foram incubadas por 2 horas a 37° C e após, foi feita a lavagem por três vezes com tampão PBST. Em seguida, foram acrescentados 100 µl/poço do conjugado anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com fosfatase alcalina na diluição de 1:30.000 em PBS. Depois de incubação a 37° C por 1 hora e lavagem com tampão PBST, adicionou-se 100 µl/poço do substrato pNPP (para-nitrofenil fosfato) na concentração de 1mg/ml diluído em tampão do substrato (0,05 M Dietanolamina pH 9,6). Incubou-se no escuro à temperatura ambiente por 1 e 2 horas. A leitura da absorbância a 405nm foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems Multiskan MCC-340).

3.3.2. Anticorpo de captura monoclonal x anticorpo de detecção policlonal (método de captura 2)

Neste método foram utilizados os anticorpos monoclonais 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08 na sensibilização das placas e o anticorpo policlonal

PCA 1006/Br na detecção, como segundo anticorpo. Os procedimentos de incubação e lavagem foram semelhantes ao descrito anteriormente.

3.4. Caracterização molecular

3.4.1 Isolamento de dsRNA

O dsRNA foi isolado de acordo com os procedimentos descritos por Valverde et al. (1990). Um grama de tecido infectado liofilizado foi triturado com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e transferido para erlenmeyer de 125 ml, contendo: 7 ml de 2x STE (1x STE é composto de 0,05 M Trizma base; 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA; pH 6,8 com HCl); 7 ml de fenol; 7 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e 1,6 ml de 20% SDS. A mistura foi vigorosamente agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente, transferida para tubos de centrífuga de 50 ml e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 6.000 x g, 4° C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para tubos falcon de 50 ml, a concentração de etanol foi ajustada para 16% e o volume foi completado para 10 ml com 2x STE.

As amostras foram aplicadas em seringas contendo colunas de CF-11 (Celulose Fibrosa – Whatman) preparada com 1x STE com 16% etanol (2g CF-11; 50 ml de 1x STE + 16% etanol). A coluna foi lavada com 80 ml de STE contendo 16% etanol e com 5 ml de STE. O dsRNA foi eluído em 20 ml de STE e logo depois foi adicionado etanol para uma concentração final de 16%. As amostras foram aplicadas numa segunda coluna contendo metade do volume da primeira, como descrito acima. Após lavagem com 2,5 ml de STE, o dsRNA foi eluído em 6 ml de STE e precipitado com 0,1 volume de 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, durante 16 horas a -20° C. Com a retirada do sobrenadante o dsRNA foi coletado por centrifugação a 12.000 x g, durante 25

minutos a 4° C, lavado com 1,5 ml de 70% etanol e transferido para microtubos. Foi realizada uma microcentrifugação a 8.000 x g durante 15 minutos a 4° C e logo depois da retirada do etanol, o dsRNA foi seco em liofilizador e suspenso em 50 µl de água milli-Q autoclavada. O dsRNA foi analisado por eletroforese em gel 1% de agarose preparado em TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA) contendo 2 µl de brometo de etídio e fotografado sob luz UV (ultravioleta) em EAGLE EYE II Stratagene.

3.4.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada como descrito por Sambrook et al. (1989). Para o preparo das reações, o dsRNA foi inicialmente desnaturado a 75° C por 8 minutos e colocado imediatamente no gelo. As reações foram preparadas em um volume de 20 µl, contendo: tampão 5x da MuMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase), dsRNA desnaturado, Random primer (Gibco-BRL), dNTP, DTT, RNAsin (Gibco-BRL), MuMLV-RT (Gibco-BRL) e água milli-Q autoclavada. A síntese foi realizada em PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) a 37° C por 2 horas.

3.4.3. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) através da PCR

A amplificação do GCP foi realizada utilizando-se dois primers específicos CN-119-CTV (5' AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG 3') e CN-120-CTV (5' GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC 3') derivados do haplotipo T-36 da Flórida. O PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) foi programado para 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94° C, anelamento por 1 minuto a 55° C e síntese de DNA por 2 minutos a 72° C, seguidos de um período de extensão de 5 minutos a 72° C. As reações de PCR foram preparadas num volume de 25 µl contendo: tampão 10x

(200mM Tris-HCl, p H8,4; 500 mM KCl), MgCL₂ (Life Technologies do Brasil), dNTP, CN-119-CTV (forward), CN-120-CTV (reverse), Taq DNA Polymerase (Life Technologies do Brasil), cDNA e água milli-Q autoclavada.

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por meio de eletroforese em gel 1% de agarose contendo 2 µl de brometo de etídio e foram fotografados sob luz UV (ultravioleta) em EAGLE EYE II Stratagene.

3.4.4. Purificação do gene da capa protéica

O GCP foi purificado em gel de agarose 0,8% de baixo ponto de fusão (LMP) de acordo com o indicado por Sambrook et al. (1989).

A purificação foi realizada com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e o GCP foi precipitado com 0,1 volume de 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, durante 12 horas a -20° C. O GCP foi coletado por meio de centrifugação a 6.000 x g por 30 minutos e lavado com 70% etanol. Foi feita outra centrifugação a 6.000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dispensado, o GCP foi seco em liofilizador e suspenso em 12 µl de água milli-Q autoclavada.

O GCP purificado foi analisado por eletroforese em gel 1% de agarose contendo 2 µl de brometo de etídio e fotografado sob luz UV (ultravioleta) em EAGLE EYE II Stratagene.

3.4.5. SSCP (Single Stranded Conformational Polymorphism)

As análises SSCP foram realizadas de acordo com a metodologia usada por Souza et al. (2000a) e Corazza-Nunes et al. (2001). As amostras 1, 2, 3, 4 e 5, foram coletadas no sítio Progresso em Rolândia; as amostras 6, 7 e 8, do sítio Nossa Sra. Aparecida em Nova América da Colina; as amostras 9, 10 e 11, do

sítio Oshima em Nova América da Colina; e as amostras 12 e 13, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira em Cordeirópolis.

Alíquotas de 1 a 10 µl do produto de amplificação do GCP purificado foram misturadas com igual volume de solução desnaturante (95% de formamida, 2 mM de EDTA e 0,05% azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas a 95° C por 10 minutos, colocadas imediatamente no gelo e, em seguida, submetidas a eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM de EDTA, pH 8,5), a 200 volts por 15 horas a 25° C. O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com o procedimento descrito por Beidler et al. (1982)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação sorológica dos isolados de CTV da região norte do Estado do Paraná

Os dados da avaliação imunológica dos isolados do vírus da tristeza dos citros (CTV), obtidos das amostras coletadas no Paraná, foram analisados por meio de dois métodos pela combinação de anticorpos de captura e de detecção (Quadros 2 e 3). Os valores de absorvância representam as médias de três repetições.

No método policlonal de captura versus monoclonal de detecção (Quadro 2), um comportamento semelhante foi observado entre os monoclonais 30G02 e IC-04-08, tendo os valores de $A_{(405)}$ determinados pelo ELISA sido maiores quando estes anticorpos foram utilizados. Títulos menores foram obtidos com os monoclonais 37G11 e 39-08. Estes resultados podem sugerir que os anticorpos monoclonais 30G02 e IC-04-08 estão reconhecendo, por este método, uma ampla gama de epitopos, enquanto os anticorpos 37G11 e 39-08 são mais específicos na identificação de estirpes severas.

Considerando os altos títulos obtidos com os monoclonais 30G02 e IC-04-08 na maioria das amostras, a relação de absorvância ($R_{A_{405}}$) foi calculada respectivamente entre estes anticorpos e os monoclonais específicos 37G11 e 39-08. Os valores de $R_{(30G02/37G11)}$ variaram de 1,6 a 14,3 e $R_{(IC-04-08/37G11)}$ de 1,1 a 10,9. Já a relação $R_{(30G02/39-08)}$ variou de 1,8 a 15,8 e $R_{(IC-04-08/39-08)}$ de 2,9 a 17,1 (Quadro 2).

De acordo com Machado et al. (1997), a relação de absorvância entre monoclonais universais e específicos ($R_{MU/ME}$) representa uma medida indireta de determinação de complexos virais. Baixos valores de $R_{(A_{405})}$ como resultado de altos valores de $A_{(405)}$ indicariam que o complexo tem uma fração significativa de epitopos reconhecidos pelos monoclonais específicos e vice-versa. Como se pode observar no Quadro 2, muitos epitopos foram reconhecidos pelo monoclonal

37G11 nas amostras 5 (Rolândia), 7 e 8 (Nova América da Colina) e por ambos os monoclonais específicos nas amostras 11 (Nova América da Colina) e 13 (SP/CCSM).

Quadro 2 – Valores médios das D.O. 405nm obtidas em ELISA Sandwich utilizando o antissoro policlonal 1006 anti-CTV (1:1000) como anticorpo de captura e os anticorpos monoclonais 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08 (1:1000) como anticorpo de detecção. Segunda leitura – 2 horas depois do substrato

Antígenos	30G02	IC-04-08	37G11	R _{30G02/37G11}	R _{IC0408/37G11}	39-08	R _{30G02/39-08}	R _{IC0408/39-08}
*CB-22	1,340	1,122	0,928			0,568		
*CB-104	1,031	0,634	0,722			0,734		
**Pl. sadia	0,008	0,006	0,037			0,039		
1-SP-Rol	0,773	0,904	0,120	6,4	7,5	0,193	4,0	4,6
2-SP-Rol	1,213	0,909	0,233	5,2	3,9	0,115	10,0	7,9
3-SP-Rol	0,828	0,551	0,060	13,8	9,8	0,126	6,6	4,3
4-SP-Rol	1,145	0,547	0,080	14,3	6,8	0,132	8,6	4,1
5-SP-Rol	0,509	0,504	0,140	3,6	3,6	0,060	8,4	8,4
6-NSA-NAC	0,973	0,764	0,070	13,9	10,9	0,110	8,8	6,9
7-NSA-NAC	0,244	0,335	0,147	1,6	2,2	0,030	8,1	11,1
8-NSA-NAC	0,158	0,171	0,159	0,9	1,1	0,010	15,8	17,1
9-SO-NAC	0,014	0,065	0,110	0,12	0,5	0,004	3,5	16,2
10-SO-NAC	0,044	0,020	0,158	0,27	0,1	0,024	1,8	0,8
11-SO-NAC	0,206	0,175	0,107	1,9	1,6	0,060	3,4	2,9
12-CB-CCSM	0,649	0,657	0,105	6,1	6,2	0,090	7,2	7,3
13-CB-CCSM	0,185	0,314	0,101	1,8	3,1	0,070	2,6	4,4

* = controle positivo

** = controle negativo

Valores de $A_{(405)}$ inferiores a 0,10 foram observados nas amostras 9 e 10 com os monoclonais 30G02 e IC-04-08. Considerando que títulos altos foram obtidos com estes monoclonais na maioria das amostras, concluiu-se que as

reações não foram significativas nestes casos. Títulos muito baixos foram obtidos na maioria das amostras com o anticorpo monoclonal 39-08, inclusive com os extratos vegetais 12 e 13 (SP/CCSM), oriundos de plantas inoculadas com estirpes severas do complexo “Capão Bonito”.

Quando anticorpos monoclonais foram utilizados na cobertura das placas e o policlonal PCA 1006/BR como segundo anticorpo (método monoclonal de captura versus policlonal de detecção) altos títulos foram observados com o monoclonal 30G02, produzido a partir das proteínas recombinantes CB-22 e CB-104 do capsídeo do vírus. Relações de absorvância ($R_{A_{405}}$) com valores positivos foram observadas entre este monoclonal e os específicos, inclusive com o IC-04-08 (Quadro 3). De acordo com Corazza-Nunes et al. (2001) este monoclonal está reconhecendo um determinante sorológico comum a uma ampla gama de isolados, fortes e fracos. Semelhantemente, os monoclonais 3DF1 e 3CA5, produzidos para reconhecer estirpes severas de CTV, reagiram uniformemente contra todos os 23 isolados representantes de coleções da Europa, Ásia e América do Norte (Vela et al., 1988). O caráter universal destes monoclonais foi verificado em muitos experimentos de caracterização de isolados de CTV (Machado et al., 1997; Powell et al., 1992).

Os valores de $A_{(405)}$ obtidos com os monoclonais 37G11, 39-08 e IC-04-08 foram inferiores aos observados com o monoclonal universal 30G02. Os anticorpos 37G11 e 39-08 apresentaram baixos valores de $A_{(405)}$, independentemente do local de amostragem (Rolândia ou Cornélio Procópio). Os valores de $R_{(30G02/37G11)}$ e $R_{(30G02/39-08)}$ foram superiores a quatro na maioria das amostras, indicando que o complexo apresenta uma pequena fração de epitopos reconhecidos por estes monoclonais. Valores de $R_{(30G02/IC-04-08)}$ inferiores a 4 foram obtidos com todas as amostras, o que pode significar que muitos epitopos da estirpe severa CB-22 foram reconhecidos pelo monoclonal IC-04-08 ou que, como observado com o primeiro método, este anticorpo está reagindo com muitos haplotipos do vírus.

As amostras 9 e 10, coletadas no município de Nova América da Colina, apresentaram baixos valores de A_{405} com o monoclonal 30G02 e baixos valores

de $R_{(30G02/37G11)}$, $R_{(30G02/39-08)}$ e $R_{(30G02/IC-04-08)}$, sugerindo que muitos epitopos de estirpes severas de CTV foram reconhecidas nestes extratos de plantas pelos monoclonais específicos utilizados.

Todas as amostras apresentaram valores de $A_{(405)}$ superiores a três vezes o valor do controle negativo com todos os monoclonais utilizados, com exceção da amostra 1 (município de Rolândia) na reação com o anticorpo 37G11, demonstrando que o método monoclonal de captura versus policlonal de detecção revelou-se mais eficaz na captura de CTV dos extratos de plantas infectadas.

A eficiência de anticorpos monoclonais na cobertura das placas para captura de CTV foi também verificada por Nikolaeva et al. (1997) em teste DASI-ELISA. No entanto, ao utilizarem os dois métodos para diferenciar isolados de CTV que causam caneluras dos que causam declínio em laranja doce, os autores observaram que a combinação policlonal de captura versus monoclonal de detecção foi mais seletiva para isolados que causam caneluras, tendo os anticorpos reagido uniformemente com todos os isolados quando os monoclonais foram colocados na cobertura da placa (Nikolaeva et al. 1998).

Como mostra o Quadro 3, reações diferenciadas foram observadas com os quatro anticorpos monoclonais utilizados. Enquanto o monoclonal 30G02 se apresentou com um caráter universal, reconhecendo uma ampla gama de epitopos, os monoclonais 37G11, 39-08 e IC-04-08 indicaram ser mais específicos no reconhecimento de estirpes severas.

Quadro 3 – Valores médios das D.O. 405nm obtidas em ELISA Sandwich utilizando os anticorpos monoclonais 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08 (1:1000) como anticorpos de captura e o antissoro policlonal 1006 anti-CTV (1:1000) como anticorpo de detecção. Segunda leitura – 2 horas depois do substrato

Antígenos	30G02	37G11	R _{(30G02}	39-08	R _{(30G02}	IC-04-08	R _{(30G02}
			/37G11)		/39-08)		/IC0408)
*CB-22	2,250	1,733		1,933		1,471	
*CB-104	2,085	1,640		1,909		1,220	
**Pl. sadia	0,007	0,038		0,021		0,019	
1-SP-Rol	1,500	0,037	40,5	0,302	4,9	0,477	3,1
2-SP-Rol	1,213	0,149	8,1	0,313	3,8	0,507	2,3
3-SP-Rol	1,677	0,306	5,4	0,189	8,8	0,642	2,6
4-SP-Rol	1,776	0,377	4,7	0,303	5,8	0,626	2,8
5-SP-Rol	1,263	0,281	4,4	0,220	5,7	0,492	2,5
6-NSA-NAC	1,854	0,145	12,7	0,155	11,9	0,615	3,0
7-NSA-NAC	0,965	0,153	6,3	0,137	7,0	0,413	2,3
8-NSA-NAC	0,624	0,145	4,3	0,235	2,6	0,209	2,9
9-SO-NAC	0,391	0,279	1,4	0,152	2,5	0,285	1,3
10-SO-NAC	0,237	0,161	1,4	0,115	2,0	0,191	1,2
11-SO-NAC	0,698	0,161	4,3	0,239	2,9	0,264	2,6
12-CB-CCSM	1,038	0,123	8,4	0,263	3,9	0,708	1,4
13-CB-CCSM	1,071	0,254	42	0,163	6,5	0,469	2,2

* = controle positivo

** = controle negativo

4.2. Caracterização molecular

Na caracterização molecular do gene do capsídeo do vírus da tristeza dos citros (CTV), as treze amostras testadas produziram, após a transcrição reversa e o PCR, um fragmento de DNA correspondente ao gene da proteína do capsídeo do vírus. Nas análises SSCP, as variáveis consideradas foram o número de bandas e suas posições em cada perfil eletroforético (Figura 1).

Os perfis eletroforéticos apresentaram um número de quatro a seis bandas. Como cada banda observada corresponde a uma fita de DNA do dúplice do gene da proteína do capsídeo, verifica-se que cada complexo é constituído por uma mistura de duas a três estirpes. Estes resultados comprovam que, em condições de campo, as plantas são geralmente infectadas por isolados

constituídos por uma mistura de estirpes como descrito por Gillings et al. (1996), Souza et al. (2000a) e Corazza-Nunes et al. (2001).

A análise SSCP demonstrou que há uma baixa diversidade genética entre os isolados de CTV coletados na região norte do Paraná. Padrões de bandas

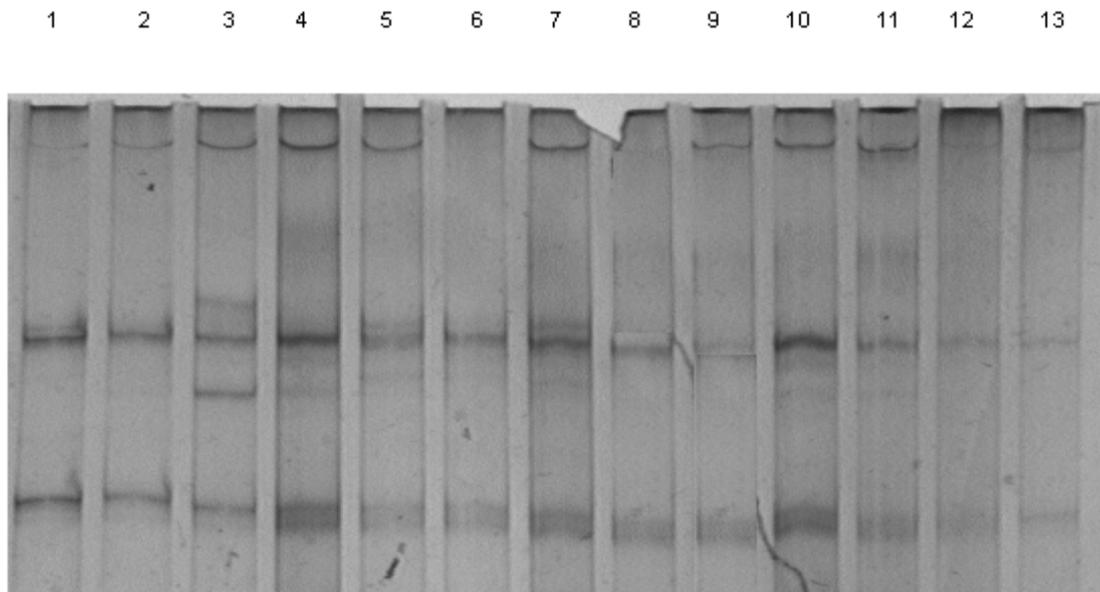


Figura 1 – Padrões SSCP de isolados do vírus da tristeza dos citros coletados em amostras 1, 2, 3, 4 e 5, coletadas no sítio Progresso, Rolândia; amostras 6, 7 e 8, coletadas no sítio Nossa Senhora Aparecida, Nova América da Colina; amostras 9, 10 e 11, coletados no sítio Oshima, Nova América da Colina; amostras 12 e 13, isoladas da variante “Capão Bonito”.

semelhantes foram observados entre os perfis 1 e 2 correspondentes às amostras coletadas no município de Rolândia (Figura 1). Os perfis eletroforéticos do intervalo de 4 a 11, que representam amostras coletadas nos municípios de Rolândia e Nova América da Colina, apresentaram um padrão de bandas bastante similar ao das amostras 12 e 13, correspondentes aos isolados oriundos do Estado de São Paulo, obtidos de plantas inoculadas com estirpes severas do complexo “Capão Bonito”. Considerando-se que, além deste fato, valores significativos de $A_{(405)}$ foram obtidos nestas amostras com todos os monoclonais específicos

utilizados no teste DASI-ELISA (Quadro 3), pode-se sugerir que estas plantas estejam infectadas por variantes severos do vírus.

Os pomares cítricos das regiões norte, noroeste e oeste do Paraná são bastante recentes e constituídos principalmente de mudas oriundas do Estado de São Paulo, formadas a partir de material pré-imunizado com o isolado 1743/82, denominado clone “Pêra IAC”, que tem controlado satisfatoriamente os danos induzidos pelo CTV no Brasil por mais de três décadas.

No entanto, estudos recentes realizados em pomares do Estado de São Paulo revelaram que árvores com cerca de 3 a 4 anos, formadas a partir deste material pré-imunizado, vêm apresentando sintomas severos do vírus (Müller et al., 1999; Souza et al., 2000b). Fato semelhante pode estar ocorrendo nos pomares de laranja-pêra da região norte do Paraná.

Estudos minuciosos e acurados são necessários para uma melhor caracterização da tristeza no Paraná. Tais informações poderão contribuir para o planejamento de estratégias de controle e levantamento de novos e melhores isolados protetivos para programas de proteção cruzada. Para tais estudos, as técnicas moleculares e imunológicas, associadas à avaliação da sintomatologia, representam ferramentas valiosas.

5. CONCLUSÕES

- Por avaliação sorológica, utilizando DASI-ELISA, o método com anticorpo monoclonal na captura e policlonal na detecção apresentou títulos maiores com todos os monoclonais testados.
- A análise dos padrões SSCP demonstrou que há uma baixa diversidade genética entre os isolados de CTV da região norte do Estado do Paraná, e que cada complexo é constituído por uma mistura de duas a três estirpes;
- As plantas analisadas podem estar infectadas por estirpes severas de CTV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO, A.A.; MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Laranja**, v.18, p.1-26, 1997.

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, p. 287, 2001.

ALMEIDA, A.M.R. **Noções de sorologia aplicadas a fitovirologia**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 1995.

BAR-JOSEPH, M. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Ann. Rev. Phytopathology**, n. 27, p. 291-316, 1989.

BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical biochemistry**, n. 126, p. 374-380, 1982.

CAMBRA, M.; CAMARASA, E.; GORRIS, M.T.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J.; TSAI, M.C. Epitope diversity of citrus tristeza virus isolates in Spain. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 12, Riverside, 1993. Proceedings. IOCV, 13, p. 33-38, 1993.

CLARK, M.F.; LISTER, R.M.; BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. **Methods Enzymol**, n. 118, p. 742-766, 1986.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of citrus tristeza virus (CTV) complexes in pre-immunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, n. 27, p. 11-16, 2001.

COSTA, A.S.; MÜLLER, G.W. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. **Plant Disease**, n. 64, p. 538-541, 1980.

DOLJA, V.V.; KARASEV, A.; KOONIN, E.V. Molecular biology and evolution of Closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. **Ann. Rev. Phytopathology**, n. 32, p. 261-285, 1994.

FEBRES, V.J.; PAPUU, S.S.; RUBIO, L.; AYLON, M.A.; MORENO, P.; GUERRI, J.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. Single stranded conformational polymorphism enables the differentiation of citrus tristeza closterovirus strains. **Phytopathology**, n. 85, p. 1210, 1995.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. **Phytopathology**, n. 86, p. 1331-1335, 1996.

GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J.; LEE, R. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**. n. 44, p. 305-317, 1993.

GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J. Restriction Analysis of amplified CTV coat protein cDNA is a sensitive and rapid method for monitoring and cotrolling CTV infections. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 13, Riverside, 1996.Proceedings. IOCV, p. 25-37, 1996.

MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; TARGON, M.L.P.N.; BAPTISTA, C.R.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Diagnóstico do vírus da tristeza dos citros com diferentes anticorpos monoclonais. **Fitopatologia Brasileira**. n. 22, p. 191-194, 1997.

MORENO, P.; GUERRI, J.; ALBIACH, M.R.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; MARTINEZ, M.E. Interference between citrus tristeza virus (CTV) isolates detected by analysis of double stranded RNA (dsRNA). In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologist**, 13, Riverside, 1996. Proceedings. IOCV, n. 13, p. 55-63,1996.

MORIMOTO, F. Situação atual da Citricultura. In: GARCIA JR., J.B.; CROCE FILHO, J.; Andrade, J.M.B.; STENZEL, N.M.C.; LEITE JR, R.P.; CARVALHO, S.L.C. (eds.) **Encontro Paranaense de Citricultura, Maringá: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná. Anais...** p. 51-56, 1990.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 4. Riverside, 1968. Proceedings. IOCV, n. 4, p. 71-82, 1968.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. **Proc. Int. Soc. Citriculture**, n. 3, p. 868-872, 1977.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUES, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR, J.; AMARO, A.A. (eds.) **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas, SP, Fundação Cargill, v. 2, p. 734-62, 1991.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. **Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros**. Campinas: Fundação Cargill, p. 55-65, 1993.

MÜLLER, G.W., TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado “Pêra IAC” na citricultura paulista. **Laranja**. Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 399-408, 1999.

NICKEL, O.; SANTOS FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D. Segregation of citrus tristeza virus strains by graft propagation. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 13, Riverside, 1996. Proceedings. IOCV, n. 4, p. 64-70, 1996.

NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; POWELL, C.A.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Modulation of the antigenic reactivity of the citrus tristeza virus coat protein. **Journal of Immunological Methods**, n. 206, p. 97-105, 1997.

NIKOLAEVA, O. V.; KARASEV, A.V.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. **Plant Disease**, n. 82, p. 1276-1280, 1998.

PERMAR, T.A.; GARNSEY, S.M. Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of citrus tristeza virus. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 11, Riverside, 1991. Proceedings. IOCV, p. 56-59, 1991.

POWELL, C.A.; PELOSI, R.R.; COHEN, M. Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. **Plant Disease**, n. 76, p. 141-144, 1992.

REZENDE, J.A. M.; MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por pré-imunização. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n. 3, p. 185-226, 1995.

ROCHA-PENÃ, M. A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricidus* – Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. **Plant Disease**, n. 79, p. 437-445, 1995.

ROISTACHER, C.N.; MORENO, P. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus – a review. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 11, Riverside, 1991. Proceedings. IOCV, n. 11, p. 7-19, 1991.

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 applied Biology**. Warwick, v. 129, p. 479-489, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

SEKIYA, M.E.; LAWRENCE, S.D.; McCAFFERY, M.; CLINE, K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of citrus tristeza virus. **J. Gen. Virol.** n. 72, p. 1013-1020, 1991.

SOUZA, A.A.; CARVALHO, S.A.; TARGON, M.L.P.N.; MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A. Characterization of citrus tristeza virus isolates by SSCP of the coat protein gene in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 14, Riverside, 2000. Proceedings. IOCV, n. 14, p. 131-135, 2000a.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TRAGÓN, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Evaluation of changes which occurred in a mild protective citrus tristeza virus isolate in “Pêra” sweet orange by using RFLP and SSCP analysis of the coat protein gene. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 14, Riverside, 2000. IOCV, n. 14, p. 136-140, 2000b.

STACH-MACHADO, D.R.; TARGON, M.L.P.N.; ARRUDA, G.; BARBOSA, R.A.; BARRETO, M.J.; WAGNER, G.A.; MACHADO, M.A. Obtenção de anticorpos monoclonais para avaliação do complexo “Capão Bonito” do vírus da tristeza dos citros (CTV). **Fitopatologia Brasileira**, n. 23, p. 319, 1998 (Resumo).

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; COLETTA FILHO, H.D.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F. Sequence of coat protein gene of the severe citrus tristeza virus complex Capão Bonito. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 14, Riverside, 2000. Proceedings. IOCV, n. 14, p. 121-126, 2000.

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

VALVERDE, R.A.; NAMETH, S.T.; JORDAN, R.L. Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, n. 71, p. 255-258, 1990.

VAN VUUREN, S.P.; COLLINGS, R.P.; GRAÇA, J.V. Growth and production of lime trees preimmunization with mild citrus tristeza virus isolates. **Phytophylactica**, n. 25, p. 39-42, 1993.

VELA, C.; CAMBRA, M.; SANZ, A.; MORENO, P. Use of Specific Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Citrus Tristeza Virus. In: **Conference of the International Organization of Citrus Virologists**, 10, Riverside, 1988. IOCV, n. 10, p. 55-61, 1988.

APÊNDICE

Apêndice A

LISTA DE ABREVIATURAS

A ₍₄₀₅₎	Absorbância 405nm
CDNA	DNA complementar
CTV	Citrus Tristeza Virus
DASI-ELISA	Double-Antibody Sandwich Indirect ELISA
DNTP	Dinucleotídeo trifosfato
DsRNA	RNA fita dupla
ELISA	Enzyme Linked Imunosorbent Assay
GCP	Gene da Capa Proteica
μl	Microlitro
M	Molar
ml	Mililitro
MM	Milimolar
PBS	Tampão fosfato
PBST	Tampão fosfato + Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Potencial de hidrogênio
PNPP	Para-nitrofenil fosfato
PVP	Polivinilpirrolidona
R _(A405)	Relação de absorbância entre os monoclonais
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SSCP	Single Strand Conformational Polymorphism
SsRNA	RNA fita simples
UV	Ultravioleta
X g	Aceleração da gravidade