

# Métodos Biológicos e Moleculares de Detecção de Viróides dos Citros.

Cristiane de Jesus Barbosa<sup>1</sup>; Carlos Augusto Dorea Bragança<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical [/barbosa@cnpmf.embrapa.br](mailto:barbosa@cnpmf.embrapa.br)

<sup>2</sup> Bolsista PIBIC/CNPq – Estudante de Agronomia da UFBA

Os viróides que infectam os citros estão classificados em quatro gêneros e cinco espécies, de acordo a suas propriedades biológicas e físico-químicas (Flores et al., 2000): *Pospiviroid* - viróide da exocorte dos citros (*Citrus exocortis viroid*, CEVd); *Apscaviroid* - viróide da folha curva dos citros (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd, variantes CVd-Ia e CVd-Ib), viróide III dos citros (*Citrus III viroid*, CVd-III); *Hostuviroid* - viróide do nanismo do lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd, variantes CVd-IIa, CVd-IIb e CVd-IIc); e *Cocadviroid* - viróide IV dos citros (*Citrus IV viroid*, CVd-IV). Mais recentemente, foram observadas duas novas e prováveis espécies do gênero *Apscaviroid* : o *Citrus original sample*, CVd-OS no Japão (Ito et al., 2001) e o viróide da *Atlantia citroide* na Espanha (Barbosa, 2004). Somente o CEVd e variantes patogênicos do HSVd são agentes causais de doenças nos citros, a exocorte e a cachexia/xiloporose, respectivamente.

A exocorte está presente em praticamente todas as regiões citrícolas do mundo. O sintoma mais característico da doença é a presença de descamamento na casca de porta-enxerto sintomáticos como o *P. trifoliata*, seus híbridos e o limão `Cravo`, associados ao nanismo mais o menos acentuado. O CEVd é o agente etiológico da exocorte do *P. trifoliata*. Apesar dos postulados de Koch não terem sido realizados para a exocorte do limão `Cravo` (*Citrus limonia* Osbek.), se considera que a mesma também seja causada por este patógeno. Trabalhos mais recentes, confirmaram que o CEVd é o agente causal dos sintomas de "yellow blotching" ou amarelecimento de ramos de limoeiro `Cravo` com exocorte (Barbosa, 2004).

A xiloporose foi primeiramente descrita como uma doença da lima doce Palestina. Em plantas infectadas se observavam caneluras na madeira com as

correspondentes projeções na casca na zona do enxerto, sintomas que estavam associados a descoloração da madeira.

A cachexia foi descrita na Califórnia para designar uma doença do tangelo Orlando (*C. reticulata* x *C. paradisi*) com sintomas similares aos de xiloporose observados na lima doce de Palestina. A caracterização do patógeno mostrou que tanto a xiloporose como a cachexia eram causadas por variantes do HSVd (Reanwarakorn & Semancik, 1999). Ainda que o término cachexia é o que se propôs e foi aceito na comunidade científica, nos países do Mediterrâneo e América Latina, xiloporose é o nome que se utiliza mais comumente.

## **Métodos de detecção**

O diagnóstico da exocorte da xiloporose foi realizado inicialmente por testes de patogenicidade que foram desenvolvidas antes de ser estabelecida a etiologia destas doenças. Estes métodos, denominados biológicos, consistem na inoculação de plantas indicadoras selecionadas por desenvolverem sintomas depois de um período de incubação determinado empiricamente. Até muito pouco tempo, a detecção era realizada exclusivamente mediante indexação biológica, mas a caracterização dos agentes causais destas doenças permitiu o desenvolvimento de novos métodos de detecção baseados na detecção de RNAs.

### **1. Métodos biológicos para a detecção da exocorte**

O *P. trifoliata* foi a primeira espécie utilizada como planta indicadora. O período de incubação nesta indicadora é grande, e as plantas manifestam sintomas após 4-8 anos de realizada a inoculação. No Brasil, se utilizou como indicadora o limão `Cravo` que permitia a visualização de sintomas entre 5 e 18 meses, reduzindo consideravelmente o tempo necessário para realizar o diagnóstico. Posteriormente, se observou que a cidra reagia mais rapidamente desenvolvendo sintomas entre 1-5 meses após a inoculação e foi adotada como a indicadora (Salibe, 1961).

Como a cidra é uma espécie monoembriônica, quando se inoculavam plantas obtidas de semente, ocorriam variações na expressão dos sintomas e em conseqüência, se sugeriu a utilização de propagações clonais de plantas

selecionadas como mais sintomáticas. Ao observar-se que uma população de plantas de semente da seleção Arizona 861 de cidro Etrog, reagia uniformemente (Garnsey & Whidden, 1973) à inoculação, passou-se a utilizar plantas de semente desta seleção como indicadoras, evitando assim a necessidade de manter propagações clonais. A sensibilidade e a rapidez na manifestação de sintomas nesta indicadora levaram ao abandono dos ensaios de infectividade utilizados anteriormente.

A cidra Arizona 861 respondia uniformemente ao que se consideravam como isolados agressivos da exocorte mas, de modo variável frente aos considerados como fracos, pelo que algumas reações muito débeis podiam passar inadvertidas (Roistacher et al., 1977). A avaliação de uma população de plantas de semente inoculadas com os isolados mais fracos, levou a seleção de uma que era especialmente sensível. O saneamento desta planta mediante microenxertia de ápices caulinares *in vitro* (Navarro et al., 1975) originou a seleção Arizona 861-S1, que propagada vegetativamente, é a utilizada atualmente.

## **2. Métodos biológicos para a detecção da cachexia/xiloporose**

O tangelo Orlando foi a primeira planta indicadora utilizada para o diagnóstico da cachexia. Este, apesar de sua sensibilidade, podia tardar cerca de 4 anos em exibir sintomas em resposta à infecção com os isolados menos agressivos e ainda assim, os resultados eram erráticos e pouco reproduzíveis. Depois foi selecionada a tangerina Parson's Special como uma espécie mais sensível, capaz de exibir sintomas cerca de um ano após a inoculação (Roistacher et al., 1973).

A tangerina Parson's special enxertada sobre limoeiro rugoso ou outro porta-enxerto vigoroso é a planta indicadora utilizada para a diagnose de cachexia. Os sintomas da doença se manifestam como depósitos de goma na linha de união do enxerto e para sua expressão é preciso manter as plantas a 28 °C-32 °C durante um período de 12 a 18 meses. O método, mesmo sensível, apresenta inconvenientes, como o grande período de incubação, e a interferência com outros viróides dos citros que podem impedir ou atrasar a manifestação de sintomas (Pina et al., 1991).

### 3. Métodos biológicos para a detecção dos viroides de citros

O ensaio biológico utilizando a cidra Etrog, mesmo tendo sido desenvolvido para o diagnóstico da exocorte, não é específico para detectar o CEVd. Atualmente, se sabe que todos os viroides dos citros produzem sintomas específicos na seleção 861-S1 de cidra Etrog (Tabela 1). Entretanto, pode-se observar reações que não se ajustam a estes sintomas já que os isolados de campo, normalmente, contêm uma mistura de distintos viroides que interagem entre si em infecções mistas. Assim, este método biológico em realidade permite diagnosticar a infecção por viroides mas não determinar que viróides se encontram no isolado analisado.

O diagnóstico por métodos biológicos tem uma excelente sensibilidade mas não é específico. Além disso, mesmo tendo um período de incubação relativamente curto comparado com outros indicadores, é ainda um método caro devido a necessidade de manter durante vários meses as plantas inoculadas a temperaturas de 28-32 °C.

**Tabela 1. Sintomas induzidos por espécies de viróides dos citros em cidra Etrog<sup>1,2,3</sup>.**

Viróide	nanismo	Epinastia	Necrose		
			Nervo Central	Pecíolo	Vértice folhas
CEVd	acentuado	severa	geral	+	-
CBLVd	leve	pontual	pontual	-	-
HSVd	-	-	-	+/-	+/-
CDVd	moderado	geral	geral	+	-
CVd-IV	moderado	geral	geral	+	-
CVd-OS <sup>3</sup>	-	pontual	-	+	

<sup>1</sup> Indicadora Cidra Etrog Arizona 861-S1 (Roistacher et al, 1977).

<sup>2</sup> Duran-Vila et al., 1988ab

<sup>3</sup> Ito et al., 2002

#### **4. Métodos moleculares para a detecção dos viróides de citros**

**Extração de ácidos nucleicos e análise por eletroforese** - Os métodos propostos se baseiam na análise de preparações de ácidos nucleicos mediante diferentes sistemas de dupla eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE): PAGE bidimensional "return" PAGE, descrito inicialmente para detecção de viróides em outros e ensaiadas para viróides de citros (Semancik & Duran-Vila, 1991) ; PAGE sequencial (sPAGE) (Semancik & Harper, 1984). Estes métodos são satisfatórios para detectar todos os viróides de citros a partir de cidras inoculadas, inclusive antes que manifestem sintomas.

A detecção de viróides a partir de extratos de espécies e variedades comerciais cultivadas em campo também pode ser realizada por estes métodos. Entretanto, a confiabilidade do método não foi comprovada de forma sistemática para todas as espécies e variedades comerciais nem em distintas condições de cultivo. Estudos realizados nas condições de cultivo da Espanha mediterrânea, indicam que existe uma variação importante dependendo da época do ano, e inclusive flutuações entre anos sucessivos. Estes estudos mostraram que o método não é confiável já que dadas estas flutuações anuais, em algumas ocasiões não se detectaram viróides em plantas infectadas, inclusive quando a amostragem foi realizada na época mais propícia (Palacio, 1999).

**Extração de ácidos nucleicos e hibridação molecular** - A hibridação molecular não foi utilizada de forma sistemática para as análises rotineiras de viróides. Entretanto, foi proposto a utilização da hibridação dot-blot com sondas de cDNA marcadas radiativamente para detectar o CEVd a partir de cidra (Flores, 1998) e de espécies cultivadas em campo (Gillings et al., 1988). Também se demonstrou a detecção do CEVd e HSVd a partir de espécies cultivadas em campo por "Northern" empregando sondas de cDNA e cRNA marcadas radiativamente (Albanese et al., 1991) ou oligômeros também marcados radiativamente (La Rosa et al., 1993). Contudo, assim como para as análises por sPAGE, as flutuações anuais não permitiram detectar viróides em

plantas de campo infectadas, inclusive quando se realizou a amostragem na época mas propicia (Palacio, 1999).

**Retrotranscrição e amplificação mediante a reação em cadeia da DNA polimerasa (RT-PCR)** – Este método foi também proposto para a detecção de viróides mas, sua utilização de maneira rotineira é limitada já que é freqüente a obtenção de falsos negativos em amostras que se sabe que estão infectadas. Recentemente, foi descrito combinações de iniciadores que permitem a detecção de todos os viróides mediante um sistema de Multiplex RT-PCR (Ito et al., 2002).

## Considerações Finais

De acordo com o conhecimento atual método de detecção de viróides mais recomendado é aquele que combina a detecção biológica e métodos moleculares, como a detecção do RNA por meio de técnicas como a sPAGE e hibridação.

A cidra Etrog Arizona 861-S1 ainda é a planta indicadora por excelência já que permite a diagnose de todos os viróides descritos em citros, apesar de apresentar limitações devido ao custo e falta de especificidade, como foi relatado anteriormente. Estas limitações foram minimizadas utilizando um método "combinado", onde se utiliza a indexação biológica associada com a detecção mediante sPAGE ou hibridação molecular (Duran-Villa et al., 1993). Assim, as análises das cidras inoculadas por sPAGE ou hibridação permite encurtar o período de incubação e detectar todos os viróides com bons níveis de sensibilidade e especificidade. Este método combinado permite a diagnose específica das distintas espécies de viróides pela observação da migração característica em análises por sPAGE ou mediante hibridação molecular, utilizando sondas específicas. Como inclusive se pode detectar o HSVd, este método evita a necessidade de utilizar a tangerina Parson's Special como indicadora de cachexia/xiloporose. Especificamente para este caso, o método de detecção combinado é interessante já que o aparecimento de sintomas de cachexia/xiloporose podem ser mascarados na Tangerina Parson's Special

quando os isolados a analisar são portadores de diferentes variantes de HSVd. A presença de variantes patogênicas e não patogênicas deste viróide numa mesma planta pode causar interferência na manifestação dos sintomas (Semancik et al., 1992).

Mais recentemente, foi proposta a análise de cidra inoculadas mediante um sistema de hibridação de impressões de ramas de cidras previamente inoculadas (Palacio et al., 2000), que evita a necessidade de realizar extrações de ácidos nucléicos, e por tanto permite analisar simultaneamente um grande número de amostras.

## Referências Bibliográficas

ALBANESE, G. et al. Hybridization analysis of citrus viroids with citrus exocortis viroid- and hop stunt viroid- specific probes. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 11. Riverside **Proceedings**... Riverside: CA. USA, 1991. p. 202-205. 1991.

BARBOSA, C.J. Comportamiento de especies de cítricos, híbridos y géneros afines frente a la infección con viroides. Evaluación del impacto de la transmisión mecánica, Valencia, 2004. p. 142. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Espanha, 2004.

DURAN-VILA, N.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Improved indexing of citrus viroids. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, Riverside, **Proceedings**... Riverside:CA. USA., 1993, p 202-211.

DURAN-VILA, N.; Pina, J.A., Molins, M.I., Navarro, L. A new indexing method for cachexia. In CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS, 11, Riverside **Proceedings**... Riverside:CA 1991, p. 224-229.

FLORES, R. Detection of citrus exocortis viroid in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10, Riverside. **Proceedings**... Riverside: CA. USA, 1988, p 192-196.

FLORES, R.; Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T. I. Subviral agents: Viroids. En: Virus Taxonomy, Seventh report of The International Committee on Taxonomy of Viruses. (M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, D.J. McGeoch, J. Maniloff, M.A. Mayo, C.R. Pringle, R.B. Wickner, Eds.), pp. 1009-1024. Academic Press, San Diego, CA, USA. 2000.

GARNSEY, S.M.; WHIDDEN R. Severe, uniform response by monoembryonic seedlings of the Arizona 861 selection of "Etrog" citron (*Citrus medica*) to

exocortis virus (CEV). **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.57, p. 1010-1012, 1973.

GILLINGS, M.R.; BROADBENT, P.; GOLLNOW, B.I. Biochemical indexing for citrus exocortis viroid. pp 178-187. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, Riverside. **Proceedings...** Riverside: CA. USA, 1988, p 178-187

ITO, T.; Ieki, H.; Ozaki; K.; Ito, T. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed citrus viroid OS. **Archive of Virology**, v. 146, pp. 975-982, 2001.

ITO, T.; Ieki, H.; Ozaki, K.; Iwanami, T.; Nakahara, K.; Hataya, T.; Ito, T.; Isaka, M.; Kano, T. Multiple citrus viroid in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 542-547, 2002

LA ROSA, M.; Tessitori, M.; Albanese, G.; Catara, A.; Davino, M. Diagnosis of citrus exocortis and hop stunt-homologous citrus viroids by oligonucleotide probes. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, Riverside, **Proceedings...** Riverside :CA. USA, 1993, p. 435-43

NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N., MURASHIGE, T. Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus-free citrus. **American Society of Horticultural Science**, V. 100, n. 5, p. 471-479. 1975.

PALACIO, A. **La exocortis y la cachexia de los cítricos: Mejora de los métodos de detección y caracterización.** 1999. 143f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Universidade Politécnica de Valencia, Valencia, 1999.

PALACIO, A., FOISSAC, X., DURAN-VILA, N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, p. 897-903, 2000.

PINA, J.A., DURAN-VILA, N., NAVARRO, L. Interference of citrus viroids with cachexia symptoms on Parson's Special mandarin. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, v. 11. Riverside **Proceedings...** Riverside: CA. USA, 1991. P. 206-208

REANWARAKORN, K.; SEMANCIK, J.S. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, n. 7, p. 568-574, 1999.

ROISTACHER, C.N.; BLUE, R.L.; CALAVAN, E.C. A new test for citrus cachexia. **Citrograph** v. 58, n.7, p. 261-262, 1973.

ROISTACHER, C.N. ET AL. A new more sensitive citron indicator for the detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEV). **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 61, n.2, p.135-139, 1977.

SALIBE, A.A. **Contribuição ao estudo da doença exocorte dos citros.** 1961. 71f. Dissertação de Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, 1961. 71 p.

SEMANCIK, J.S. & DURAN-VILA, N. The grouping of citrus viroids: additional physical and biological determinants and relationships with disease of citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, v. 11. Riverside **Proceedings**... Riverside: CA. USA, 1991.p. 178-188.

SEMANCIK, J.S.; HARPER, K.L. Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, , v. 81, p. 4429-4433, 1984.