

# Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Estado do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa proteica

Bianca Pierina Carraro<sup>1</sup>, William Mário de Carvalho Nunes<sup>1,5\*</sup>, Maria Júlia Corazza-Nunes<sup>2,5</sup>, Marcos Antonio Machado<sup>3</sup> e Dagmar Ruth Stach-Machado<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. <sup>3</sup>Centro de Citricultura Sylvio Moreira, IAC, Cordeirópolis, São Paulo, Brasil. <sup>4</sup>Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. <sup>5</sup>Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - NBA, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. Autor para correspondência. e-mail: wmcnunes@uem.br

**RESUMO.** Treze isolados do *Citrus tristeza virus* (CTV), obtidos de pomares de laranja 'Pêra', da região Norte do Paraná, foram avaliados e comparados a dois isolados severos do Estado de São Paulo, por meio de I-DAS ELISA (Indirect double antibody sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e de SSCP (Single-strand conformation polymorphism) do gene da proteína do capsídeo do vírus. Extratos de plantas de dois municípios amostrados apresentaram consideráveis valores de absorvância ( $A_{405}$ ), com os anticorpos monoclonais específicos para estirpes severas do vírus, e padrões SSCP do gene da proteína do capsídeo semelhantes aos dos isolados, oriundos do Estado de São Paulo, obtidos de plantas inoculadas com o 'complexo Capão Bonito'. Os resultados sugerem que os pomares citrícolas da região Norte do Paraná estejam infectados por variantes severos do vírus.

**Palavras-chave:** ELISA, CTV, anticorpos monoclonais.

**ABSTRACT. Evaluation of the *Citrus tristeza virus* complex occurrence in Northern Paraná State through immunological assay and SSCP.** Thirteen *Citrus tristeza virus* (CTV) strains from 'Pera' citrus orchards, collected in Northern Paraná State, Brazil, were evaluated and compared with two severe CTV strains from São Paulo State through I-DAS ELISA (Indirect Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) and SSCP (Single-strand Conformation Polymorphism) of virus capsid gene. In samples collected in two counties, high levels of absorbency ( $A_{405}$ ) were recorded, when monoclonal antibodies specific to CTV severe strains were used. In addition, SSCP patterns of these samples were identical to patterns recorded for the *Capão Bonito* complex from São Paulo State. These results suggest that citrus orchards of Northern Paraná State are infected with severe CTV strains.

**Key words:** ELISA, CTV, monoclonal antibodies.

## Introdução

No Brasil, vários pomares de laranja doce (*Citrus sinensis*) cv. 'Pêra' sobre porta-enxertos suscetíveis ao CTV foram severamente afetados pela tristeza no final da década de 1950. O controle foi obtido satisfatoriamente por meio da mudança de porta-enxerto de laranja azeda para o limão cravo (tolerante ao CTV) e da introdução de material pré-imunizado (Pêra IAC) com um único isolado fraco protetivo, o 1743/82, que tem mantido a capacidade de proteção ao longo de 30 anos, não só em São

Paulo, mas também em outros estados (Costa e Müller, 1980).

Recentemente, registros da ocorrência de plantas, clones de 'Pêra' IAC, severamente atingidas pela tristeza em pomares, principalmente da região Sudoeste paulista, indicaram a necessidade de monitoramento das alterações do complexo protetivo por variantes severas do vírus (Müller *et al.*, 1999).

Métodos imunológicos com a utilização de anticorpos monoclonais associados à técnica de SSCP (single-strand conformation polymorphism)

têm proporcionado novas ferramentas na análise comparativa de complexos do *Citrus tristeza virus* em condições de campo (Corazza-Nunes *et al.*, 2001).

No Paraná, face à ocorrência do “cancro cítrico” nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado, a citricultura permaneceu interdita por três décadas, ficando restrita à região do Alto Ribeira (Morimoto, 1990). O desenvolvimento de pesquisas, principalmente relacionadas ao controle da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, agente causal do cancro cítrico, aliado ao apoio governamental, tem possibilitado a liberação e o incremento da citricultura paranaense, que vem apresentando, desde a década de 80, uma evolução positiva na área de plantio de laranja, além da produção e da exploração industrial de suco concentrado. A implantação dos primeiros pomares, a partir de 1988, foi realizada principalmente a partir de mudas oriundas do Estado de São Paulo, muitas delas produzidas sem um controle fitossanitário rígido. Até o momento, estudos minuciosos e acurados com relação à tristeza não têm sido realizados nos parques citrícolas paranaenses. Frente a essa realidade, este trabalho teve por objetivo avaliar complexos de CTV de pomares de laranja ‘Pêra’ da região Norte do Estado do Paraná, estabelecendo comparações com isolados severos de São Paulo por meio de I-DAS ELISA (Indirect double antibody sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e SSCP.

## Material e métodos

### Isolados de CTV

Os isolados de CTV avaliados neste estudo foram obtidos de 11 plantas sintomáticas (porte da copa reduzido) de laranja doce, *Citrus sinensis* cv. ‘Pêra’, pertencentes a propriedades agrícolas da região Norte do Estado do Paraná. Dois isolados foram coletados de plantas inoculadas com o complexo severo ‘Capão Bonito’, pertencentes a um experimento instalado em casa de vegetação, no Centro Apta Citros “Sylvio Moreira” - IAC, Cordeirópolis, Estado de São Paulo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Locais da coleta das amostras de citros (*C. sinensis* L. Osb) para avaliação, pelo teste ELISA, do *Citrus tristeza virus* (CTV)

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

Para a avaliação sorológica e para a extração de dsRNA (RNA de dupla fita), nervuras de folhas e de cascas de ramos jovens foram colhidas nos quatro quadrantes das plantas e reunidas para formar uma única amostra.

### Análise sorológica

A análise sorológica foi realizada por meio de I-DAS ELISA, segundo a metodologia descrita por Garnsey e Cambra (1991). Os anticorpos utilizados foram: o policlonal PCA 1006/Br (diluição: 1:1.000), produzido em coelho, e os monoclonais (Mabs) 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08 (diluição 1:1.000), produzidos a partir de proteínas recombinantes do capsídeo de haplotipos severos brasileiros de ‘Capão Bonito’ (Stach-Machado *et al.*, 1998). Os ensaios foram conduzidos testando diferentes tempos de leitura da absorbância a 405nm, empregando os Mabs 30G02, 37G11, 39-08 e IC-04-08 na sensibilização das placas, e o policlonal como segundo anticorpo, como proposto por Nikolaeva *et al.* (1997, 1998).

Todos os ensaios foram realizados com três repetições, utilizando as proteínas CB-22 e CB-104 (proteínas do capsídeo de haplotipos do complexo ‘Capão Bonito’) como controle positivo e extratos de plantas sadias como controle negativo. Foram consideradas positivas as amostras com OD<sub>405</sub> superior a três vezes o valor do controle negativo.

### Extração e purificação de dsRNA

A extração de dsRNA, a partir de tecidos liofilizados infectados por CTV, foi efetuada utilizando fenol, clorofórmio, SDS (Sodium Dodecyl 1 Sulphaate) e tampão de extração 2 x STE (100 mM Tris-HCl, 2mM NaCl, 2mM EDTA pH 6.8), seguida pela purificação por meio de dois ciclos de cromatografia em colunas de celulose (Whatman CF11), de acordo com o procedimento descrito por Valverde *et al.* (1990).

### RT-PCR do gene

Para a síntese da primeira fita de cDNA o dsRNA do CTV, purificado e desnaturado a 75°C por 8min, foi usado como molde em uma reação de 20µl contendo: 75mM KCl, 50mM Tris, pH 8.3, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM de cada dNTP, 2mM de DTT (dithiothreitol), 0.5 unidade.µl<sup>-1</sup> de inibidor da Rnase (Invitrogen), 1µl (1µg.µl<sup>-1</sup>) de “random primers” (Invitrogen) e 100 unidades de MMLV-RT (Invitrogen). O gene da proteína do capsídeo foi amplificado por PCR, utilizando os primers CN-119 (5’AGATCTACCATGGACGACGAAACAAA G 3’) e CN-120 (5’GAATTCGCGGCCGCTCAA

CGTGTGTTAAATTTCC 3'), derivados do isolado T-36, da Flórida, USA. As amplificações foram efetuadas em termociclador MJ Resarch programado para 35 ciclos de: 1min a 94°C, 1min a 55°C e 2min a 72°C, seguidos de uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos das reações de amplificações foram purificados em gel de agarose 0.8%, de baixo ponto de fusão, de acordo com o procedimento descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### Análise SSCP

As análises SSCP foram realizadas de acordo com a metodologia usada por Souza *et al.* (2000a). Alíquotas de 1 a 10µl do produto de amplificação foram misturadas com igual volume de solução desnaturante (95% formamida, 2mM EDTA e 0.005% azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas a 95°C, durante 10min, colocadas em gelo e submetidas à eletroforese em gel não-desnaturante de poliacrilamida 8%, em tampão TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM, pH 8.5). A eletroforese foi conduzida em uma voltagem constante de 200 volts, por 15 horas, a 25°C. O gel foi corado com nitrato de prata, de acordo com o procedimento descrito por Beidler *et al.* (1982).

### Resultados e discussão

As avaliações imunológicas, utilizando anticorpos monoclonais na cobertura das placas e policlonal como segundo anticorpo (Nikolaeva *et al.*, 1997), revelaram-se eficazes na captura e na caracterização dos complexos de CTV dos pomares de laranja 'Pêra' da região Norte do Paraná. Todas as plantas avaliadas apresentaram reações positivas ao CTV, com todos os Mabs, com exceção da planta 1 do município de Rolândia, com o monoclonal 37G11 (Tabela 2).

Considerando os altos títulos obtidos com o monoclonal 30G02 na maioria das amostras, a relação de absorvância ( $R_{A405}$ ) foi calculada entre esse anticorpo e os monoclonais 37G11, 39-08 e IC-04-08. A relação de absorvância entre monoclonais universais e específicos ( $R_{MU/ME}$ ), sugerida por Machado *et al.* (1997), foi utilizada como uma medida indireta de determinação de complexos virais. Baixos valores de  $R_{(A405)}$ , como resultado de altos valores de  $A_{(405 \text{ Mab})}$ , indicariam que o complexo tem uma fração significativa de epitopos reconhecidos pelos monoclonais específicos e vice-versa.

Valores positivos de  $R_{A405}$  foram obtidos entre o anticorpo 30G02 e os demais monoclonais utilizados, indicando que, como os Mabs 3DF1 e

3CA5 (Vela *et al.*, 1988), esse monoclonal está reconhecendo um determinante sorológico comum a uma ampla gama de isolados, fortes e fracos, como sugerido por Corazza-Nunes *et al.* (2001).

**Tabela 2.** Valores médios das D.O. 405nm obtidas em ELISA Sandwich, utilizando os anticorpos monoclonais 30 G 02, 37 G 11, 39 08 e IC 04-08 (1:1000) como anticorpos de captura, e o antissoro policlonal 1006 anti-CTV (1:1000) como anticorpo de detecção. 2ª leitura - 2 horas depois do substrato

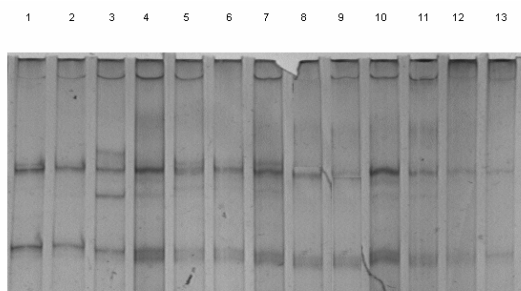
Antígenos	30G02	37G11	$R_{(30G02/37G11)}$	39-08	$R_{(30G02/39-08)}$	IC-04-08	$R_{(30G02/IC-04-08)}$
*CB-22	2.250	1.733		1.933		1.471	
*CB-104	2.085	1.640		1.909		1.220	
**Pl. sadia	0.007	0.038		0.021		0.019	
1-SP-Rol	1.500	0.037	40.5	0.302	4.9	0.477	3.1
2-SP-Rol	1.213	0.149	8.1	0.313	3.8	0.507	2.3
3-SP-Rol	1.677	0.306	5.4	0.189	8.8	0.642	2.6
4-SP-Rol	1.776	0.377	4.7	0.303	5.8	0.626	2.8
5-SP-Rol	1.263	0.281	4.4	0.220	5.7	0.492	2.5
6-NSA-NAC	1.854	0.145	12.7	0.155	11.9	0.615	3.0
7-NSA-NAC	0.965	0.153	6.3	0.137	7.0	0.413	2.3
8-NSA-NAC	0.624	0.145	4.3	0.235	2.6	0.209	2.9
9-SO-NAC	0.391	0.279	1.4	0.152	2.5	0.285	1.3
10-SO-NAC	0.237	0.161	1.4	0.115	2.0	0.191	1.2
11-SO-NAC	0.698	0.161	4.3	0.239	2.9	0.264	2.6
12-CB-CCSM	1.038	0.123	8.4	0.263	3.9	0.708	1.4
13-CB-CCSM	1.071	0.254	4.2	0.163	6.5	0.469	2.2

\* = controle positivo; \*\* = controle negativo

Os valores de  $R_{(30G02/37G11)}$  e  $R_{(30G02/39-08)}$  foram superiores a quatro, na maioria das amostras, indicando que o complexo apresenta uma pequena fração de epitopos reconhecidos por esses monoclonais (Tabela 2). Por outro lado, os valores de  $R_{(30G02/IC-04-08)}$  variaram de 1.2 a 3.1, sugerindo que uma parcela significativa do complexo viral dessas plantas era constituída por variantes severas, semelhantes ao haplotipo CB-22.

Os títulos mais baixos com o Mab 30G02 (universal) foram observados nas amostras 9 e 10 do município de Nova América da Colina, que, conseqüentemente, apresentaram também os menores valores de  $R_{(30G02/37G11)}$ , de  $R_{(30G02/39-08)}$  e de  $R_{(30G02/IC-04-08)}$ . Segundo a literatura, nas plantas pré-imunizadas, as estirpes fracas do complexo protetivo se multiplicam mais intensamente do que as fortes, resultando em altos títulos com monoclonais universais (Lee *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1999). Os resultados obtidos em I-DAS-ELISA indicam, portanto, alteração do complexo protetivo nessas plantas.

A complexidade dos perfis eletroforéticos SSCP demonstrou que, em condições de campo, as plantas são geralmente infectadas por complexos constituídos por mais de uma estirpe de CTV (Figura 1).



**Figura 1.** Padrões SSCP de isolados do *Citrus tristeza virus* nas amostras 1, 2, 3, 4 e 5, coletadas no sítio Progresso, Rolândia; amostras 6, 7 e 8, coletadas no sítio Nossa Senhora Aparecida, Nova América da Colina; amostras 9, 10 e 11, coletadas no sítio Oshima, Nova América da Colina; amostras 12 e 13, variante “Capão Bonito”

Baixa diversidade genética entre os isolados de CTV coletados na região Norte do Paraná foi revelada por SSCP. Padrões de bandas semelhantes foram observados entre os perfis 1 e 2, que correspondem às amostras coletadas no município de Rolândia (Figura 1). Já os padrões de bandas das amostras 3 e 4 mostraram-se distintos dos demais. Por outro lado os perfis eletroforéticos das amostras 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, que representam plantas de propriedades citrícolas dos municípios de Rolândia e de Nova América da Colina, apresentaram padrões bastante similares, contendo algumas bandas distintas entre eles, ao das amostras 12 e 13, correspondentes aos isolados oriundos do Estado de São Paulo, obtidos de plantas inoculadas com o complexo ‘Capão Bonito’. Esses resultados, somados àqueles obtidos em I-DAS-ELISA, em que valores significativos de  $A_{(405)}$  e de  $R_{MabU/MabE}$  foram observados em muitas dessas amostras com os monoclonais específicos, principalmente com o IC-04-08, sugerem que alterações do complexo protetivo (isolado ‘Pêra IAC’) por haplotipos severos ocorreram em muitas plantas dos pomares da região Norte do Estado do Paraná. Esses isolados severos não necessariamente são do complexo Capão Bonito, pois as plantas afetadas por eles apresentam sintomatologia característica, tais como caneluras no porta-enxerto limão-cravo, característica esta não observada nas plantas utilizadas neste estudo.

Investigações recentes, realizadas em pomares do Estado de São Paulo, mostraram que muitas plantas, formadas a partir de borbulhas de ‘Pêra IAC’, apresentaram sintomas severos de CTV (Müller et al., 1999). Alterações dos complexos protetivos têm sido detectadas em algumas dessas plantas por meio de RFLP (restriction fragment length polymorphism) e de SSCP (Souza et al., 2000b).

A exaustão do isolado protetivo, devido a alterações das propriedades fisiológicas das plantas ou das condições ambientais, permitindo a infecção por novos isolados severos, é uma das causas apontadas para explicar a quebra da proteção (Van Vuuren, 1995; Nickel et al., 1996; Müller et al., 1999). Outra hipótese é a de que o isolado protetivo não tenha sido efetivamente instalado no ato da pré-imunização, fazendo subisolados com menos habilidade protetiva e invasiva serem introduzidos na planta (Nickel et al., 1996; Müller e Costa, 1991).

Os pomares cítricos das regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná são bastante recentes e constituídos, até 1991, apenas por mudas pré-imunizadas oriundas do Estado de São Paulo, introduzidas sem um controle fitossanitário rígido, principalmente com relação à tristeza. A partir de 1992, iniciou-se a produção de mudas em viveiros instalados no Estado do Paraná, utilizando borbulhas de material pré-imunizado, propagado no Instituto Agrônômico do Paraná (Iapar). Os pomares dos municípios de Rolândia e de Nova América da Colina, amostrados neste estudo, são constituídos por mudas produzidas em viveiros paranaenses.

Estudos minuciosos e acurados são necessários para uma melhor caracterização da tristeza no Paraná, para verificar as alterações dos complexos virais no campo e também para a certificação de mudas em viveiros. Para tais estudos, as técnicas moleculares e imunológicas, associadas à avaliação da sintomatologia, representam ferramentas valiosas.

## Referências

- BEIDLER, L.L. et al. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.*, San Diego, v. 126, p. 374-380, 1982.
- CORAZZA-NUNES, M.J. et al. Evaluation of *citrus tristeza virus* (CTV) complexes in pre-immunized Marsh seedless grapefruit. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v. 27, p. 11-16, 2001.
- COSTA, A. S.; MÜLLER, G. W. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 64, p. 538-541, 1980.
- GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M. Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for citrus pathogens. In: ROISTACHER, C.N. (Ed.). *Graft-transmissible diseases of citrus - Handbook for detection and diagnosis*. Rome: FAO, 1991, p. 193-216.
- LEE, R.F. et al. Traits of *Citrus tristeza virus* important for mild strain cross protection: The Florida approach. *Phytophylactica*, Pretoria, v. 19, p. 215-218, 1987.
- MACHADO, M.A. et al. Diagnóstico do vírus da tristeza dos citros com diferentes anticorpos monoclonais. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 22, p. 191-194, 1997.

- MORIMOTO, F. Situação atual da Citricultura. In: ENCONTRO PARANAENSE DE CITRICULTURA, 2., 1990, Maringá. Anais...Maringá: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná, 1990. p. 51-56.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUES, O. *et al.* *Citricultura brasileira*. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, v. 2, 1991. p. 734-762
- MÜLLER, G.W. *et al.* Trinta anos de uso do clone pré-imunizado "Pêra" IAC na citricultura paulista. *Laranja*, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 399-408, 1999.
- NICKEL, O. *et al.* Segregation of *Citrus tristeza virus* strains by graft propagation. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 13, Riverside, 1996. Proceedings...Riverside: IOCV, 1996. p. 64-70.
- NIKOLAEVA, O.V. *et al.* Modulation of the antigenic reactivity of the citrus tristeza virus coat protein. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, n. 206, p. 97-105, 1997.
- NIKOLAEVA, O.V. *et al.* Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 82, p. 1276-1280, 1998.
- SAMBROOK, J. *et al.* *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- SOUZA, A.A. *et al.* Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by SSCP of the coat protein gene in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, Riverside, 2000. Proceedings...Riverside: IOCV, 2000a. p. 131-135.
- SOUZA, A.A. *et al.* Evaluation of changes which occurred in a mild protective citrus tristeza virus isolate in "Pêra" sweet orange by using RFLP and SSCP analysis of the coat protein gene. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14, Riverside, 2000. Proceedings...Riverside: IOCV, 2000b. p. 136-140.
- STACH-MACHADO, D.R. *et al.* Obtenção de anticorpos monoclonais para avaliação do complexo 'Capão Bonito' do vírus da tristeza dos citros (CTV). *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 23, p. 319, 1998.
- VALVERDE, R.A. *et al.* Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.*, St. Paul, v. 71, p. 255-258, 1990.
- VAN VUUREN, S.P. *et al.* Growth and production of lime trees preimmunization with mild citrus tristeza virus isolates. *Phytophylactica*, Pretoria, v. 25, p. 39-42, 1993.
- VELA, C. *et al.* Use of Specific Monoclonal Antibodies for Diagnosis of *Citrus tristeza virus*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10, Riverside, 1988. Proceedings... Riverside: IOCV, 1988. p. 55-61.

Received on October 02, 2002.

Accepted on April 22, 2003.