

Detecção do *Citrus tristeza virus* em plantas armadilhas de laranja Pêra livre de vírus

Rubia de Oliveira Molina¹, Aline Maria Orbolato Gonçalves-Zuliani², Carlos Alexandre Zanutto³, Larissa Siqueira Soares⁴ e William Mário de Carvalho Nunes⁵

¹Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Rodovia Celso Garcia Cid, km 375,86047-902 - Londrina – PR. e-mail: rubiamolina@iapar.br
^{2,3,4,5}Universidade Estadual de Maringá-NBA-Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada, Av. Colombo, 5790, UEM, 87020-900, Maringá, PR (alineorb@hotmail.com, cazanutto@uem.br, paizinhos_larissa@hotmail.com, wmcnunes@uem.br)

Resumo - O objetivo deste trabalho foi avaliar 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 *Citrus tristeza virus* (CTV) possa ser detectada nas condições naturais de campo. Plantas armadilhas de laranja foram instaladas em pomares das regiões Norte e Noroeste do Paraná, com cinco repetições por pomar. O material foi coletado e analisado periodicamente por ELISA e IC-RT-PCR. Nas análises sorológicas, foram utilizados um anticorpo policlonal e quatro anticorpos monoclonais. Para a análise por IC-RT-PCR, foi utilizado um anticorpo policlonal para a captura do vírus. A detecção do vírus pela técnica ELISA ocorreu entre sete a oito meses após o plantio das mudas, enquanto por IC-RT-PCR, o CTV foi detectado quatro meses após o plantio, nas plantas da região Norte. A análise da sintomatologia revelou forte sintoma de canelura em apenas uma das plantas da região Norte. A técnica de IC-RT-PCR foi mais sensível na determinação do tempo mínimo em que a infecção sistêmica ocorre nas condições de campo, enquanto ELISA revelou-se mais eficiente quanto a amplitude e repetitividade.

Palavras-chave: Vírus da Tristeza dos Citros, ELISA, IC-RT-PCR.

Detection of the *Citrus tristeza virus* in virus free pêra sweet orange trap plants under field conditions

Abstract - The objective of this study was to analyze 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 *Citrus tristeza virus* (CTV) inoculation to systemic infection by the virus under natural field conditions. Trap plants were installed in orchards in the North and Northwest of the Paraná State, with five repetitions per orchard. The plant material was collected and analyzed periodically by ELISA and IC-RT-PCR. For the immunological analyses, one polyclonal and four monoclonal antibodies were used. For the IC-RT-PCR analysis one polyclonal antibody was used for the virus capture. 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 revealed strong stem pitting symptom in just one of the plants from the North area. The technique of IC-RT-PCR was considered more effective in the determination of the minimum time for systemic CTV detection of plants exposed to infection under the field conditions, while ELISA proved to be more efficient in terms of amplitude and repeatability.

Keywords: Citrus Tristeza, ELISA, IC-RT-PCR.

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 ocorre como um complexo de isolados que diferem nos sintomas induzidos nos diferentes hospedeiros tendo a capacidade de infectar praticamente todas as espécies, variedades e híbridos do gênero *Citrus*, sendo 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, vários métodos eficientes de diagnósticos têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados, entre eles os métodos sorológicos, os biomoleculares e as associações entre estes dois métodos (Almeida & Lima, 2001).

No entanto, poucos trabalhos sobre o CTV investigaram o período de incubação ou tempo latente, que pode contribuir para o entendimento da epidemiologia e para programas de controle desta virose. Com o intuito de ampliar estes estudos foram analisadas 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, avaliando 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.

Material e Métodos

O material vegetal utilizado como plantas armadilha para o CTV foram quinze mudas de laranja 'Pêra', enxertadas em porta-enxerto de limão 'Cravo' e livres de vírus pela técnica de microenxertia. Estas foram conduzidas em estufa protegidas com tela anti-afídeo até o momento de serem levadas a campo. O primeiro experimento foi instalado no campo em três pomares comerciais de laranja 'Pêra', sendo um localizado na região Norte e dois na região Noroeste do Paraná, com cinco repetições por pomar, distribuídas aleatoriamente entre as árvores adultas.

Folhas e ramos jovens coletados das plantas livres de vírus (controle negativo), das quinze plantas armadilhas, de plantas adultas de laranja 'Pêra' pertencentes aos pomares e localizadas ao redor das plantas armadilha (controles positivos), foram coletados a cada três meses, totalizando oito amostragens. A nervura principal das folhas 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 livre de vírus, foi instalado nos mesmos pomares comerciais das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná 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.

Folhas e ramos jovens das quinze plantas armadilha do segundo experimento foram coletados a cada mês, totalizando cinco amostragens. 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.

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 trituradas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em tampão de extração PBS-Tween20 2% PVP (polivinilpirrolidona) e, centrifugadas 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 e o anticorpo policlonal PCA 1006/Br (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 1 mg/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 (A405) superior a duas e meia vezes o valor do controle negativo, como sugerido por Mathews et al. (1997).

Para a realização da técnica de imunocaptura as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em 1 mL de tampão de extração PBS-Tween20, 2% PVP. Em seguida, foram centrifugadas para obtenção do sobrenadante. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 µl/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 µl/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.

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 o mix contendo a enzima transcriptase reversa para a síntese de DNA complementar (cDNA). As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas, sendo após, retirado da placa e transferido para um microtubo de 200µl. A amplificação do GCP foi realizada utilizando-se dois 'primers' específicos para CTV, o CN119 e o CN120.

As amostras foram submetidas à extração de ácidos nucléicos totais seguida de RT-PCR, Para tanto as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e ressuspendidas em 500 µl 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 500 µl de Clorofórmio e, novamente, as amostras foram levadas a centrífuga por mais 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo, sendo 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%. O produto da extração foi suspenso em 25 µl de água milli-Q autoclavada. Em seguida, realizou-se a transcrição reversa (RT) e a amplificação do GCP através da técnica de PCR.

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.

Resultados e Discussão

Nas 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, 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. Na primeira avaliação, todas as amostras apresentaram valores de A405 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 o outono e inverno.

A segunda coleta foi realizada sete meses após o plantio, 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. 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 A405 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.

Na coleta realizada 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. Bar-Joseph & 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. 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 dois anos após o início das observações.

Um 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 o movimento sistêmico do vírus na planta ocorre poucas semanas após a inoculação, porém, a quantidade reduzida de vírus presente nos tecidos torna inviável sua detecção por testes imunológicos.

Entretanto, Bar-Joseph & Nitzan (1991) conseguiram verificar, através de ELISA, que após a inoculação do CTV, por borbulhas, em plantas indicadoras de laranja 'Azeda', são necessários 44 dias para encontrar o vírus nas partes basais da planta e de 51 a 58 dias para que ocorra a infecção sistêmica. Valores crescentes e, muitas vezes, expressivos de absorvância, 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.

Para 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 Corazza et al. (2012) e Zanutto et al., (2013), através de análise de sintomatologia e das técnicas RFLP e SSCP, 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.

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.

Na 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. Os resultados obtidos nas coletas realizadas aos 19, 20, 21 e 22 meses após o plantio, demonstraram que todas as plantas instaladas nos três pomares ainda apresentavam-se livre de vírus, pela sensibilidade desta técnica.

No perfil eletroforético dos produtos da PCR das amostras coletadas aos 23 meses após o plantio, 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. 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 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 aos 30 meses após o plantio, 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.

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 à 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 IC-RT-PCR sobre ELISA. O melhor desempenho destas duas técnicas baseadas em PCR sobre ELISA 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. Estes resultados não eram esperados, uma vez que os “primers” utilizados sempre se revelaram específicos para a amplificação do GCP do CTV.

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 haplótipos severos de CTV. Este resultado está de acordo com os estudos realizados por Carraro et al. (2003) e Corazza et al. (2012), 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.

Conclusões

1. Pelos resultados da técnica de ELISA, a detecção do CTV nas plantas armadilhas nas regiões Norte e Noroeste do Estado ocorreram entre sete e oito meses após o plantio, revelando-se mais eficiente quanto à amplitude e repetitividade.

2. A técnica IC-RT-PCR mostrou a presença do CTV nas plantas armadilhas da região Norte aos quatro meses após o plantio, entretanto não foi capaz de detectar o CTV nas plantas armadilhas da região Noroeste, sendo mais sensível na determinação do tempo mínimo em que a infecção sistêmica pelo CTV ocorre nas condições naturais de campo.

3. A análise da sintomatologia observada nas plantas armadilhas revelou caneluras em uma das plantas da região Norte, sugerindo a presença de isolados severos de CTV nesta região.

Referências

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: **Princípios e Técnicas de Diagnóstico 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: 11th Conf. IOCV. **Proceedings**. p.62-65, 1991.

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**, v.25, p.269-273, 2003.

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

CORAZZA, M.J.; ZANUTTO, C.A.; ZANINELI-RÉ, M.L.; MÜLLER, G.W.; NUNES, W.M.C. Comparison of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates by RFLP analysis of the coat protein nucleotide sequences and by the severity of the symptoms. **Tropical Plant Pathology**, v.37, p.179-184, 2012.

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.

DIAS, L.C.F. **Caracterização imunoquímica dos anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citros do complexo Capão Bonito**. 2002. 94p. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

- 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: 15th Conf. IOCV. **Proceedings**, p.48-53, 2002.
- HUANG, Z.; RUNDELL, P.A.; GUAN,X.; POWEELL, 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.
- 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: 10th Conf. IOCV. **Proceedings**, p.33-38, 1988.
- LEE, R.F.; BAKER, P.S.; ROCHA - PENÃ, M.A. **The *Citrus tristeza* virus (CTV), and Introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central America and Caribbean.** Internacional Institute of Biological Control Berks, UK, 1994, 197p.
- 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.
- 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.
- 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, p.391-396, 1997.
- ROCHA-PENÃ, M.A.; LEE, R.F. Serological techniques for detection of *Citrus tristeza* virus. **J. Virol. Methods**, v.34, p.311-331, 1991.
- 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: 16th Conf. IOCV. **Proceedings**, p.52, 2004.
- 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.
- 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: 15th Conf. IOCV. **Proceedings**, p.165-171, 2002.
- ZANUTTO, C.A.; CORAZZA, M.J.; NUNES, W.M.C.; MÜLLER, G.W. Evaluation of the capacity of new mild *Citrus tristeza* virus (CTV) isolates selected for a preimmunization program. **Scientia Agricola**, v.70, n.2, p.116-124, 2013.