**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Tentativas de purificação e produção
de antissoro contra o vírus da morte súbita
dos citros e isolamento do CSDaV em plantas herbáceas**

Mateus de Almeida Santos

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2011

Mateus de Almeida Santos
Bacharel/licenciado em Ciências Biológicas

**Tentativas de purificação e produção
de antissoro contra o vírus da morte súbita
dos citros e isolamento do CSDaV em plantas herbáceas**

Mateus de Almeida Santos

Orientador:
Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Santos, Mateus de Almeida

Tentativas de purificação e produção de antissoro contra o vírus da morte súbita dos citros e isolamento do CSDaV em plantas herbáceas / Mateus de Almeida Santos. - - Piracicaba, 2011.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Citricultura 2. Doenças de plantas 3. Plantas herbáceas 4. Tristeza cítrica 5. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.3
S237t

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Alceu e minha mãe Rosita, que são
modelo de pais, pessoa, conduta e dignidade; que
me deram vida e sempre me incentivaram a
crescer.

À minha esposa Roberta, companheira de todos
os momentos.

Dedico.

"...Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu"
(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteia todos os dias com a vida, que é meu companheiro, amigo e meu porto seguro.

Ao professor Dr. Jorge A. M. Rezende, meu muito obrigado pela oportunidade, pela confiança, por todo aprendizado, pela disponibilidade e abertura que sempre me deu.

Ao Dr. Nelson A. Wulff, pela confiança que sempre teve no meu trabalho, pelo incentivo e por tudo que me ensinou

À Roberta, pelo apoio, compreensão, paciência, amizade e companheirismo.

Aos meus pais, às minhas irmãs (Cíntia e Lenise), cunhados, cunhadas, sobrinhos (Ana Clara, Raquel, Thaís, Ana Luísa, Ana Beatriz, Isabelle, Davi e a minha mais nova sobrinha, que ainda está na barriga!) e aos meus sogros. Enfim, à família toda, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À Leninha e Malu, por me acolherem com tanto carinho em casa. Meu muito obrigado!

Ao Antonio Juliano Ayres, gerente do Departamento Científico do Fundecitrus, por todo apoio e incentivo. Aos pesquisadores do Fundecitrus, Diva, Renato, Silvio, Belasque, Geraldo e Marcelo, por toda contribuição científica. À Roberta, Andreia, Newton, Ana e Nete pelo apoio, amizade e as boas risadas do dia-a-dia. Ao Rodrigo Toloy que muito me ajudou nas inoculações e PCRs. À Elaine, pela amizade e por toda ajuda no laboratório. À Paula e Anelise, pela ajuda e amizade. Ao Jaci, Dênis, Luiz, André, Renata, Priscilla, Daniela, Michele e todos os colegas do Fundecitrus que de alguma forma contribuíram no meu trabalho.

Aos amigos e colegas do departamento de Fitopatologia, ao Guilherme, aos companheiros de disciplina, ao Edivaldo Buriolla, professores e funcionários!

Ao amigo prof. Francisco Tanaka, por todo apoio e amizade. Aos professores Marcel e Pedro pelo incentivo. Ao prof. Waldir Cintra, pela amizade e por tudo que me ensinou no tempo em que trabalhamos juntos.

À todos, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Importância da citricultura no Brasil e em São Paulo, suas características e ameaças	17
2.2 Morte súbita dos citros (MSC)	18
2.2.1 Sintomas	19
2.2.2 Etiologia	20
2.2.3 Vetor do agente causal da MSC	23
2.2.4 Manejo da MSC	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Isolado do CSDaV	27
3.3 Imunoprecipitação do CTV com proteína A-Sepharose	29
3.4 Produção de antissoro para o CSDaV	29
3.5 Método de análise do antissoro	30
3.6 RT-PCR	30
3.7 Tentativa de transmissão do CSDaV para outras espécies	31
3.8 Tentativas de infecção de plantas de citros somente com o CSDaV	32
3.8.1 Por meio da Cuscuta	32
3.8.2 Através de cortes no tronco	33
3.8.3 Por meio de Toxoptera citricida	34
3.8.3.1 Detecção do CSDaV em afídeos	34
3.8.3.2 Testes de transmissão do CSDaV através de afídeos	35
3.8.4 Por meio da inoculação de sementes	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Isolado do CSDaV	37
4.2 Purificado viral	37

4.3 Testes dos antissoros produzidos	40
4.4 Transmissão do CSDaV para outras espécies.....	41
4.5 Transmissão do CSDaV para plantas de citros.....	45
4.5.1 Através da Cuscuta	45
4.5.2 Através de cortes no tronco	45
4.5.3 Por meio de Toxoptera citricida.....	46
4.5.4 Inoculação viral em sementes	46
5 DISCUSSÃO	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE	59

RESUMO

Tentativas de purificação e produção de antissoro contra o vírus da morte súbita dos citros e isolamento do CSDaV em plantas herbáceas

A morte súbita dos citros (MSC) foi identificada em 2001, no município de Comendador Gomes, Minas Gerais, e desde então foi responsável pela perda de 4 milhões de plantas na região sul do Triângulo Mineiro, e no norte e noroeste do estado de São Paulo. É uma doença de combinação copa/porta-enxerto, afetando principalmente laranjeira doce enxertada em limoeiro 'Cravo', e que culmina na morte das plantas. Passados dez anos do seu relato, até hoje não se tem conhecimento exato do agente causal e dos possíveis vetores. Sabe-se, todavia, que em todas as plantas com morte súbita encontram-se o vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) e um vírus do Gênero *Marafivirus*, Família *Tymoviridae*, denominado Citrus sudden death associated virus (CSDaV). Devido esse fato, há a necessidade de separá-los para testar os postulados de Koch para o CSDaV. O principal objetivo deste trabalho foi tentar isolar o CSDaV para verificar o seu real envolvimento com a MSC. Também se procurou purificar esse vírus para a produção de antissoro policlonal para trabalhos de diagnose da doença. Para a purificação do CSDaV foi utilizado o protocolo de purificação do *Potato leaf roll virus*, porém os resultados não foram satisfatórios devido a constante presença do CTV. Tentativas de remoção do CTV por meio de imunoprecipitação com antissoro homólogo não foram satisfatórias. O antissoro produzido reagiu indistintamente com extratos de plantas infectadas com o CSDaV e o CTV. O CSDaV foi transmitido mecanicamente para plantas de *Nicotiana* sp., *N. clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, causando principalmente infecção localizada. A presença do vírus foi confirmada por RT-PCR e a sua identidade por meio do sequenciamento de nucleotídeos do produto da amplificação. Tentativas de transmissão do CSDaV usando inóculo de extrato de folhas de plantas do campo, por meio da *Cuscuta* sp., através de cortes no tronco das plantas com lâmina embebida no inóculo, com pulgões *Toxoptera citricida* aparentemente virulíferos somente para o tymovirus e por meio da inoculação de sementes de citros deram resultados negativos.

Palavras-chave: CSDaV; CTV; Inoculação; Imunoprecipitação

ABSTRACT

Attempts to purify and produce antiserum against the citrus sudden death associated virus and CSDaV isolation in herbaceous plants

Citrus sudden death (CSD) disease was identified in 2001, at Comendador Comes County, State of Minas Gerais, Brazil. Since then the disease has caused the death of 4 million trees in Southwestern Minas Gerais State and Northern São Paulo State. This new and destructive disease affects sweet orange as well as other species, varieties, and hybrids when grafted on Rangpur (*Citrus limonia*). Then years after the first report on CSD, the causal agent and possible vector(s) have not been precisely identified. It is known, however, that all disease trees are infected with Citrus tristeza virus (CTV) and Citrus sudden death associate virus (CSDaV), which is a member of the Genus *Marafivirus*, Family *Tymoviridae*. Due to this, it is necessary to separate these pathogens, in order to complete Koch's postulated for the CSDaV. The main purpose of the present work was to try to isolate the CSDaV to verify its role on CSD disease. In addition, attempts were done to purify the virus and produce polyclonal antiserum for disease diagnosis. Purification was carried out as described for Potato leaf roll virus, but results were not suitable due to the constant presence of CTV. Efforts to remove CTV by immunoprecipitation with homologous antiserum did not succeed. The produced antiserum reacted indistinctly with extracts of plants infected with both viruses. SCDaV was mechanically transmitted to *Nicotiana* sp., *N. clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor*, and *C. quinoa*, causing mainly local infection. Infection was confirmed by RT-PCR and virus identity was determined by nucleotide sequence of the amplified fragment. Efforts to transmit CSDaV, using as inoculum extract from field infected plants, by means of *Cucucuta* sp., by incisions on the trunk of the test-plants, with *Toxoptera citricida* apparently viruliferous only for the tymovirus, and by means of citrus seed inoculation gave negative results.

Keywords: CSDaV; CTV; Inoculation; Immunoprecipitation

1 INTRODUÇÃO

A Morte Súbita dos Citros (MSC) é uma doença de combinação copa/porta enxerto, que tem afetado plantas de pomares da região sul do Triângulo Mineiro, e no norte e noroeste do estado de São Paulo.

A doença foi identificada em 2001, primeiramente no município de Comendador Gomes, estado de Minas Gerais, em talhões de laranjeira (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 'Valência' enxertadas sobre limoeiro (*C. limonia* Osbeck) 'Cravo'. Posteriormente a doença foi detectada nas laranjeiras 'Pêra', 'Natal', 'Hamlim', 'Valência' e 'Westin', enxertadas sobre limoeiro Cravo. Em 2004, foi também detectada em porta-enxerto de limoeiro (*C. volkameriana* Pasq.) 'Volkameriano' (ROMÁN et al., 2004). A doença afeta ainda outras espécies, variedades e híbridos, tais como as tangerinas 'Pokan', 'Cravo' (*C. reticulata* Blanco), e 'Murcott' (*C. sinensis* x *C. reticulata*), lima doce (*C. limettoides* Tan.) e limoeiro Tahiti (*C. latifolia* Tan.), quando enxertados em limoeiro 'Cravo' (YAMAMOTO et al., 2011). Em 2002, no estado de São Paulo, cinco municípios apresentavam cerca de 22 mil plantas cítricas com sintomas característicos de morte súbita. Em 2003 este número cresceu para 18 municípios, chegando a 44 mil plantas sintomáticas, não levando em conta as plantas que já haviam sido erradicadas. O aumento da área afetada pela doença foi de 2.816 km² para 12.810 km² (FUNDECITRUS, 2004). Segundo levantamento feito pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), a doença avançou 60 km entre o ano de 2003 e 2004. Estima-se que, no estado de São Paulo, 400 mil plantas tenham sido erradicadas, causando um prejuízo de 8 milhões de dólares. Se forem computados os municípios de Minas Gerais os números sobem para 4 milhões de árvores erradicadas, com prejuízo em torno de 40 milhões de dólares (FUNDECITRUS, 2004). Levantamento realizado em 2005, mostrou que a MSC está praticamente estacionada nas regiões onde ela foi originalmente constatada, não se expandindo para novos municípios, porém nestes locais continua sendo considerada muito grave e sua incidência aumentando, constituindo-se uma séria ameaça para a produção de citros (FUNDECITRUS, 2005).

Os sintomas das plantas afetadas pela MSC iniciam por folhagem verde-pálida e consequente desfolha e morte apical de ramos (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001). Em seu estágio final, as folhas caem e a árvore morre, mantendo os frutos

presos ao pedúnculo (MÜLLER et al., 2002). O principal sintoma para fins de diagnose é a coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, na região do floema funcional (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

Plantas com sintomas iniciais – perda de brilho e da coloração verde escura das folhas – apresentam média de produção 30% menor que a das árvores sadias, enquanto que plantas com sintomas severos – desfolha parcial e poucas brotações internas – apresentam produção 50% menor em relação às plantas sadias (BASSANEZI et al., 2007).

O agente causal da morte súbita ainda é uma incógnita. O fato de ser transmitido por enxertia originou a hipótese de a doença ser causada por um agente biótico (YAMAMOTO et al., 2003). Patógenos como bactérias, fitoplasmas e alguns microrganismos do solo foram descartados, assim como os viróides, pela baixa incidência ou mesmo ausência de detecção em plantas nos talhões afetados. A hipótese de ser um vírus ganhou destaque pelo fato da doença apresentar a mesma distribuição espacial que a tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) e que na década de 30 praticamente dizimou a citricultura paulista. O CTV é endêmico no Brasil podendo ser encontrado em todas as espécies e variedades de citros (BASSANEZI et al., 2002). Duas hipóteses foram então levantadas: ser o agente causal uma nova estirpe do CTV ou uma nova estirpe aliada a um estresse ambiental (BASSANEZI et al., 2003). Porém, outro vírus, pertencente à família *Tymoviridae*, está associado de maneira constante com o CTV nas plantas doentes. Esse vírus foi nomeado *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) sendo detectado em 99,7% das plantas com MSC (MACCHERONI et al., 2005). Assim, surgiu uma outra hipótese de que a MSC pode ser resultante da ação isolada do CSDaV ou da ação sinérgica deste com o CTV.

O principal objetivo deste trabalho é isolar o CSDaV para verificar o seu real envolvimento com a MSC e assim, poder fechar os postulados de Koch. Também se procurou purificar esse vírus para a produção de antissoro policlonal para trabalhos de diagnose da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da citricultura no Brasil e em São Paulo, suas características e ameaças

A citricultura brasileira apresenta-se como a maior em termos mundiais. A safra 2009/2010 produziu 397 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg. No ano de 2009, o faturamento de toda a cadeia citrícola brasileira foi de US\$ 14,6 bilhões, gerando uma arrecadação de US\$189 milhões em impostos para o país (NEVES et al., 2010).

O estado de São Paulo detém 53% de toda a produção mundial de suco, seguido pelo estado da Flórida, nos E.U.A., com 28% (NEVES et al., 2010). São Paulo domina tanto a produção nacional de laranja quanto a de lima ácida ‘Tahiti’ e de tangerinas (MATOS JUNIOR et al., 2005). Algumas características são marcantes na citricultura paulista: a continuidade espacial, ocupando uma área quase contígua de aproximadamente 615.300 ha (FNP, 2003); e a continuidade temporal, devido à perenidade das plantas – esta continuidade confere maior exposição das plantas ao ataque de doenças e pragas - além da baixa variabilidade genética das plantas, que aumenta a chance de epidemias de pragas e doenças (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2003).

A grande vulnerabilidade às epidemias faz com que uma parte considerável do custo de produção seja destinada ao combate delas. Doenças como o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros (CVC) e, atualmente o “greening”, geram grande preocupação e prejuízos aos citricultores. A MSC também tem papel relevante neste cenário, uma vez que, desde seu primeiro relato em fevereiro de 2001, no município de Comendador Gomes, Minas Gerais (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001), já foi responsável pela morte de 4 milhões de plantas cítricas nas regiões sul do Triângulo Mineiro, e norte e noroeste do estado de São Paulo e ainda continua como um grande desafio para os produtores dessas regiões.

2.2 Morte súbita dos citros (MSC)

A MSC recebeu este nome devido à velocidade com que as plantas definham e morrem (INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA, 2001). O primeiro relato oficial da doença ocorreu em fevereiro de 2001, no município de Comendador Gomes, Estado de Minas Gerais. Porém, quatro anos antes, em 1997, já havia indícios da doença no município de Prata, Minas Gerais, pela morte de muitas laranjeiras enxertadas sobre limoeiro 'Cravo', por motivos até então desconhecidos (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

No ano de 1999, no município de Comendador Gomes, 518 plantas morreram e em agosto de 2000 foram identificadas 767 plantas doentes e 210 mortas, totalizando 20,76% das plantas do pomar. Em janeiro de 2001 este número subiu para 86% entre plantas doentes ou mortas, na mesma propriedade (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

A doença afeta plantas cítricas enxertadas em limoeiro 'Cravo', sendo constatada em copas de laranjeiras 'Valência', 'Natal', 'Pera-Rio', 'Hamlin', 'Westin', 'Pineapple' e 'Rubi'. Experimentos conduzidos em áreas próximas a propriedades afetadas pela MSC para avaliar a suscetibilidade do limoeiro 'Cravo', mostraram que em pouco mais de três anos o sintoma típico de amarelecimento na região do câmbio do porta-enxerto estava presente em 10 seleções de limoeiro 'Cravo', mostrando a grande suscetibilidade deste porta-enxerto (POMPEU JR.; BLUMER, 2008). Em 2004 sintomas de MSC também foram relatados em laranjeiras 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Volkameriano' (ROMÁN et al 2004). Foi o primeiro relato de ocorrência da doença em plantas enxertadas em porta-enxerto diferente de limoeiro 'Cravo'. Todas as laranjeiras doce enxertadas em tangerineira 'Cleópatra' (*C. reshni* hort. Ex Tanaka), assim como em mandarin 'Sunki' [*C. sunki* (Hayata) hort. Ex Tanaka], citrumelo 'Swingle' [*C. paradisi* Macfaden x *Poncirus trifoliata* (L.) Rafinesque] e trifoliata (*Poncirus trifoliata* Rafinesque), se mostram tolerantes, não apresentando nenhum tipo de sintoma (POMPEU JR.; BLUMER, 2008).

2.2.1 Sintomas

Os sintomas iniciais da MSC se caracterizam pela perda de brilho das folhas em contraste com as plantas saudáveis, que se tornam cor verde-clara, tendendo para o amarelo-esverdeado, característica semelhante ao sintoma da doença declínio dos citros. O que se decorre destes sintomas iniciais são desfolha parcial, com poucas brotações novas e ausência de brotações internas (diferindo-a do declínio) e, em alguns casos, seca de ponteiros. Há o comprometimento do sistema radicular, com grande quantidade de raízes mortas e, por fim, a morte da planta. Durante esse processo sintomático nota-se uma coloração amarelo-alaranjada nos tecidos internos da casca do porta-enxerto, na região do floema funcional, contrastando com a coloração clara da casca da copa. Este sintoma é característico das plantas com MSC e, juntamente com os outros sintomas, tem permitido a identificação das plantas afetadas por essa doença (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001).

O tempo entre o aparecimento dos sintomas iniciais e a morte da planta varia em função de vários fatores, como a idade da planta, época do ano em que aparecem os sintomas e número de frutos na planta, podendo variar entre poucas semanas, em plantas com grande número de frutos no início do período chuvoso, até vários meses em plantas pouco enfolhadas e com baixa produção de frutos (BASSANEZI et al., 2002). A MSC já foi observada em plantas com dois anos de idade, sendo mais frequente naquelas com mais de seis anos (POMPEU JR.; BLUMER, 2008).

A MSC assemelha-se muito à tristeza dos citros, no tocante ao declínio rápido das plantas afetadas, como acontece às plantas de laranjeira doce enxertadas sobre laranjeira 'azedada', combinação intolerante à tristeza dos citros. A anatomia patológica que ocorre nas plantas afetadas pela tristeza dos citros é similar àquela das plantas afetadas pela MSC. Estudos em microscopia de luz e de transmissão eletrônica mostraram redução no tamanho das células do floema, colapso e necrose dos vasos condutores, superprodução e degradação do floema, acúmulo de floema não-funcional e invasão do córtex pelo floema não-funcional velho (ROMÁN et al., 2004).

No sistema vascular de ramos e casca observa-se que a degeneração do floema se agrava com a intensificação dos sintomas externos. O citoplasma fragmenta-se, perdendo a definição de contorno. Assim que os sintomas se tornam mais acentuados as células do floema se esvaziam, restando apenas a parede celular. Como resultado da dificuldade de translocação pelo floema, observa-se acúmulo de grãos de amido em todas as células, que se agrava pela complexação de fenóis com as organelas das células que armazenam substâncias (F.A.O. Tanaka; E. W. Kitajima – *dados não publicados*). Modificações consistentes são notadas quando se compara o perfil protéico de plantas saudáveis e doentes, sendo estas alterações mais facilmente detectadas na casca do porta-enxerto, onde há um menor acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (CANTÚ et al., 2008).

O aumento na espessura da casca, na região do câmbio, se dá pelo acúmulo de floema não-funcional, como se pôde notar em estudos histológicos ao microscópio de luz (ROMÁN et al., 2004).

2.2.2 Etiologia

Testes de enxertia foram realizados em 2002, onde borbulhas de plantas com sintomas de MSC e borbulhas de plantas tolerantes (laranjeira ‘Natal’ enxertada em tangerineira ‘Cleópatra’) foram inoculadas em plantas saudáveis. Em pouco mais de um ano, algumas destas plantas já apresentavam o amarelecimento característico na região do porta-enxerto, mostrando que o agente indutor da MSC foi transmitido por enxertia e, conseqüentemente, de natureza aparentemente biótica (YAMAMOTO et al., 2003).

Com a transmissibilidade através da enxertia, a busca por agentes patogênicos envolvidos na doença passou a receber grande atenção. Testes para a detecção de bactérias habitantes do xilema e floema foram realizados por meio de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para sequências de nucleotídeos conservadas no 16S rDNA de fitoplasmas, espiroplasmas e eubactérias. Não foi constatada a presença de tais organismos em tecidos das plantas doentes testadas (I. P. Bedendo; M. A. Machado; J. Hartung; M. Garnier – *dados não publicados*).

Outras características que eliminaram a provável participação desses microrganismos dizem respeito aos sintomas que, no caso destas bactérias se apresentam de forma mais localizada, não se assemelhando aos sintomas da MSC, e às características de seus vetores, não apresentando a mesma eficiência de disseminação das doenças bacterianas, como ocorre com o agente causal da MSC (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; YAMAMOTO, 2003).

Viróides, moléculas desprovidas de capsídeo, foram investigados e alguns, incluindo *Citrus exocortis viroid* (CEVd) foram detectados, porém, não houve evidências de envolvimento com a MSC (ROMÁN et al., 2004).

Testes de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) foram realizados utilizando anticorpos monoclonais para a detecção de 11 diferentes vírus que infectam plantas, mas em nenhum caso houve reação positiva (ROMÁN et al., 2004). Porém, a hipótese de se tratar de um vírus, como sendo o agente causal da MSC foi a mais aceita, devido à distribuição espacial da doença, que se apresenta muito semelhante à das plantas afetadas pela tristeza dos citros (BASSANEZI et al., 2003a), causada pelo CTV, que é transmitido por afídeos, principalmente pelo pulgão-preto *Toxoptera citricida*. Os estudos epidemiológicos indicaram que o agente causal da MSC está sendo disseminado muito provavelmente pelo mesmo vetor transmissor do CTV (BASSANEZI et al., 2003a).

Tendo-se como base que o agente causal da MSC é de natureza biótica e excluídas as possibilidades de outros agentes envolvidos senão um vírus, as possibilidades de se tratar de um novo vírus com comportamento parecido ao do CTV, um novo RNA satélite ou RNA defectivo do CTV que modifica a expressão de sintomas, afetando a combinação de laranjeira doce sobre limoeiro 'Cravo' ou uma nova variante do CTV com vantagens replicativas sobre as já existentes, foram levantadas (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; YAMAMOTO, 2003). Dos muitos grupos e espécies testadas, apenas o CTV, que pertence ao gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae*, foi encontrado de maneira constante em todas as plantas com sintomas de MSC testadas, tanto em microscopia eletrônica de transmissão (E.W. Kitajima; Q. S. Novaes – *comunicação pessoal*) quanto por ELISA e técnicas moleculares (Q. S. Novaes; J. A. M. Rezende; M. A. Machado; M. Cambra; P. Moreno; F. Rabenstein –

comunicação pessoal). Dentro do complexo CTV sabe-se que há maior variabilidade genética dentro das populações de uma região, do que entre populações de regiões diferentes. Esse fato possibilita o aparecimento de novos isolados, que podem originar novas epidemias localizadas, como é o caso da MSC (RIVAS-VALENCIA et al., 2008). No entanto, estudos realizados neste sentido foram inconclusivos ou produziram resultados negativos sobre a possibilidade de a MSC estar associada com variantes genéticas distintos do CTV (DERRICK et al., 2003; TARGON et al., 2004; MACCHERONI et al., 2005; GOMES et al., 2008; RIVAS-VALENCIA et al., 2008; LOEZA-KUK et al., 2008).

No decorrer dos estudos sobre o agente causal da MSC, a presença de um segundo vírus foi descoberta nas plantas doentes examinadas. Maccheroni et al. (2005) identificaram a presença desse vírus em cerca de 99,7% das plantas amostradas que apresentavam sintomas de MSC, não detectando-o em plantas de regiões não afetadas pela doença. O novo vírus foi então nomeado Citrus sudden death-associated virus (CSDaV) e seu genoma foi sequenciado. O genoma completo do CSDaV é constituído por uma fita simples de RNA, com 6.805 nucleotídeos (kb), excluía a região 3' terminal que é poliadenilada, cujo comprimento não foi determinado. A região 5' não traduzida possui 108 nucleotídeos. Análises filogenética e de organização do genoma revelaram que o CSDaV está relacionado com membros da Família *Tymoviridae*, Gênero *Marafivirus*, embora o genoma das espécies desse gênero variem de 6,0 a 6,5 kb. Os maiores níveis de identidade do CSDaV foram encontrados com o *Oat blue dwarf virus* – OBDV (64%) e com o *Maize rayado fino virus* – MRFV (58%). Exame de microscopia eletrônica de transmissão de preparações parcialmente purificadas revelaram que o CSDaV possui partículas isométricas com aproximadamente 30 nm em diâmetro, com características semelhantes às de outros marafivirus (MACCHERONI et al., 2005). Posteriormente, Barros et al. (2005) também sequenciaram o genoma completo de um outro isolado do CSDaV e constataram 89% de identidade com o genoma do isolado do CSDaV relatado por Maccheroni et al. (2005)

Este, no entanto, não foi o primeiro relato de um membro da família *Tymoviridae* infectando plantas cítricas. Herron et al. (2002) constataram a presença de RNA com

alta similaridade de sequência de nucleotídeos com a do RNA do OBDV em citros no Estado da Flórida, nos E.U.A.

Dois marcadores têm sido usados para estudar e diagnosticar rapidamente a doença: coloração amarela e espessamento da casca do porta-enxerto e a presença de partículas do CSDaV (YAMAMOTO et al., 2011).

2.2.3 Vetor do agente causal da MSC

Yamamoto et al. (2003) foram os primeiros a relatarem a transmissão do agente causal da MSC por meio da enxertia de gemas de plantas sintomáticas, em plantas de laranjeira 'Pera' enxertadas em limoeiro 'Cravo', mantidas em telado a prova de insetos. Diante desses resultados os autores apontaram ser de natureza biótica o agente causal dessa doença. A transmissão do agente causal da MSC por enxertia foi posteriormente confirmada por Yamamoto et al. (2011).

Estudos epidemiológicos das distribuições espacial e temporal da MSC indicaram alta similaridade com os da tristeza dos citros, causada pelo CTV, cujo principal vetor é o pulgão preto dos citros, *T. citricida* (BASSANEZI et al., 2003a). Diante desses resultados os autores sugeriram que esse afídeo pode ser o vetor do agente causal da MSC, embora nenhuma espécie de vírus da família *Tymoviridae* seja transmitida por esse tipo de inseto (MARTELLI et al., 2002).

Tentativas de detecção do CSDaV em afídeos das espécies *T. citricida*, *Aphis gossypii* e *A. speraecola* coletados de plantas sintomáticas, por meio de RT-PCR, foram positivas para todas as amostras testadas. No entanto, em nenhuma amostras de cigarrinhas, vetoras naturais de espécies de marafivirus, foi detectada a presença do CSDaV por RT-PCR (MACCHERONI et al., 2005). Loeza-Kuk et al. (2008) também tiveram sucesso na detecção do CSDaV em *T. citricida* e *A. speraecola* coletados de plantas cítricas com sintomas de morte súbita, por meio de RT-PCR. O vírus foi detectado em 42% e 10% das amostras analisadas de *T. citricida* e *A. speraecola*, respectivamente. Em nenhum desses estudos, todavia, demonstrou-se experimentalmente a transmissão do CSDaV para plantas de citros por essas espécies de afídeos.

Tentativas de transmissão do agente causal da MSC por meio da mosca branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) deram resultados negativos (P. T. Yamamoto; J. R. S. Lopes – *dados não publicados*).

O envolvimento de um vetor aéreo na transmissão do agente causal da MSC foi recentemente demonstrado experimentalmente por Yamamoto et al (2011), após acompanharem o desenvolvimento de 80 plantas cultivadas no interior de uma plantação de citros severamente afetada pela doença. Nesse ensaio, 40 plantas ficaram individualmente protegidas por gaiolas cobertas com tela anti-afídeos, enquanto as outras 40 plantas ficaram expostas a infecção natural. Depois de 69 meses de observações e análises, constataram que apenas duas plantas protegidas estavam afetadas pela MSC e infectadas com o marafivirus. Doze plantas não protegidas foram eliminadas por causa de infecção com *Xylella fastidiosa*. Das 28 plantas não protegidas restantes, 17 exibiam sintomas de morte súbita no ponto de união do enxerto e estavam infectadas com o marafivirus. Apesar de todos esses resultados ainda não há a identificação precisa do vetor do agente causal da MSC.

2.2.4 Manejo da MSC

O manejo da MSC requer, primeiramente, o cuidado com a aquisição de mudas sadias. A convivência com a MSC vem sendo feita pela utilização de porta-enxertos tolerantes, com a subenxertia das plantas doentes no campo ou pelo plantio de mudas formadas sobre esses porta-enxertos tolerantes (POMPEU JR.; BLUMER, 2008). A diversificação de porta-enxertos é uma necessidade grande, uma vez que, estando a citricultura paulista, em sua grande parte, baseada em porta-enxertos de limoeiro ‘Cravo’ e este ser altamente sensível à MSC, a diversificação de porta-enxertos tolerantes à MSC, como tangerineiras ‘Cleópatra’ e ‘Sunki’ e citrumelo ‘Swingle’, torna-se uma alternativa prudente e eficaz. Nos municípios onde a MSC já ocorre recomenda-se não mais plantar mudas enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; YAMAMOTO, 2003).

A subenxertia com porta-enxertos tolerantes também tem se mostrado uma saída até o momento eficaz. O método consiste no plantio de porta-enxerto ao lado do porta-

enxerto já existente, fazendo a enxertia no tronco da variedade copa, pela técnica do “T” invertido ou encostia. O método é pouco recomendável quando o número de plantas severamente atacadas é alto, principalmente em variedades de laranjeiras tardias, como ‘Valência’ e ‘Natal’. Os melhores resultados têm sido observados em pomares com até 10 anos de idade, podendo ser feita em pomares mais velhos, desde que sejam produtivos, com bom estande de plantas e pouco afetados por outras doenças (BASSANEZI; GIMENES-FERNANDES; YAMAMOTO, 2003). O controle de insetos, principalmente afídeos, e a erradicação de plantas doentes também são medidas recomendadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolado do CSDaV

O isolado do CSDaV foi obtido de folhas de árvores de laranjeira doce 'Natal' enxertadas sobre tangerineira 'Cleópatra', com 21 anos de idade (plantio: 1990), plantadas na fazenda Novo Mundo, município de Comendador Gomes, Estado de Minas Gerais. Estas plantas são tolerantes à MSC, não apresentando sintomas da doença, embora infectadas com o CTV e o CSDaV, detectados através de RT-PCR.

Foi realizado monitoramento mensal para garantir que o CSDaV estivesse presente em todas as épocas do ano em que fossem necessárias realizar coletas de material vegetal. Para isso sete plantas do talhão foram escolhidas aleatoriamente e dois ramos de lados opostos em cada planta foram marcados com fitas. Houve também a separação do material em folhas novas e folhas velhas, vindas do mesmo ramo. Todo material coletado foi submetido a testes de RT-PCR para confirmar a presença do CSDaV.

3.2 Purificação viral

Folhas de laranjeira 'Natal' enxertadas em tangerineira 'Cleópatra', sabidamente infectadas com o CTV e o CSDaV, foram frequentemente colhidas e usadas nas tentativas de purificação do CSDaV seguindo os protocolos de purificação de diferentes vírus de plantas com morfologia semelhante a do CSDaV, conforme descritos a seguir.

Protocolo de purificação do *Cowpea mosaic virus* (CPMV), gênero *Comovirus* (DIJKSTRA et al., 1998). Maceraram-se 300 g de folhas em 600 ml de tampão de extração (NaH_2PO_4 0,1 M), centrifugando o extrato a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi dissolvido em 75 ml de tampão de extração e novamente centrifugado a 10.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante da primeira centrifugação e o precipitado descartado. Polietilenoglicol (PEG) 6000 e NaCl foram adicionados numa concentração de 4% (m/v) e 0,2 M, respectivamente, e a mistura mantida em agitação por uma hora. Após

centrifugação a 8.000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi reservado e o precipitado foi dissolvido em 120 ml de tampão de extração e nova centrifugação realizada a 10.000 g por 15 minutos. Os sobrenadantes destas duas centrifugações foram unidos. Nova centrifugação foi realizada a 120.000 g por 2 horas, onde, ao final, descartou-se o sobrenadante e dissolveu-se o precipitado em 3 ml de tampão de armazenamento (tampão de extração diluído 10 vezes), centrifugando-o a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi centrifugado mais uma vez a 120.000 g por 2 horas e novamente o precipitado foi dissolvido em poucos ml de tampão de armazenamento. Por último, realizou-se centrifugação a 10.000 g por 15 minutos, descartando o precipitado resultante e estocou-se o sobrenadante a 4°C.

Protocolo de purificação do *Maize rayado fino virus* (MRFV), família *Tymoviridae*, gênero *Marafivirus* (GÁMEZ et al., 1977). Cerca de 100 g de folhas foram trituradas em 0,01 M de tampão fosfato, pH 7,0. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. A precipitação do vírus se deu pela adição de PEG 6000 a 8% e NaCl a 0,3 M, agitando por 1 hora e centrifugando a 10.000 g por 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato. Estes procedimentos foram repetidos por 3 vezes sendo o sobrenadante final então submetido a centrifugação a 87.100 g por 1 hora sobre colchão de sacarose a 35%. Ao final observou-se três fases distintas que foram coletadas individualmente e estocadas a 4°C.

Protocolo modificado de purificação do *Potato leaf-roll virus*, família *Luteoviridae*, gênero *Polerovirus* (PERRY et al., 1998). Triturou-se a seco, em liquidificador, 300 g de folhas, acrescentando-se a seguir 600 ml de tampão 0,1 M citrato (tri) sódico pH 6,0, com 0,5% de beta mercaptoetanol. A solução foi filtrada em gaze para retirar o excesso de material vegetal e o pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução saturada de fosfato de sódio dibásico. Adicionaram-se 0,33 volume de clorofórmio e 0,33 volume de butanol, agitando-se durante 30 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi recolhido e PEG 6000 foi adicionado para uma concentração final de 8% (peso/volume) e NaCl para uma concentração final de 0,2 M. Após uma hora de agitação, a solução foi novamente centrifugada a 8.000 g por 15 minutos, a 20°C. O precipitado resultante desta centrifugação foi dissolvido em 150 mL de tampão fosfato de sódio com a adição de 1% de Triton X-100 sob agitação durante a

noite a 4°C. Nova centrifugação a 9.000 g por 10 minutos, a 20°C foi realizada, sendo descartado o precipitado, e o sobrenadante colocado sobre colchão de sacarose (20%) em tampão fosfato 0,02 M pH 7,5 e centrifugado a 29.500 g por 3 horas, a 20°C. O precipitado obtido foi dissolvido em 0,5 ml de tampão fosfato 0,02 M, pH 7,5, por meio de agitação durante a noite.

A suspensão viral obtida nos três protocolos foi submetida a análise em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM900, no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

3.3 Imunoprecipitação do CTV com proteína A-Sepharose

Com o objetivo de remover fragmentos de partículas do CTV presentes no final do processo de purificação, uma vez que o material vegetal sempre continha esse vírus, adotou-se a técnica de imunoprecipitação com proteína A-Sepharose. Para isso, inicialmente o antissoro policlonal contra a proteína capsidial do CTV, (Bioreba, 151522), foi diluído 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 e 1:320. Também foi usado antissoro sem diluição, o qual se denominou antissoro bruto. Cinquenta microlitros do antissoro bruto e daqueles diluídos foram adicionados a 50 µl do purificado viral, separadamente. As misturas foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 50 µl de suspensão contendo proteína A-Sepharose preparada a 50% em soro fisiológico. Após 30 minutos de incubação em homogeneização constante, as amostras foram centrifugadas por pulso de 30 segundos, atingindo velocidade máxima de 10.000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante analisado por RT-PCR para detecção do CTV e do CSDaV.

3.4 Produção de antissoro para o CSDaV

Para a produção de anticorpos policlonais contra a proteína capsidial do CSDaV foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 4 meses de idade. A suspensão do vírus purificado, com e sem imunoprecipitação do CTV com proteína A-Sepharose, foi emulsificada com o adjuvante de Freund (1:1), e a mistura resultante foi injetada via intramuscular na coxa do coelho. Semanalmente foram

aplicados 400 uL da emulsão, sendo 200 uL da suspensão viral e 200 uL do adjuvante, em um total de 4 imunizações. O sangue foi coletado 10 dias após a última injeção através de cortes feitos na veia marginal da orelha do coelho. A amostra de sangue coletada foi coagulada a 4°C por 12 horas, seguida de uma centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O soro foi transferido para microtubos de eppendorf (1,5 mL), os quais foram etiquetados e armazenados a -20°C.

3.5 Método de análise do antissoro

Para análise da eficiência e especificidade do antissoro produzido em coelho para a detecção do CSDaV, foi realizado teste de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) do tipo “Plate Trapped Antigen” (PTA-ELISA) (MOWAT; DAWSON, 1987) com amostras purificadas designadas P21, P24, P25, P40, P41, P42 e P43, amostra de laranjeira doce ‘Natal’ sobre tangerineira ‘Cleópatra’ (N/CI), da região de Comendador Gomes, MG, infectada com o CTV e o CSDaV; laranjeira doce ‘Valência’ enxertada em limoeiro ‘Cravo’, da região de Araraquara (V/Cr Ar) e da região de Botucatu (V/Cr Bt), infectada apenas com o CTV; amostra de laranjeira doce ‘Valência’ enxertada sobre limoeiro ‘Cravo’ livre de vírus (V/Cr LV), da estufa do Fundecitrus. Foram também utilizados controles positivos e negativos para CTV adquiridos comercialmente da marca Bioreba (C+ Bior / C- Bior). Para a detecção da reação sorológica foi usado conjugado anti-imoglobulina IgG de coelho marcada com fosfatase alcalina (Sigma A-3687). A revelação foi feita com p-Nitrofenil fosfato (PNPP) dissolvido em tampão de PNPP, na proporção de 2 mg/mL⁻¹. Foram consideradas positivas as amostras com três repetições que apresentaram valores médios de absorbância a 405 nm superiores a três vezes os valores médios de absorbância do controle negativo (SUTULA et al., 1986)

3.6 RT-PCR

A presença do CTV e do CSDaV, tanto nas plantas fonte de inóculo quanto nas plantas inoculadas, foi feita a partir do RNA total extraído das folhas, utilizando-se o protocolo Trizol Reagent (Invitrogen). O RNA total foi submetido a uma reação de RT-

PCR com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos. Para a detecção do CSDaV utilizou-se o seguinte par de iniciadores: Com_F (5'-ATGGTCTCAGGCGACGACTCCCT-3') e Com_R (5'-GTGAGGATGGGAGCAGAGGAAC-3') (YAMAMOTO et al., 2011). Para a detecção do CTV foi utilizado o par de iniciadores CN119 (5'-AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG-3') e CN120 (5'-GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTAAATTTC C-3') (ROY; RAMACHANDRAN, 2002). As bandas esperadas foram de 601 pb para CSDaV e 660 pb para CTV.

O cDNA foi sintetizado por transcriptase reversa com a enzima ImpromII (1ul, Promega), utilizando-se 5ul do RNA total, 1ul de RNase OUT (Invitrogen), 0,5uM de primer randômico, 0,25mM de dNTPs, tampão ImpromII 1x, 3mM de MgCl₂ em um volume final de 20ul. A síntese ocorreu a 42°C por 1 hora e a inativação da enzima se deu por incubação a 70°C por 15 minutos.

Para a PCR foi utilizado o DNA complementar para amplificação das regiões correspondentes nos genomas do CTV e do CSDaV. Essas reações de amplificação das regiões correspondentes nos genomas do CTV e do CSDaV foram realizadas utilizando-se 1ul do cDNA em tampão da enzima 1x, 0,25mM de dNTPs, 3mM de MgCl₂, 0,5 uM de cada primer iniciador e reverso, e 0,4ul da enzima taq polimerase hot start (Invitrogen), em volume final do mix de 20ul. As condições para amplificação contaram de um ciclo de 1 minuto a 80°C e dois minutos a 94°C; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 69°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1x e o gel corado em uma solução de 0,5 µg/mL de Brometo de Etídio, sendo o produto da amplificação visualizado por exposição à luz ultravioleta e registrado por aparelho Eagle Eye II.

3.7 Tentativa de transmissão do CSDaV para outras espécies

Para as tentativas de isolamento do CSDaV foram utilizadas, inicialmente, as seguintes espécies indicadoras de vírus: *Nicotiana* sp, *N. clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, tomateiro (*Solanum lycopersicum*), pepino (*Cucumis sativus*) e vinca (*Catharantus roseus*) obtidas através de sementes, plantadas em substrato e

mantidas em casa de vegetação, protegidas da ação de insetos. Essas plantas foram inoculadas com extrato vegetal das folhas de laranjeira 'Natal' enxertada em tangerina 'Cleópatra', infectadas com o CTV e o CSDaV. O extrato foi preparado em uma proporção de 1:20 (g/mL), macerando-se pecíolo, nervura e limbo das folhas em tampão fosfato de sódio, 0,2 M, pH 7,5. O extrato obtido foi imediatamente inoculado mecanicamente em folhas das indicadoras contendo o abrasivo carborundum, sendo as mesmas lavadas em água corrente para retirar o excesso de abrasivo. Após a inoculação as plantas foram mantidas em casa de vegetação e monitoradas diariamente quanto ao aparecimento de sintomas. A confirmação da infecção foi feita por RT-PCR.

3.8 Tentativas de infecção de plantas de citros somente com o CSDaV

3.8.1 Por meio da *Cuscuta*

Plantas de laranjeira doce 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo', infectadas com o CTV e o CSDaV, foram usadas como fontes de inóculo. Plantas de *Cuscuta campestris* e *C. subinclusa* foram primeiramente estabelecidas, separadamente, nas plantas de citros fontes de inóculo. Após estabelecidas, hastes das espécies de cuscuta foram colocadas sobre seis mudas sadias de laranjeira 'Valência' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' e também sobre quatro plantas de vinca (*Catharantus roseus*), sendo três plantas de laranjeira e duas plantas de vinca para cada espécie de cuscuta utilizada. As hastes das cuscutas foram conduzidas às novas plantas de modo que as 'pontes' tivessem uma distância máxima de cinco centímetros para facilitar a possível translocação do vírus de uma planta para a outra. O tempo em que cada muda de laranjeira 'Valência' ficou ligada à cuscuta variou em duas, quatro e oito semanas cada (figura 1). Após este período, fragmentos de haste de cuscuta de ambas as espécies foram coletadas das regiões entre a fonte de inóculo e a planta-teste e submetidos a análise de RT-PCR para a detecção do CSDaV e do CTV. Decorridas mais quatro semanas as plantas-teste foram analisadas para a presença dos vírus nas folhas novas por meio de RT-PCR.

Figura 1 - Planta de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo' infectada com o CSDaV e o CTV unida por pontes de cuscuta a mudas de laranjeira 'Valência' e de vinca

3.8.2 Através de cortes no tronco

As tentativas de transmissão do CSDaV para plantas de citros por meio de cortes no tronco das plantas foram feitas de acordo com procedimento usado com sucesso por Garnsey et al (1977) para a transmissão do CTV.

Um mês antes da inoculação foram retiradas as folhas da região onde foram feitas as inoculações e as plantas mantidas em casa de vegetação. O inóculo foi obtido como descrito no item 3.6. A inoculação se deu com o auxílio de uma lâmina perfazendo de 40 a 50 cortes transversais ao longo do caule das plantas, onde para cada corte a lâmina era banhada na solução contendo o CTV e CSDaV (figura 2). Foram separadas uma planta de cada grupo para inoculação somente com o tampão (controle). Ao final, as áreas dos troncos inoculadas foram envoltas em filme plástico Parafilm e as plantas mantidas em casa de vegetação. Após 30 dias da inoculação foi retirado o filme plástico. As análises moleculares para a detecção do CSDaV foram realizadas após um e três meses da inoculação.

Figura 2 - Metodologia de inoculação por cortes. **A** – porta-enxertos de limoeiro ‘Cravo’ utilizados como plantas-teste. **B** – Lâmina banhada em macerado de folhas de laranjeira ‘Natal’ sobre tangerineira ‘Cleópatra’ infectada com o CTV e o CSDaV. **C** – Corte transversal no tronco do porta-enxerto. **D** – Região onde foram realizados os cortes protegida por filme plástico

3.8.3 Por meio de *Toxoptera citricida*

3.8.3.1 Detecção do CSDaV em afídeos

Ramos de plantas de laranjeira ‘Pêra’ enxertadas sobre limoeiro ‘Cravo’, de propriedades da região de Comendador Gomes, MG, apresentando sintomas de MSC e colonizados por *T. citricida* foram cortados e inseridos em sacos de voil. Ramos de laranjeiras da região de Araraquara contendo *T. citricida* também foram coletados e acondicionados em sacos de voil para serem usados como testemunha. Os insetos foram transportados vivos ao laboratório, onde foram separados em tubos de eppendorf com dez indivíduos cada, perfazendo total de 6 amostras, sendo uma com os insetos da amostra testemunha. Foi realizada extração de RNA total dos afídeos utilizando

protocolo Trizol Reagent LS. O RNA total foi submetido a RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o CTV e o CSDaV.

3.8.3.2 Testes de transmissão do CSDaV através de afídeos

Porta-enxertos de limoeiro ‘Cravo’, com aproximadamente vinte centímetros de altura e apresentando brotações novas, foram acondicionados em gaiolas. Os indivíduos de *T. citricida*, provenientes de colônias cuja análise molecular detectou apenas o CSDaV, foram transferidos para estas plantas (figura 3). Foram colocados aproximadamente cinquenta insetos por planta, num total de 10 plantas. Os afídeos permaneceram nessas plantas por duas semanas quando então foram eliminados. As plantas permaneceram em casa de vegetação, protegidas da presença de insetos. Análises de RT-PCR foram realizadas 30 e 60 dias após a retirada dos afídeos para a detecção do CSDaV e do CTV.

Figura 3 - Afídeos virulíferos para CSDaV se alimentando em porta-enxertos de limoeiro ‘Cravo’

3.8.4 Por meio da inoculação de sementes

A inoculação de sementes de citros com CSDaV foi feita de maneira semelhante a utilizada por Louie et al. (1995) para a inoculação do Maize white line mosaic virus (MWLMV) em sementes de milho. Inicialmente, 362 sementes selecionadas de limoeiro 'Cravo' foram deixadas submersas em água destilada durante uma noite. Em seguida as sementes foram secadas com papel filtro para a inoculação. O inóculo foi preparado como em 3.6. Para cada semente, foram realizadas 2 a 3 perfurações de 1 – 2 mm de profundidade, sendo que a cada perfuração, a agulha era banhada no inóculo. Após a inoculação as sementes foram semeadas em tubetes, em substrato de pinus, mantidos em casa de vegetação (figura 4). Quatro meses após a semeadura, quando as plantas apresentavam tamanho médio de 10 cm, foram coletadas folhas de cada uma delas e submetidas a análise molecular de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o CTV e o CSDaV.

Figura 4 Hidratação das sementes (1), secagem das sementes pós-hidratação (2), alfinete entomológico sendo banhado em macerado de folhas de laranjeira 'Natal' enxertada em tangerineira 'Cleópatra', infectada com CSDaV e CTV (3), inoculação da semente (4) e sementes germinando

4 RESULTADOS

4.1 Isolado do CSDaV

Resultado de análise de RT-PCR para a detecção do CSDaV em folhas velhas e novas, coletadas de plantas no campo infectadas com o CTV e o CSDaV está ilustrado na figura 5. Na maioria dos casos o CSDaV foi eficientemente detectado em folhas novas, mas não naquelas mais velhas do mesmo ramo da planta. O CTV foi detectado em todas as amostras.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb). As letras N e V representam extrações de RNA total de folhas novas e velhas, respectivamente

4.2 Purificado viral

Foram realizadas três tentativas de purificação do CSDaV com cada um dos protocolos descritos em 3.2, porém o único que resultou em partículas virais ao final da purificação foi aquele desenvolvido para purificação do PLRV (PERRY et al.,1998). Análises da suspensão viral ao final da purificação feitas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) permitiram a detecção de pequeno número de partículas isométricas do CSDaV, porém sempre acompanhadas de grande quantidade de partículas alongadas, intactas ou quebradas, do CTV (figura 6). A identidade dos vírus foi confirmada por RT-PCR a partir do RNA extraído da suspensão final do purificado. Ao

tudo foram realizadas 54 tentativas de purificação do CSDaV usando o protocolo de purificação do PLRV, às quais foram nomeadas de P1 a P54.

Figura 6 - Visualização de suspensão viral purificada ao MET. Partículas alongadas flexuosas (CTV) e isométricas (CSDaV). Escala: 200 nm

Foram realizadas cinco tentativas de isolamento de partículas do CSDaV por meio da imunoprecipitação do CTV com antissoro contra a proteína capsial desse vírus, adicionado à suspensão do purificado viral P20. Este foi escolhido por ter apresentado o melhor resultado na purificação.

Análises ao MET das suspensões virais após imunoprecipitação, com diferentes diluições do antissoro contra o CTV, indicaram a presença de partículas isométricas do CSDaV e a aparente ausência do CTV (figura 7).

A confirmação do CSDaV nas suspensões virais após a imunoprecipitação foi feita por RT-PCR. O CSDaV foi detectado em todas as amostras. O CTV não foi detectado nas suspensões submetidas à imunoprecipitação com o antissoro bruto e com aqueles

diluídos 1:5, 1:10 e 1:20. Nas demais diluições houve aparente detecção deste vírus (Figura 8).

Figura 7 - Visualização ao MET de suspensão de purificado viral após imunoprecipitação com antissoro contra o CTV, diluído 1:10, mostrando partículas isométricas do CSDaV. Escala: 200 nm

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) **A**, e do CTV (660 pb) **B**, após imunoprecipitação do purificado viral com antissoro contra o CTV. 1 - antissoro bruto; 2 – 8 antissoro diluído 1:5,1:10, 1:20, 1:40,1:80, 1:160 e; 8 - 1:320, respectivamente; 9 - controle negativo e 10 – respectivos controles positivos

4.3 Testes dos antissoros produzidos

Na tabela 1 estão apresentados os valores de absorbância obtidos em teste de PTA-ELISA usando antissoros produzidos através de imunizações de coelhos com purificado viral sem imunoprecipitação (soro 1) e com imunoprecipitação para a remoção de partículas do CTV (soro 2). Nota-se que as suspensões dos purificados virais P21, P24, P25, P40, P41 e P43 reagiram com ambos antissoros na mesma intensidade. Os extratos de folhas de laranjeira infectada com o CSDaV e o CTV (N/CI), bem como aqueles de plantas infectadas somente com o CTV (V/Cr Ar, V/Cr Bt e V/Cr LV) e o controle positivo para CTV reagiram com ambos os antissoros.

Tabela 1 - Valores de absorbância do teste de PTA-ELISA para detecção do CSDaV. **Soro 1:** oriundo de preparado viral sem imunoprecipitação para remoção do CTV. **Soro 2:** oriundo de preparado viral imunoprecipitado com antissoro contra o CTV

Amostra	Soro 1	Soro 2
P21	3.760	3.915
P24	4.174	3.212
P25	4.011	4.122
P40	3.861	3.052
P41	1.648	2.918
P43	3.993	3.511
N/CI	4.025	4.012
V/Cr Ar	3.806	3.409
V/Cr Bt	4.213	4.001
V/Cr LV	0.279	0.125
C+ Bior	4.011	3.923
C- Bior	0.124	0.112

P21, P24, P25, P40, P41 E P43 – Purificados virais; **N/CI** – Extrato de laranjeira ‘Nata’ sobre tangerineira ‘Cleópatra’ infectada com CTA e CSDaV; **V/Cr Ar** – extrato de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ da região de Araraquara infectada com CTV; **V/Cr Bt** – extrato de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ da região de Botucatu infectada com CTV; **V/Cr LV** – extrato de laranjeira ‘Valência’ sobre limoeiro ‘Cravo’ livre de vírus; **C+ Bior** – controle positivo comercial para CTV (Bioreba); **C- Bior** – controle negativo comercial (Bioreba).

4.4 Transmissão do CSDaV para outras espécies

Resultados da reação de diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com extrato de folhas novas de plantas cítricas comprovadamente infectadas com o CSDaV e o CTV, coletadas no campo, estão apresentados na tabela 2 e ilustrados nas figuras 9, 10 e 11.

Tabela 2 - Reação de diferentes espécies vegetais inoculadas mecanicamente com extrato foliar de laranjeira infectada com o CTV e o CSDaV, avaliada com base na presença de sintomas e detecção do vírus por RT-PCR

Espécies	Nº de plantas infectadas / Nº de plantas inoculadas	
	CSDaV	CTV
<i>Nicotiana sp.</i>	9/10	0/10
<i>N. clevelandii</i>	6/10	0/10
<i>C. quinoa</i>	8/10	0/10
<i>C. amaranticolor</i>	7/10	0/10
Tomate	0/10	0/10
Pepino	0/10	0/10
Vinca	0/5	0/5

Nicotiana sp., *C. quinoa* e *C. amaranticolor* apresentaram lesões muito semelhantes àquelas ocorridas pela ação do atrito do abrasivo com a folha, após quatorze dias da inoculação, porém, nas folhas inoculadas com suspensão viral as lesões se apresentavam muito mais severas. Análise de RT-PCR a partir de RNA total extraído de folhas inoculadas permitiu a detecção do CSDaV em 90%, 80% e 70% das plantas de *Nicotiana sp.*, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, respectivamente (figura 12).

O CSDaV também foi detectado por RT-PCR em RNA total extraído de folhas não inoculadas, adjacentes àquelas inoculadas de duas plantas de *Nicotiana sp.* e uma de *C. quinoa*. Em uma destas plantas de *Nicotiana sp.* também foi detectado em folhas jovens do ponteiro, sugerindo invasão sistêmica (figura 13).

N. clevelandii apresentou, após vinte dias da inoculação, manchas pálidas circulares espalhadas pelo limbo foliar (figura 11). O CSDaV foi detectado por RT-PCR nas lesões de 60% dessas plantas. Tomateiro, pepino e vinca não apresentaram nenhum tipo de sintoma e o vírus não foi detectado por RT-PCR. O CTV não foi detectado por RT-PCR em nenhuma das plantas-teste inoculadas.

Figura 9 - **A e B** – Folhas de *C. quinoa* inoculadas mecanicamente com extrato de folha de laranjeira infectada com o CTV e o CSDaV; **C** – testemunha inoculada com tampão

Figura 10 - **A** – Folhas de *C. amaranticolor* inoculadas mecanicamente com extrato de folha de laranjeira infectada com o CTV e o CSDaV; **B** – testemunhas inoculadas com tampão

Figura 11 - Folhas de *N. clelandii* inoculada mecanicamente com extrato de folha de laranjeira infectada com o CTV e o CSDaV; **B** – testemunha inoculada com tampão

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) A, e do CTV (660 pb) B em folhas inoculadas das plantas-teste. M – marcador de peso molecular de 100 pb, 1 e 2 – *Nicotiana* sp., 3 e 4 – *N. clevelandii*, 5 e 6 – *C. quinoa*, 7 e 8 – *C. amaranticolor*, 9 e 10 – tomateiro, 11 e 12 – pepino, 13 e 14 – Vinca; 15 – controle negativo; 16 – respectivos controles positivos

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) A, e do CTV (660 pb) B em folhas não inoculadas das plantas-teste. M – marcador de peso molecular de 100 pb, 1 e 2 – folhas adjacentes às inoculadas (*Nicotiana* sp.); 3 a 5 – folhas de brotações novas (*Nicotiana* sp.); 6 e 7 – folhas adjacentes às inoculadas (*C. quinoa*); 8 e 9 – folhas de brotações novas (*C. quinoa*); 10 – controle negativo; 11 – respectivos controles positivos

Os produtos da RT-PCR de uma amostra positiva de cada uma das três espécies infectadas foram purificados, clonados e o ácido nucléico sequenciado. As sequências de nucleotídeos obtidas mostraram identidade de 99% com a sequência correspondente do CSDaV depositada no GeneBank, números de acesso AY884005 (MACCHERONI et al, 2005); DQ185573 (BARROS et al, 2005), confirmando a identidade do vírus presente nas lesões.

4.5 Transmissão do CSDaV para plantas de citros

4.5.1 Através da Cuscuta

Testes de RT-PCR realizados a partir de RNA total extraído de fragmentos de hastes de cuscuta de ambas as espécies foram todos negativos quanto à presença do CSDaV e do CTV. As seis mudas de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo', assim como as quatro plantas de vinca, submetidas à análise de RT-PCR também apresentaram resultado negativo quanto à presença de ambos os vírus (figura 14).

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) A, e do CTV (660 pb) B. M – marcador de peso molecular de 100 pb, 1 a 3 – extrato foliar de laranjeira 'Valência' sobre limoeiro 'Cravo', 4 – haste de *Cuscuta campestris*, 5 – haste de *C. obtusiflora*, 6 – controle negativo; 7 – respectivos controles positivos

4.5.2 Através de cortes no tronco

Foram realizados três eventos de inoculação utilizando cento e dezoito porta-enxertos de limoeiro 'Cravo' com diâmetro de tronco de aproximadamente 8 mm, treze mudas de laranjeira 'Valência' enxertadas em limoeiro 'Cravo' de mesmo diâmetro, cinquenta e duas plantas de 'Cidra' etrog enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' e três

plantas de vinca. Análises de RT-PCR realizadas com RNA totais extraídos de todas as plantas-teste, 30 e 90 dias após a inoculação, deram resultados negativos para CSDaV. Apenas uma planta de 'Cidra' sobre 'Cravo' mostrou-se infectada com o CTV.

4.5.3 Por meio de *Toxoptera citricida*

O resultado da análise de RT-PCR do RNA extraído das cinco amostras, contendo dez afídeos cada, foi positivo para a detecção do CSDaV, porém negativo para o CTV. Na amostra controle, com afídeos coletados na região de Araraquara, não foi detectado nenhum dos vírus (figura 15).

Nenhuma das 10 plantas de limoeiro 'Cravo' inoculadas com os afídeos virulíferos para o CSDaV mostrou-se infectada com esse vírus após análise de RT-PCR, 60 dias depois da inoculação. O CTV também não foi detectado em nenhuma dessas plantas.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) **A**, e do CTV (660 pb) **B** em afídeos (*Toxoptera citricida*). 1 – Marcador de peso molecular de 100 pb; 2 a 6 – afídeos da região de C. Gomes; 7 – afídeos da região de Araraquara (controle negativo); 8 – Respectivos controles positivos

4.5.4 Inoculação viral em sementes

Após quatro meses da inoculação e semeadura, 219 sementes germinaram, representando 60% do total semeado. Foi realizada extração de RNA total de folhas de

cada uma das plantas germinadas seguido de RT-PCR com iniciadores específicos para a detecção do CSDaV e do CTV. Todas as amostras foram negativas para ambos os vírus conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% de cDNA amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção do CSDaV (601 pb) A, e do CTV (660 pb) B em algumas plantas de limoeiro 'Cravo' inoculadas com *T. citricida* virulíferos para o CSDaV. M – marcador de peso molecular de 100 pb, 1 a 13: plantas germinadas de sementes inoculadas; 14 – controle negativo; 15 – respectivos controles positivos

5 DISCUSSÃO

Durante o período de realização desse trabalho sempre utilizou-se como fonte de inóculo para o CSDaV folhas de laranjeiras doce 'Natal' enxertada sobre tangerinas 'Cleópatra', cultivadas na região de Comendador Gomes, MG. Antes do preparo do inóculo, sempre foi confirmada a presença do marafivirus e do CTV no tecido vegetal. A presença desse closterovirus é normal, pois ele está presente em praticamente todas as plantas cítricas no Brasil e já foi relatado anteriormente em associação com o CSDaV (MACCHERONI et al. 2005).

As análises de RT-PCR, feitas com RNA total extraído de folhas novas e velhas do mesmo ramo da planta, indicaram que as primeiras foram melhores fontes de inóculo devido à frequente detecção do vírus. Esse fato está provavelmente relacionado com o título e a distribuição do vírus nos diferentes tecidos da planta durante a invasão sistêmica. A distribuição e o acúmulo do vírus na planta durante o processo de movimentação sistêmica geralmente não é uniforme, pois existem vários fatores como genes do hospedeiro, genes virais, sistema de defesa da planta e variáveis ambientais que afetam a taxa e a extensão do movimento e concentração do vírus na planta (HULL, 2002). Exemplo clássico são as ilhas verde escuras que aparecem em folhas de fumo com mosaico causado pelo vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* – TMV) que apresentam poucas ou nenhuma partícula infecciosa de vírus, quando comparada com áreas verde claras ao redor (ATKISON; MATTHEWS, 1970).

Estudos sobre a replicação e acúmulo de isolados do CTV, que está restrito ao floema das plantas, com base nas detecções do antígeno por ELISA e do RNA de fita dupla (dsRNA), revelaram variabilidade em função do isolado viral e da espécie de citros infectada (DODDS et al., 1987). Esses autores também constataram um efeito marcante da época do ano na concentração do vírus nas plantas. A detecção do CTV foi melhor em amostras coletadas das plantas durante o período de temperaturas mais amenas. Esse fato também foi observado no presente trabalho em relação a detecção do CSDaV, cuja presença nas amostras coletadas de plantas no campo sempre foi melhor no período de fevereiro a setembro, do que entre outubro e janeiro (dados não apresentados).

Entre os três protocolos de purificação de vírus de plantas escolhidos, em função principalmente da semelhança morfológica com o CSDaV, os melhores resultados foram alcançados com aquele desenvolvido para a purificação do *Potato leaf roll virus* (PLRV) (PERRY et al., 1998). Apesar de esse protocolo ter permitido a purificação do CSDaV, não foi possível excluir o CTV, que estava presente em todas as folhas coletadas das plantas no campo (figura 6). A titulação do vírus também revelou-se muito baixa, com base nas observações de suspensões do vírus semi-purificado no microscópio eletrônico (figura 6). Maccheroni et al. (2005) também obtiveram baixa concentração do CSDaV durante tentativas de purificação e atribuíram esse fato ao baixo título do vírus nos tecidos da planta. Essa sugestão foi feita com base na dificuldade de detecção de partículas do CSDaV em extrato de planta constatado negativamente e em cortes ultra finos de tecidos de plantas doentes observadas no microscópio eletrônico. Essas observações estão de acordo com estudos realizados com o OBDV (BANTTARI; ZEYEN, 1971) e o Grapevine asteroid mosaic-associated vírus (GAMaV) (SABANADZOVIC et al., 2000), que são marafivirus relacionados filogeneticamente com o CSDaV (MACCHERONI et al., 2005).

As tentativas de remoção das partículas do CTV das suspensões semi purificadas do CSDaV por meio da imunoprecipitação com antissoro contra o CTV e proteína A-Sepharose aparentemente deram resultados positivos, especialmente quando utilizou-se antissoro bruto ou altamente concentrado. Após a imunoprecipitação não foi possível visualizar partículas do closterovirus no microscópio eletrônico (figura 7), nem detectá-lo por meio de RT-PCR (figura 8). No entanto, os antissoros produzidos em coelhos imunizados com suspensões semi purificadas, submetidas ou não a imunoprecipitação para remoção do CTV, reagiram de maneira semelhante com o extrato contendo o CTV. Esse resultado é sugestivo de que minúsculos fragmentos de partículas do CTV, capazes de ativar o sistema imunológico dos coelhos, ainda estavam presentes mesmo após o processo de imunoprecipitação.

O CSDaV foi transmitido mecanicamente para plantas de *Nicotiana* sp., *N. clevelandii*, *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, causando sintomas localizados nas folhas inoculadas. A presença do vírus nas folhas inoculadas foi confirmada por RT-PCR e posterior sequenciamento do ácido nucleico do fragmento amplificado de

algumas amostras. Em raros casos o vírus foi detectado em folhas não inoculadas adjacentes aquelas inoculadas em folhas do ponteiro, sugerindo invasão sistêmica. Em nenhuma das plantas infectadas foi detectada a presença do CTV, mostrando que essas indicadores são apropriadas para isolamento do CSDaV. A transmissão mecânica desse vírus é um resultado incomum, pois espécies do Gênero *Marafivirus* são restritas ao floema e não são transmitidas mecanicamente pelo método convencional de fricção do inóculo nas folhas (MARTELLI et al., 2002).

As tentativas de transmissão do CSDaV por meio de cortes realizados no tronco das plantas, com lâminas umedecidas em extrato de folhas de plantas infectadas com esse vírus e o CTV, foram negativos para o marafivirus e de muito baixa eficiência para a transmissão do CTV. Garnsey et al. (1977) tiveram sucesso na transmissão do CTV através de 50 cortes no tronco das plantas, porém com baixa eficiência.

C. campestris e *C. subinclusa* não permitiram a transmitiram do CSDaV ou do CTV para plantas de laranjeira 'Valência' enxertadas sobre limoeiro 'Cravo' e plantas de vinca. Sabe-se, todavia, que Weathers e Hartung (1964) transmitiram experimentalmente o CTV por meio de *C. subinclusa*.

As tentativas de transmissão do CSDaV para sementes, por meio de punções com agulha umedecida em extrato foliar de plantas infectadas também não teve sucesso. Nenhuma das 219 plantas obtidas de sementes inoculadas apresentou-se infectada após análise por RT-PCR. Esse procedimento foi usado com sucesso para a inoculação de sementes de milho com o *Maize white line mosaic virus* (MWLMV) (LOUIE, 1995) e com o *Maize rayado fino virus* (MRFV) (MADRIZ-ORDEÑANA et al., 2000). Esses últimos autores também transmitiram o MRFV para sementes de cevada utilizando o mesmo procedimento.

Fato interessante foi a constatação de colônias de *T. citricida*, coletadas de plantas no campo infectadas com o CSDaV e CTV, que mostraram-se aparentemente virulíferas somente para o CSDaV, conforme resultados de análise de RT-PCR. No entanto, afídeos que se alimentaram em plantas cítricas sadias não foram capazes de transmitir esse vírus. A presença desse marafivirus em *T. citricida* não é novidade. Maccheroni et al (2005) foram os primeiros a relatarem a sua detecção em *T. citricida*, *A. gossypii* e *A. spiraecola*, porém não há menção sobre testes de transmissão.

Estudos epidemiológicos apontaram que o agente causal da morte súbita do citrus é transmitido no tempo e no espaço de maneira semelhante a do CTV por *T. citricida*, o principal vetor desse vírus (BASSANEZI et al., 2003a). Yamamoto et al. (2011) recentemente confirmaram a existência de um vetor aéreo na transmissão do agente causal da morte súbita dos citros em ensaio no campo, porém não identificaram o tipo de vetor envolvido. A possível necessidade do CTV para auxiliar a transmissão do CSDaV, conforme tem sido sugerida (ROMÁN et al., 2004; BOVÉ 2005) ainda necessita confirmação experimental. Estudos recentes indicaram a presença do CSDaV em cigarrinhas coletadas de plantas afetadas pela morte súbita dos citros (N.A. Wulff, dados não publicados). Como as espécies de marafivirus são transmitidas por cigarrinhas e não por afídeos, esses resultados abrem uma nova via para investigações.

Apesar de todos os esforços até o momento não foi possível transmitir o CSDaV isoladamente para plantas cítricas para analisar a participação desse vírus na síndrome da morte súbita dos citros.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Metodologias como a inoculação por cortes no caule de porta enxertos, utilização de cuscuta como ponte biológica e punção em sementes, não foram eficientes na transmissão ou inoculação do CSDaV em plantas cítricas.

A inoculação mecânica em *Nicotiana* sp., *N. clevelandii*, *C. quinoa* e *C. amaranticolor*, porém, foi eficiente no isolamento do CSDaV, abrindo novas possibilidades para o estudo do envolvimento deste vírus na morte súbita dos citros.

REFERÊNCIAS

ATKISON, P.H.; MATTHEWS, R.E.F. On the origin of daek green tissue in tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. **Virology**, Heidelberg, v. 40, p.344-356, 1970.

BANTTARI, E.E.; ZEYEN, R.J. Histology and ultrastructure of flax crinkle. **Phytopathology**, St Paul, v. 61, p.1249-1252, 1971.

BARROS, C.C.P.; NAGATA, T.; SANTOS, M.A.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JUNIOR, W.C. de. Sequenciamento do genoma completo do marafivirus isolado de laranjeiras com sintomas de morte súbita dos citros. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p. S191, 2005.

BASSANEZI, R.B.; YAMAMOTO, P.T.; GIMENES-FERNANDES, N. Progresso dos sintomas de “morte súbita” em pomares de laranjeiras ‘Valência’ e ‘Pera’. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.28, p.23, 2002.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIM FILHO, A.; AMORIM, L.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOTTWALD, T. R.; BOVÉ, J. M. Spatial and temporal analyses of Citrus Sudden Death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. **Phytopathology**, St Paul, v.93, n.4, p.502-512, 2003a.

BASSANEZI, R.B.; GIMENES, N.F.; YAMAMOTO, P.T. **Morte súbita dos citros** – Araraquara: Fundecitrus, 2003b. 54p. (Boletim citrícola, 24)

BASSANEZI, R.B.; MONTESINO, L.H.; SANCHES, A.L.; SPÓSITO, M.B. Effect of Citrus Sudden Death on Yeld and quality of sweet Orange cultivars in Brazil. **Plant Disease**, St Paul, v.91, p.1407-1412, 2007.

BOVÉ, J.M. In retrospect: Citrus Sudden Death, a graft-transmissible, tristeza-like bud union disease. in: . HILF, M.E. DURAN-VILA, N. ;ROCHA-PEÑA, M.A. (ED.). **Conf. IOCV, 16th** Riverside :IOCV, 2005. p.213-216

MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU Jr. ,J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico ; Fapesp, 2005. v. 1. 929 p.

CANTÚ, M.D.; MARIANO, A.G.; PALMA, M.S.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A. Proteomic analysis reveals suppression of bark chitinases and proteinase inhibitors in citrus plants affected by the Citrus Sudden Death disease. **Phytopathology**, St Paul, v.98, p.1084-1092, 2008.

DERRICK, K.S.; BERETTA, M.J.; BARTHE, G.A.; KAYIM, M. Identification of strains of *Citrus tristeza virus* by subtraction hybridization. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, p. 1355-1359, 2003.

DODDS, J.A.; JARUPAT, T.; LEE, J.G.; ROISTACHER, C.N. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. **Phytopathology**, St Paul, v. 77, p. 442-447, 1987.

FNP. Citros. **Agrianual 2003: anuário da citricultura Brasileira**. FNP consultoria & agroinformativos. São Paulo, 2003. p.295-314.

FUNDECITRUS. MSC evolui. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n.120, p.6, jan/fev 2004.

FUNDECITRUS. Localizada e grave. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n.131, p.14, nov/dez 2005.

GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E. Mechanical transmission of Citrus Tristeza Vírus. **Phytopathology**, St Paul, v.67, p.965-968, 1977.

GIMENES FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Doença de causa desconhecida afeta pomares cítricos no norte de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.27, p.93, 2001.

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R.B. Manejo integrado de doenças dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Uberlândia, v.28, p.S66-S72, 2003.

HERRON, C.M.; da GRAÇA, B.M.; da GRAÇA, J.V.; SHATTERS JR, R.G.; MIRKOV, T.E. A low titer RNA entity in a *Citrus tristeza virus*-infected Mexican lime plant with similarities to *oat blue dwarf virus* and *grapevine fleck virus*. **Phytopatology**, St Paul, v.92, p.S36, 2002.

HULL, R.M. **Plant Virology**. New York: Academic Press, 1001p.2002.

INFORMATIVO CENTRO DE CITRICULTURA. Nova doença já causa prejuízos a pomares de SP e MG. **Informativo Centro de Citricultura**, Cordeirópolis, v. 76, p.1-4, 2001.

POMPEU JR, P.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; JUNIOR, J.P. **Citros**. Campinas, 929p. 2005.

POMPEU JR, P.; BLUMER, S. Morte súbita dos citros: suscetibilidade de seleções de limão-cravo e uso de interenxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 1159-1161, 2008.

LOEZA-KUK, E.; OCHOA-MARTÍNEZ, D.L.; AGUILERA, G.M.; RIVAS-VALENCIA, P.; ESPINOSA, M.A.G.; JESUS-JUNIOR, W.C.; MONTER, A.V.; WULFF, N.A.; BALCH, E.P.M. Detection of Citrus Sudden Death-associated virus and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. **Agrociencia**, Pelotas, v.42, p.669-678, 2008.

LOUIE, R. Vascular puncture of maize kernels for the mechanical transmission of Maize white line mosaic virus and other viruses of maize. **Phytopathology**, St Paul, v.85, n.2, p.139-143, 1995.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M.C.; GREGGIO, C.C.; PIAZZA, J.P.; KAMLA, R.F.; ZACHARIAS, P.R.A.; BAR-JOSEPH, M.; KITAJIMA, E.W.; ASSUMPÇÃO, L.C.; CAMAROTTE, G.; CARDOZO, J.; CASAGRANDE, E.C.; FERRARI, F.; FRANCO, S. F.; GIACHETTO, P.F.; GIRASOL, A.; JUNIOR, H.J.; SILVA, V.H.A.; SOUZA, L.C.A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; ZANCA, A.S.; ARRUDA, P.; KITAJIMA, J.P.; REINACH, F. C.; FERRO, J.A.; SILVA, A.C.R. Identification and characterization of a new virus (*Tymoviridae* family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n.5, p.3028-3037, 2005.

MADRIZ-ORDEÑANA, K.; ROJAS-MONTERO, R.; LUNDGAARD, T.; RAMÍREZ, P.; THORDAL-CHRISTENSEN, H.; COLLINGE, D.B. Mechanical transmission of maize rayado fino marafivirus (MRFV) to maize and barley by means of the vascular puncture technique. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, n.2, p.302-307, 2000.

MARTELLI, G.P.; SABANADZOVIC, S.; ABOUH-GHANEM SABANADZOVIC, N.; EDWARDS, M.C.; DREHER, T. 2002. THE FAMILY *TYMOVIRIDAE*. **Archives of Virology**, Heidelberg, v. 147, p.1837-1846, 2002.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Washington, v.15, n.3, p.233-247, 1987.

MÜLLER, G.W.; DE NEGRI, J. D.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MATTOS JÚNIOR, D.; POMPEU JÚNIOR, J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; CARVALHO, S.A.; GIROTTI, L.F.; MACHADO, M.A. Morte súbita dos citros: uma nova doença na citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.371-386, 2002.

NEVES, M.F. (Coord.); TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSORI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto Markestrat, p.8-9, 2010.

PERRY, K.L.; MILLER, J.; LISTER, R.M.; MAYO, M.A. Luteovirus isolation and RNA Extraction. In: FOSTER, G.D.; TAYLOR, S.C. (Ed.) **Methods in molecular biology: plant virology protocols**. Totowa, v.81, p.232-239, 1998.

REVISTA LARANJA, Cordeirópolis, v.27, p.13-29, 2006.

RIVAS-VALENCIA, P.; LOEZA-KUK, E.; MORA-AGUILERA, G.; FEBRES, V.; OCHOA-MARTÍNEZ, D.; GUTIÉRREZ-ESPINOSA, M.A.; JESUS-JUNIOR, W.C.; MALVAS, C.C.; WULFF, N.A. Estrutura poblacional de aislamientos del *Citrus Tristeza Virus* y su asociación con la Muerte Súbita de los Cítricos em Brasil. **Agrociencia**, Pelotas, v.42, p.85-93, 2008.

ROMÁN, M.P.; CAMBRA, J.J.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F.A.O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R. B.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; AYRES, A.J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L.F.; BOVÉ, J.M. Sudden Death of citrus in Brazil: A graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**, St Paul, v.88, p.453-467, 2004.
 ROY, A.; RAMACHANDRAN, P. Bi-directional PCR – a tool for identifying strains of *citrus tristeza virus*. **India Phytopathology**, New Delhi, v.55, n.2, p.182-186, 2002.

SABANADZOVIC, S.; GHANEM-SABANADZOVIC, N.A.; CASTELLANO, M.A., DIGIARO, M.; MARTELLI, G.P. Grapevine fleck virus-like viroses in *Vitis*. **Arquivos of Virology**, Heidelberg, v.145, p.553-565, 2000.

SUTULA, C.L.; GILLET, J.M.; MORRISSEY, S.M.; RAMSDELL, D.C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. **Plant Disease**, St Paul, v.70, p.722-726, 1986.

TARGON, M.L.P.N.; ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; KISHI, L.; SOUZA, A.A.; SANTOS, F.A.; MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A. Evaluation of CTV haplotypes in plants exhibiting citrus sudden death symptoms. In: ISC CONGRESS, 10., 2004. **Abstract...** p.83. 2004.

WEATHERS, L G.; HARJUNG, M.K. Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*. **Plant Disease**, St Paul, v. 48, p. 102-103, 1964.

YAMAMOTO, P.T.; JESUS JR, W.C.; BASSANEZI, R.B.; SANCHES, A.L.; AYRES, A. .; GIMENES-FERNANDES, N.; BOVÉ, J.M. Transmission of the agent inducing symptoms citrus sudden death by graft inoculation under insect proof conditions. **Fitopatologia Brasileira**, Uberlândia, v.28, p.S265, 2003.

YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; WULFF, N.A.; SANTOS, M.A.; SANCHES, A. L.; TOLOY, R.S.; GIMENES-FERNANDES, N.; AYRES, A.J.; JESUS JUNIOR, W. C.; NAGATA, T.; TANAKA, F.A.O.; KITAJIMA, E.W.; BOVÉ, J.M. Citrus Sudden Death is transmitted by graft-inoculation and natural transmission is prevented by individual insect-proof cages. **Plant Disease**, St Paul, v.95, p.104-112, 2011.

APÊNDICE

Sequência de nucleotídeo do CSDaV obtida diretamente do produto da RT-PCR a partir do RNA total extraído de *Nicotiana sp.*

```
ATGGTCTCAGGCGACGACTCCCTCCTGGATCGTGAGCCTCCCACTCGCCC
TGAATGGGTTATCCTCCAGCCTCTTCTCAGTCTCCGCTTCAAGAAAGAAAGGGGTC
GGTACGCCACCTTCTGTGGCTACTACGCCTCCCATGTGCGGCTGTGTCCGCTCCCC
CGTGGCTCTCTTTGCCAAGCTGGCCATAGCTGTGATGACGGCTCCATCTCTGACA
AAATGGCCTCATACCTCTCTGAATTTGCTCTTGGCCACTCCCTTGGAGACCATCTCT
GGGAAGCTTTGCCCCCTCGAGGCCGTTCCCTTCCAATCTGCCTGCTTTGACTTCTTC
TGCCGCCGGGGCCCCCAGACACCTCAAGCTCTCTCTCATGCTCGGCGAGGTCCCAG
AATCCATCATTGCCCCGCATCGGGTCATCCTTGAAGTGGGCCTCTCATGCCATCTAC
ACCACACTCTCCTCTGCCGCTCGAGTGGCCATTCTGAGATCCTCCCGCAACAGCA
GATCCATGCCAGATGANCCCGACACCACTCTGCTACAAGGTGAATTGCTTCAGCAC
TTTCAAGTACCATTGCAATCTGACACTCTCCTGCCTCTCACTGGTGGTTCCTCT
GCTCCCATCCTCTC
```

Sequência de nucleotídeo do CSDaV obtida diretamente do produto da RT-PCR a partir do RNA total extraído de *C. amaranticolor*.

```
AtGGTCTCAGGCGACGACTCCCTTCTGGATCGTGAGCCCCCACCACCCCGAGtG
GGtCATTCTCCAGCCACTTCTCAGCCTCCGCTTCAAGAAAGAAAGAGGTGCGGTACG
CCACCTTCTGTGGCTACTACGCCTCCCATGTGGGCTGTGTTGCTCCCCCATTGCT
CTCTTTGCTAAACTTGCCATAGCTGTGATGACGGCTCGATCTCTGACAAAATGGC
CTCATACCTCTCTGAATTTGCTCTCGGCCATTCCCTCGGGGACCATCTATGGGAAG
CCCTCCCCCTTGAGGCTGTGCCTTTCCAGTCTGCTTGCTTCGACTTCTTCTGCCGC
CGAGCCCCAAGGCACCTCAAGCTCTCTCTCATGCTCGGCGAAGTCCCAGAGTCCA
TCATTGCCCCGCATAGGATCCTCCTTGAAATGGGCTTCTCATGCCATCTACACCACT
CTCTCCTCTGCGCCCCGAGCGGCCATTCTCAGATCCTCCCGCAATAGCAGGTCCAT
GCCAGATGACCCAGACACTACCCTGCTACAAGGTGAATTGCTTCAGCATTTTCAAG
CACCATTGCAATCTGACACTCTGCTGCCTCTTACTGGTGGTTCCTCTGCTCCCA
TCCTCAC
```