

LUCIANA CARDOSO MARTINS SGANZERLA

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS EM PLANTAS
ARMADILHAS DE LARANJA 'PÊRA' LIVRE DE VÍRUS**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA CARDOSO MARTINS SGANZERLA

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS EM PLANTAS
ARMADILHAS DE LARANJA 'PÊRA' LIVRE DE VÍRUS**

Dissertação 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 - 2006

LUCIANA CARDOSO MARTINS SGANZERLA

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DOS CITROS EM PLANTAS
ARMADILHAS DE LARANJA 'PÊRA' LIVRE DE VÍRUS**

Dissertação 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 24 de fevereiro de 2006

Prof^a. Dr^a. Dagmar Ruth Stach Machado

Prof. Dr. Gerd Walter Müller

Prof^a. Dr^a. Maria Júlia Corazza Nunes

Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

A Deus que sempre me dá força e sabedoria.
A minha família, Luiz, Conceição e Silvana que sempre me incentivaram.
A meu esposo, Zander, pelo companheirismo e compreensão.
A minha filha, Rafaela, pela felicidade que sua chegada trouxe durante a
execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado em todos os desafios e alegrias.

À Professora Doutora Maria Júlia Corazza Nunes, pela orientação científica, paciência, dedicação e, principalmente, pela oportunidade.

Aos co-orientadores, Professor Doutor William Mário Carvalho Nunes e Professor Doutor Gerd Walter Müller, pelo incentivo e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisa de Biotecnologia Aplicada, vinculado ao Centro de Ciências Agrárias, nas pessoas do coordenador geral, Professor Doutor William Mário Carvalho Nunes, e coordenadora técnico-científico, Professora Doutora Maria Júlia Corazza Nunes, onde o trabalho foi realizado.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, do Instituto Agronômico de Campinas, pela doação de mudas e treinamento.

Ao Departamento de Imunologia da Unicamp, na pessoa da Professora Doutora Dagmar Ruth Stach Machado, pela disponibilidade de seu laboratório, treinamento e doação de anticorpos.

Ao Luiz Antonio Peroni do Departamento de Imunologia da Unicamp, pelo treinamento para a realização das avaliações imunológicas.

Ao Professor Dennis Armando Bertolini, do Departamento de Farmácia da UEM, pelo empréstimo de equipamento que possibilitou a leitura das placas de ELISA.

Aos citricultores, que permitiram a instalação dos experimentos em seus pomares.

À Alessandra Tenório Costa, pelo companheirismo e apoio no laboratório.

Ao Carlos Alexandre Zanutto, por ajudar e esclarecer dúvidas no laboratório e no campo.

Ao José Alcides Remolli, pelo auxílio no experimento de campo.

Aos colegas do laboratório Marilda P. Caixeta, Rúbia O. Molina, Aline M. Gonçalves, Maria Lúcia Zaninele Ré, Waldecy M. S. Leonel e Janaína Ciboto Mulati, pelo companheirismo.

Aos professores e funcionários do CTI, pela gentileza e concessão dos equipamentos.

A minha família, pelo incentivo e imensa colaboração, em especial na etapa final do trabalho.

A todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

Luciana Cardoso Martins Sganzerla, filha de Luiz Martins e Maria Conceição Cardoso Martins, nasceu em Maringá em 03 de dezembro de 1978.

Graduou-se em Ciências Biológicas, em dezembro de 2001, pela Universidade Estadual de Maringá.

Concluiu em junho de 2003 o curso de Pós-Graduação em Biologia, em nível de especialização, pelo Departamento de Ciências Morfofisiológicas, da Universidade Estadual de Maringá.

Iniciou o curso de mestrado em março de 2004, no Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá.

Atuou como professora no ensino fundamental e médio no setor público e privado de ensino na cidade de Maringá.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A Tristeza do Citros	3
2.1.1. Descoberta, disseminação e epidemias	3
2.1.2. Hospedeiros e sintomatologia	4
2.1.3. Controle da doença	6
2.2. O <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	7
2.2.1. Classificação e morfologia.....	7
2.2.2. O genoma viral.....	8
2.2.3. Epidemiologia	9
2.2.4. Detecção e caracterização do CTV	10
2.2.4.1. Testes sorológicos.....	11
2.2.4.1.1. Anticorpos.....	12
2.2.4.2. Métodos moleculares	14
2.2.4.3. IC-RT-PCR	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Material vegetal e isolados de CTV.....	17
3.2. Análise Sorológica	21
3.3. IC-RT-PCR	22
3.3.1. Imunocaptura	22
3.3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela Transcriptase Reversa	22
3.3.3. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) através da PCR.....	23
3.4. Extração de ácidos nucleicos totais seguida de RT-PCR	23
3.4.1. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela Transcriptase Reversa	24
3.4.2. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) através da PCR.....	25
3.5. Avaliação de caneluras	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26

4.1. A Detecção de CTV através de ELISA	26
4.2. A Detecção de CTV através de IC-RT-PCR e extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR	36
4.3. Avaliação das caneluras	41
5. CONCLUSÕES	42
6.REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

SGANZERLA, Luciana Cardoso Martins. Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2006. DETECÇÃO DO VÍRUS DA TRISTEZA DO CITROS EM PLANTAS ARMADILHAS DE LARANJA 'PÊRA' LIVRE DE VÍRUS. Professora orientadora: Dr^a Maria Júlia Corazza-Nunes. Professores Conselheiros: Dr. William Mário de Carvalho Nunes e Dr. Gerd Walter Müller.

A investigação do período entre o tempo em que ocorre a infecção pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) e sua detecção na planta em condição natural de campo têm sido pouco relatadas, embora estes dados sejam importantes para o entendimento da epidemiologia e planejamento das medidas de controle desta virose. Este estudo teve o objetivo de analisar a eficiência das técnicas de “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) e imunocaptura seguida da reação da polimerase em cadeia (IC-RT-PCR) na determinação do tempo necessário para que a infecção sistêmica pelo CTV possa ser detectada nas condições naturais de campo. Para a obtenção de material para as análises, plantas armadilhas de laranja ‘Pêra’ (*Citrus sinensis* L.), livres de vírus, foram instaladas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, com cinco repetições por pomar. O material vegetal foi coletado e analisado periodicamente por ELISA e IC-RT-PCR. Nas análises sorológicas, foram utilizados o anticorpo policlonal PCA 1006/BR e os anticorpos monoclonais 30g-02, 37g-11, 39-07 e IC-04-12. Todos os ensaios foram realizados com três repetições e a leitura das placas foi efetuada em leitor de ELISA a 405nm, considerando positivas as amostras com valores de absorvância superior a duas e meia vezes ao valor do controle negativo. Para a análise por IC-RT-PCR, placas de poliestireno foram sensibilizadas com o anticorpo policlonal 1006/BR, para a captura do vírus. Posteriormente, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) pela Transcriptase Reversa (RT) e, em seguida, a amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) através da PCR. Os resultados demonstraram que, em condições naturais de campo, a detecção do vírus através de ELISA ocorreu entre sete a oito meses após o plantio das mudas, enquanto que, por IC-RT-PCR, o CTV foi detectado quatro meses após o plantio, nas plantas da região Norte. A análise da sintomatologia, realizada após dois anos da instalação do experimento, revelou forte sintoma de canelura em apenas uma das plantas da região Norte. No entanto, não foi observada a discriminação de isolados severos nos testes de ELISA através dos anticorpos monoclonais específicos para o Complexo ‘Capão Bonito’. A técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na determinação do tempo mínimo em que a infecção sistêmica pelo CTV ocorre nas condições naturais de campo, enquanto que a técnica de ELISA, revelou-se mais eficiente quanto a amplitude e repetibilidade.

Palavras-chave: Plantas armadilhas, *Citrus tristeza virus*, ELISA, IC-RT-PCR.

ABSTRACT

SGANZERLA, Luciana Cardoso Martins. Universidade Estadual de Maringá, February/2006. DETECTION OF THE *Citrus tristeza virus* IN VIRUS FREE 'PÊRA' SWEET ORANGE TRAP PLANTS UNDER FIELD CONDITIONS . Major teacher: Dr^a Maria Júlia Corazza-Nunes. Co- Major Teachers: Dr. William Mário de Carvalho Nunes and Dr. Gerd Walter Müller.

Investigations of the period of time elapsed between *Citrus tristeza virus* (CTV) infection and its detection in plants under natural field conditions, are scarce, although these data are important for the understanding of the epidemiology and the planning of control measures of this virus. This study had the objective of analyzing the efficiency of the "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA) and immunocapture techniques followed by the polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) in the determination of the time elapsed from CTV inoculation to systemic infection by the virus under natural field conditions. Virus free 'Pêra' sweet orange (*Citrus sinensis* L). Trap plants, were installed in orchards in the North and Northwest of the Paraná State Brazil areas, with five repetitions per orchard. The plant material was collected and analyzed periodically by ELISA and IC-RT-PCR. For the immunological analyses polyclonal antibody PCA 1006/BR and the monoclonal antibodies 30g-02, 37g-11, 39-07 and IC-04-12 were used. All the assays were replicate three times and reading of the plates was carried out in a ELISA reader to 405nm. Samples were considered positive when absorbance values were two and half times superior to the value of the negative control. For the IC-RT-PCR analysis, polystyrene plates were sensitized with the polyclonal antibody 1006/BR, for the virus capture. Afterwards, the synthesis of complementary DNA was accomplished (cDNA) for Reverse Transcriptase (RT) and, following, the amplification of the gene capsid protein (GCP) through the PCR. The results demonstrated that, under natural field conditions, the detection of the virus through ELISA occurred from seven to eight months after the plants were put in the field, while by IC-RT-PCR, CTV was detected four months after planting, in the North area plants. The symptomatology analysis done two years after the experiment installation, revealed strong stem pitting symptom in just one of the plants from the North area. However, the severe isolate discrimination was not observed in the tests of ELISA through the specific monoclonal antibodies for the Capão Bonito complex. The technique of IC-RT-PCR, however, with protocol adaptation, was considered more effective than the ELISA one in the determination of the minimum time for systemic CTV detection of plants exposed to infection under the natural field conditions.

Key-words: Trap plants, *Citrus tristeza virus*, ELISA, IC-RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

Das moléstias associadas às plantas cítricas, a tristeza, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), é considerada uma das mais destrutivas doenças que atingiram a cultura no último século.

O CTV é um closterovirus que ocorre como um complexo de isolados que diferem nos sintomas induzidos nos diferentes hospedeiros. Esta virose tem a capacidade de infectar praticamente todas as espécies, variedades e híbridos do gênero *Citrus*, algumas Rutáceas não cítricas e certas espécies de *Passiflora* (WALLACE, 1978; MÜLLER, COSTA, 1991). O vírus é transmitido via enxertia e de forma semipersistente por diferentes espécies de afídeos (LEE et al., 1994).

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas visando detectar e caracterizar isolados de CTV nos seus diferentes hospedeiros. A indexação biológica é um método de diagnóstico do CTV utilizado há muitos anos nos programas de certificação de matrizes e inspeção de pomares, contudo, o procedimento é lento, laborioso e caro (ROCHA-PEÑA, LEE, 1991).

Atualmente, com o grande progresso científico e tecnológico, vários métodos eficientes de diagnósticos têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados, entre eles os métodos sorológicos, os biomoleculares e as associações entre estes dois métodos (SEQUEIRA, 1992; ALMEIDA, LIMA, 2001).

No entanto, nas últimas décadas, muitas pesquisas foram feitas sobre o CTV, mas poucas investigam o período de incubação, que podem contribuir para o entendimento da epidemiologia e para programas de controle desta virose.

Com o intuito de ampliar estes estudos, nas condições paranaenses, a presente pesquisa teve como objetivos:

- Analisar a eficiência das técnicas de “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) e imunocaptura seguida de reação da polimerase em cadeia (IC-RT-PCR) na detecção de CTV.
- Avaliar o espaço de tempo necessário de exposição para que plantas livres de vírus sejam infectadas pelo CTV, em condições naturais de campo, em três pomares comerciais do Estado do Paraná.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Tristeza do Citros

2.1.1. Descoberta, disseminação e epidemias

Os primeiros relatos da tristeza dos citros se deram na África do Sul, no início do século XX, em plantas que demonstravam incompatibilidade em laranja doce enxertada em laranja ‘Azeda’. A mesma incompatibilidade foi observada em outras regiões do mundo (COSTA, 1956; ROISTACHER, 1991; ROCHA-PEÑA et al., 1995; MÜLLER, REZENDE, 2004).

Na Argentina, em 1930, foi registrada a primeira grande epidemia, que mais de 10 milhões de árvores foram perdidas devido à tristeza (COSTA, 1956; BAR-JOSEPH et al., 1989). Problemas semelhantes ao ocorrido neste país foram observados nos Estados Unidos e Espanha, causando, no mundo, danos que chegaram aos 50 milhões de plantas em aproximadamente 60 anos (BAR-JOSEPH et al. 1989).

No Brasil, a tristeza pode ter sido introduzida vindo da Argentina ou, então, diretamente da África do Sul, em plantas ou borbulhas, trazidas por empresas que possuíam plantações de citros tanto na África como no Brasil. Os primeiros registros datam 1937, na região do Vale do Paraíba, no Estado de São Paulo, onde passou a ser denominada tristeza. A virose se alastrou rapidamente dizimando os pomares brasileiros na década de 1940, quando, aproximadamente, seis milhões de plantas cítricas sobre porta-enxerto de laranja ‘Azeda’ foram perdidas (COSTA, 1956; BAR-JOSEPH et al., 1989; MÜLLER, COSTA, 1991; MÜLLER et al, 1999).

Em 1940, Bitancourt, desenvolvendo estudos estatísticos da distribuição da doença no campo, observou que a disseminação da doença se fazia na direção dos ventos predominantes e de planta a planta. Este fato levou o pesquisador a formular uma das primeiras hipóteses em relação ao agente causal e modo de transmissão da tristeza. Tratava-se de uma doença infecciosa, causada, provavelmente, por um vírus, transmitido por inseto (BAR-JOSEPH et al., 1989).

A natureza infecciosa da tristeza foi confirmada apenas em 1946 por Meneghini et al., que transmitiram a doença através de afídeos, e em 1947 por Wallace e Fawcett, que transmitiram a doença através da enxertia de borbulhas infectadas. Os resultados obtidos por estes pesquisadores foram repetidos no Brasil por Bennet e Costa em 1949, que além de confirmarem a transmissão do vírus por união de tecidos e por insetos, também forneceram uma série de informações adicionais, compreendendo o círculo de hospedeiras e reação dos diferentes tipos de citros à tristeza (MÜLLER, 1976; BAR-JOSEPH et al., 1989).

As partículas do *Citrus tristeza virus* (CTV) foram observadas pela primeira vez em tecidos vegetais do floema de plantas sintomáticas, por Kitajima et al. (1964), através de técnicas de microscopia eletrônica, que permitiram a confirmação do agente causal da doença. A purificação parcial do vírus no Brasil foi obtida por Silva e colaboradores em 1965 (MÜLLER et al., 1991; BAR-JOSEPH et al., 2002).

2.1.2. Hospedeiros e sintomatologia

O *Citrus tristeza virus* (CTV) infecta, praticamente, todas as espécies, variedades e híbridos do gênero *Citrus*, algumas Rutáceas não cítricas, como a *Aeglopsis chevalieri* Swing, *Afraegle paniculata* Schum e *Pamburus missiones* Swing, e certas espécies de *Passiflora* (MCGOVERN et al., 1994).

Os tecidos das plantas cítricas podem responder de diferentes formas à infecção pelo CTV, podendo ser tolerantes, parcialmente tolerantes, intolerantes ou resistentes ao vírus. Assim, são consideradas tolerantes as plantas que

possibilitam a multiplicação do vírus em seus tubos crivados sem que haja necrose na região da enxertia, não afetando o crescimento e a produção. Já uma espécie é considerada resistente quando não permite a multiplicação das partículas virais em seus tecidos (BORDIGNON et al., 2003).

Deste modo, os sintomas podem variar conforme a espécie hospedeira (copa e porta-enxerto), acoplados a severidade do isolado do vírus, tempo de infecção, habilidade de proteção cruzada e condições ambientais, principalmente, da temperatura (MÜLLER, COSTA, 1993; ROCHA-PEÑA et al., 1995; BORDIGNON et al., 2003).

Segundo Lee et al. (1994), os principais sintomas induzidos pelo CTV são agrupados em: declínio rápido, caracterizado por causar danos às células do floema no ponto abaixo da união enxerto/porta-enxerto; caneluras, caracterizadas por depressões rasas e alongadas que se formam no lenho, tanto no tronco, como nos galhos e ramos mais finos; amarelecimento, palidez e suberização das nervuras.

Em copas de citros suscetíveis ao vírus enxertadas em porta-enxerto de laranja azeda, os sintomas característicos são as folhas ligeiramente bronzeadas, aspecto coreáceo, quebradiças e, em alguns casos, ocorre também o amarelecimento da nervura central, declínio rápido da planta, seca gradativa dos galhos, necrose dos tubos crivados da laranja azeda, podridão das radículas e morte da planta (MÜLLER, 1976; POMPEU JUNIOR, 1986; MÜLLER, COSTA, 1991).

Variedades de laranja doce, como 'Barão', 'Mediterrânea' e 'Pêra', de pé franco ou enxertada em porta-enxerto mais tolerante, infectadas com o vírus, apresentam reações variadas de anançamento, clorose das folhas e caneluras. As plantas afetadas apresentam pequena produção, com predominância de frutos miúdos, de cor verde pálida, conformação defeituosa, com elevada acidez e baixo teor de suco, contudo, os haplótipos que induzem caneluras não levam as plantas à morte (MÜLLER, 1976; MÜLLER, COSTA, 1991; FERGUSON, GARNSEY, 1993; LEE et al., 1994).

No Brasil, ocorrem vários complexos de CTV levando à expressão de

diferentes sintomas. Entre esses isolados, o conjunto denominado “Complexo Capão Bonito” é considerado o mais severo por provocar sérios danos na combinação de copa de laranja ‘Pêra’ em porta-enxerto de limão ‘Cravo’. As plantas infectadas apresentam baixa taxa de crescimento, brotos axilares curtos, galhos quebradiços, folhas menores, com sintomas de deficiência de nutrientes, frutos miúdos, secos e com sementes mal formadas, e caneluras (MÜLLER et al., 1976, 1991 ; TARGON et al.; 2000).

2.1.3. Controle da doença

Em países onde a tristeza não esta amplamente disseminada, como é o caso da Espanha e Israel, o controle se dá pela erradicação das plantas infectadas dos pomares e utilização de combinações copa/porta-enxerto tolerantes. Porém, no Brasil e outros países, onde o CTV encontra-se completamente disseminado devido à presença abundante do afídeo vetor, as técnicas de controle devem ser planejadas, considerando sempre a sua presença (MÜLLER, 1976; MÜLLER, COSTA, 1991).

Num primeiro momento, a medida de controle do CTV utilizada nestes países baseou-se na substituição do porta-enxerto de laranja Azeda por outros mais tolerantes. Entretanto, observações posteriores, realizadas em pomares comerciais, demonstraram que copas de algumas variedades de laranja doce, como a ‘Pêra’, pomelos e limas ácidas não se desenvolviam satisfatoriamente, mesmo quando enxertadas em cavalos tolerantes (REZENDE, MÜLLER, 1995).

O controle satisfatório da virose, nestas variedades, foi alcançado por meio da proteção cruzada ou pré-imunização a partir de 1961 (REZENDE, MÜLLER, 1995; MÜLLER et al., 1999; MÜLLER, CARVALHO, 2001; SCHÄFER et al., 2001). Isto se deu graças a estudos realizados na década de 1950 numa parceria entre pesquisadores brasileiros e norte-americanos, que demonstraram a existência de isolados fracos do vírus da tristeza, com habilidade de proteção contra os isolados fortes (COSTA, MÜLLER, 1980; MÜLLER et al.,

1999; MÜLLER, CARVALHO, 2001).

Para dar início ao programa de pré-imunização, 45 isolados fracos foram selecionados e testados. No entanto, foram considerados satisfatórios apenas dois isolados para laranja 'Pêra', dois isolados para limão 'Galego' e um isolado para pomelo (MÜLLER et al., 1999; MÜLLER, CARVALHO, 2001).

De acordo com Costa e Müller (1980), o uso da pré-imunização, com isolados fracos para o controle da tristeza em plantas de laranja 'Pêra', é praticamente o único caso no mundo onde essa técnica atingiu escala comercial de desenvolvimento, provocando o ressurgimento do cultivo dessa variedade que estava praticamente desaparecendo do estado de São Paulo, devido a sua alta sensibilidade a essa virose.

Estimativas realizadas no ano de 2001 indicavam a existência de mais de 80 milhões de plantas de 'Pêra' pré-imunizadas no Brasil, uma vez que experimentos de campo e também comparações levadas a cabo por citricultores, seguidas de plantios ao longo dos anos, mostram que o clone de laranja 'Pêra' pré-imunizado tem se posicionado entre os melhores da variedade, indicando que a proteção vem sendo mantida através das sucessivas propagações clonais (MÜLLER, CARVALHO, 2001).

2.2. O *Citrus tristeza virus* (CTV)

2.2.1. Classificação e morfologia

O *Citrus tristeza virus* (CTV) pertence à família Closteroviridae, gênero *Closterovirus* (YOKOMI, DEBORDE, 2005). É constituído por partículas longas e filamentosas, apresenta simetria helicoidal, dimensões que podem variar de 10 a 12 nm de diâmetro e 2000 nm de comprimento (KITAJIMA et al., 1964) e peso molecular de aproximadamente $6,5 \times 10^3$ KDa, estando normalmente localizadas no floema de plantas infectadas, formando corpos de inclusão (KARASEV et al.,

1995). Estes agregados já foram detectados em parênquima de floema, mesófilos e células da epiderme (BAR-JOSEPH et al., 1989; DOLJA et al., 1994).

2.2.2. O genoma viral

O CTV é constituído por um capsídeo protéico de 25 KDa envolvendo uma molécula de RNA de fita simples (ssRNA), de sentido positivo (+), e não possui cauda poli-A na extremidade 3' (SEKYA et al., 1991). O genoma completo é composto de aproximadamente 19.296 nucleotídeos, com 12 ORFs (open reading frames) que podem codificar 19 produtos protéicos, como a RNA polimerase (ORF 1b), a helicase (ORF 1a), a proteína do capsídeo viral p25 (ORF 7), a proteína p27, apontada como uma cópia divergente da p25 (ORF 6) (KARASEV et al., 1995; HILF, 2005).

Além dos vírions de fita única positiva de RNA, as plantas infectadas pelo CTV contêm uma população heterogênea de, pelo menos, nove partículas menores de RNA subgenômicos (PAPPU et al., 1993; HILF et al., 1995; KARASEV et al., 1998) e também de RNAs de 2,0 e 5,0 KB, defectivos, instáveis e variáveis (KARASEV et al., 1998). Estas partículas defectivas podem estar associadas aos sintomas típicos de amarelecimento de plântulas (MAWASSI et al., 1995; YANG et al., 1999).

Sekya et al. (1991) realizaram os primeiros trabalhos de clonagem e seqüenciamento do gene da proteína do capsídeo (GCP) do isolado de CTV T36 da Flórida. O estudo apontou a presença de uma matriz de leitura aberta (ORF) de 669 nucleotídeos flanqueada por vários códons de terminação.

Atualmente, são conhecidas as seqüências completas de sete isolados de CTV: T30, um isolado moderado da Flórida (ALBIACH-MARTÍ et al., 2000); T36, isolado que causa declínio na Flórida (KARASEV et al., 1995); VT, isolado que causa declínio em Israel (MAWASSI et al., 1996); SY568, isolado que causa declínio e caneluras em laranja doce na Califórnia (YANG et al., 1999); T385, isolado moderado da Espanha (VIVES et al., 1999); NUaga, isolado do Japão

(SUASTIKA et al. 2001); e Qaha, isolado do Egito (GenBank Accession N° AY340974). Segundo Hilf (2005), a seqüência de nucleotídeos destes isolados varia entre 19.226 e 19.302, contudo, o número de ORFs presentes é similar.

2.2.3. Epidemiologia

O vírus é transmitido por propagação vegetativa, enxertia de borbulhas, galhos, pedaços de folhas e raízes, além de diferentes espécies de afídeos vetores, entre elas *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Myzus persicae*, *Toxoptera aurantii*, *Toxoptera citricida*, sendo o último o mais eficiente (MCGORVERN et al., 1994; YOKOMI, 1994).

A transmissão do CTV, através do vetor, se dá de maneira semipersistente, isto é, o vírus não se multiplica no afídeo e não há período latente (BAR-JOSEPH et al., 1989). O *T. citricida* é um inseto com dimensões de 1,5 mm a 2,4 mm que apresenta coloração marrom escura, na forma jovem, e preto brilhante, quando adulto, se diferenciado pelas antenas e asa da fêmea alada (MCGOVERN et al., 1994). Este vetor se move predominantemente de uma árvore para outra imediatamente adjacente, além disso, pulgões individuais são capazes de transmitir o CTV em 30 minutos após um período de aquisição de 20 minutos a 1 hora, podendo permanecer infectivos por 24 até 48 horas após o período de aquisição (MÜLLER, 1976; MCGORVERN et al., 1994; MÜLLER, 1996).

O desempenho do *T. citricida*, quanto à transmissão do CTV, foi confirmado por Costa e Grant, em 1951, que verificaram uma eficiência de 17% realizando inoculações com insetos individuais. O mesmo teste realizado com outros afídeos vetores demonstrou que estes são bem menos eficientes (MÜLLER, 1976).

Após a inoculação do CTV na planta, pelo afídeo, seja no campo ou em casa de vegetação, de forma natural ou experimental, um período mínimo é requerido para que o vírus se dissemine pela planta. Neste sentido, estudos, que

analisaram a distribuição e movimento do vírus através da indexação biológica em plantas indicadoras de limão ‘Galego’, indicaram que o tempo mínimo de detecção do CTV no tecido próximo ao local da inoculação por borbulhas foi de oito dias (PRICE, 1968; TOLBA, 1976). Tolba (1976) observou que a infecção sistêmica somente ocorreu após um ano da inoculação por borbulhas. No entanto, Kitajima et al. (1964) detectaram a presença de partículas virais de CTV nos tecidos de floema dezesseis dias após a inoculação através de microscopia eletrônica.

2.2.4. Detecção e caracterização do CTV

Inúmeras técnicas têm sido utilizadas visando detectar e diferenciar haplótipos de CTV. Inicialmente, o diagnóstico era baseado apenas na sintomatologia, já que não era possível isolar o patógeno. A prática, porém, não assegura confiabilidade, uma vez que a doença pode apresentar semelhanças com deficiência nutricional ou outras patologias, como a podridão do pé, causada por fungos do gênero *Phytophthora*, sendo que apenas um exame das raízes pode distinguir as duas doenças (MOREIRA, 1960).

A indexação ou caracterização biológica é um método de diagnóstico do CTV utilizado há muitos anos nos programas de certificação de matrizes e inspeção de pomares. Este procedimento utiliza plantas indicadoras para a expressão dos sintomas característicos da doença investigada. A planta a ser indexada é, geralmente, enxertada sobre um porta-enxerto de crescimento vigoroso, que recebe borbulhas da planta indicadora ou é enxertada diretamente sobre a planta indicadora (BOVE, 1995).

São utilizadas como indicadoras de CTV as variedades de laranja azeda (*C. aurantium*), lima ácida ‘Galego’ ou lima ‘Mexicana’ (*C. aurantifolia*), pomelos ‘Marsh seedless’ e ‘Duncan’ (*C. paradisi*) entre outras. Contudo, apesar do emprego de plantas indicadoras de diferentes espécies ser considerado imprescindível na caracterização de isolados do vírus, a técnica demanda tempo

relativamente longo para apresentar os resultados, exige uma infraestrutura de casa de vegetação e câmaras climáticas, além de não permitir a discriminação entre isolados do vírus (ROCHA-PEÑA, LEE, 1991; SEQUEIRA, 1992; MÜLLER, 1994).

O teste de infectabilidade consiste em submeter plantas livres de vírus aos insetos vetores. Constitui uma técnica segura, porém, é demorada e necessita ser executada em viveiros ou estufas (MOREIRA et al., 1954; BROADBENT et al., 1996).

Recentemente, com o grande progresso científico e tecnológico, vários métodos eficientes de diagnósticos têm sido desenvolvidos e/ou aperfeiçoados, destacando-se os métodos sorológicos, biomoleculares, além de associações entre estes métodos (SEQUEIRA, 1992; NIBLETT et al., 2000; ALMEIDA, LIMA, 2001).

2.2.4.1. Testes sorológicos

O imunodiagnóstico baseia-se na reação antígeno-anticorpo, que marcado por imunofluorescência, radioatividade ou conjugado a uma enzima, produz uma reação capaz de ser quantificada (KOENING, PAUL, 1982; SEQUEIRA, 1992). Entre as diversas técnicas imunológicas capazes de detectar a presença de partículas virais encontram-se: o “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA) (BAR-JOSEPH et al., 1979), “radio immunosorbente assay” (RIA) (LEE et al., 1981), “immunofluorescent assay” (IFA) (BRLANSKY et al., 1984), Western blot (LEE et al., 1987) entre outras.

O ELISA é o método imunoenzimático de maior importância para o diagnóstico de CTV e um dos mais utilizados, em função da rapidez na obtenção dos resultados, possibilidade de executar ensaios em grande escala, custo relativamente baixo, alta sensibilidade, capacidade de quantificar e diferenciar haplótipos do vírus, além da execução ser fácil, sem exigir elevada especialização do pessoal (SEQUEIRA, 1992; MCGOVERN et al., 1994;

CAMBRA et al, 2000; DIAS, 2002).

A versão da técnica de ELISA, designada “sandwich” de duplo anticorpo e introduzida, na fitopatologia, por Clark e Adams em 1977, baseia-se em fazer aderir a uma placa de poliestireno anticorpos específicos para o vírus. Em seguida coloca-se nos poços o extrato das amostras a serem testadas, juntam-se, depois, os anticorpos conjugados a uma enzima e, finalmente, coloca-se o substrato que, ao reagir com a enzima, levará a formação de coloração amarelada. A leitura, então, é realizada num colorímetro, onde para cada poço é medida a absorbância no comprimento de onda de 405 nm. Embora esta versão seja satisfatória, ela apresenta limitações no campo de diagnóstico. Criaram-se, então, os métodos indiretos, assim designados porque o conjugado contendo a enzima não se liga diretamente ao antígeno. Nestes métodos, após colocar as amostras contendo o vírus, aplica-se um segundo anticorpo (anticorpo detector), no qual o conjugado irá se fixar. Portanto, esta versão exige que um segundo anticorpo seja preparado contra o primeiro anticorpo. Isto é possível injetando o primeiro anticorpo em outro animal (KOENIG, PAUL, 1982; ROCHA-PEÑA, LEE, 1991; SEQUEIRA, 1992).

2.2.4.1.1. Anticorpos

No sentido de realizar testes sorológicos, faz-se necessário o desenvolvimento de anticorpos. Estes, por sua vez, são moléculas de imunoglobulinas com sítios de combinação que reconhecem a forma dos epítopos, produzidos em animais cujo antígeno foi injetado em seu organismo (MILSTEIN, 1980). A grande diversidade sorológica que ocorre entre os isolados de CTV permitiu o desenvolvimento de anticorpos policlonais, que reconhecem diversos epítopos num único vírus, e monoclonais, que podem reconhecer um único epítipo na proteína do capsídeo do CTV, possibilitando a identificação de estirpes específicas (NIKOLAEVA et al., 1996).

Os epítomos são regiões funcionais de um antígeno, com 6 a 12 resíduos de aminoácidos, capazes de se ligarem a sítios específicos de moléculas de imunoglobulinas (NIKOLAEVA et al., 1996). São conhecidas as seqüências do epítomo do anticorpo monoclonal MCA13 (PAPPU et al., 1993) e 3DF1 (PAPPU et al., 1994) entre outros.

No Brasil, trabalho realizado por Targon et al. (1997) permitiu a obtenção de duas proteínas recombinantes a partir da clonagem e expressão do gene do capsídeo viral do haplótipo de CTV presente em 'Pêra' 135 CB. Estas proteínas, denominadas CB-22 e CB-104, possuem um peso molecular de 28,7 Kda e 19 Kda, respectivamente, e apresentam homologia de 91,2% na sua seqüência de ácidos nucléicos e 95,1% na seqüência de aminoácidos.

Utilizando estas proteínas, Stach-Machado et al. (2002) produziram anticorpos monoclonais. A imunização de camundongos com uma ou com ambas as proteínas permitiu a obtenção de três grupos distintos de anticorpos dessa natureza. O primeiro grupo de anticorpo monoclonal, denominado IC-04-12, apresenta especificidade apenas para a proteína CB-22 e homologia com haplótipos que induzem sintomas fracos em plantas indicadoras. O segundo grupo de anticorpo monoclonal, denominado 39, é específico para a proteína CB-104 e apresenta alta homologia com isolados severos de CTV. O terceiro grupo, constituído pelos monoclonais 30 e 37, reconhece as duas proteínas e não apresenta reação cruzada com outras proteínas da própria planta (STACH-MACHADO et al., 2002).

Vários anticorpos monoclonais vêm sendo utilizados no diagnóstico do CTV, destacando-se: o anticorpo monoclonal MCA-13, desenvolvido a partir do haplótipo T36, que induz ananicamento em plantas cítricas na Flórida (PAPPU et al., 1993a; PERMAR et al., 1990), os anticorpos 3DF1 e 3CA5, produzidos a partir de isolados da Espanha, que reagem com um grande número de haplótipos, independente dos sintomas induzidos no hospedeiro (POWELL et al., 1992), os anticorpos 4B1, 4C1, 4E5 e 4F3, desenvolvidos no Marrocos, que reagem com um grande número de isolados do vírus (ZEBZAMI et al., 1993).

2.2.4.2. Métodos moleculares

As técnicas moleculares, que tornaram possível a manipulação do material genético dos organismos, têm sido utilizadas para identificação do CTV. Entre elas destacam-se o mapeamento de peptídeos da proteína do capsídeo viral (LEE et al., 1987), a análise de dsRNA de plantas infectadas (DODDS et al., 1987), a clonagem e seqüenciamento do genoma viral (PAPPU et al., 1993a), a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLES, FALOONA, 1986 apud ANDRADE, 1993), a análise do polimorfismo de fragmentos de restrição do gene da capa protéica (RFLP) (GILLINGS et al., 1993) e a análise do polimorfismo conformacional da fita simples de DNA (SSCP) (FEBRES et al., 1995).

A análise de mapeamento de peptídeos, revela diferenças na sensibilidade de proteínas do capsídeo à digestão enzimática e ao número e tamanho dos peptídeos gerados (DODDS et al., 1987).

A análise de dsRNA de plantas infectadas consiste em extrair material genético do vírus em sua forma replicativa, submeter as amostras à eletroforese em gel de poliácridamida e comparar os perfis eletroforéticos dos haplótipos do vírus (MORENO et al., 1990; MORENO et al., 1991). Contudo, segundo os autores, os perfis de dsRNA podem variar dependendo do hospedeiro e da estação do ano e nem sempre se relacionam com a virulência do haplótipo.

A hibridização com sondas de cDNA ou cRNA é uma técnica que tem sido utilizada para detectar diferenças localizadas em algumas regiões do genoma de diferentes haplótipos de CTV, todavia, o procedimento tem se mostrado bastante restrito graças à necessidade purificação do RNA e a utilização de sondas radioativas (SEQUEIRA, 1992; 1995; NARVÁEZ et al., 2000). Além disso, o desenvolvimento de ‘sondas frias’, não radioativas, vem se destacando (SEQUEIRA, 1992).

A comparação de seqüências de genes individuais é considerada hoje a técnica mais precisa, contudo, é a mais cara e laboriosa (SOUZA et al., 2001).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de um trecho

de DNA milhões de vezes em poucas horas. Na PCR, é possível reproduzir o processo de replicação natural do DNA com as vantagens de extrema rapidez e de ser possível determinar precisamente o trecho de DNA a ser amplificado. Sendo necessário para a realização da técnica a utilização de um primer, que é uma seqüência curta de DNA, que pareia com o DNA-molde e serve de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA. Atualmente os primers podem ser projetados e sintetizados sob medida para amplificação de qualquer fragmento de DNA (ANDRADE, 1993; LANZA et al., 2000;).

A análise RFLP consiste em digerir o gene da proteína do capsídeo (GCP) ou outras regiões variáveis do genoma do CTV com enzimas de restrição, submetendo às reações em corrida eletroforética e comparando os fragmentos gerados de acordo com o tamanho de restrição (GILLINGS et al., 1993; SOUZA et al., 2001).

Zanineli-Ré (2004) desenvolveu um estudo visando ampliar os conhecimentos sobre o comportamento de árvores de laranja 'Pêra' infectadas pelo CTV, através de sintomatologia induzida pelo vírus, e caracterização dos haplótipos de CTV, através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), em plantas de diferentes pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná.

Também no Estado, trabalho realizado por Costa et al. (2005), através de análise RFLP, propôs à identificação e seleção de árvores de laranja 'Pêra' com potencial para plantas matrizes, avaliando os complexos de CTV presentes nestas plantas, comparando-os com haplótipos fortes e fracos conhecidos.

A análise SSPC baseia-se em mutações de ponto que induzem alterações na conformação da molécula de DNA de fita simples (ssDNA) e, conseqüentemente, sua mobilidade eletroforética, sendo assim, capaz de detectar diferenças mínimas na seqüência de nucleotídeos de isolados de CTV (SAVOV et al., 1992; RÚBIO et al., 1996).

Leonel (2004) caracterizou os complexos do vírus presentes em plantas de três variedades de laranja doce, submetidos a diferentes tratamentos. Carraro et al. (2003) avaliaram complexos de CTV de pomares de laranja 'Pêra' da

região Norte do Estado do Paraná, estabelecendo comparações com isolados severos do Estado de São Paulo.

A microscopia eletrônica é um importante meio para a detecção de vírus, contudo, a operação tem um alto custo, requer ajuda técnica altamente treinada e além disso, a técnica não possibilita diferenciar os isolados (ROCHA-PEÑA, LEE, 1991).

2.2.4.3. IC-RT-PCR

A técnica IC-RT-PCR (Immunocapture-Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) combina a purificação parcial do vírus através de anticorpos, a PCR e a quantificação do produto amplificado por fluorescência, compreendendo uma prática segura e rápida (NOLASCO et al., 1993; HILF, GARNSEY, 2002). No entanto, Nolasco et al. (1997) afirmam que, apesar das vantagens oferecidas pelo método, ainda há restrição quanto a sua utilização, isto porque a técnica de PCR é mais laboriosa e onerosa do que a técnica de ELISA.

A imunocaptura utiliza placas de poliestireno ou policarbonato contendo anticorpos específicos para a captura do vírus que se pretende detectar. As partículas capturadas pelos anticorpos são transcritas e amplificadas pela reação de RT-PCR (NOLASCO et al., 1993; NOLASCO et al., 1997; HILF, GARNSEY, 2002).

Vários autores têm utilizado a técnica de IC-RT-PCR na detecção e caracterização do CTV. Nolasco et al. (1997) avaliaram, através da técnica, isolados que entraram ilegalmente em Portugal. Zemzami et al. (2002) confrontaram características biológicas e moleculares, obtidas pelo IC-RT-PCR, de isolados de CTV do Marrocos. Mathews et al. (1997) compararam o método IC-RT-PCR, extração de ácidos nucleicos totais, seguida de RT-PCR e ELISA, para avaliar o tempo necessário para ocorrer a detecção do CTV pelos diferentes métodos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e isolados de CTV

O material vegetal, fonte de inóculo de CTV, consistiu, inicialmente, de quinze mudas de laranja 'Pêra', enxertadas em porta-enxerto de limão 'Cravo' e livres de vírus pela técnica de microenxertia. As mudas foram produzidas pelo Centro APTA Citrus "Sylvio Moreira", do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), localizado no município de Cordeirópolis, São Paulo, e encaminhadas para a Universidade Estadual de Maringá, Paraná, onde foram armazenadas em estufa até o momento de serem levadas a campo.

Após a certificação da sanidade das mudas em relação ao CTV, obtida através de testes de ELISA, em 24 de março de 2003, o primeiro experimento foi instalado no campo em 4 de abril de 2003. O plantio foi realizado em três pomares comerciais de laranja 'Pêra', sendo um localizado na região Norte e dois na região Noroeste do Estado do Paraná, com cinco repetições por pomar, distribuídas aleatoriamente entre as árvores adultas para atuarem como plantas armadilhas de CTV (Figura 1 e 2, Quadro 1).

Folhas e ramos jovens de plantas livres de vírus (controle negativo), das quinze plântulas, de plantas adultas de laranja 'Pêra', pertencentes aos pomares (controles positivos) e localizadas ao redor das armadilhas, foram coletados nos meses de abril/2003, julho/2003, novembro/2003, janeiro/2004, março/2004, julho/2004, setembro/2004 e dezembro/2004. As nervuras principais e as cascas dos ramos foram retiradas com auxílio de estilete, liofilizadas e utilizadas para a avaliação da infecção por CTV através de ELISA.

Um segundo experimento, também constituído de quinze mudas de laranja 'Pêra' em porta-enxerto de limão 'Cravo', livres de vírus por

microenxertia, cedidas pelo Núcleo de Biotecnologia Aplicada (NBA) da UEM, foi instalado nos mesmos pomares comerciais das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, em 11 de outubro de 2004, e avaliado por IC-RT-PCR.

A primeira avaliação por IC-RT-PCR foi realizada antes do plantio para a certificação da sanidade das plântulas. A instalação desse segundo experimento foi, também, realizada com cinco repetições por pomar, plantadas aleatoriamente entre as plantas adultas de laranja 'Pêra' dos mesmos pomares comerciais (Quadro 2).

Folhas e ramos jovens das quinze plântulas do segundo experimento foram coletados nas seguintes datas: 16/10/2004, 01/11/2004, 07/12/2004, 10/01/2005 e 17/02/2005. O material (nervuras de folhas e cascas de ramos) foi liofilizado e utilizado para a detecção de CTV por IC-RT-PCR.

Devido ao pequeno tamanho das mudas, o material vegetal para as coletas era bem reduzido, deste modo, as amostras das plantas de cada uma das propriedades foram agrupadas formando um 'bulk' de amostras.



Figura 1. Planta armadilha instalada no pomar de Alto Paraná na região Noroeste do Estado.



Figura 2. Planta armadilha instalada no pomar de Nova Esperança na região Noroeste do Estado.

Quadro 1. Plantas de laranja ‘Pêra’ que atuaram como armadilhas de CTV no experimento 1 (ELISA) e locais de plantio.

N° de ordem das plantas	Local da Propriedade	Região do Estado
1	Nova Esperança – PR	Noroeste
2	Nova Esperança – PR	Noroeste
3	Nova Esperança – PR	Noroeste
4	Nova Esperança – PR	Noroeste
5	Nova Esperança – PR	Noroeste
6	Rolândia – PR	Norte
7	Rolândia – PR	Norte
8	Rolândia – PR	Norte
9	Rolândia – PR	Norte
10	Rolândia – PR	Norte
11	Alto Paraná – PR	Noroeste
12	Alto Paraná – PR	Noroeste
13	Alto Paraná – PR	Noroeste
14	Alto Paraná – PR	Noroeste
15	Alto Paraná – PR	Noroeste

Quadro 2. Plantas de laranja ‘Pêra’ que atuaram como armadilhas de CTV no experimento 2 (IC-RT-PCR) e locais de plantio.

N° de ordem	Local da Propriedade	Região do Estado
16	Nova Esperança – PR	Noroeste
17	Nova Esperança – PR	Noroeste
18	Nova Esperança – PR	Noroeste
19	Nova Esperança – PR	Noroeste
20	Nova Esperança – PR	Noroeste
21	Rolândia – PR	Norte
22	Rolândia – PR	Norte
23	Rolândia – PR	Norte
24	Rolândia – PR	Norte
25	Rolândia – PR	Norte
26	Alto Paraná - PR	Noroeste
27	Alto Paraná - PR	Noroeste
28	Alto Paraná - PR	Noroeste
29	Alto Paraná - PR	Noroeste
30	Alto Paraná - PR	Noroeste

3.2. Análise Sorológica

A análise sorológica foi realizada 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 foram pesadas (0,150 g), trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 1,5 mL de tampão de extração PBS-Tween20 2% PVP (polivinilpirrolidona) e, em seguida, centrifugadas a 6500 rpm por 15 minutos para obtenção do sobrenadante.

Todos os ensaios foram realizados com três repetições, utilizando extratos de plantas do campo como controles positivos e extratos de plantas sadias como controles negativos. Os anticorpos utilizados para realização do ELISA foram os monoclonais 30g-02, 37g-11, 39-07 e IC-04-12 (diluições 1:1000) e o anticorpo policlonal PCA 1006/Br (diluição 1:1000) (STACH-MACHADO et al., 2002).

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl/poço do anticorpo policlonal em tampão carbonato 0,2M pH 9,6 (1:1000) e incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com 100 µl/poço da mistura de tampão fosfato salino (PBS) e 2% de leite em pó ‘Molico’ e, após serem incubadas durante 1 hora a 37°C, foram lavadas por três vezes com tampão PBS-Tween 20 (PBS + 0,05% de Tween 20). Foram adicionados, em seguida, 100 µl/poço da solução de extração das amostras e dos controles positivos e negativos e as placas foram incubadas overnight a 4°C. Após ser realizada a lavagem por três vezes com tampão PBS-Tween 20, foram adicionados os anticorpos monoclonais (100 µl/poço) na diluição de 1:1000 em PBS. As placas foram mantidas por duas horas a 37°C e, em seguida, novamente lavadas por três vezes com PBS-Tween 20. Posteriormente, foram acrescentados 100 µl/poço do conjugado antiimunoglobulina de camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:10.000 em PBS, incubando as placas a 37°C por uma hora. Após a lavagem das placas, foram adicionados 100 µl/poço

de substrato pNPP (para-nitrofenil fosfato) na concentração de 1mg/mL diluído em tampão substrato (0,05M Dietanolamina pH 9,6). As placas foram envolvidas em papel alumínio e mantidas no escuro a temperatura ambiente. A leitura das placas foi realizada em leitor de ELISA (Rosys Anthos 2010) a um comprimento de onda de 405 nm, após 1, 2 e 3 horas de incubação no escuro. Foram consideradas positivas as amostras com valores de absorbância (A_{405}) superior a duas e meia vezes o valor do controle negativo, como sugerido por Mathews et al. (1997).

3.3. IC-RT-PCR

3.3.1. Imunocaptura

As amostras foram pesadas (0,1 g), trituradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 1 mL de tampão de extração PBS-Tween20, 2% PVP. Em seguida, foram centrifugadas a 6500 rpm por 15 minutos para obtenção do sobrenadante.

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 μ l/poço do anticorpo policlonal 1006 em tampão carbonato 0,2M pH 9,6 (1:10000) e incubadas a 37°C por 3 horas e meia. As placas foram lavadas por três vezes com tampão PBS-Tween 20 (PBS + 0,05% de Tween 20) e 100 μ l/poço da solução de extração e dos controles positivos e negativos foram adicionados. Após incubação overnight a 4°C, foi realizada a lavagem por três vezes com tampão PBS-Tween 20.

3.3.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela Transcriptase Reversa

As placas com as amostras foram colocadas em estufa a 65°C por 10

minutos para a desnaturação do dsRNA (RNA de fita dupla) viral e, em seguida, foram mantidas em gelo por 1 minuto. Logo após a retirada das placas do gelo, foi adicionado em cada poço um mix contendo Transcriptase reversa (RT), Random primers (Invitrogen), dNTP (10mM), DTT (2mM), TTR, RNaseOUT (Invitrogen) (10U) e água milli-Q autoclavada, com volume final de 30µl. As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, para que ocorresse a síntese da primeira fita de cDNA. O produto da reação da transcriptase reversa foi retirado da placa e transferido para um microtubo de 200µl. ou 500 µl.

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

A amplificação do GCP foi realizada utilizando-se dois ‘primers’ específicos para CTV, o CN119 e o CN120. As reações de PCR foram preparadas em um volume de 25 µl contendo: tampão 10X (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), MgCl₂ (50mM), dNTP (10mM), CN119 (100ng), CN120 (100ng), Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (2,5U), cDNA e água milli-Q autoclavada. O termociclador foi programado para 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 48°C e síntese de DNA por 1 minuto a 72°C, seguidos de um período de extensão de 10 minutos a 72°C.

O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de 1% de agarose, contendo 2µl de brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

3.4. Extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR

As amostras foram pesadas (0,150 g), trituradas em nitrogênio líquido e

ressuspendidas em 500µl de tampão de extração (SDS 2%, Tris 0.1M pH 8.0, EDTA 2mM, água milli-Q). Em seguida, foram agitadas por 10 minutos. A essa mistura, foram adicionados 500 µl de 1:1 fenol-clorofórmio e elevada a uma temperatura de 70°C por 5 minutos; em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a temperatura ambiente e adicionadas 500µl de Clorofórmio e, novamente, as amostras foram levadas a centrífuga por mais 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo.

O sobrenadante (150µl de cada amostra) foi adicionado em colunas de sephadex, preparadas em seringas estéreis de 1 mL. As colunas, contendo o sobrenadante, foram centrifugadas em baixa rotação por um minuto. Ao produto resultante da centrifugação, foram adicionados 1/10 de acetato e 3 volumes de etanol 100%. As amostras foram armazenadas a -20°C overnight, centrifugadas por 25 minutos e lavadas com etanol 70% e 100%, respectivamente. O produto da extração foi suspenso em 25µl de água milli-Q autoclavada. Em seguida, realizou-se a transcrição reversa (RT) e a amplificação do GCP através da técnica de PCR.

3.4.1. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela Transcriptase Reversa

Em microtubos foram colocados 3µl da amostra e um mix contendo Transcriptase reversa (RT), Random primers (Invitrogen), dNTP (10mM), DTT (2mM), TTR, RNaseOUT (Invitrogen) (10U) e água milli-Q autoclavada, com volume final de 20µl. Os microtubos foram incubados a 37°C por 2 horas, para que ocorresse a síntese da primeira fita de cDNA.

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

A amplificação do GCP foi realizada conforme descrito anteriormente na técnica de IC-RT-PCR, utilizando-se os 'primers' específicos para CTV, CN119 e CN120. O mix para as reações de PCR foi preparado em um volume de 25 µl contendo: tampão 10X (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl), MgCl₂ (50mM), dNTP (10mM), CN119 (100ng), CN120 (100ng), Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (2,5U), cDNA e água milli-Q autoclavada. O termociclador foi programado para 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 48°C e síntese de DNA por 1 minuto a 72°C, seguidos de um período de extensão de 10 minutos a 72°.

O produto da reação de amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de 1% de agarose, contendo 2µl de brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

3.5. Avaliação de caneluras

Para avaliação de caneluras, segmentos de ramos foram coletados das plantas armadilhas do primeiro experimento, após dois anos do plantio. Estes segmentos foram acondicionados em sacos de papel. Posteriormente, as cascas foram removidas e observadas a presença ou ausência deste sintoma. Foram, então, atribuídas notas de 1 a 5, seguindo a escala de notas diagramática de Meissner-Filho et al. (2002), onde: 1= ausência de caneluras, 2= presença de caneluras esparsas, 3= número intermediário de caneluras, 4= várias caneluras superficiais ou poucas caneluras profundas e 5= toda a superfície do ramo coberta por caneluras superficiais ou profundas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. A Detecção de CTV através de ELISA

As avaliações feitas por ELISA, utilizando como primeiro anticorpo o policlonal 1006/BR e como segundo anticorpo os monoclonais 30g-02, 37g-11, 39-07 e IC-04-12, encontram-se sumarizados nos Quadros 3, 4, 5 e 6.

O diagnóstico imunológico realizado em março de 2003, antes do plantio, demonstrou que todas as mudas de laranja 'Pêra', que posteriormente (abril de 2003) foram levadas ao campo como plantas armadilhas, estavam livres de vírus. Nessas plantas, os valores de absorbância a 405nm (A_{405}) foram muito próximos de zero.

Como as mudas estavam muito pequenas e com pouco material (folhas) disponível para as avaliações sorológicas, a primeira coleta foi realizada três meses após o plantio, em julho de 2003. Na primeira avaliação, todas as amostras apresentaram valores de A_{405} inferiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo, com todos os monoclonais utilizados, revelando-se negativas à infecção pelo CTV. Estes resultados eram esperados, uma vez que as plântulas apresentavam um lento desenvolvimento, com poucas brotações, e pulgões não haviam sido observados sobre as mesmas durante os meses de outono e inverno.

A segunda coleta foi realizada em novembro de 2003, durante a primavera, quando as plantas estavam mais desenvolvidas, com brotações novas, e colonizadas por pulgões, principalmente, as que foram plantadas no pomar da região Norte do Estado (Figura 3). Nessa ocasião, os títulos obtidos com o anticorpo monoclonal 30g-02 foram superiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo, revelando a presença do vírus nos tecidos de todas as plantas armadilhas. Apenas duas plantas de cada um dos ensaios com os monoclonais

IC-04-12, 37g-11 e 39-07 apresentaram-se, ainda, negativas. A maioria das amostras positivas apresentou valores de A_{405} ainda bastante baixos, em comparação com os controles positivo, variando de 0,122 a 0,174 com o monoclonal 30g-02, de 0,095 a 0,136 com o monoclonal IC-04-12, de 0,103 a 0,151 com o monoclonal 37g-11 e de 1,22 a 0,218 com o monoclonal 39-07.



Figura 3. Planta armadilha colonizada por afídeos na propriedade de Rolândia (região Norte do Estado do Paraná).

Na coleta realizada no mês de janeiro de 2004, dez meses após o plantio, todas as plantas apresentaram valores de A₄₀₅ superiores a duas e meia vezes o valor do controle negativo com todos os monoclonais utilizados.

Estudos, semelhantes a este, que procuram relatar o período de tempo necessário para que a infecção pelo CTV possa ser detectada por ELISA nas condições naturais de campo, são escassos na literatura.

Com este objetivo, Bar-Joseph e Nitzan (1991) selecionaram nove árvores de Minneola (*C. reticulata* x *C. paradisi*) em um pomar de Israel, onde a tristeza não é endêmica, e acompanharam sua infecção por isolados severos de ananismo. A primeira avaliação realizada por ELISA demonstrou que todas as plantas estavam livres de vírus. A presença do vírus nos tecidos só foi detectada através do diagnóstico imunológico seis meses após o surgimento dos primeiros sintomas e, aproximadamente, dois anos após o início das observações.

Um outro experimento em condições não endêmicas da tristeza foi conduzido em plantas sadias de laranja ‘Valência’, estabelecidas em uma área não comercial da Flórida (GOTTWALD et al., 2002). Nessas plantas, um, de quatro ramos marcados, foi inoculado com borbulhas infectadas com o isolado fraco T30. Plantas sadias, com nenhum dos ramos inoculados, foram usadas como controle. O movimento do CTV para os ramos não inoculados de algumas das plantas foi detectado por ELISA somente seis meses após a inoculação, enquanto que os controles não apresentaram títulos que comprovassem a presença do vírus nos tecidos, mesmo após os dezessete meses de avaliação do experimento.

Nas condições naturais de campo, no Brasil, onde a tristeza é endêmica, os resultados do presente estudo demonstraram que a infecção pelo CTV foi detectada nas plantas armadilhas pela sensibilidade do método ELISA, aproximadamente, oito meses após o plantio. Isto não significa, no entanto, que o vírus não estava presente nos tecidos das plantas em períodos anteriores a sua detecção. Sobre esse aspecto Gottwald et al. (2002) consideraram que, provavelmente, o movimento sistêmico do vírus na planta ocorre poucas semanas

após a inoculação, porém, a quantidade reduzida do vírus presente nos tecidos torna inviável sua detecção por testes imunológicos.

Entretanto, Bar-Joseph e Nitzan (1991) conseguiram verificar, através de ELISA, que após a inoculação do CTV, por borbulhas, em plantas indicadoras de laranja 'Azeda', são necessários quarenta e quatro dias para encontrar o vírus nas partes basais da planta e cinquenta e um a cinquenta e oito dias para que ocorra a infecção sistêmica.

Como pode ser constatado nos Quadros 3, 4 e 5, valores crescentes e, muitas vezes, expressivos de absorbância, foram observados com os anticorpos 30g-02, IC-04-12 e 37g-11 nas plantas estabelecidas no pomar de Rolândia (região Norte do Paraná). Resultados semelhantes com estes monoclonais foram registrados apenas na planta 13 do pomar do município de Alto Paraná, localizado na região Noroeste do Estado. As demais plantas da região Noroeste apresentaram pequeno aumento nos títulos, sendo que algumas mantiveram valores muito próximos aos iniciais. Estes resultados podem estar associados à observação da presença ocasional de pulgões nos pomares da região Noroeste, em contraste com sua maior frequência e quantidade na região Norte (Figura 3). Segundo Rodríguez et al. (2004), a infecção por CTV é proporcional ao número de afídeos que pousam em plantas suscetíveis.

Títulos crescentes também foram observados com o monoclonal 39-07 na maioria das amostras. Porém, em relação às plantas do pomar de Rolândia, a detecção por este anticorpo foi menos efetiva do que pelos anticorpos 30g-02 e IC-04-12. Pouca variação foi observada nos valores de absorbância dos controles positivos com todos os monoclonais.

Nos estudos realizados por Carraro et al. (2003), os valores de absorbância, obtidos com os anticorpos 30g-02 e IC-04-12, foram mais significativos do que com os anticorpos 37g-11 e 39-07 em todas as amostras. Resultados semelhantes foram obtidos por Corazza-Nunes et al. (2001) com o monoclonal 30g-02 em relação ao 37g-11 e 39-07. Os autores sugeriram que os anticorpos 37g-11 e 39-07 estavam reagindo mais especificamente com isolados

severos de CTV, enquanto que o monoclonal 30g-02 não estava discriminando isolados.

Ao analisar as habilidades destes anticorpos, Stach-Machado et al. (2002) e Dias (2002) explicaram que os anticorpos monoclonais 30g-02 e 37g-11 estão reconhecendo um determinante sorológico comum a uma ampla gama de isolados fracos e fortes, atuando como um anticorpo monoclonal universal. Em relação ao monoclonal IC-04-12, os autores consideraram que este apresenta homologia com haplótipos que induzem sintomas fracos em plantas indicadoras, enquanto que monoclonal 39-07 apresenta alta homologia com isolados severos de CTV.

Recentemente, estudos realizados por Zanineli-Ré (2004), através da análise da sintomatologia e RFLP, revelaram que as plantas de laranja doce dos pomares da região Noroeste do Estado do Paraná estão infectadas por isolados fracos a moderados, enquanto que muitas plantas dos pomares da região Norte estão infectadas por isolados severos de CTV. No entanto, como já descrito, os títulos obtidos com o monoclonal 39-07 nas plantas armadilhas instaladas na região Norte foram semelhantes ou mais baixos do que aqueles observados em muitas das plantas armadilhas da região Noroeste. Além disso, não foram observadas diferenças marcantes entre a detecção por este monoclonal em relação ao 30g-02, considerado universal. Portanto, durante o período de avaliação deste estudo, não foi possível verificar a habilidade do monoclonal 39-07 na discriminação de isolados severos de CTV nas condições paranaenses.

Flutuações nos valores de absorbância foram observadas em algumas das amostras com os quatro anticorpos monoclonais utilizados, principalmente, nos meses de julho e setembro de 2004 nas plantas 1, 6 e 9 com o monoclonal 30g-02, 6 e 10 com monoclonal IC-04-12 e 6, 8 e 10 com o monoclonal 39-07. Nestas plantas, os títulos obtidos na avaliação de julho de 2004 sugeriram uma maior concentração do vírus nos tecidos do que nas coletas dos meses posteriores. De acordo com Lee et al. (1988), a severidade dos sintomas e o título do CTV são influenciados pela temperatura. Os autores descreveram que sintomas severos são produzidos em temperaturas mais frias e uma redução no

título do vírus pode ocorrer com o aumento gradativo da temperatura, levando, em condições de calor extremo, a termoterapia.

Quadro 3. Valores médios de A₄₀₅, obtidos em ELISA utilizando o anticorpo policlonal 1006 (1:1000) para captura do antígeno e o anticorpo monoclonal 30g-02 (1:1000) como anticorpo de detecção.

Planta/Localidade	mar/03	jul/03	Nov/03	jan/04	mar/04	jul/04	set/04	dez/04
Controle negativo ¹	0	0,043	0,040	0,029	0,037	0,050	0,046	0,034
Controle positivo/NE ²	0,837	0,836	0,836	0,798	0,830	0,847	0,823	0,792
1/NE	0	0,073	0,135	0,137	0,141	0,322	0,221	0,231
2/NE	0	0,041	0,124	0,131	0,131	0,135	0,135	0,186
3/NE	0	0,089	0,131	0,129	0,132	0,135	0,138	0,141
4/NE	0	0,085	0,128	0,151	0,137	0,129	0,126	0,147
5/NE	0	0,048	0,131	0,127	0,139	0,141	0,149	0,161
Controle positivo/R ³	0,577	0,506	0,513	0,499	0,506	0,549	0,521	0,477
6/R	0	0,061	0,141	0,139	0,421	0,597	0,413	0,462
7/R	0	0,052	0,141	0,174	0,281	0,271	0,276	0,593
8/R	0	0,068	0,136	0,308	0,211	0,216	0,289	0,317
9/R	0	0,087	0,174	0,372	0,306	0,305	0,298	0,381
10/R	0	0,079	0,132	0,153	0,157	0,293	0,229	0,285
Controle positivo/AP ⁴	0,788	0,654	0,539	0,680	0,625	0,659	0,650	0,653
11/AP	0	0,045	0,146	0,136	0,127	0,121	0,115	0,172
12/AP	0	0,061	0,122	0,153	0,131	0,118	0,116	0,138
13/AP	0	0,057	0,123	0,129	0,131	0,123	0,153	0,342
14/AP	0	0,056	0,124	0,163	0,124	0,119	0,119	0,167
15/AP	0	0,091	0,127	0,134	0,124	0,124	0,116	0,186

¹- Planta livre de vírus; ²- Planta da propriedade de Nova Esperança; ³- Planta da propriedade de Rolândia; ⁴- Planta da propriedade de Alto Paraná.

NE- Nova Esperança; R- Rolândia; AP- Alto Paraná.

Quadro 4. Valores médios de A₄₀₅, obtidos em ELISA Sandwich utilizando o anticorpo policlonal 1006 (1:1000) para captura do antígeno e o anticorpo monoclonal IC-04 (1:1000) como anticorpo de detecção.

Planta/Localidade	mar/03	jul/03	nov/03	jan/04	mar/04	jul/04	set/04	dez/04
Controle negativo ¹	0	0,049	0,035	0,039	0,048	0,040	0,053	0,039
Controle positivo/NE ²	0,458	0,506	0,554	0,557	0,486	0,580	0,672	0,657
1/NE	0	0,098	0,113	0,111	0,105	0,109	0,116	0,119
2/NE	0	0,060	0,119	0,121	0,123	0,106	0,130	0,122
3/NE	0	0,116	0,116	0,115	0,126	0,124	0,129	0,127
4/NE	0	0,095	0,122	0,146	0,108	0,112	0,123	0,147
5/NE	0	0,053	0,102	0,108	0,107	0,113	0,124	0,123
Controle positivo/R ³	0,536	0,532	0,528	0,643	0,506	0,557	0,505	0,525
6/R	0	0,095	0,112	0,351	0,774	1,132	1,026	0,838
7/R	0	0,099	0,084	0,448	0,509	0,586	0,582	0,971
8/R	0	0,115	0,095	0,347	0,367	0,381	0,388	0,415
9/R	0	0,086	0,089	0,183	0,783	0,718	0,566	0,587
10/R	0	0,079	0,097	0,118	0,385	0,501	0,494	0,492
Controle positivo/AP ⁴	0,483	0,495	0,508	0,475	0,463	0,468	0,487	0,454
11/AP	0	0,016	0,136	0,110	0,104	0,101	0,114	0,113
12/AP	0	0,090	0,119	0,110	0,108	0,109	0,116	0,121
13/AP	0	0,087	0,118	0,107	0,103	0,108	0,394	0,574
14/AP	0	0,103	0,116	0,112	0,106	0,116	0,124	0,121
15/AP	0	0,119	0,114	0,108	0,104	0,114	0,121	0,118

¹- Planta livre de vírus; ²- Planta da propriedade de Nova Esperança; ³- Planta da propriedade de Rolândia; ⁴- Planta da propriedade de Alto Paraná.

NE- Nova Esperança; R- Rolândia; AP- Alto Paraná.

Quadro 5. Valores médios de A₄₀₅, obtidos em ELISA Sandwich utilizando o anticorpo policlonal 1006 (1:1000) para captura do antígeno e o anticorpo monoclonal 37g-11 (1:1000) como anticorpo de detecção.

Planta/Localidade	Mar/03	jul/03	nov/03	jan/04	mar/04	jul/04	set/04	dez/04
Controle negativo ¹	0	0,054	0,040	0,039	0,048	0,051	0,046	0,044
Controle positivo/NE ²	0,557	0,556	0,555	0,579	0,540	0,595	0,574	0,575
1/NE	0	0,053	0,117	0,117	0,112	0,143	0,138	0,145
2/NE	0	0,060	0,116	0,112	0,119	0,131	0,120	0,114
3/NE	0	0,079	0,098	0,111	0,117	0,112	0,118	0,134
4/NE	0	0,091	0,107	0,354	0,118	0,116	0,119	0,114
5/NE	0	0,095	0,103	0,120	0,119	0,106	0,136	0,126
Controle positivo/R ³	0,515	0,507	0,500	0,562	0,475	0,508	0,476	0,488
6/R	0	0,064	0,107	0,215	0,211	0,339	0,340	0,399
7/R	0	0,040	0,131	0,203	0,197	0,151	0,181	0,303
8/R	0	0,069	0,127	0,141	0,141	0,156	0,188	0,172
9/R	0	0,099	0,151	0,119	0,223	0,212	0,235	0,229
10/R	0	0,096	0,109	0,114	0,134	0,225	0,246	0,224
Controle positivo/AP ⁴	0,771	0,632	0,493	0,564	0,587	0,575	0,599	0,504
11/AP	0	0,032	0,118	0,115	0,114	0,119	0,124	0,228
12/AP	0	0,078	0,099	0,111	0,131	0,120	0,126	0,114
13/AP	0	0,096	0,118	0,107	0,134	0,105	0,161	0,179
14/AP	0	0,085	0,121	0,132	0,121	0,106	0,136	0,116
15/AP	0	0,029	0,116	0,113	0,112	0,117	0,129	0,125

¹- Planta livre de vírus; ²- Planta da propriedade de Nova Esperança; ³- Planta da propriedade de Rolândia; ⁴- Planta da propriedade de Alto Paraná.

NE- Nova Esperança; R- Rolândia; AP- Alto Paraná.

Quadro 6. Valores médios de A₄₀₅, obtidos em ELISA Sandwich utilizando o anticorpo policlonal 1006 (1:1000) para captura do antígeno e o anticorpo monoclonal 39-07 (1:1000) como anticorpo de detecção.

Planta/Localidade	mar/03	jul/03	nov/03	jan/04	mar/04	jul/04	set/04	dez/04
Controle negativo ¹	0	0,022	0,048	0,039	0,040	0,039	0,037	0,052
Controle positivo/NE ²	0,536	0,554	0,573	0,549	0,557	0,508	0,559	0,518
1/NE	0	0,039	0,131	0,135	0,134	0,136	0,201	0,441
2/NE	0	0,050	0,113	0,133	0,130	0,137	0,152	0,176
3/NE	0	0,043	0,122	0,130	0,125	0,131	0,140	0,190
4/NE	0	0,040	0,131	0,184	0,138	0,136	0,348	0,376
5/NE	0	0,035	0,153	0,122	0,138	0,145	0,183	0,205
Controle positivo/R ³	0,654	0,616	0,578	0,563	0,472	0,595	0,518	0,499
6/R	0	0,047	0,128	0,396	0,317	0,441	0,395	0,398
7/R	0	0,049	0,187	0,199	0,296	0,232	0,241	0,323
8/R	0	0,050	0,152	0,164	0,202	0,205	0,142	0,146
9/R	0	0,030	0,218	0,137	0,158	0,153	0,318	0,298
10/R	0	0,045	0,102	0,128	0,183	0,205	0,133	0,128
Controle positivo/AP ⁴	0,656	0,576	0,497	0,513	0,528	0,500	0,563	0,597
11/AP	0	0,043	0,211	0,131	0,126	0,146	0,136	0,142
12/AP	0	0,046	0,129	0,125	0,142	0,153	0,213	0,219
13/AP	0	0,049	0,126	0,121	0,158	0,128	0,193	0,218
14/AP	0	0,048	0,124	0,122	0,133	0,142	0,165	0,321
15/AP	0	0,055	0,125	0,122	0,136	0,144	0,151	0,315

¹- Planta livre de vírus; ²- Planta da propriedade de Nova Esperança; ³- Planta da propriedade de Rolândia; ⁴- Planta da propriedade de Alto Paraná.

NE- Nova Esperança; R- Rolândia; AP- Alto Paraná.

Mathews et al. (1997) observaram uma redução nos títulos das avaliações de ELISA realizadas no verão. Os autores consideraram que pode ocorrer uma supressão do CTV nesta estação do ano e que, deste modo, a sensibilidade da técnica é reduzida, tornando-se inviável sua utilização nos meses de temperatura elevada, uma vez que a baixa concentração do vírus pode não ser detectada.

Porém, no presente estudo, plantas que apresentaram maior concentração do vírus nos meses de temperatura mais elevada também foram observadas, como, por exemplo, as plantas 8 e 9 com o monoclonal 30g-02, 4 e 7 com o monoclonal 37g-11 e 11 com o monoclonal 39-07.

4.2. A Detecção de CTV através de IC-RT-PCR e extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR

A primeira avaliação nas plantas armadilhas do segundo experimento, realizada antes de serem levadas ao campo, confirmou a sanidade das mesmas quanto ao CTV, através de IC-RT-PCR. Os resultados obtidos nas coletas de 16/10/2004, 01/11/2004, 07/12/2004 e 10/01/2005, realizadas após o plantio, demonstraram que todas as plantas instaladas nos três pomares comerciais ainda apresentavam-se livre de vírus, pela sensibilidade desta técnica.

No perfil eletroforético dos produtos da PCR das amostras coletadas em 17/02/2005, foi possível observar a presença de um fragmento de aproximadamente 670 pb, correspondente ao gene da proteína do capsídeo do CTV (SEKYA et al., 1991), no “bulk” das amostras da propriedade da região Norte do Estado, confirmando a presença de partículas virais nestas plantas. No entanto, nenhum fragmento foi observado no perfil eletroforético referente ao “bulk” das amostras das propriedades da região Noroeste do Estado do Paraná, mesmo após várias repetições da técnica (Figura 4). Estes resultados podem não significar, porém, a ausência do vírus nos tecidos das plantas, mas sim que sua concentração era muito baixa para ser detectada pelo anticorpo policlonal de

captura ou para ser transcrita e amplificada pelas enzimas transcriptase reversa e Taq polimerase.

Entretanto, nos estudos realizados por Nolasco et al. (1997), a técnica de IC-RT-PCR permitiu detectar o CTV em todas as amostras positivas com ELISA e também em 20% das amostras que se mostraram sorologicamente negativas. Os autores ressaltaram que a sensibilidade da técnica de IC-RT-PCR é superior a da ELISA.

Novos testes, utilizando a técnica de IC-RT-PCR, foram realizados em 11/01/2006, aproximadamente um ano após a detecção do CTV nos tecidos das plantas instaladas no pomar do município de Rolândia, no norte do Estado. O fragmento de 670 pb foi, novamente, detectado apenas no bulk destas amostras, permanecendo ausentes naqueles que representavam as amostras da região Noroeste (Figura 5).

Estes estudos demonstraram que a técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na detecção do CTV nas plantas armadilhas da região Norte do Estado, uma vez que as partículas virais foram detectadas quatro meses após o plantio por este método. Porém, o fato do CTV ter sido detectado por ELISA em todas as plantas armadilhas, de ambas as regiões do Estado, sete a oito meses após o plantio, demonstra que a ausência do fragmento correspondente a amplificação do GCP nos perfis eletroforéticos dos bulks das amostras da região Noroeste pode ser devido aos problemas da sensibilidade da técnica aos tecidos destas plantas.

O tempo necessário para que ocorra a infecção sistêmica em mudas de três variedades de citros, em condições de casa de vegetação, foi avaliado por Huang et al. (2004), através das técnicas de ELISA, IC-RT-PCR e extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR, semanalmente, durante três meses após a inoculação. Os resultados obtidos revelaram que a detecção do CTV ocorreu quatro semanas após a inoculação, pela técnica de extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR, cinco semanas após a inoculação com IC-RT-PCR, e apenas seis semanas após a inoculação por ELISA, demonstrando a superioridade da técnica extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR

sobre as demais e da PCR sobre ELISA. O melhor desempenho destas duas técnicas baseadas em PCR sobre ELISA também foi verificado por Mathews et al. (1997).

A técnica de extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR também foi empregada neste estudo para identificar o tempo mínimo de infecção sistêmica pelo CTV nas plantas armadilhas. No entanto, o produto da amplificação da PCR revelou a presença de um fragmento com peso molecular inferior a 600 pb em todos os perfis dos bulks das amostras analisadas, sugerindo não se tratar do GCP do CTV (Figura 6). Estes resultados não eram esperados, uma vez que os “primers” utilizados sempre se revelaram específicos para a amplificação do GCP do CTV.

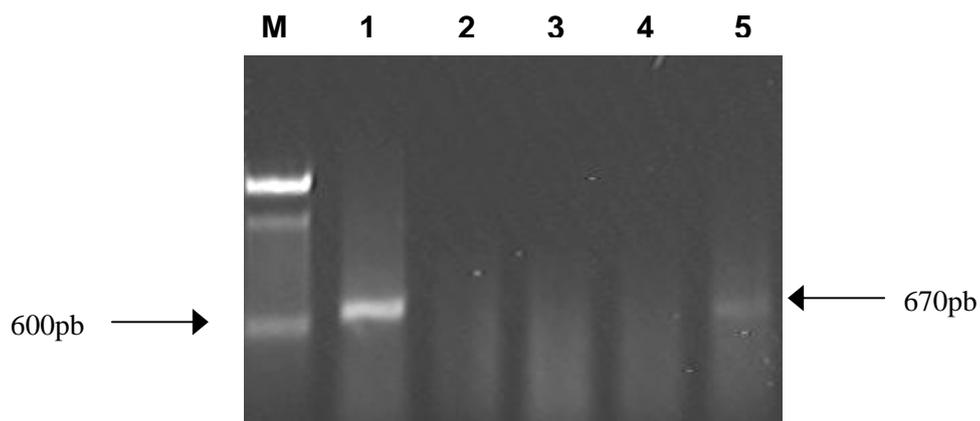


Figura 4. Produtos da PCR obtidos após amplificação do cDNA dos isolados de CTV da coleta de 17/02/2005 através de IC-RT-PCR. M: Marcador de DNA de 1Kb; 1: controle positivo; 2: controle negativo; 3: bulk das amostras de Nova Esperança ; 4: bulk das amostras de Alto Paraná; 5: bulk das amostras de Rolândia.

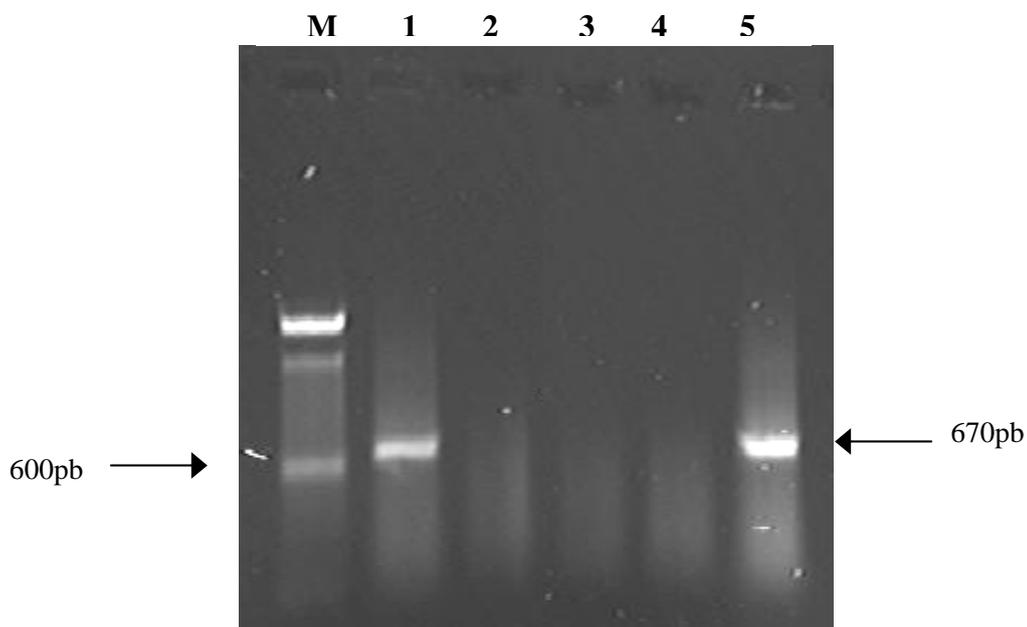


Figura 5. Produtos da PCR obtidos após amplificação do cDNA dos isolados de CTV da coleta de 11/01/2006 através de IC-RT-PCR. M: Marcador de DNA de 1Kb; 1: controle positivo; 2: controle negativo; 3: bulk das amostras de Nova Esperança ; 4: bulk das amostras de Alto Paraná; 5: bulk das amostras de Rolândia.

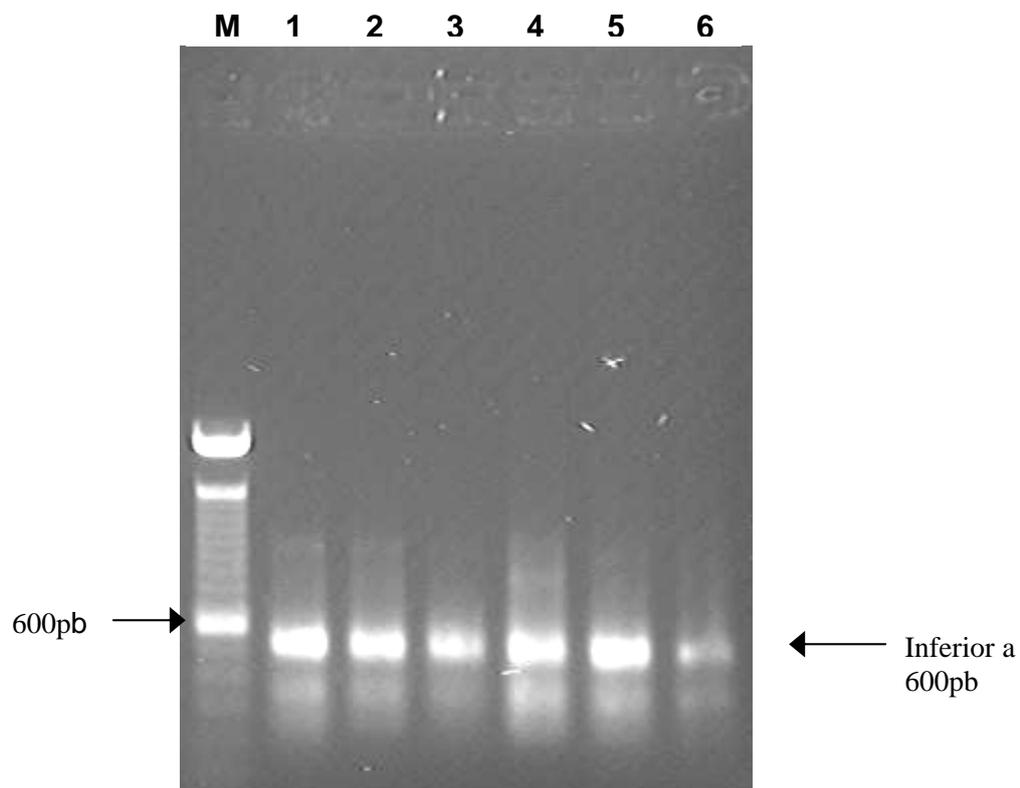


Figura 6. Produtos da PCR obtidos após amplificação do cDNA dos isolados de CTV da coleta de 17/02/2005 através da extração de ácidos nucléicos totais (1:bulk das amostras de Nova Esperança; 2: bulk das amostras de Alto Paraná; 3: bulk das amostras de Rolândia) e 11/01/2006 (4: bulk das amostras de Nova Esperança; 5 bulk das amostras de Alto Paraná; 6: bulk das amostras de Rolândia)

4.3. Avaliação das caneluras

A sintomatologia da tristeza foi avaliada após dois anos da instalação do experimento através da observação da presença de caneluras nos ramos das plantas armadilhas.

Os valores atribuídos aos ramos das plantas indicaram que apenas a planta nove, instalada no pomar da região Norte do Estado, apresentou este sintoma. De acordo com a escala diagramática de Meissner-Filho et al. (2002), a intensidade de canelura apresentada por esta planta está no nível 4, sugerindo a infecção por haplotipos severos de CTV (Figura 7).

Este resultado está de acordo com os estudos realizados por Carraro et al. (2003) e Zanineli-Ré (2004), os quais demonstraram, como já descrito, que variantes severos do CTV, causadores do sintoma de canelura, fazem parte dos complexos virais presentes nos pomares da região Norte do Estado.

Este resultado vem fortalecer a hipótese de que o monoclonal 39-07 não está discriminando os isolados severos de CTV nas condições paranaenses.



Figura 7. Planta armadilha 9, instalada na propriedade do município de Rolândia no norte do Estado.

5. CONCLUSÕES

As análises dos resultados do diagnóstico do CTV por ELISA, IC-RT-PCR e sintomatologia indicaram que:

- Através da técnica de ELISA, a detecção do CTV nas plantas armadilhas, instaladas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado, ocorreu entre sete e oito meses após o plantio;
- A presença do CTV nas plantas armadilhas da região Norte foi detectada pela técnica de IC-RT-PCR quatro meses após o plantio;
- O CTV não foi detectado nas plantas da região Noroeste do Estado através da técnica de IC-RT-PCR;
- Por ELISA, não foi possível observar a discriminação de isolados severos através da utilização dos anticorpos monoclonais específicos para o complexo ‘Capão Bonito’;
- A técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na determinação do tempo mínimo em que a infecção sistêmica pelo CTV ocorre nas condições naturais de campo, enquanto que a técnica de ELISA, revelou-se mais eficiente quanto a amplitude e repetibilidade;
- A análise da sintomatologia observada nas plantas armadilhas, dois anos após a instalação do experimento, revelou caneluras em uma das plantas da região Norte, sugerindo a presença de isolados severos de CTV nesta região.

6.REFERÊNCIAS

ALBIACH-MARTÍ, M.R.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; HILF, M.E.; SHANKER, S.; ALMIRA, E.C.; VIVES, M.C.; LÓPEZ, J.; GUERRI, R.; FLORES, R.; MORENO, P.M.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J. Virol.*, v.74, p.6856-6865, 2000.

BALLESTER-OLMOS, J.F. MORENO, P. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*, v.90, p. 134-138, 2000.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: *Princípios e Técnicas de Diagnose Aplicados em Fitovirologia*. SBF. Fortaleza, 2001.

BAR-JOSEPH, M.; NITZAN, Y. The spread and distribution of *Citrus tristeza virus* isolates in sour orange seedlings. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, p.62-65, 1991.

BAR-JOSEPH, M. MARCUS, R.; LEE, R.F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Ann. Rev. Phytopathology*,. n. 27, p. 291-316, 1989.

BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S. M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D. E.; CLARK, M. F.; LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, v.69, n.2, p.190-194, 1979.

BAR-JOSEPH, M.X.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; AYLÓN, M.A.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* molecular research. In: *Proc. 15th Conf. IOCV*, p 1-7. IOCV, Riverside, CA, 2002.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. *Bragantia*, Campinas, v.62, n.3, p.345-355, 2003.

BOVE, J.M. Interaction between virus and virus-like pathogens and the host plant susceptible, tolerant and resistant citrus species. Chapter 2. *Virus and virus-like diseases of citrus in Near East region*, 1995.

BRLANSKY, R.H. Application of the *Citrus tristeza virus* antisera in labeled antibody, immunoelectron microscopical, and sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion tests. In: *Proc. 9th Conf. IOCV*, p.337-342, 1984.

BROADBENT, P.; BRLANSKY, G.H.; INDSTO, J. Biological characterization of Australia isolates *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease*, v.80, p.329-333, 1996.

CAMBRA, M.; GORRIS, M.T.; MARROQUÍN, C.; ROMAN, M.P.; BALLESTER-OLMOS, A.; MARTINEZ, C.; MENDOZA, A.H.; LÓPEZ, A.; NAVARRO, L. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus*. In the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, v.71, p.85-95, 2000.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. *Acta Scientiarum*. Maringá, v.25, n.2, p.269-273, 2003.

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

CLARK, M.F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, n.34, p.475-483, 1977.

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.T.; CORAZZA-NUNES, M. J.; MÜLLER, G.W.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; SGANZERLA, L.C.M.; MACHADO, M.A.; Caracterização molecular de isolados do *Citrus tristeza virus* com potencial para pré-
imunização. *Fitopat. Bras.* 30 (suplemento), agosto, 2005 (Resumo).

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.

COSTA, A.S. Present status of the tristeza disease of citrus in south america. *FAO PLANT PROTECTION BULLETIN*, v.4, n.7, p.98-105, 1956.

DIAS, L.C.F. Caracterização imunoquímica dos anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citrus do complexo Capão Bonito. [Tese de mestrado] Universidade Estadual de Campinas, 2002.

DODDS, J. A.; JARUPAT, T.; LEE, J. G.; ROISTACHER, C. N. Detection of strain specific double-stranded RNAs in citrus species infected with *citrus tristeza virus*: a review. *Phytopathology*, n.19, p131-137, 1987.

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.; PAPPU, S. S.; RUBIO, L.; AYLON, M. A.; MORENO, P.; GUERRI, J.; LEE, R. F.; NILBETT, C. L. Single stranded conformational polymorphism enables the differentiation of citrus tristeza closterovirus estrains. *Phytopathology*, n.85, 1995.

FERGUSON, J.J.; GARNSEY, M.S. Citrus virus and virus-like diseases. *University of Florida. Circular 1131*, 1993.

GARNSEY, S.M.; GSALVES, D.; PURCILULL, D.E. Rapid diagnosis of *Citrus tristeza virus* infection by SDS immunodiffusion procedures. *Phytopatology*, v.69, p.88-95, 1979.

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.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; RILEY, T.D. Latency of systemic infection in young field-grown sweet orange trees following graft-inoculation with *Citrus tristeza virus*. In: *Proc. 15th Conf. IOCV*, p.48-53, 2002.

HILF, M.E.; MAVRODIEVA, V.A.; GARNSEY, S.M. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Virology*, v.95, n.8, 2005.

HILF, M.E.; GARNSEY, S.M. *Citrus tristeza virus* in Florida: A synthesis of historical and contemporary biological, serological, and genetic data. In: *Proc. 15th Conf. IOCV*, p.13-20, 2002.

HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; PAPPU, H.R.; GUMPF, D.J.; NIBLETT, C.L.; GARNSEY, S.M. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, v.208, p.576-582, 1995.

HUANG, Z.; RUNDELL, P.A.; GUAN, X.; POWELL, C.A. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant disease*, v.88, n.6, 2004.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON, W.O. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, v.208, p.511-520, 1995.

KARASEV, A. V.; DAWSON, W. O.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M. Molecular biology of *Citrus tristeza virus*: implications for disease diagnosis and control. *Acta horticulturae*, v. 472, p.333-337, 1998.

KITAJIMA, E. W.; SILVA, D. M.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Thread-like particles associated with Tristeza disease of Citrus. *Nature*, 1964

KOENING, R.; PAUL, H.L. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. *Journal of virology Methods*, n.5: p.113-125, 1982.

LANZA, A.M.; GUIMARÃES, G.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe agropecuário*, v.21, n.204, p.97-103. Belo Horizonte, 2000.

LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; MARAIS, L.J.; MOLL, J.N.; YOUTSEY, C.O. Distribution of *Citrus tristeza virus* in grapefruit and sweet orange in Florida and South Africa . In:*Proc. 10th Conf. IOCV*, p.33-38, 1988.

LEE, R. F.; BAKER, P. S.; ROCHA - PENÃ, M. A. *The Citrus tristeza virus (CTV), and Introducion to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central america and Caribbean. Internacional Institute of Biological Control Berks, UK, 197p. 1994.*

LEE, R. F.; ROISTACHER, C.N.; NIBLETT, C.L.; ROCHA - PENÃ, M.A.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K.; GUMPF, D.G.; DODDS, J.A. Presence of *Toxoptera citricidus* in central america: a threat to citrus in Florida and the United States. *CITRUS INDUSTRY*. June, 1992.

LEE, R. F.; CALVERT, L. A.; ÁNGEL, J.; HUBBARD, J.D. *Citrus Tristeza Virus: Characterization of coat proteins. Phytophatology*. n.78, p.1221-1226, 1987.

LEONEL, W.M.S. *Avaliação molecular do Citrus tristeza virus de clones de laranja doce submetidos à limpeza clonal e pré-imunização*. [Dissertação de mestrado]- Universidade Estadual de Maringá- Maringá, 2004.

MATHEWS, D.M.; RILEY, K.; DODDS, J.A. Comparison of detection methods for *Citrus tristeza virus* in field trees during months of nonoptimal titer. *Plant disease*, n.81, p.525-529, 1997.

MAWASSI, M.; MITKIEWSKA, E.; HILF, M.E.; ASHOULIN, L.; KARASEV, A.V.; GAFNY, R.; LEE, R. F.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O.; BAR-JOSEPH, M. Multiple species of defective RNAs in plnats infected with *Citrus tristeza virus*. *Virology*, n.214, p. 264-268, 1995.

MAWASSI, M.; MITKIEWSKA, E.; GOFMAN, R.; YANG, G.; BAR-JOSEPH, M. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol*, v.77, p.2359-2364, 1996.

MCGOVERN, R. J.; LEE, R. F.; NIBLETT, C.L. Florida cooperative extension service. *Tristeza*, p.1-4, 1994.

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*, v.27, n.3, p.312-315, 2002.

MILSTEIN, C. Anticuerpos monoclonales. *Investigation y Ciencia*, n.51, p.38-48,1980.

MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, J.T. Métodos para identificação e constrole da tristeza dos citros, 1954. In: *Laranja. Cordeirópolis*, n.19, v.1, p.197-228, 1998.

MOREIRA, S. Um novo problema para nossa citricultura. *Revista da Agricultura*, Piracicaba, n.35, p.77-82, 1960. In: *Laranja. Cordeirópolis*, n.20, p.401, 1999.

MORENO, P.J.; GUERRI, J.F.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; MATINEZ, M.E. Segregation of *Citrus tristeza virus* strains evidenced by double-stranded RNA (dsRNA) analysis. In: *Proc. 11th Conf. IOCV*, p.20-24, 1991.

MORENO, P. GUERRI, J.F.; MUÑOZ, N. Identification of spanish strains of *Citrus tristeza virus* by analyses of double-stranded RNA. *The American Phytopathological Society*, v.80, n.5, 1990.

MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A. Trinta e três anos de controle da tristeza dos citros por premunização. In: *XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia. Fitopatologia Brasileira 26* (suplemento), p.241-242, agosto de 2001.

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.

MÜLLER, G.W.; REZENDE, A.M. preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: *Diseases of Fruits and Vegetables. Diagnosis and Management*. v.1, p.361-395, 2004.

MÜLLER, G. W.;CARVALHO, S.A.; GUIRADO, N. Indexação para viroses das matrizes de citros do centro de citricultura Sylvio Moreira- Xiloporose. *Laranja*, Cordeirópolis , n.15, v.2, p.213-220, 1994.

MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. *Summa Phytopathologica*. Piracicaba, n.2, p.245-263, 1976.

MÜLLER, G.W. Pulgão e tristeza dos citros no Brasil. *Laranja*, v.17, n.1, p.292-293, 1996.

MULLES, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* p.335-350, 1986. In: ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, p.175-186, 1993.

NARVÁEZ, G.; SKANDER, B.S.; AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods, Elsevier Science BV*, n.85, p.83-92, 2000.

NIBLETT, C.L.; GENE, H.; CEVIK, B.; HALBERT, S.; BROWN, L.; NOLASCO, G.; BONACALZA, B.; MANJUNATH, K.L.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.R., LEE, R.F. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Research*, n.71, p.97-106, 2000.

NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; POWELL, C.A.; GUMPF, D.J.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat proteins fragments. *Phytopathology*, n.86, p.974-979, 1996.

NOLASCO, G.; SEQUEIRA, Z.; BONACALZA, B.; MENDES, C.; TORRES, V.; SANCHEZ, F.; URGOITI, B.; PONZ, F.; FEBRES, V.J.; CEVIK, B.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. Sensitive CTV diagnoses using immunocapture reverse transcriptional polymerase chain reaction and an exonuclease fluorescent probe assay. *Fruits*, v.52, n.6, p.391-396, 1997.

NOLASCO, G.; BLAS, C.; TORRES, V.; PONZ, F. A method combining immunocapture and PCR amplification in microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods*, n.45, v.2, p.201-218, 1993.

PAPPU, H. R.; PAPPU, S. S.; NIBLETT, C. L.; LEE, R. F.; CIVEROLO, E. Comparative sequence analysis of the coat protein of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes*. n.7, p.255-264, 1993.

PAPPU, H. R.; PAPPU, S. S.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R. F.; NIBLETT, C. L. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among several isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.9, p.3641-3644, 1993a.

PAPPU, H. R.; KARASEV, A.V.; ANDERSON, E.J.; PAPPU, S. S.; HILF, M.E.; FEBRES, V.J.; ECKOFF, R.M.G.; McCAFFERY, M.; BOYKO, V.; GOWDA, S.; DOJLA, V.V.; KOONIN, E.V.; GUMPF, D.J.; CLINE, K.C.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, W.O.; LEE, R. F.; NIBLETT, C. L. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the Citrus tristeza closterovirus genome. *Virology*, n.199, p.35-46, 1994.

PERMAR, T.A.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, v.80, p.224-228, 1990.

POMPEU JUNIOR, J. Variedade de porta-enxerto para citros. In: 1° *Encontro Paranaense de Citricultura. Anais*. Londrina, p.79-96, 1986.

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.

PRICE, W.C. Translocation of tristeza and psorosis viruses. In: *Proc. 4th Conf. IOCV*, p.52-58, 1968.

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. Serological techniques for detection of *citrus tristeza virus*. *J. Virol. Methods*, v.34, p. 311-331, 1991.

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.

RODRÍGUEZ, A.; GORRIS, M.T.; SERRA, J.; ROMÁN, M.P.; COLLADO, C.; MENDONZA, H.; CAMBRA, M. Estimation of the number of *Citrus tristeza virus*- viruliferous aphids landing on individual citrus seedlings and viral incidence in different citrus rootstocks in Spain. In: *Proc. 16th Conf. IOCV*, p.52, 2004 (Resumo).

ROISTACHER, C.N.; MORENO, P. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* – a review. In: *Conf. 11th Proc. IOCV*, 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.

SAVOV, A.; ANGELICHEVA, D.; JORDANOVA, A.; EIGEL, A.; KALAYDJIEVA, L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Research*, v.20, n.24, p.6741-6742, 1992.

SCHÄFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A. L. C. Porta-enxertos utilizados na Citricultura. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.4, p.723-733, 2001.

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.

SEQUEIRA, J. C. Técnicas Serológicas e bio-moleculares de diagnósticos de Vírus e de Viróides em Plantas. *Summa Phytopathologica*. v.18, abril-junho, 1992.

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 Coat pre in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. In: *Proc. 14th Conf. IOCV*, p.131-136, 2000.

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).

STACH-MACHADO, D.R.; PERONI, L.A.; DIAS, L.C.F.; CAPORRINO, M.C.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Characterization of monoclonal antibodies for identification of the severe strain of 'Capão Bonito' *Citrus tristeza virus*. In: *Proc. 15th Conf. IOCV*, p.165-171, 2002.

SUASTIKA, C.; NATSUAKE, T. HIROTSUGU, T.; KANO, T.; IEKI, H.; OKUDA, S. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. *J. Gen. Plant Path.*, n.67, p.73-77, 2001.

TARGON, M.L.P.N. *Expressão e análise do gene do capsídeo de isolados do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros*. 142p. [Tese de doutorado]- Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1997.

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: *Proc. 14th Conf. IOCV*, n.14, p. 121-126, 2000.

TOLBA, M.A.; RAGAB, M.M.; NOUR-ELDIN, F. Distribution and movement of the casual virus in citrus plants. In: *Proc. 7th Conf. IOCV*, p.63-67, 1976.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; LOPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTÍ, R.M. The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *J. Gen. Virol.* v.80, p.811-816, 1999.

WALLACE, J.M. Virus and virus-like disease. The Citrus Industry. Division of Agricultural Science University of California Berkeley. v.2, p.67-184, 1978.

YANG, G.A. ;CHE,X.B.;GOFMAN, R; BEM-SHALOM, Y; PIESTUM, D; GAFNY, R; MAWASSI, M; BAR-JOSEPH, M.D. RNA molecules associated with sub isolates of the VT strain of *Citrus tristeza virus* which induce different seedling- yellows reactions. *Virus Genes*, v19, n1, p.5-13, 1999.

YOKOMI, R.K.; DEBORDE, R.L. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of *Citrus tristeza virus* isolates from CTV eradicated and noneradicated districts in central California. *Plant disease*, v.89, n.8, p. 859-866, 2005.

YOKOMI, R.K. The brown citrus Aphid and *Citrus tristeza virus*. *Citrograph*, v.6, p.14-18, 1994.

ZANINELI-RÉ, M.L. *Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros pela sintomatologia e análise de RFLP do gene do capsídeo.2004. 55p.* [Dissertação de mestrado]- Universidade Estadual de Maringá- Maringá, 2004.

ZEBZAMI, M.; HILL, J.H.; VAN DEUSEN, R.A.; NADORI, E.B. Characterization of monoclonal antibodies raised against *Citrus tristeza virus* in morocco. In: *Conf. 12th IOCV conf*, p.93-99, 1993.

ZEMZMI,M.; SOARES, C.M.; BAILEY, A.M.; NIBLETT, C.L.; NOLASCO, G. Comparison of molecular and biological characteristics of fourteen moroccan isolates of *Citrus tristeza virus*. In: *Conf. 15th IOCV conf.*, p.8-13, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)