

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA EXPRESSÃO DE SINTOMAS DA LEPROSE DOS CITROS EM HOSPEDEIROS VEGETAIS**

MEIRE E.L.**SOMMER**<sup>1</sup>; MARINES **BASTIANEL**<sup>2</sup>; MARIA A. **NUNES**<sup>3</sup>; MARCELA P.  
**BERGAMINI**<sup>4</sup>; LUCIANE L. **COERINI**<sup>5</sup>

**Nº 12109**

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito da temperatura na expressão dos sintomas do vírus da leprose dos citros em plantas de citros, hospedeiro natural, e em de feijão comum, hospedeiro experimental. As plantas foram infestadas com ácaros virulíferos e avaliados quanto ao tempo de aparecimento dos sintomas em duas temperaturas 15° e 30°C (em câmara BOD) e em temperatura ambiente em casa de vegetação (controles). As plantas foram avaliadas diariamente, quanto ao aparecimento e tipo de sintomas induzidos nas plantas hospedeiras. A detecção do vírus foi feita por RT-PCR de cortes foliares das lesões. Foi observado que para os dois hospedeiros o tempo de surgimento dos sintomas é menor na temperatura de 30 °C. Os resultados demonstram claramente que a temperatura influencia no tempo de surgimento dos sintomas do vírus da leprose dos citros, entretanto a influência desta temperatura no acúmulo de partículas virais nas plantas hospedeiras, ainda, está em estudo.

---

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Uniararas, Araras-SP, meiresommer@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Orientadora: Pesquisadora, Centro de Citricultura/IAC, Cordeirópolis-SP.

<sup>3</sup> Colaborador: Pesquisador, Centro de Citricultura/IAC, Cordeirópolis-SP.

<sup>4</sup> Colaborador: Aluna IC, Centro de Citricultura/IAC, Cordeirópolis-SP.

<sup>5</sup> Colaborador: Mestranda, Centro de Citricultura/IAC, Cordeirópolis-SP.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of temperature on symptom expression of citrus leprosis virus in plants, natural host, and bean common, experimental host. The plants were infested with viruliferous mites and evaluated for time required for the onset of symptoms at two temperatures 15 ° and 30 ° C (BOD) and at room temperature in a greenhouse (controls). The plants were evaluated daily for the appearance of symptoms and types of symptoms induced in the host plants. The virus was performed by RT-PCR from leaf sections of the lesions. It was observed that the two host of onset of symptoms is at least 30°C. The results clearly demonstrate that temperature influences the time of appearance of symptoms of the Citrus leprosis virus, however the influence of temperature on the accumulation of viral particles in host plants is also under study.

## INTRODUÇÃO

A leprose dos citros é causada pelo *Citrus leprosis virus-C* (CiLV-C), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Tenuipalpidae) (BASTIANEL et al., 2010). Os sintomas se caracterizam por lesões locais tanto em frutos, quanto em folhas e ramos, não sendo observada presença de partículas virais em folhas saudáveis ou assintomáticas (KITAJIMA et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010). Sua presença já foi confirmada em quase todos os estados brasileiros de Norte a Sul e em grande parte da América do Sul e Central (BASTIANEL et al., 2010).

Em geral, os vírus transmitidos por *Brevipalpus* são bastante distintos de outros vírus de plantas, por exemplo, ficam restritos às áreas de lesões não invadindo a planta sistematicamente, possuem partículas baciliformes e se acumulam ou no núcleo ou no citoplasma das células afetadas.

Proteínas virais com a capacidade de suprimir o silenciamento de RNA em diferentes pontos da via metabólica já foram identificadas em um grande número de vírus de plantas e mesmo em alguns vírus de animais. A atividade dessas proteínas supressoras pode afetar a via de silenciamento envolvida no controle da expressão de genes do hospedeiro, e em alguns casos esse efeito está associado com a indução de sintomas durante a infecção viral (DIAZ-PENDÓN; DING, 2008; ZERBINE et al., 2005).

A temperatura afeta as interações planta-patógeno, podendo aumentar ou diminuir a resistência da planta em diferentes patossistemas (WANG et al., 2009). Sintomas induzidos por viroses de muitas plantas são atenuados quando as plantas

são cultivadas em alta temperatura, um fenômeno que pode estar relacionado à eficiência de defesa do hospedeiro (SZITTYA et al., 2003; CHELLAPPAN et al, 2005), em alguns vírus de RNA de senso positivo, como o caso do CiLV-C.

Ainda não se sabe se há efeito da temperatura na expressão dos sintomas do vírus da leprose dos citros e no acúmulo viral em plantas de citros, informações importantes para o entendimento desse patossistema, que ao contrário da maioria das viroses em plantas, possui algum mecanismo, ainda desconhecido, que impede a infecção sistêmica do vírus no hospedeiro vegetal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas plantas de feijão Una (*Phaseolus vulgaris*) e laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osbeck), respectivamente, hospedeiro experimental e natural do CiLV C (GROOT et al., 2006; BASTIANEL et al., 2010).

As plantas foram infestadas com ácaros *B. phoenicis* virulíferos, oriundos de uma população mantida em frutos de laranja doce com sintomas de leprose. Para a confirmação de aquisição viral dos ácaros, por ocasião do estabelecimento dos experimentos biológicos uma amostra de dez ácaros de cada fruto foi submetida ao diagnóstico molecular conforme descrito por Kubo et al. (2011).

Ácaros supostamente virulíferos foram transferidos para as plantas com o auxílio de um pincel de poucos pêlos. Foram infestadas duas folhas por planta, com 5 ácaros cada, e 10 repetições biológicas (10 plantas) de cada hospedeiro (citros e feijão) para cada tratamento (temperatura). As plantas foram obtidas por sementes e mantidas em recipientes do tipo tubete em substrato apropriado. Para cada tratamento (genótipo x temperatura x ambiente) foi colocado uma planta não infestada com ácaros como testemunha.

Os experimentos foram conduzidos em temperatura de 15° e 30°C, em câmara BOD com controle de temperatura, e em temperatura ambiente (controles) em casa de vegetação. As plantas foram avaliadas diariamente, após a infestação, quanto ao aparecimento de sintomas e tipos de sintomas induzidos nas plantas hospedeiras. Folhas com ou sintomas de cada tratamento (hospedeiro x temperatura x ambiente) foram coletados e submetidos à análise molecular para detecção do CiLV. Para tal, foi realizado a extração de RNA total, síntese de cDNA, e confirmada a presença de vírus por RT-PCR utilizando primers específicos para a proteína de movimento conforme descrito por Locali et al. (2003).

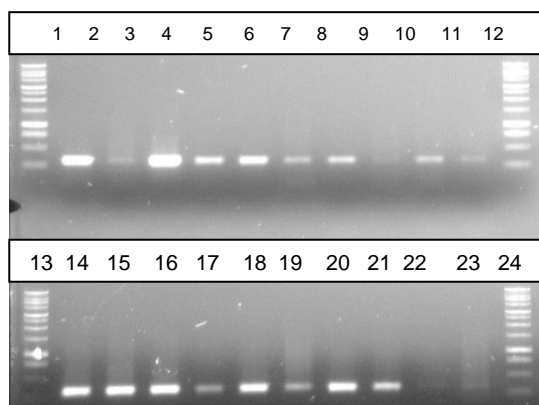
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início do aparecimento de sintomas em temperatura alta (30°C) foram observados três dias após a infestação com ácaros virulíferos, na BOD, em oito plantas de feijão (80%) e 13 dias em plantas de laranja (30%) (Tabela 1). Aos 08 e 20 dias de avaliação, respectivamente, todas as plantas de feijão e laranja estavam sintomáticas. Nas plantas mantidas em casa de vegetação (controle) o início do aparecimento de sintomas foi retardado em um dia para o feijão (início aos 4 dias em 30% das plantas) e dois dias para laranja (início aos 15 dias em 20% das plantas). Quando submetidas à temperatura mais baixa (15°C na BOD), observou-se que o início dos sintomas se deu ainda mais tardiamente, sendo necessário para o feijão de 5 a 16 dias, respectivamente com 70% e 30% das plantas, e de 16 a 19 dias para laranja, respectivamente para 10% e 40% das plantas (Tabela 1). Para o experimento em baixa temperatura (15°C), o tempo máximo para a expressão dos sintomas em feijão foi de 16 dias (todas as plantas), ao passo que para a laranja Pêra, após 50 dias de avaliação, apenas 50% das plantas de laranja apresentaram sintomas. Este estudo ainda não foi concluído e as plantas assintomáticas serão monitoradas por um período máximo de 90 dias. Todas as plantas utilizadas como controle negativo permaneceram assintomáticas. Para todas as plantas sintomáticas a presença do vírus foi confirmada por RT-PCR (Figura 1). As amostras utilizadas para análise molecular por RT-PCR serão também utilizadas para a determinação da quantidade de partículas virais contidas em cada uma das amostras, por PCR quantitativo (em andamento).

Estes resultados demonstram claramente que a temperatura influencia no tempo de surgimento dos sintomas do vírus da leprose dos citros, sendo mais rápido a temperaturas elevadas, tanto para citros quanto para feijão, entretanto a influência desta temperatura no acúmulo de partículas virais nas plantas hospedeiras, ainda, se encontra em estudo.

**TABELA 1:** Tempo de aparecimento dos sintomas de leprose nos diferentes hospedeiros avaliados em BOD, em duas diferentes temperaturas e seus respectivos controles em casa de vegetação.

Temperatura	Feijão			Laranja		
	Início sintomas (dias)	Nº plantas c/ sintomas	Nº plantas sintomáticas/ infestadas	Início sintomas (dias)	Nº de plantas c/sintomas	Nº plantas sintomáticas/ infestadas
30° BOD	3 - 8	8 - 2	10/10	13 - 20	3 - 7	10/10
ambiente	4 - 9	3 - 7	10/10	15 - 28	2 - 6	10/10
15° BOD	5 -16	7 - 3	10/10	16 - 19	1 - 4	5/10
ambiente	6 -16	3 - 7	10/10	6 -16	1 - 4	5/10



**FIGURA 1:** Visualização da amplificação viral das amostras de feijão comum e laranja, avaliadas em diferentes temperaturas (BOD). 1,13 e 24: Ladder (100 pb); 2 a 6: feijão mantido a 30°C; 7 a 11: feijão mantido a 15°C; 14 a 18: laranja mantida a 30°C; 19 a 23: laranja mantida a 15°C.

## CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram claramente que a temperatura influencia no tempo de surgimento dos sintomas do vírus da leprose dos citros, sendo mais rápido a temperaturas elevadas, tanto para citros quanto para feijão.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBITI, pela bolsa concedida.

Ao Centro de Citricultura Silvio Moreira - IAC, pela oportunidade de estágio.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Proc. nº 2008/52.691-9).

## REFERÊNCIAS

- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; BASSANEZI, R.B.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ATÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem, **Plant Disease**, v.94,p.284 – 292, 2010.
- GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. In: **XVII Encontro Nacional de Virologia, 2006, Campos do Jordão, SP. Virus Reviews & Research**, 2006. v. 11. p. 67-68.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, n. 1-3, p.135-160, 2003.
- LOCALI, E.C., FREITAS-ASTÚA, J., SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., ASTUA-MONGE, G., ANTONIOLO, R., KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas. **Plant Disease**, v.87, n.11, p.1317-1321, 2003.
- SZITTYA, G.; SILHAVY, D.; MOLNAR, A. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. **The EMBO Journal** v.22, p.633-640, 2003.
- WANG, Y.; BAO, Z.I.; ZHU, Y.; HUIA, J. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions** v.22, p.498-506, 2009.
- ZERBINI, F. M.; ALFENAS, P. F.; ANDRADE, E. C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.13, p.191-246, 2005.