

ANA CLAUDIA GONÇALVES

Separação de Vírus de Importância
Fitopatológica em Citros: CTV e CSDaV
Através de Citometria de Fluxo

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista - UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Araraquara
2010

Dedico a DEUS, pois foi o principal responsável pelo êxito desse trabalho, a meus pais Francisco e Carolina e a meu irmão Alexandre por me apoiarem me amarem e incentivarem em todos os momentos desse projeto

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ser a razão do meu viver e minha fonte de fé, coragem, determinação, confiança e Amor.

A São João Batista por ter sido o precursor do êxito do meu doutorado.

Aos meus pais, pelo dom da vida, pelo amor e por tudo que me proporcionam.

Ao meu irmão Alexandre Henrique Gonçalves, pelo simples fato de ser uma Dádiva de DEUS em minha vida.

Aos meus familiares, pelo amor, carinho e apoio incondicionais.

Ao professor Paulo, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao meu grande amigo Oedem Paulo Almeida, por todos os favores, por toda a paciência e toda a dedicação dadas a mim e a este projeto.

A minha tia Maria Bratfisch Cezarino por toda ajuda psicológica, pelas orações e por todo Amor que sempre me dedicou.

Ao pesquisador Nelson Wulff, pela excepcional orientação sobre os vírus estudados.

A todos os funcionários do Fundecitrus pelo apoio, ajuda e dedicação, principalmente aos amigos Mateus, Rodrigo, Jaci, Renata e Priscila.

Aos companheiros de laboratório, pelo convívio e aprendizado diário.

A Patrícia Palma por toda técnica aprendida e pela ajuda concedida para a conclusão desse projeto.

A Claudia Daniele de Souza por toda dedicação e companheirismo.

A Capes e ao Fundecitrus, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

A Marcel Bellato Spósito, membro da banca de qualificação e da banca de defesa, por toda a cooperação e incentivo.

A todos os integrantes da banca de defesa deste projeto, por toda a ajuda, sugestões, e esclarecimentos.

A Francisco Osvaldo Zanin, por todo o incentivo, apoio, garra e determinação.

As amigas Érica C. Borsari Borelli, Silvia Mouro, Vanessa Felix, Silvia Camargo, Teresa Cofre, Karen Altieri, Camila Scapin, Natália Noronha e Tamara Amaral pelo companheirismo incondicional, pelas conversas, pelas festas e pelo aprendizado que me proporcionaram.

A Carlos Eduardo Brantis (Kaduzinho), por toda ajuda e companheirismo!

RESUMO

Devido a grande importância econômica da citricultura no Brasil e mundo e aos problemas sanitários enfrentados sendo alguns limitantes para o cultivo, como é o caso das doenças causadas por vírus como: a tristeza cítrica, causada pelo vírus da tristeza dos citros (CTV), pertencente ao gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae*, uma das maiores ameaças da citricultura mundial, mesmo com a pré imunização através de estirpes fracas do vírus e substituição de porta enxertos, estirpes fortes de CTV ainda causam prejuízos consideráveis. E com o aparecimento da doença morte súbita dos citros (MSC) de etiologia não determinada.

Pelo fato de não haver ainda métodos eficientes de separação de ambos os vírus presentes em uma única amostra, levantando se as hipóteses que a causa da MSC esteja relacionada a uma estirpe do vírus CTV, a um vírus do gênero *Marafivirus* denominado *Citrus Sudden Death-associated Virus* (CSDaV), pertencente ao gênero *Marafivirus*, família *Tymoviridae*, ou a uma associação entre eles. Este trabalho vem propor um método eficaz de separação por citometria de fluxo (FC) de CTV e CSDaV em amostras semi purificadas, diluídas em tampão TE, pH7,5, utilizando marcação de ácidos nucleicos com Iodeto de Propídeo (PI) e conjugação de anticorpos policlonais anti CTV com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), cuja eficácia do método foi comprovada pela reação da polimerase em cadeia (PCR).

Palavras-chave: citricultura, vírus, citometria de fluxo, MSC, CTV, CSDaV, FITC e PI.

ABSTRACT

Because of high economic importance of citrus in Brazil and the world and health problems being faced some limiting factors for growing as is the case of diseases caused by viruses such as sadness citrus caused by citrus tristeza virus (CTV) belonging to Closterovirus gender, family Closteroviridae, one of the biggest threats to the citrus industry worldwide, even with the pre immunization using mild virus strains and replacement of the rootstocks, strong strains of CTV still cause considerable damage. And with the onset of the disease citrus sudden death (MSC) of undetermined etiology.

Because there is not yet efficient methods of separation of the two viruses present in a single sample, raising the hypotheses that the cause of SCD is related to a strain of CTV, a virus Marafivirus group called Citrus Sudden Death-associated Virus (CSDaV) belonging to the genus Marafivirus, Tymoviridae family, or an association between them, this paper proposes an effective method of separation by flow cytometry (FC) and CTV in samples CSDaV semi purified, diluted in TE buffer, pH7, 5, using marking of nucleic acids with propidium iodide (PI) and a combination of polyclonal anti CTV with Fluorescein isothiocyanate (FITC), the effectiveness of the method was confirmed by polymerase reaction chain reaction (PCR)

Keywords: Citrus, viruses, separation, flow cytometry, MSC, PI, CSDaV, CTV, FITC,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Coloração de folhas de árvores saudas e árvores doentes	24
Figura 2.	Vista aérea de diferentes plantas de laranja	24
Figura 3.	Colapso das plantas e retenção de frutos	25
Figura 4.	Coloração de folhas de árvores saudas e árvores doentes	25
Figura 5.	Subenxertia em plantas afetadas pela MSC	26
Figura 6.	Microscopia eletrônica de plantas cítricas com CTV e CSDaV	31
Figura 7.	Controle negativo (não marcado com fluorocromo) em escala linear e logarítmica	39
Figura 8.	Marcação com PI das amostras de CTV e CSDaV, obtidas de acordo com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995).	48
Figura 9.	Marcação com PI das amostras de CTV obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995)	49
Figura 10.	Marcação com PI das amostras de CTV e CSDaV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995)	50

Figura 11.	Marcação com PI das amostras de CTV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995).	51
Figura 12.	Marcação com Syber Gold das amostras de CTV e CSDaV, obtidas de acordo com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; 1995.	52
Figura 13.	Marcação com Syber Gold das amostras de CTV, obtidas de acordo com Protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995).	53
Figura 14.	Marcação com Syber Gold das amostras de CTV e CSDaV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação de KEITH et al.; 1995.	54
Figura 15.	Marcação com Syber Gold das amostras de CTV. obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995)	55
Figura 16.	Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV da amostra CTV e CSDaV	56
Figura 17.	Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV da amostra CTV.	57
Figura 18.	Visualização e identificação dos vírus CSDaV e CTV por citometro Facs Canto e os parâmetros analisados pelo software versão Diva	58
Figura 19.	Separação dos vírus CSDaV e CTV por citometria de fluxo	60
Figura 20.	PCR do Q1 para CSDaV	62
Figura 21.	PCR do Q1 para CTV	62

Figura 22.	PCR do Q2 para CSDaV	63
Figura 23.	PCR do Q2 para CTV	63
Figura 24.	PCR do Q3 para CSDaV	64
Figura 25.	PCR do Q3 para CTV	64
Figura 26.	PCR do Q4 para CSDaV	65
Figura 27.	PCR do Q4 para CTV	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais fluorocromos utilizados em citometria de fluxo e sua respectiva emissão e excitação de fluorescência	30
Tabela 2.	Estatística da visualização e identificação das amostras A, B, C, D, E, F e G de plantas com CTV e CSDaV por citômetro Facs Canto	59
Tabela 3.	Estatística da separação das amostras A, B, C, D, E, F e G de plantas com CTV e CSDaV por citômetro Facs Aria	30
Tabela 4.	Resultado da RT-PCR de amostras separadas por citometria de fluxo	66

ABREVIATURAS

°C	graus Celcius
µg	micrograma
µL	microlitro
Anti	anticorpo
AC	anticorpo
BSA	soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
CP	proteína do capsideo
CSDaV	<i>Citrus sudden death-associated virus</i>
C-terminal	carboxi-terminal
CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETOH	álcool etílico
FACS	Fluorescence activated cell sorting.
FC	Citometria de fluxo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FL	filtro
FSC	Forwad Scatter.
G	gravidade
kb	quilobase

kDa	quilodalton
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation.
M	molar
ME	Microscopia eletrônica
MEP	Microscopia de epifluorescência
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
PAMV	<i>Potato aucuba mosaic virus</i>
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
pH	potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídeo
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
S.G	Syber Gold
SLCC	suco de laranja concentrado congelado
SSC	Side scatter.
TAE	Tris-acetato EDTA
TEM	microscopia eletrônica de transmissão
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Importância da citricultura no Brasil e no mundo	14
1.2. Aspectos gerais do gênero Citrus	16
1.3. Tristeza dos citros.....	17
1.4. Morte Súbita dos Citros	20
1.5 Citometria de fluxo	31
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
2.2.1. Padronização de método de citometria de fluxo para os vírus fitopatológicos de importância em citrus	31
2.2.2. Confirmação do vírus através de testes moleculares comparados com os resultados obtidos por citometria de fluxo.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Material.....	33
3.2. Métodos.....	33
3.2.1. Purificação das amostras	33
3.2.2. Extração de RNA total	36
3.2.2.1. Amostras plantas	36
3.2.2.2. Amostras citometriade fluxo	36
3.2.3. Detecção do CTV e CSDaV através da RT-PCR.....	37
3.2.3.1. Síntese do cDNA.....	37
3.2.3.2. Reação da polimerase em cadeia (PCR)	37
3.2.4. Padronização de método: Citometria de Fluxo (FC)	38
3.2.4.1. Amostras Controles	38
3.2.4.2. Marcação dos vírus com Iodeto de Propídeo (PI).....	40
3.2.4.3. Marcação dos Vírus com Syber Gold	40
3.2.4.4. Conjugação dos anticorpos anti CTV com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).....	41
3.2.4.5. Marcação dos vírus com PI e Conjugação dos anticorpos com FITC ...	42
3.2.4.6.. Marcação para a separação dos vírus CTV e CSDaV	42
4. RESULTADOS	44
4.1. Análise por CF dos fluorocromos utilizados	44
4.1.1. Sensibilidade do fluorocromo PI para marcação de CTV e CSDaV	44

4.1.2. Sensibilidade do fluorocromo Syber Gold para marcação de CTV e CSDaV	44
4.1.3. Sensibilidade do fluorocromo FITC para conjugação ao anticorpo anti CTV	45
4.1.4. Visualização dos vírus CTV e CSDaV marcados com PI e FITC	45
4.1.5. Separação dos vírus CTV e CSDaV marcados com PI e FITC	46
4.1.6. Análise estatística da eficiência dos fluorocromos Iodeto de Propídeo e Syber Gold	47
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância da citricultura no Brasil e no mundo

A citricultura é amplamente distribuída e economicamente importante nas regiões subtropicais e tropicais, onde as condições edafoclimáticas são adequadas para o seu desenvolvimento (DAVIS & ALBRIGO, 1994).

Duas regiões dominam o mercado mundial de suco de laranja: o Estado de São Paulo, no Brasil, e o Estado da Flórida, nos Estados Unidos. Juntos produzem 90% do suco de laranja consumido no mundo (NEVES et al, 2006). A produção americana de laranja e seus derivados são voltados ao mercado interno, enquanto no Brasil, o foco dos negócios da indústria citrícola está na exportação. Da fruta produzida no Brasil 30% é destinada para o consumo de mesa e 70% para o processamento de sucos (IBGE, 2008).

A citricultura brasileira é um dos setores mais competitivos do agronegócio. As repetidas geadas, ocorridas no Estado da Flórida (EUA) na década de 1980 fizeram com que o Brasil ganhasse importância perante a citricultura mundial tornando-se líder na produção de citros e de suco concentrado (TOZATTI, 2006). O Brasil produz cerca de 30% da laranja cultivada no mundo e 59% do suco de laranja concentrado congelado consumido no mundo (USDA, 2008).

O segmento de produção de suco de laranja concentrado congelado (SLCC) brasileiro possui desempenho singular dentro da economia brasileira, pois, não existe outro produto que detenha quase 60% da produção mundial e mais de 80% de participação nas vendas do mercado mundial. O sistema agroindustrial da laranja investe fortemente em inovações, pesquisa e tecnologia, movimentando

aproximadamente R\$ 9 bilhões por ano (NEVES et al, 2006, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS, 2008).

A instalação de um parque industrial voltado para o mercado externo de suco e a proximidade das metrópoles nacionais de maior poder aquisitivo tornaram São Paulo o maior pólo mundial citrícola (BOTEON; NEVES, 2005). O Estado se beneficia com 400 mil postos de trabalho (diretos e indiretos), impostos, investimentos e consumo, contribuindo para que as cidades apresentem índices de desenvolvimento superiores à média do Brasil (NEVES et al., 2007). Na região Nordeste, destacam-se os estados da Bahia e Sergipe como o 2º e 3º produtores nacionais, respectivamente, onde a Bahia responde por 54% da produção e 45% da área colhida, e Sergipe responde por 39% da produção e 43% da área colhida. Juntos, Bahia e Sergipe, representam cerca de 8% da produção citrícola brasileira. (EMBRAPA, 2007).

A produção integrada de citros, portanto, vem contribuir como elemento de sustentabilidade e competitividade para o agronegócio, e permitir além do aumento da qualidade dos frutos, a possibilidade de abertura de novos nichos de mercado e a exportação dos mesmos, devido ao uso de normas que atendem rigorosos padrões de controle baseados na sustentabilidade, aplicação de recursos naturais e regulação de mecanismos para a substituição de insumos poluentes, utilizando instrumentos adequados de monitoramento dos procedimentos e a rastreabilidade de todo o processo, tornando-o economicamente viável, ambientalmente correto e socialmente justo (EMBRAPA, 2007).

No entanto, o fato da cadeia produtiva da citricultura em todo o mundo ser uma das mais dinâmicas e rentáveis atividades do agronegócio, não a livra de ser também uma das que mais desafios vem enfrentando para a garantia da

manutenção da produtividade. Particularmente, o crescente número de pragas e doenças que afetam os citros nas condições brasileiras, em que velhos e novos problemas surgem e ressurgem com vigor, tem levado a morte de milhões de plantas por ano (MACHADO et al., 2005). A citricultura brasileira tem se mostrado bastante vulnerável aos diversos problemas fitossanitários que têm surgido ao longo da sua história e que são responsáveis por grandes perdas para a cultura. Entre outros fatores, essa vulnerabilidade pode estar associada a pouca diversidade de cultivares copa/porta-enxerto utilizada (TOZATTI, 2006).

1.2. Aspectos gerais do gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, tribo Citreae e subtribo Citrinae e é originário da região sudeste do continente asiático, estendendo-se do centro da China ao Japão e do Leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE; REECE). Acredita-se, também, que Yunnan, na China, desempenhe um papel importante na origem de espécies contemporâneas de *Citrus* (GMITTER JÚNIOR; HÚ, 1990).

Além do gênero *Citrus*, a tribo Citreae compreende ainda outros 27 gêneros e a subtribo Citrinae, outros 12 gêneros. De importância comercial, além do *Citrus*, aparecem os gêneros *Fortunella* e *Poncirus* (GIACOMETTI, 1991). O gênero *Poncirus* apresenta uma única espécie, *P. trifoliata*, muito utilizada como porta-enxerto e em hibridações (SWINGLE; REECE, 1967).

Análises filogenéticas posteriores, sugeriram a existência de três espécies verdadeiras dentro das espécies cultivadas de *Citrus*, as tangerinas (*C. reticulata*), as toranjas (*C. grandis* ou *C. máxima*) e as cidras (*C. medica*). As quais podem se apresentar como grandes arbustos ou pequenas árvores, alcançando entre 5 m e 15

m de altura. Os demais genótipos teriam sido derivados de hibridações entre estas três espécies (BARRETT; RHODES, 1976). Estudos utilizando marcadores moleculares e bioquímicos, incluindo isoenzimas, análise do genoma de organelas e microsátélites, vieram a concluir que a grande maioria dos genótipos conhecidos e cultivados hoje tem sua base genética fortemente relacionada com as três referidas espécies (NICOLOSI et al., 2000).

Em meados do século XIX, uma grave doença atacando as raízes dos citros hoje conhecida por gomose causada por *Phytophthora* ssp. dizimou os plantios de laranjas doces nas ilhas Açores. Começou então a ser utilizada a laranja Azeda (*Citrus aurantium*), um porta-enxerto resistente a *Phytophthora* (BAR-JOSEPH et al., 1989), o qual se tornou predominante em várias partes do mundo. Com a expansão da citricultura no mundo, verificou-se que, em algumas regiões como Java, Austrália e África do Sul, as combinações de laranjas doces sobre laranja Azeda entravam em colapso, enquanto sobre *Poncirus trifoliata* ou limão Rugoso (*C. jambhiri*), eram bem sucedidas e vigorosas, sendo então utilizadas em substituição da laranja 'Azeda' como porta-enxerto. Meneghini (1946).

A necessidade de se aumentar as bases genéticas dos citros, assim como a potencialização do germoplasma já existente segue o desenvolvimento de programas de melhoramento, a biotecnologia é um instrumento que pode contribuir efetivamente no ganho ou na potencialização de características desejáveis (MACHADO et al., 2005).

1.3. Tristeza dos citros

A tristeza cítrica é uma das doenças mais importantes que atingiram a

citricultura mundial. Provavelmente originária da Ásia, foi registrada pela primeira vez na África do Sul, no início do século XX, e tem sido disseminada para todos os países citrícolas (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Estima-se que próximo a cem milhões de árvores foram mortas ou tornaram-se improdutivas pela tristeza, principalmente nos países da América do Sul, América Central, nos Estados Unidos, na Espanha e em Israel. No Brasil a doença foi observada pela primeira vez em 1937 em pomares do Vale do Paraíba (SP), introduzida por material de citros trazido diretamente da África do Sul ou da Argentina, onde foi relatada em 1930. Doze anos após a introdução da doença no Brasil, das 11 milhões de plantas cítricas existentes, 9 milhões sobre porta-enxerto de laranja 'Azeda' (*Citrus aurantium*) morreram (FEICHTENBERGER et al., 2005).

O agente etiológico da tristeza dos citros é um vírus pertencente ao gênero Closterovírus denominado *Citrus tristeza virus* (CTV), constituído de partículas flexuosas em forma de bastão medindo aproximadamente 12 x 2000nm, possuindo como material genético RNA de fita simples positivo, com 19.296 nucleotídeos e peso aproximadamente de 20kb (GARNSEY; LEE, 1989).

O CTV é limitado ao floema e pode ser transmitido por enxertia, experimentalmente pela *Cuscuta*, e mecanicamente, por ferimentos no floema. É transmitido de forma semi-persistente por diferentes espécies de afídeos (*Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Aphis craccivora*, *Dactynotus jaceae*, *Myzus persicae* e *Toxoptera aurantii*) (FEICHTENBERGER et al., 2005). Sendo o *T. citricida*, o vetor mais eficiente (MORENO et al., 2008). O estudo do vetor *T. citricida* é relevante, pois a transmissão por afídeos e a passagem no hospedeiro podem significativamente alterar a composição de populações de CTV sendo assim um fator importante em sua evolução.

Os sintomas típicos do CTV com o declínio e possivelmente morte da planta com frutos retidos na copa, são acompanhados pela podridão e morte das radículas. Algumas vezes pode ser observada uma linha marrom na região da enxertia, quando a casca é retirada (MULLER, et al., 2005; FEICHTENBERGER et al., 2005). Na região sudeste do estado de São Paulo, ocorre uma forma de tristeza extremamente forte denominada de Capão Bonito, constatada no final de 1965 por Muller et al. (1968), a qual afeta praticamente todas as variedades comerciais de laranja doce e limão 'Cravo', provocando sintomas como redução de crescimento, brotação axilar anormal e curta nos galhos, redução no tamanho da folha e clorose com produção de frutos miúdos.

Praticamente todas as espécies, variedades, híbridos e muitos afins de citros, além de algumas espécies não-Rutácea como *Passiflora gracilis*, *P. caerulea*, *P. incense* e *P. incarnata*, são hospedeiras do vírus da tristeza dos citros. A manifestação da tristeza depende da virulência da estirpe do CTV, de condições ambientais e principalmente de fatores inerentes a própria planta, como a idade, capacidade de permitir multiplicação do vírus e tolerância dos tecidos a degeneração, principalmente do floema. Plantas mais novas, tanto em combinações intolerantes, como nos pés francos intolerantes, são mais fáceis de infectar e mostram os sintomas mais rapidamente. As laranjas doces (*C. sinensis*), as tangerinas (*C. reticulata*, *C. reshini*, *C. sunki*), certos pomelos (*C. paradisi*), alguns tangelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*) e o limão 'Galego' (*C. aurantifolia*) são considerados suscetíveis, pois permitem a multiplicação do vírus até concentrações elevadas, enquanto *Poncirus trifoliata*, alguns citrumelos (*P. trifoliata* x *C. paradisi*), a laranja 'Azeda' e alguns limões verdadeiros (*C. limon*) são tidas como resistentes, pois não permitem o incremento do vírus, ou o permitem muito pouco. As laranjas

doces, exceto a variedade Pêra, as tangerinas, alguns tangelos, *Poncirus trifoliata*, alguns citrumelos, citranges 'Troyer' e 'Carrizo' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), limão 'Cravo' (*C. limonia*), limão 'Rugoso' (*C. jambhiri*) e limão 'Volkameriano' (*C. volkameriana*) são tidos como tolerantes, enquanto a laranja 'Azeda', alguns limões verdadeiros, o limão 'Galego', certos pomelos e a laranja 'Pêra' são intolerantes a presença do vírus. Em pé franco, os sintomas da tristeza só manifestam quando ele é suscetível e intolerante, como o limão 'Galego' e alguns pomelos. Em plantas enxertadas, os sintomas são expressos quando o porta-enxerto for intolerante e a copa suscetível, como laranjas doces e tangerinas enxertadas sobre laranja 'Azeda', ou quando a copa for suscetível e intolerante, como a laranja 'Pêra' e certos pomelos. Nas combinações de laranja doce sobre laranja 'Azeda' os sintomas são expressos de 2 a 4 meses, enquanto que em lima da 'Pérsia' (*C. latifolia*), em 10 anos (FEICHTENBERGER et al, 2005).

O CTV ocorre em todas as áreas citrícolas do país e a presença do patógeno sempre terá que ser levada em conta na planificação dos pomares de citros (FEICHTENBERGER et al, 2005).

O controle do CTV foi realizado pela substituição dos portas-enxerto intolerantes por tolerantes, e utilização da pré-imunização com estirpes fracas do vírus (MULLER; COSTA, 1991) Essa técnica inovadora pode ser considerada precursora da biotecnologia no controle de doenças em citros.

1.4. Morte Súbita dos Citros

A doença denominada de Morte Súbita dos Citros (MSC) vem causando danos significativos a citricultura brasileira desde o início desse século (MULLER et al.,

2005). O nome morte súbita dos citros foi atribuído devido à rápida velocidade com que as plantas afetadas são levadas a morte.

A MSC foi observada em Comendador Gomes, Minas Gerais, no ano de 1999 (GIMENES-FERNANDES; BASSANEZI, 2001). Em janeiro de 2004, cerca de 2 milhões de plantas apresentavam sintomas da MSC, distribuídas em municípios do sul do triângulo mineiro e no norte, noroeste e centro do estado de São Paulo (JESUS JUNIOR et al., 2004). Mesmo permanecendo restrita a região original de ocorrência, seu efeito é bastante destrutivo sendo que as plantas sintomáticas quase triplicaram nos talhões sem subenxertia acompanhados pelo Fundecitrus no ano de 2006.

A MSC é uma doença de combinação copa/porta-enxerto em laranjeiras doces. Em variedades como 'Hamlin', 'Natal', 'Westin', 'Valência', 'Pêra' e 'Rubi' sobre limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) foram verificados sintomas associados à MSC. Porém, nas combinações de laranjeiras doces sobre outros porta-enxertos como tangerinas "Cleópatra" (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka), 'Sunki' (*Citrus sunki* Blanco), *Poncirus trifoliata* (L.) e citrumelo Swingle (*P.trifoliata* x *Citrus paradise* Macfyden) os sintomas referentes à MSC ainda não foram observados (JESUS JUNIOR; BASSANEZI, 2004; GIMENES-FERNANDES et al., 2002). Grande parte de toda a citricultura brasileira utiliza como porta-enxerto o limoeiro 'Cravo' em razão das suas características vantajosas como precocidade, rusticidade, produtividade e principalmente resistência a seca, o que permite a redução dos custos de irrigação. A condição que reforça o fato da MSC ser uma doença de combinação de porta-enxerto é que em "pé franco" de limoeiro 'Cravo' (*C. limonia*) não foram encontrados sintomas da doença. Laranjeiras doces enxertadas em limão Volkamerlano (*C.volkameriana* Ten.) também são afetados pela MSC (ROMÁN et al., 2004).

O primeiro sintoma da MSC observado na planta consiste na perda de brilho das folhas generalizada por toda a copa. As folhas ficam com aspecto pálido e de cor verde clara, contrastando com a coloração verde brilhante das folhas de plantas sádias (figura 1). Em plantas jovens é comum observar o amarelecimento das nervuras das folhas. Geralmente, ocorre perda de turgidez das folhas acompanhada de desfolha parcial e raramente ocorrem brotações internas na copa. Em algumas variedades, especialmente na 'Pêra', pode ocorrer a seca de ponteiros. Em estágio mais avançado ocorre desfolha total e morte da planta (figura 2). Quando o sintoma se manifesta em plantas submetidas à grande demanda de água e nutrientes, com grande carga de frutos próximos a maturação, pode ocorrer o colapso súbito da planta, permanecendo os frutos aderidos à árvore. (figura 3) As plantas doentes apresentam intensa podridão de raízes, e ausência ou pequena quantidade de radicelas (FEICHTENBERGER et al., 2005). O sintoma característico da doença, que tem permitido o seu diagnóstico, é a presença de uma coloração amarelada intensa, nos tecidos internos da casca do porta-enxerto abaixo da zona da enxertia (figura 4). A doença provoca diminuição na produção de frutos por árvores (quantidade e peso) (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2007).

Após a constatação das primeiras árvores com sintomas, a doença pode atingir de 30 a 99% das plantas do talhão em dois anos. Normalmente a velocidade de aparecimento de novas plantas com sintomas é maior no final do período seco (inverno no estado de São Paulo) e início da estação chuvosa (primavera) e é reduzida no período de outono (BASSANEZI, et al., 2002).

Análises proteômicas em plantas com MSC identificaram supressão de duas categorias de proteínas relacionadas a patogênese: isoformas de quitinase e de inibidores de protease (CANTÚ et al., 2008).

A observação de alterações nos metabólitos na casca do tronco da copa e do porta-enxerto de plantas afetadas pela MSC, demonstrou que a MSC altera a deposição de triacilglicerídeos e sacarose nas cascas. Com a evolução da sintomatologia ocorre alteração no perfil dos ácidos graxos, com o decréscimo dos teores de ácido oléico e linolênico e aumento dos ácidos cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico e linoléico (PRESTES et al., 2009).

Em relação à etiologia, dois tipos de vírus são encontrados nas plantas com sintomas de MSC: CTV e um marafivírus denominado de Citrus Sudden Death associated Virus (CSDaV) (MACCHERONI, et al., 2005), o qual apresenta partículas isométricas. O CSDaV pertence a família *Tymoviridae* gênero *Marafivirus* possui genoma de RNA fita simples positivo com 6.806 nucleotídeos. A associação do CSDaV com plantas sintomáticas a MSC foi demonstrada por Maccheroni et al., (2005). Yamamoto et al. 2010, demonstraram que plantas com acesso a vetores aéreos foram infectadas e apresentaram sintomas de MSC, enquanto plantas protegidas por telas antiafídicas ficaram sem sintomas. Todas as plantas sintomáticas apresentaram além do CTV o marafivírus. No mesmo trabalho, foi obtida eficiência de 96% na transmissão do marafivírus em experimento de transmissão por enxertia. Através de protocolos rotineiramente empregados em purificação viral, estas partículas não podem ser separadas e não há relatos de algum mecanismo eficaz para separação de ambos os vírus presentes nas amostras de plantas afetadas pela MSC. Desta maneira, embora tenha-se a associação do marafivírus e plantas com MSC, não há como testar os postulados de Koch para o marafivírus. O padrão de distribuição das plantas sintomáticas a MSC corresponde ao mesmo padrão de disseminação do CTV pelo vetor *Toxoptera citricida*

(BASSANEZI et al., 2003) e este afídeo, assim como *Aphis spiraecola* e *A. gossipy* são portadores do CSDaV (MACCHERONI et al., 2005).

Foi encontrado por análise de RT-PCR em uma alta frequência (99,7%) nas plantas afetadas pela doença considerado um forte candidato como agente causal da MSC, e encontrado também nos pulgões: *Toxoptera citricida*, *Aphis spiraecola* e *Aphis grossyphii*.

As medidas de controle são baseadas no que foi observado até agora durante pesquisas realizadas desde o aparecimento da doença MSC, já que a causa ainda não esta cientificamente comprovada sendo recomendado, portanto, para evitar-se a MSC ou sua propagação: não transportar mudas, cavalinhos e borbulhas das regiões contaminadas para regiões onde a doença ainda não foi constatada; evitar o plantio sobre limoeiro 'Cravo' e 'Volkameriano'; produzir e plantar mudas em diferentes porta-enxertos tolerantes; nas áreas afetadas recomenda-se a subenxertia com porta-enxertos tolerantes, como as tangerineiras 'Cleópatra' e 'Sunki' ou citrumelo 'Swingle' em árvores sobre limoeiro 'Cravo' ou 'Volkameriano' (figura 5) (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2007).



Figura 1. Folhas coletadas de árvores sadias apresentando-se verdes brilhantes e de árvores doentes com coloração verde pálida, mostrando a diferença de coloração entre as mesmas (Fonte: Fundecitrus, 2006).



Figura 2. Vista aérea de plantios de laranjeiras doce ‘Valencia’ enxertadas em limoeiro ‘Cravo’, apresentando sintomas de MSC, e de laranjeiras doce ‘Valencia’ enxertadas em tangerineiras ‘Cleópatra’, sadias (A). Em B verificou-se 2 linhas de plantio de laranja doce, enxertada em tangerineira “Cleópatra”, sem sintomas da doença no meio de um plantio de laranja doce “Valencia” enxertada em limão “Cravo” (Fonte: Fundecitrus, 2006).



Figura 3. Colapso das plantas e retenção dos frutos (Fonte: Fundecitrus, 2006)



Figura 4. Coloração amarelada nos tecidos internos da casca do porta enxerto 'Limão Cravo', na região do floema funcional, contrastando-se com os tecidos brancos da casca da copa (Fonte: Fundecitrus, 2006).



Figura 5. Subnórtia realizada em planta com 6 anos de idade, utilizando a técnica do T invertido, com 2 cavalinhos para plantas adultas (Fonte: Fundecitrus, 2006).

1.5. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que mede e analisa simultaneamente diversas características físicas de partículas individuais, em geral células, à medida que o fluxo passa por um feixe de luz. As propriedades analisadas são: o tamanho relativo, a granulidade relativa ou a complexibilidade interna da partícula e a intensidade relativa da fluorescência. Essas características são determinadas por meio de um sistema de acoplamento óptico - eletrônico que registra a forma como a partícula dispersa luz do laser incidente e emite fluorescência. (INTRODUÇÃO A CITOMETRIA DE FUXO, 2000). A suspensão líquida, que contém as partículas a serem analisadas, é introduzida no centro de uma câmara de fluxo preenchida por um fluido (sheath fluid), o qual possui uma velocidade muito superior a da suspensão líquida, o que permite a detecção de até 100.000 partículas (eventos) por segundo (Silva et al., 2005).

Dorigo et al., 2007, compararam a eficiência da citometria de fluxo (FC) com

as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de epifluorescência (MEP), para a contagem de vírus em ecossistemas aquáticos, concluindo que esses métodos são satisfatórios, sendo porém a citometria de fluxo de uma a sete vezes mais eficiente.

A citometria de fluxo permite a avaliação da heterogenicidade de culturas microbianas. Desta forma, dados discretos representando subpopulações podem fornecer uma imagem mais detalhada e real da complexibilidade e heterogenicidade que ocorre em um determinado bioprocessos (Porter et al, 1996). A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade da partícula. Os fluorocromos utilizados oferecem um método sensível para se obter informações a cerca da estrutura, função e vitalidade das células e ou partículas. Há dois modos de uso: por ligação covalente do fluorocromo à moléculas que se unem especificamente a componentes celulares e fluorocromos que variam suas características em função do microambiente que os cerca (Bertho, 2002).

Entre os fluorocromos mais utilizados em citometria de fluxo estão: o Iodeto de Propídeo (PI), o qual promove uma ligação covalente com os ácidos nucleicos tanto DNA, quanto RNA, sendo um fluorocromo com elevado peso molecular que se liga preferencialmente em ácidos nucleicos de fita dupla, sendo de baixo custo, fácil manuseio e podendo ser adquirido já na forma de uso; o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) que é o marcador fluorescente mais comumente utilizado para conjugar proteínas via grupo amina, reagindo com grupos de proteínas com amino terminal ou aminas primarias dentre outros (DOLEŽEL, 1997; GOLIM et al., 2007) e o Syber Gold pertencente a geração dos novos fluorocromos empregados em

citometria, sendo conhecido como o mais sensível fluorocromo para marcação de DNA e RNA. Na tabela 1 estão demonstradas a emissão e excitação de fluorescência dos principais fluorocromos utilizados em citometria.

Um citometro de fluxo pode ser classificado como um analisador ou como *cell sorting*. Um analisador é um equipamento que é capaz de realizar somente as análises das partículas que estão em suspensão na amostra avaliada. Ele pode fazer essa análise baseada em diversos parâmetros que incluem informações relativas a morfologia dessas partículas (tamanho e complexidade interna) e avaliações de fluorescências (o número de fluorescências avaliadas simultaneamente depende das especificações de cada equipamento) sendo utilizado para tanto o modelo de citômetro de fluxo BD FACS Canto (Becton Dickinson Biosciences). Já um citômetro capaz de fazer *sorting*, além de realizar todas as funções associadas a um analisador, pode separar diferentes partículas da amostra avaliada, baseado em características de cada partícula (BD MEDICAL SUPPLIED, 2010).

O princípio de *sorting* de melhor desempenho e maior eficiência atualmente é o *sorting* eletromagnético, utilizado em equipamentos como o modelo de citometro BD FACS Aria (Becton Dickinson Biosciences) que se baseia na formação de microgotas de solução salina contendo uma partícula dentro de cada gota formada. Baseado nas informações dadas pelo usuário ao instrumento a respeito de quais partículas que se deseja separar, o instrumento vai carregar positiva ou negativamente as gotas, dependendo do tipo de partícula que esta contida nela. Essas gotas passam pelo centro de duas placas defletoras, uma carregada positiva e outra negativamente. Pelo princípio físico de que cargas de mesmo sinal se repelem enquanto cargas de sinais opostos se atraem, ao passarem por entre as

placas defletoras, essas gotas serão direcionadas para componentes de coleta específicos diferentes, podendo ser coletadas em tubos (que permitem a separação de até 4 tipos de partículas ao mesmo tempo), em lâminas de microscopia ou em placas de cultura (que podem variar desde 6 até 384 poros). As gotas que não contém partículas de interesse para a separação, não serão carregadas e, conseqüentemente, não serão atraídas ou repelidas, sendo conduzidas para o descarte (BD MEDICAL SUPPLIED, 2010).

Tabela 1. Principais fluorocromos utilizados em citometria de fluxo e sua respectiva emissão e excitação de fluorescência.

SUBSTÂNCIA	EXCITAÇÃO (nm)	EMISSÃO (nm)
Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	490	520
PE	480-550	570
PerCP	450-550	650
APC	650	660
Iodeto de Propídeo (PI)	536	623
DAPI	350	470
Brometo de etídeo	510	595
XTRITC	580	604
Syber Gold	510	595

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia de separação através de citometria de fluxo para vírus de importância fitopatológica em citros.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Padronização do método de citometria de fluxo para os vírus fitopatológicos de importância em citros

A citometria de fluxo é um método rápido para a aquisição de dados multiparamétricos de análise, e vem sendo utilizada com êxito para a contagem e análise de comunidades de microrganismos, como: algas, protozoários, bactérias e vírus (MARIE et al., 1999; LINDSTRÖM et al., 2002; ROSE et al., 2004), para a identificação e quantificação populacional de DNA e RNA e investigação de ciclo celular (MARIE et al., 1997; GASOL et al., 1999), para identificação de populações de interesse utilizando sondas moleculares (LANGE et al., 1996), avaliação da fisiologia celular (LEBARON et al., 2001). A principal vantagem da utilização da citometria de fluxo consiste na possibilidade em analisar um grande número de células rapidamente e promover estatisticamente dados mais significativos (MARIE et al., 1999). Nesse trabalho propomos o desenvolvimento de uma metodologia eficaz e de baixo custo para visualização e separação de vírus fitopatológicos de importância em citros, utilizando fluorocromos específicos para marcação de ácidos nucléicos e conjugação de proteínas como anticorpos.

2.2.2. Confirmação dos vírus através de testes moleculares comparados com os resultados obtidos por citometria de fluxo

Como já descrito, após o uso da técnica de citometria de fluxo para visualização e separação dos vírus de importância fitopatológica em citros, os resultados obtidos serão confirmados através de RT PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Utilizou-se 7 amostras de laranja doce 'Natal' enxertada sobre o porta-enxerto Cleópatra, tolerante a MSC, positivas para CTV e CSDaV coletadas da folha (limbo) em pomares monitorados pelo Fundecitrus em regiões endêmicas. Como controle foi empregado 7 plantas cítricas de laranjeiras 'Valência' sobre porta-enxerto de limão 'Cravo', apresentando somente o CTV proveniente de estufa de vegetação, localizada no Fundecitrus, na cidade de Araraquara, São Paulo.

As amostras de cada tratamento foram produzidas em duplicata. Sendo cada amostra checada quanto a presença de CTV e CSDaV através de RT-PCR.

3.2. Métodos

3.2.1. Purificação das amostras

As amostras foram preparadas seguindo o protocolo para Potato leaf-roll virus (KEITH et al.; 1995). Esse protocolo consiste em duas partes distintas desenvolvidas em um dia cada. Parte das amostras seguiram o protocolo completo (2 dias) e parte foram preparadas eliminando-se o segundo dia, ou seja, a segunda parte da purificação, afim de se empregar tempo e custo menor no preparo das amostras.

No primeiro dia, ou seja, na 1^o parte da purificação viral, 300g de folhas foram trituradas a seco em 600ml de solução tampão 0,1 de citrato trisódico, pH 6,0 acrescentou-se 0,5% de beta mercaptoetanol. Depois se realizou a filtração com

gazes para retirada do excesso de material, sendo em seguida o pH ajustado para 7,0, utilizando-se fosfato de sódio bibásico. Adicionou-se a solução 0,33 volume de clorofórmio e 0,33 volume de butanol e procedeu-se a agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 20°C no rotor Sorvall GSA a 10000 rpm por 15 minutos (4°C), em seguida foi retirada a fase aquosa e descartou-se o pellet. Adicionou-se a fase aquosa PEG6000 para uma concentração final de 8% (volume/volume) e NaCl para uma concentração final de 0,2M. Procedeu-se a agitação por 1 hora a temperatura ambiente e em seguida centrifugou-se a 20°C no Sorvall GSA a 8000 rpm por 15 minutos (4°C). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em solução tampão fosfato acrescentado de triton X-100(1%) e em seguida ressuspendeu-se overnight a 4°C.

No segundo dia, ou seja, na 2ª parte da purificação viral centrifugou-se a 20°C no rotor Sorvall GSA a 9000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se o sobrenadante e procedeu-se a centrifugação em um colchão de sacarose (20% volume/volume) em solução tampão fosfato 0,02M, pH 7,5 em rotor Beckman 50,2 Ti a 29500 rpm por 3 horas a 20°C. Para este procedimento foi colocado 15ml do sobrenadante por tubo e adicionado 5ml da solução de sacarose (total de 8 tubos), em seguida descartou-se o sobrenadante e foi ressuspendido o pellet em 0,5ml de solução tampão fosfato 0,02M, pH 7,5, para cada um dos tubos. Ressuspendeu-se overnight a 4°C. Em seguida procedeu-se a visualização das partículas virais em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM900, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – na cidade de Piracicaba, S.P, conforme demonstrado abaixo na figura 6.

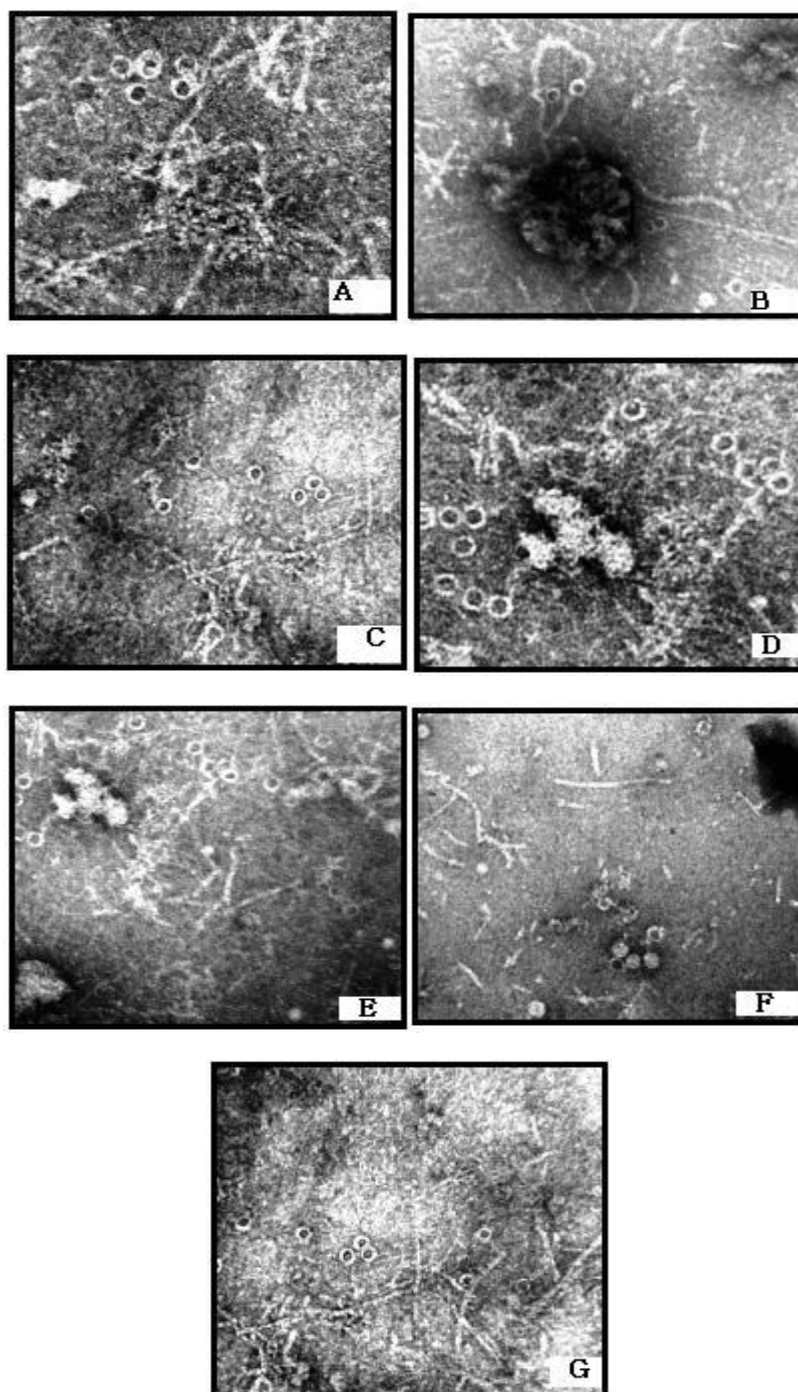


Figura 6. Microscopia eletrônica de plantas cítricas com CTV e CSDaV: Amostras (A, B, C, D, E, F e G) de plantas cítricas contendo os vírus CTV e CSDaV, vistas em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM900, onde morfologicamente as partículas referentes ao CTV apresentam-se filamentosas e as correspondem ao vírus CSDaV esféricas.

3.2.2. Extração de RNA total

3.2.2.1. Amostras Plantas

Para a extração de RNA total de plantas, utilizou-se 0,1g de material vegetal (limbo). O processo de extração ocorreu segundo o protocolo TRIZOL LS (Invitrogen), conforme descrito abaixo.

Inicialmente foi realizada a maceração com N₂ líquido. Em seguida adicionou-se 1ml de Trizol LS e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação adicionou-se 0,2µl de clorofórmio e incubou-se por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente realizou-se a centrifugação por 15 minutos a 12.000g (4°C). Retirou-se então a fase superior adicionando ½ de volume de solução de precipitação e ½ volume de álcool isopropílico. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi então centrifugado por 10 minutos a 12.000g(4°C). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 1ml de 70%, em seguida procede-se a inversão do tubo manualmente e bem lentamente para lavar a parede do mesmo (nesta fase pode-se congelar a amostra a -80°C). Realizou-se a centrifugação por 5 minutos a 7.000g(2°C), descartou-se o ETOH 70% e os tubos permaneceram abertos no gelo por 10 a 15 minutos para secagem do pellet. O qual foi ressuscitado em 30µl de H₂O DEPC.

3.2.2.2. Amostras citometria de fluxo

Foram utilizados 20µL de cada uma das amostras, seguindo o protocolo TRIZOL LS (Invitrogen), em conformidade com o item 3.2.2.1 descrito acima.

3.2.3. Detecção do CTV e CSDaV através da RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa)

3.2.3.1. *Síntese do cDNA.*

O cDNA foi obtido com o RNA total: 5µL de RNA foram incubados com 2,5µL do iniciador reverso C1-esp-Rev 5' AGATGGGATTGCCCGGTGAAGG 3', (10mM) 2,5µL de CN120 5' GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC 3', 1µL de dNTPs (2,5mM) a 70°C por 5 minutos. Os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos. Acrescentou-se 4µL de tampão da enzima (5x); 2,4µL de MgCl₂ (25mM), 1µL de RNase OUT e 1µL da enzima Improm II (Promega) e 0,6µL de H₂O. A síntese da primeira fita ocorreu a 42°C por 1 hora. A enzima foi inativada por incubação a 70°C por 15 minutos.

3.2.3.2. *Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)*

Na PCR utilizou-se o cDNA para amplificação das regiões de interesse. Para o CTV, utilizaram-se os primers CN119 5' AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG 3' e CN120 5' GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC 3' (ROY & RAMACHANDRAN et al., 2002), produzindo um amplicon de 601 pb. O CSDAV foi amplificado com os primers C1-esp-For 5' CCGCTGTCACCATTGCTTCCAG 3' e C1-esp-Rev 5' AGATGGGATTGCCCGGTGAAGG 3', com amplicon de 472pb. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 20µL, sendo 1µL de cDNA, 2µL de tampão (10x), 0,6µL de MgCl₂ (50mM), 1,6µL de dNTPs (2,5mM), 1µL de cada iniciador (10mM), 0,2µL da enzima Taq polimerase e 12,6µL de H₂O. O

programa de amplificação foi composto por um ciclo de 1 minuto a 80°C e 2 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 TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. O gel corado em solução de 0,5ug/mL de Brometo de Etídio. O produto da amplificação foi visualizado por exposição à luz ultravioleta e registrado por um aparelho EAGLE Eye II.

3.2.4. Padronização de método: Citometria de Fluxo (FC)

3.2.4.1. Amostras Controles

Para cada análise, utilizando os diferentes fluorocromos apresentados neste trabalho (PI, Syber Gold e FITC), através de citometria de fluxo, foi utilizado como branco (controle) amostras de CTV/CSDaV e amostras de CTV não marcadas com fluorocromos, (figura 7) sendo estas necessárias para os ajustes feitos no aparelho, evitando assim a interferência de sinal de fluorescência quando os fluorocromos são empregados. Todos possuem excitação a 488nm com emissão de fluorescência que abrange uma faixa de 520nm a 623nm de fluorescência. A emissão de fluorescência lida em filtros detectores específicos presentes no interior dos citômetros.

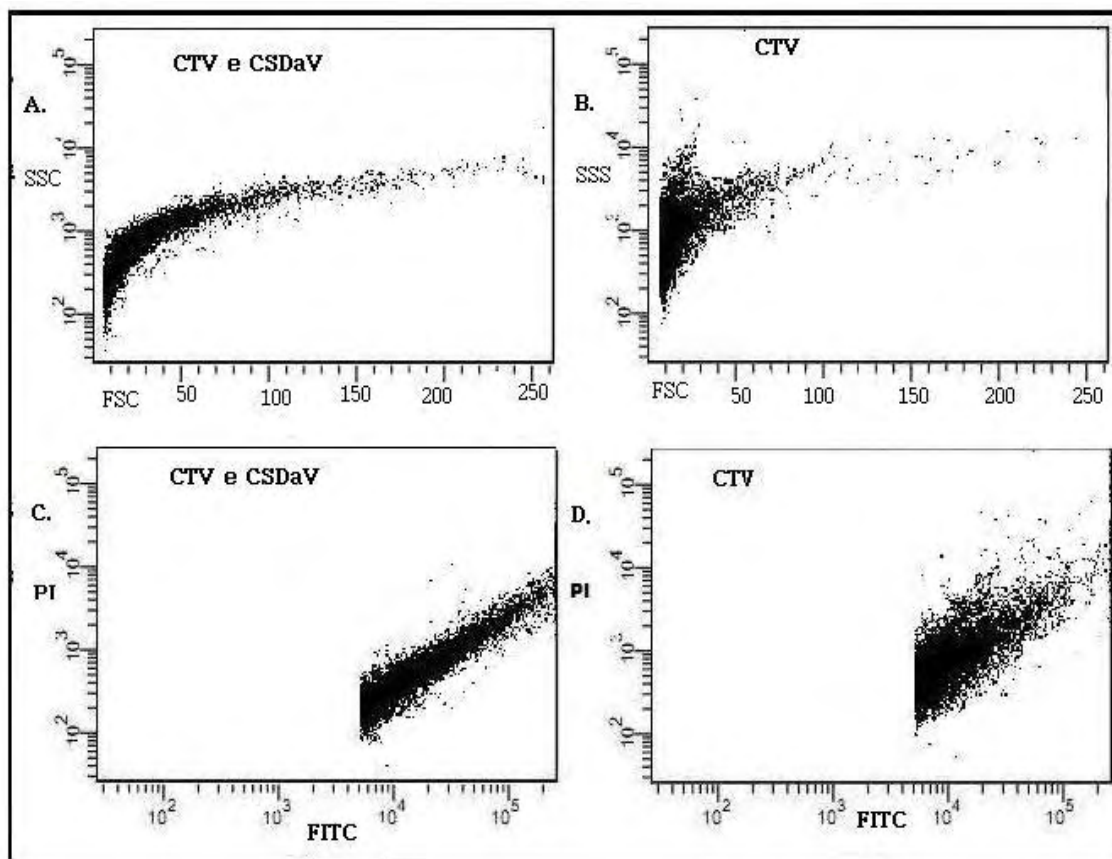


Figura 7. Controle negativo (não marcado com fluorocromo) em escala linear e logarítmica: em escala linear: FSC (eixo x) relativo ao tamanho das partículas e SSC (eixo y) relativo a granulosidade interna das partículas, das amostras contendo CTV e CSDaV (A) e somente CTV (B) e em escala logarítmica: o fluorocromo PI relativo ao eixo y e o fluorocromo FITC relativo ao eixo x, das amostras de CTV e CSDaV (C) e CTV (D). Controle executado para o ajuste das voltagens dos detectores de fluorescência para posterior detecção das cores, na intensidade correta e para definir a partir de onde em um gráfico a população é considerada positiva para determinada fluorescência.

3.2.4.2. Marcação dos vírus com Iodeto de Propídeo (PI)

Seguindo parcialmente a metodologia proposta por MARIE et al., 1997, BRUSSAARD et al., (2000) e BRUSSAARD et al., (2004) foi montado um protocolo para marcação de vírus que causam doença em cítricos. A partir do semi purificado de vírus CTV e CSDaV, foram feitas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 utilizando Tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5), estabelecendo a diluição 1:100 a ser utilizada. Para a marcação das amostras foi utilizado o fluorocromo PI, na concentração de 50 µg/µL.

Inicialmente foi executado um ensaio sem adição de fluorocromo como controle utilizando as amostras CTV e CSDaV e a amostra CTV, na diluição de 1:100 . Para cada diluição dos purificados virais, amostras CTV e CSDaV e amostra CTV, foi adicionado 50 µL PI. As amostras foram então analisadas pelo citômetro de fluxo FACS Canto e os parâmetros analisados pelo software DIVA.

3.2.4.3. Marcação dos Vírus com Syber Gold

Syber Gold – Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), obtido na concentração 10.000X, fluorocromo para marcação de DNA e RNA foi utilizado como marcador dos ácidos nucleicos virais presentes nas amostras CTV/CSDaV e CTV, cujo preparo foi feito de acordo com o protocolo do fabricante com mínimas modificações técnicas como relatado a seguir: a concentração de Syber Gold utilizada nesse trabalho foi de 25X, sendo utilizado para diluição Tampão TE (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0). A partir da diluição padrão as amostras CTV/CSDaV e CTV,

foram acrescidas de 50 μ L de Syber Gold, posteriormente essas amostras foram incubadas no escuro por um período de 20 minutos, sendo então analisadas pelo citômetro de fluxo Facs Canto e os parâmetros estabelecidos pelo software DIVA. Trabalhou-se com tubos embalados em papel alumínio, evitando a exposição à luz, pois o corante é sensível à mesma.

3.2.4.4. Conjugação dos anticorpos anti CTV com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

O Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) - Isômero I com celine (Sigma-Aldrich^(R)), foi o fluorocromo de escolha para ser conjugado às proteínas obtidas na forma já apropriada ao uso. Este foi preparado conforme protocolo do fabricante, com mínimas modificações técnicas, descritas a seguir: diminuição do volume utilizado de proteína sugerida pelo fabricante. Inicialmente, diluiu-se o FITC liofilizado em DMSO (1mg/ml). Preparou-se a concentração de 20 μ g/ml de proteína, sendo o anticorpo anti CTV policlonal 1000X concentrado, proveniente do Kit para Reagente Elisa marca Bioreba. Adicionou-se a solução de FITC/DMSO a esta proteína para dar início as reações. A incubação ocorreu por 8 horas no escuro a 4^o C. A todo o momento trabalhou-se com tubos embalados em papel alumínio, evitando a exposição à luz, pois o corante é sensível à mesma.

O anticorpo foi diluído em Tampão PBS estéril (tampão fosfato-salina, pH 7,5) na razão de 1:100.

Para a identificação dos anticorpos conjugados com FITC, através da técnica de citometria de fluxo foi utilizada a diluição viral padrão 1:100. Inicialmente colocou-se 50 μ L da amostra de CTV na diluição 1:100, acrescidos de 10 μ L de

Ac/FITC e 440 μ L de Tampão PBS (tampão fosfato-salina, pH 7,5) os quais foram analisadas no citometro Facs Canto, todo o experimento feito em duplicata.

Pelo fato de não haver anticorpo para o vírus CSDaV empregado neste trabalho, o uso de FITC torna-se o padrão estabelecido para diferenciar as duas populações virais estudadas nesse trabalho. A conjugação pelo uso de Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) foi feita através da ligação com o anticorpo Anti/CTV, adquirido 10.000x concentrado, sendo preparado de acordo com as especificações do fabricante.

3.2.4.5. Marcação dos Vírus com PI e Conjugação dos anticorpos com FITC

Experimento feito em duplicata, sendo utilizada a diluição viral padrão já pré-estabelecida. Primeiramente colocou-se 50 μ L da amostra CTV/CSDaV, acrescidos de 10 μ L de Ac/FITC e 375 μ L de Tampão PBS (tampão fosfato-salina, pH 7,5) e por último acrescentou-se 50 μ L de PI. Incubou-se essa solução no escuro por um período de 20 minutos sendo depois analisadas no citômetro Facs Canto e os parâmetros analisados pelo software DIVA.

3.2.4.6. Marcação para separação dos Vírus CTV e CSDaV

As amostras do semi-purificado contendo ambos os vírus CTV e CSDaV foram submetidas a separação viral, por Citometria de Fluxo, utilizando o Facs Canto e os parâmetros analisados pelo software Sorter Facs Diva Version 6.1.1.

Inicialmente 100 μ L de vírus na diluição 1:100, foram acrescidos de 20 μ L de Ac/FITC policlonal e 1mL de Tampão PBS (tampão fosfato-salina, pH 7,5) e por

último acrescentou-se 50 μ L de PI. Incubou-se essa solução no escuro por um período de 10 minutos e seguiram-se as análises no citômetro Facs Canto, e os parâmetros analisados pelo software Sorter Facs Diva Version 6.1.1.

4. RESULTADOS

4.1. Análises por CF dos fluorocromos utilizados

4.1.1. *Sensibilidade do fluorocromo PI para marcação de CTV e CSDaV*

Com a adição do fluorocromo PI nas amostras de CTV/CSDaV e CTV específico para marcação de ácidos nucleicos, tanto DNA como RNA obteve-se populações referentes às amostras virais de CTV/CSDaV e CTV marcadas. Nas amostras de CTV/CSDaV observou-se uma coloração verde relativa a ligação de PI ao RNA das populações presentes na amostra (figura 8). Para a amostra de CTV observou-se uma coloração verde presente relativa a marcação do fluorocromo PI as partículas de RNA contidas na amostra (figura 9).

Para as amostras que tiveram apenas a primeira etapa do protocolo de KEITH et al.; (1995). Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, mesmo além de vírus, restos celulares como: proteínas vegetais, ribossomos e polissacarídeos, também estarem presentes nas amostras. Na figura 10 através dos gráficos A, B, C, D, E, F e G referentes as amostras contendo ambos os vírus CTV e CSDaV observou-se a presença de coloração verde representando a ligação do fluorocromo PI aos ácidos nucleicos. O mesmo ocorreu quando foi observado a população referente a amostra de CTV, onde a população marcada com PI aparece na cor verde (figura 11).

4.1.2. *Sensibilidade do fluorocromo Syber Gold para marcação de CTV e CSDaV*

Pela adição do fluorocromo Syber Gold, na amostra de CTV/CSDaV, preparado

de acordo com as especificações do fabricante, observou-se uma população cujos ácidos nucleicos foram marcados com Syber Gold apresentando coloração avermelhada (figura 12). Para a marcação das amostras de CTV com o fluorocromo Syber Gold, observou-se também a presença de coloração avermelhada (figura 13).

Nas amostras de CTV/CSDaV e CTV purificadas seguindo parcialmente o protocolo de KEITH et al.; (1995) pode-se observar que o fluorocromo continuou a se ligar no RNA de ambos os vírus, através do aparecimento de coloração avermelhada (figuras 14 e 15).

4.1.3. Sensibilidade do fluorocromo FITC para conjugação ao anticorpo anti CTV

Nas amostras de CTV e CSDAV, ocorreu a conjugação do anti CTV ao fluorocromo FITC e ligação desse anticorpo Anti/CTV conjugado com as partículas virais de CTV presentes nas amostra apresentando assim fluorescência relativa ao FITC, representada pela coloração alaranjada o mesmo ocorreu para as amostras contendo apenas partículas de CTV representadas respectivamente nas figuras 16 e 17.

4.1.4. Visualização dos vírus CTV e CSDaV marcados com PI e FITC

Pelo uso do fluorocromo PI marcador de ácidos nucleicos, o qual se une ao RNA dos vírus das amostras contendo CTV/CSDaV e do anti CTV conjugado com o fluorocromo FITC, os quais possuem excitação a 488nm e emissão de fluorescência a 623 e 520nm, respectivamente, através da técnica de citometria de fluxo pode-se observar duas populações distintas demonstradas em gráfico dot plot (figura 18). As análises feitas em cada um dos quatro quadrantes elaborados no gráfico (Q1, Q2,

Q3 e Q4) demonstrou em: Q1 partículas PI positivas e FITC negativas, em Q2 dupla positividade para as partículas das amostras de CTV/CSDaV, sendo ambas PI e FITC positivas, em Q3 dupla negatividade para as partículas apresentando-se como PI e FITC negativas e em Q4 as partículas apresentaram-se FITC positivas e PI negativas.

4.1.5. Separação dos vírus CTV e CSDaV marcados com PI e FITC

Pela marcação com fluorocromos PI e FITC, foi observado duas populações distintas representadas nos quadrantes do gráfico em dot plot (figura 19), sendo respectivamente: Q1, partículas PI positivas e FITC negativas, Q2 dupla positividade, partículas PI e FITC positivas, Q3 dupla negatividade, partículas PI e FITC negativas e Q4 partículas FITC positivas e PI negativas. Para a realização da separação dos vírus CTV e CSDaV presentes nas amostras contendo CTV e CSDaV, foi necessário o cumprimento de todas as etapas referentes a purificação viral utilizada nesse trabalho. As amostras obtidas a partir da separação na CF foram testadas através da RT-PCR referentes ao Q1 (figuras 20 e 21), ao Q2 (figuras 22 e 23) ao Q3 (figuras 24 e 25) e ao Q4 (figuras 26 e 27). Os resultados da CF e da RT-PCR estão sumarizados na Tabela 4.

Fazendo-se a análise dos resultados obtidos nesse trabalho por meio de gráficos em dot plot pode-se observar que no quadrante superior esquerdo (Q1) as partículas que se apresentaram mais próximas ao eixo y e mais acima no gráfico nesse quadrante, possuíam maior positividade em relação ao PI, ou seja, quanto mais próximas as partículas estiverem no quadrante superior esquerdo do eixo y (Q1), mais PI positivas serão e conseqüentemente mais CSDaV teremos na amostra,

visto que utilizamos o PI para marcar os ácidos nucleicos de ambos os vírus: CTV e CSDaV porém com a utilização do anticorpo anti CTV conjugado ao FITC, o PI torna-se o marcador para seleção das partículas não conjugadas com FITC.

4.1.6. Análise Estatística da eficiência dos fluorocromos Iodeto de Propídeo e Syber Gold

Aplicada a análise de variância de Friedman para comparação dos dois fluorocromos utilizados, conclui-se que "Syber Gold " é estatisticamente superior ao "Iodeto de Propídeo" com probabilidade altamente significativa ($p = 0,0082$). Essa análise foi feita para a marcação utilizando os fluorocromos PI e Syber Gold nas amostras de CTV e CSDaV e nas amostras contendo somente CTV.

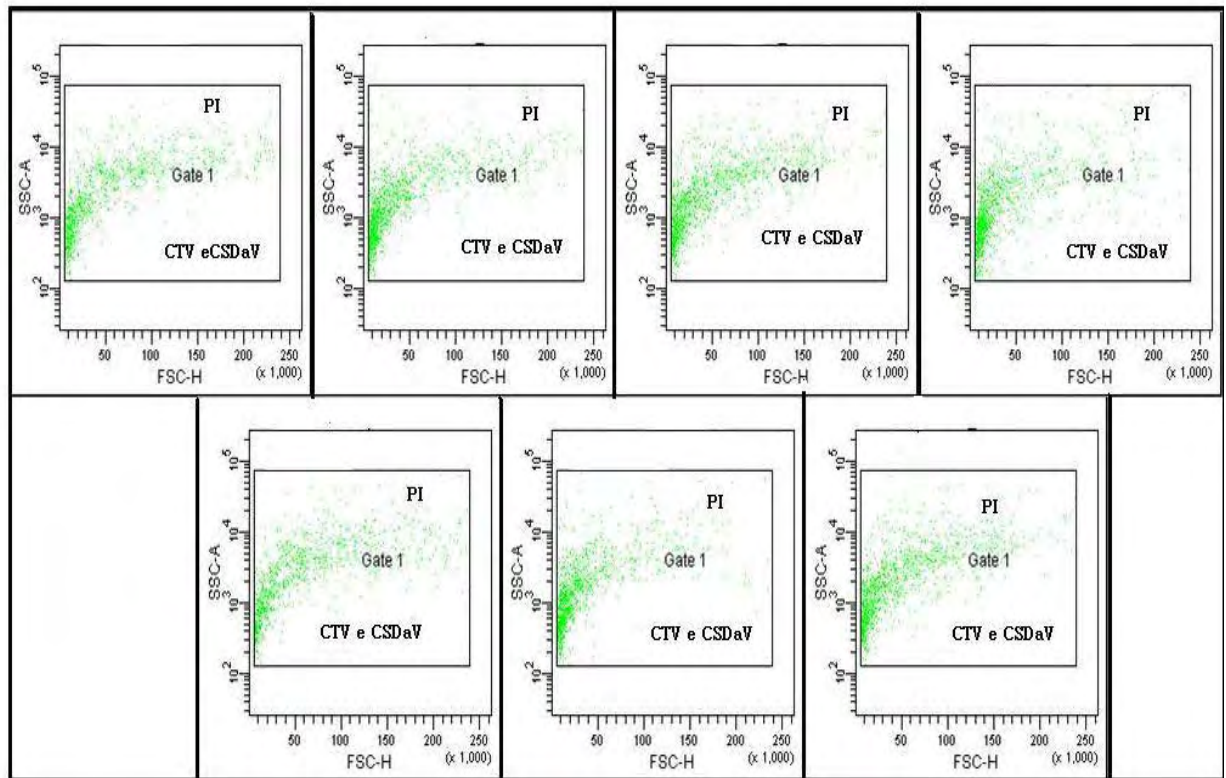


Figura 8. Marcação com PI das amostras de CTV e CSDaV, obtidas de acordo com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995). Amostras contendo ambos os vírus CTV e CSDaV marcadas com o fluorocromo PI, preparadas com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo através do citometro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA, referentes ao tamanho (FSC) e a granulosidade das partículas (SSC), representadas respectivamente pelos eixos x e y, sendo a coloração verde referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostras.

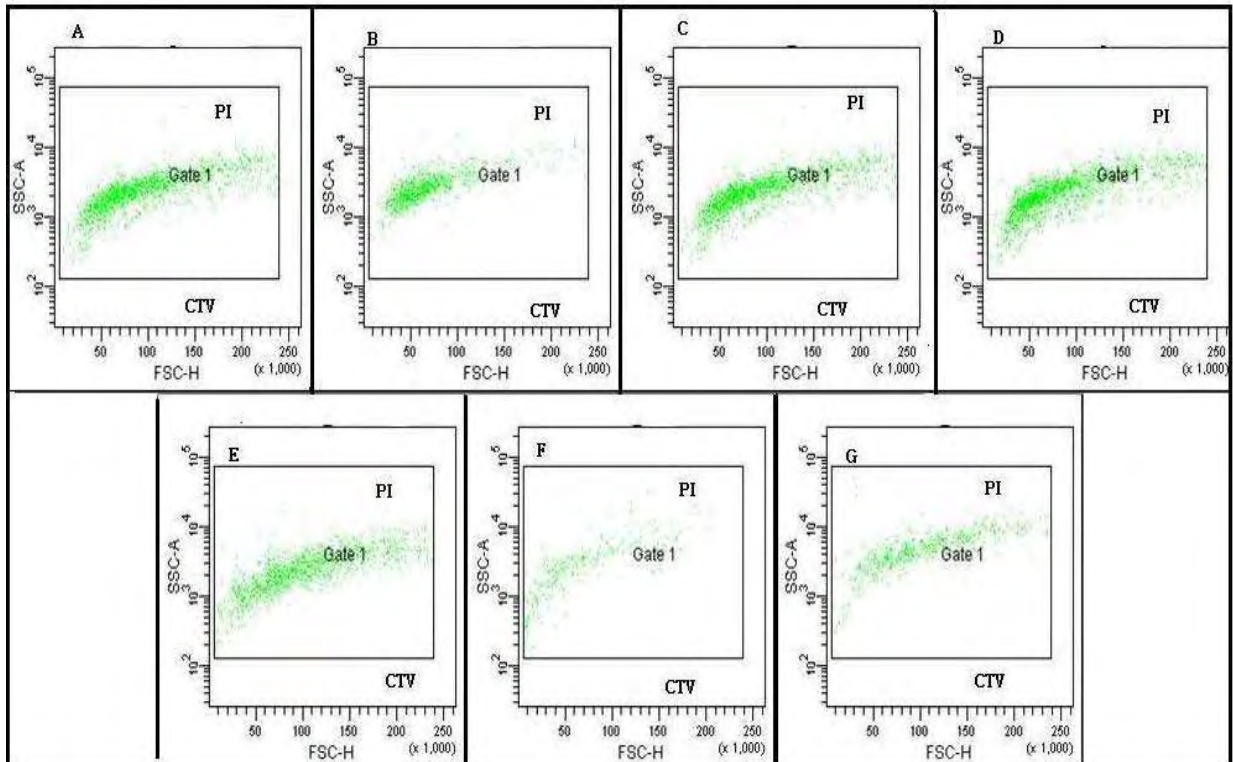


Figura 9. Marcação com PI das amostras de CTV, obtidas de acordo com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995). Amostras de CTV marcadas com o fluorocromo PI, preparadas com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo através do citômetro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA referentes ao tamanho (FSC) e a granulosidade das partículas (SSC), representadas respectivamente pelos eixos x e y, sendo a coloração verde referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostras.

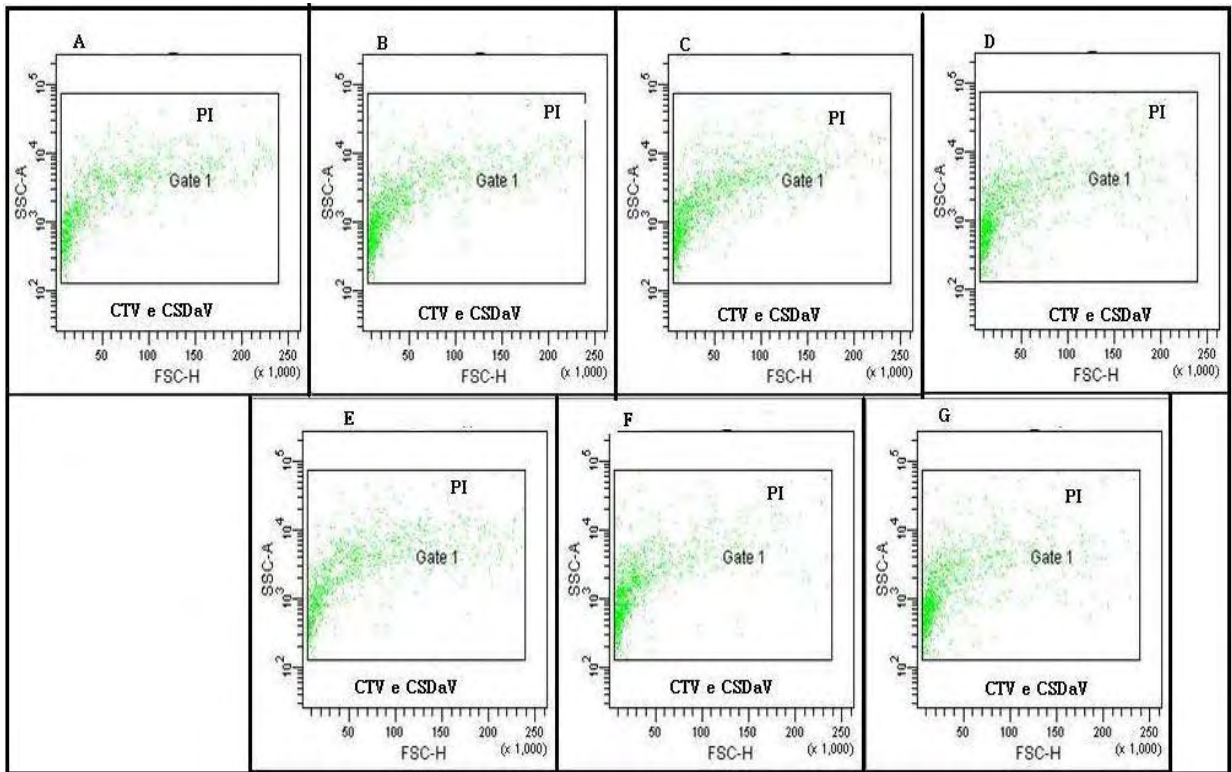


Figura 10. Marcação com PI das amostras de CTV e CSDaV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995) Amostras de CTV e CSDaV, marcadas com o fluorocromo PI, preparadas seguindo apenas a primeira parte do protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), estando além dos vírus também presente nas amostras: ribossomos, proteínas vegetais e polissacarídeos, onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo através do citometro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA sendo a coloração verde referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostras.

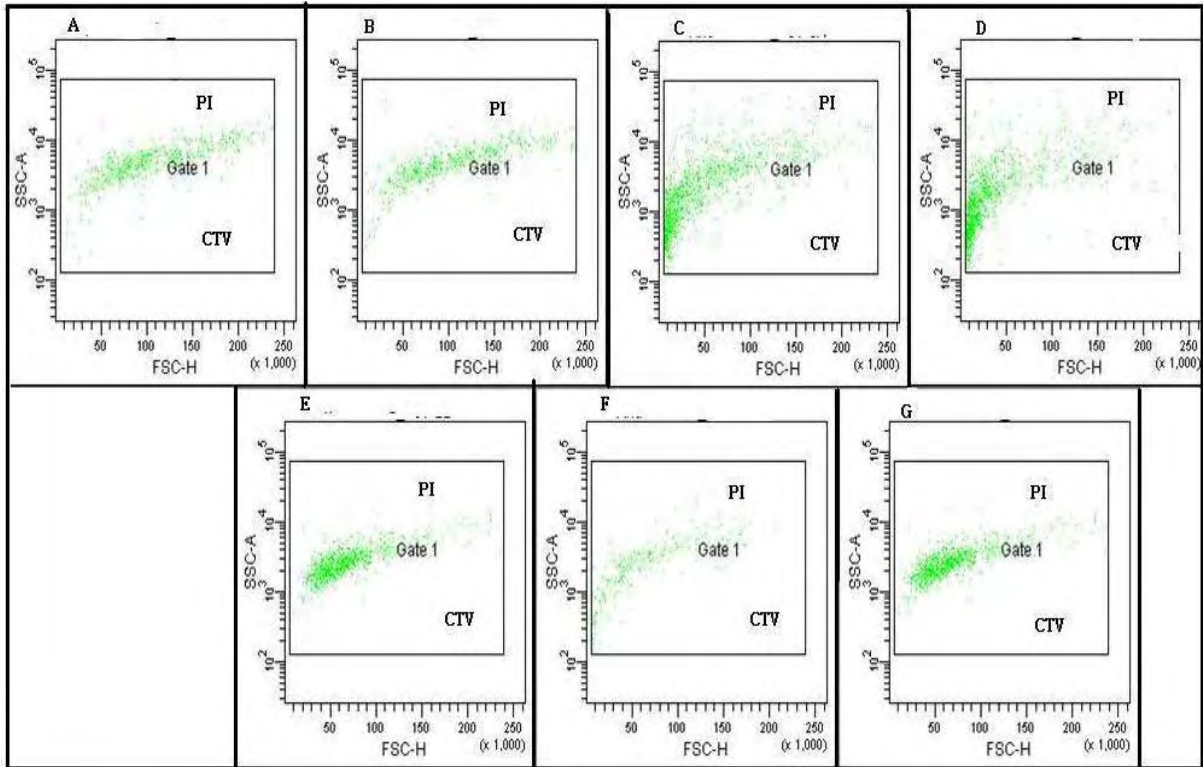


Figura 11. Marcação com PI das amostras de CTV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995). Amostras contendo o vírus CTV marcadas com o fluorocromo PI, preparadas seguindo apenas a primeira parte do protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), estando além dos vírus CTV também presente nas amostras: ribossomos, proteínas vegetais e polissacarídeos, onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo através do citometro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA sendo a coloração verde referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostras.

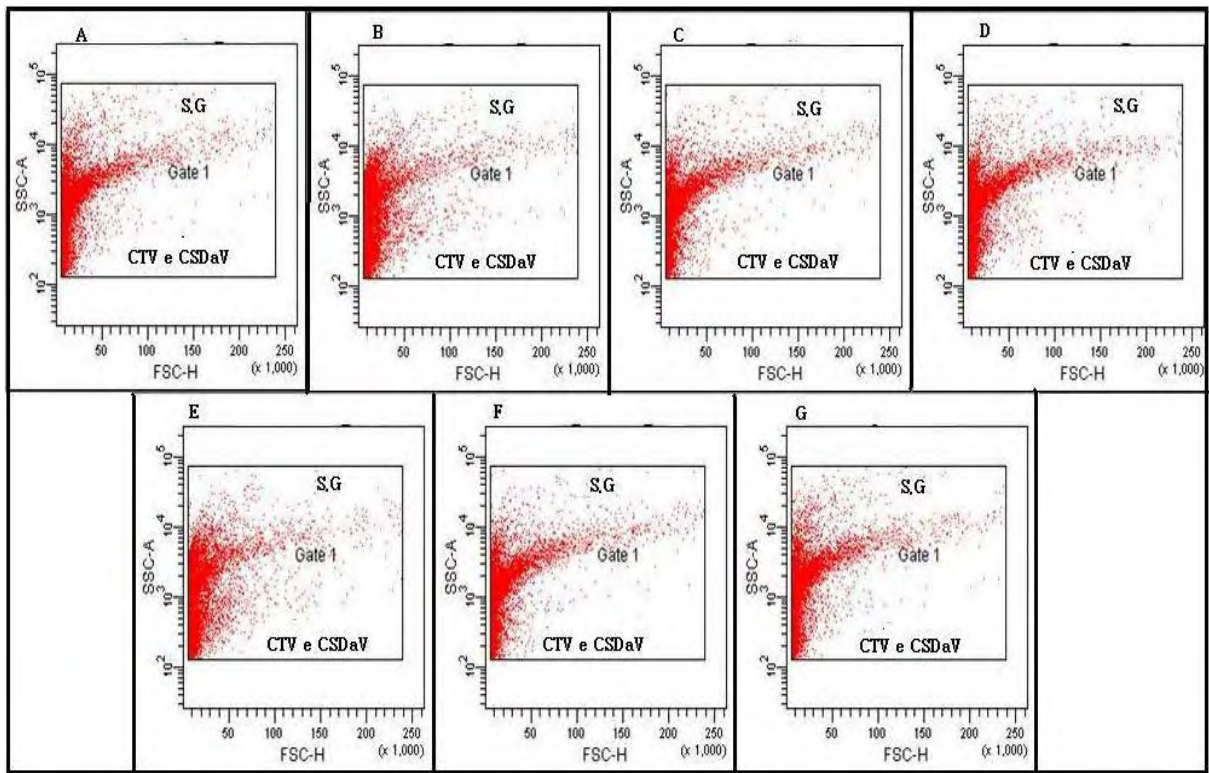


Figura 12. Marcação com Syber Gold das amostras de CTV e CSDaV, obtidas de acordo com o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; 1995. Amostras contendo os vírus CTV e CSDaV marcadas com Syber Gold, analisadas pelo citômetro de fluxo Facs Canto e os parâmetros analisados de acordo com o software DIVA. As amostras foram purificadas de acordo com o protocolo de KEITH et al.; (1995) e depois adicionado Syber Gold 25X concentrado. Através da observação da coloração avermelhada presente em cada um dos gráficos podemos visualizar a sensibilidade desse novo fluorocromo frente a RNA viral.

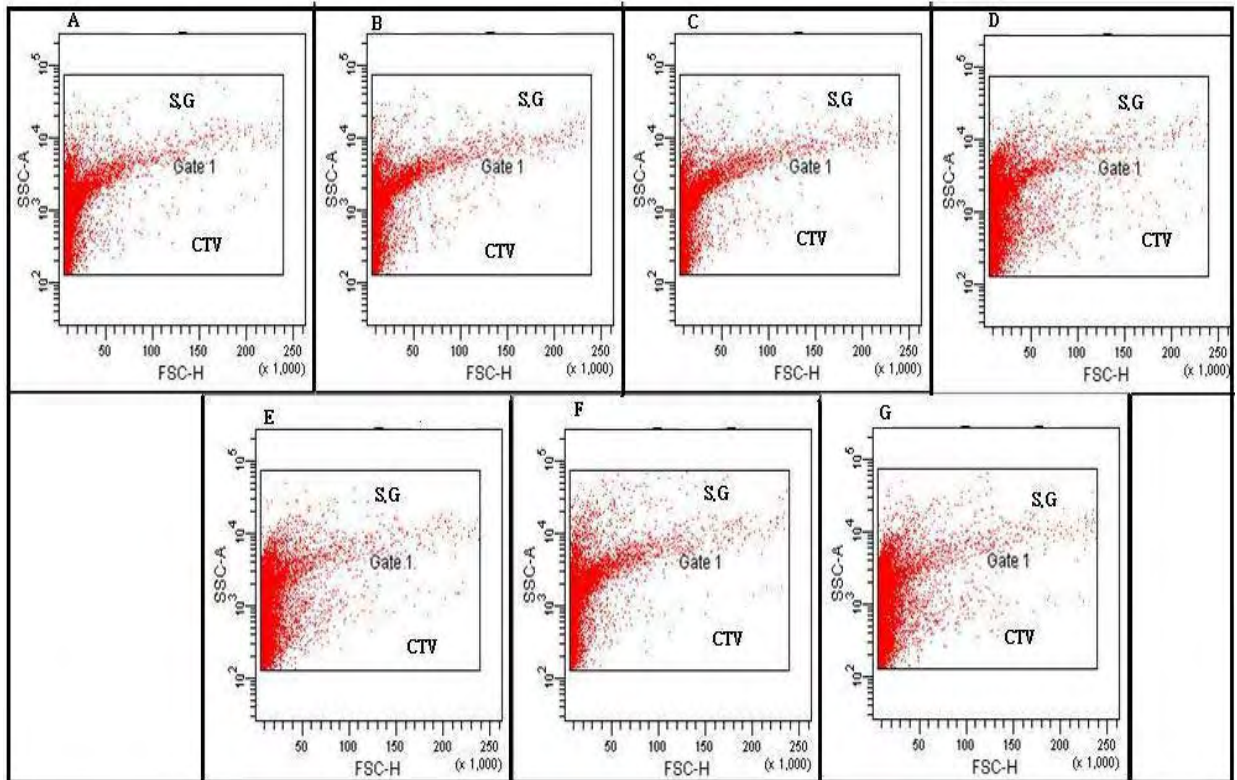


Figura 13. Marcação com Syber Gold das amostras de CTV, obtidas de acordo com Protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995). Amostras contendo o vírus CTV marcadas com o fluorocromo Syber Gold, preparadas purificadas segundo KEITH et al.; (1995), onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo através do citometro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA sendo a coloração vermelha referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA viral presentes na amostras.

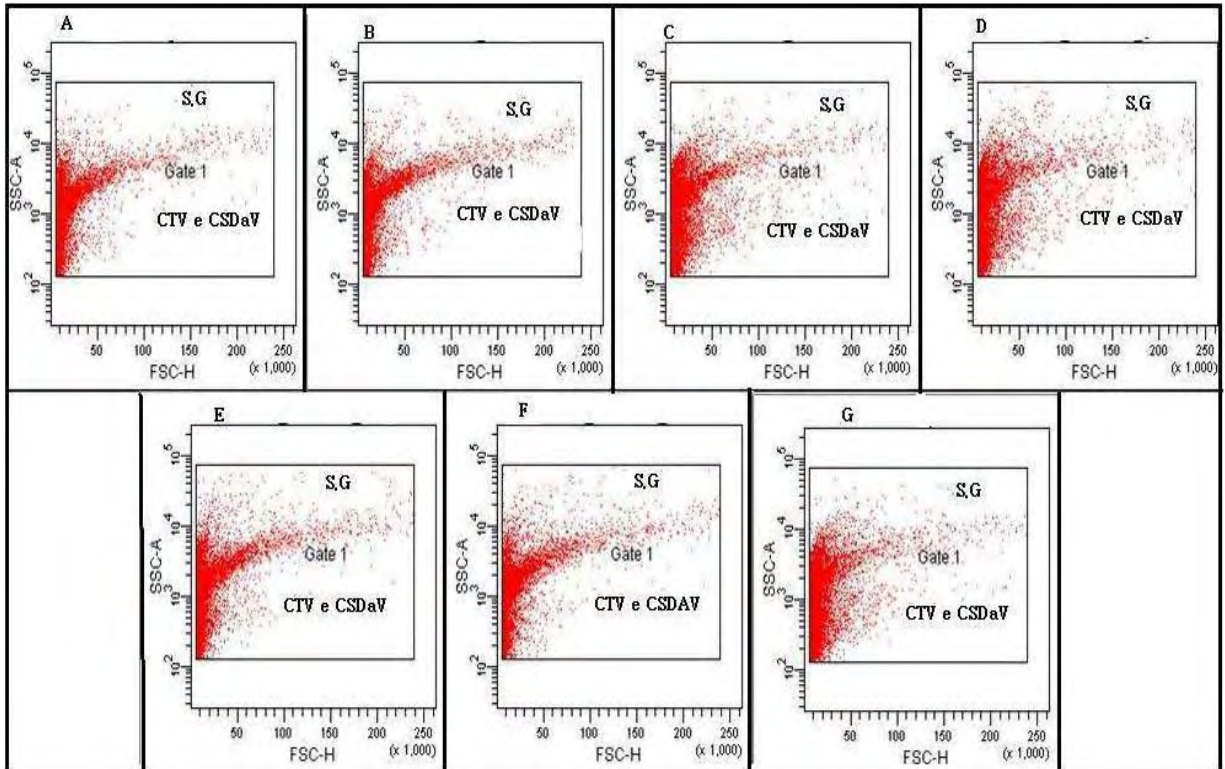


Figura 14. Marcação com Syber Gold das amostras de CTV e CSDaV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação de KEITH et al.; (1995). Amostras contendo o vírus CTV e CSDaV, marcadas com o fluorocromo Syber Gold, preparadas seguindo apenas a primeira parte do protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), tendo assim presente nas amostras: ribossomos, proteínas vegetais e polissacarídeos, onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo utilizando citômetro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA sendo a coloração vermelha referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostra

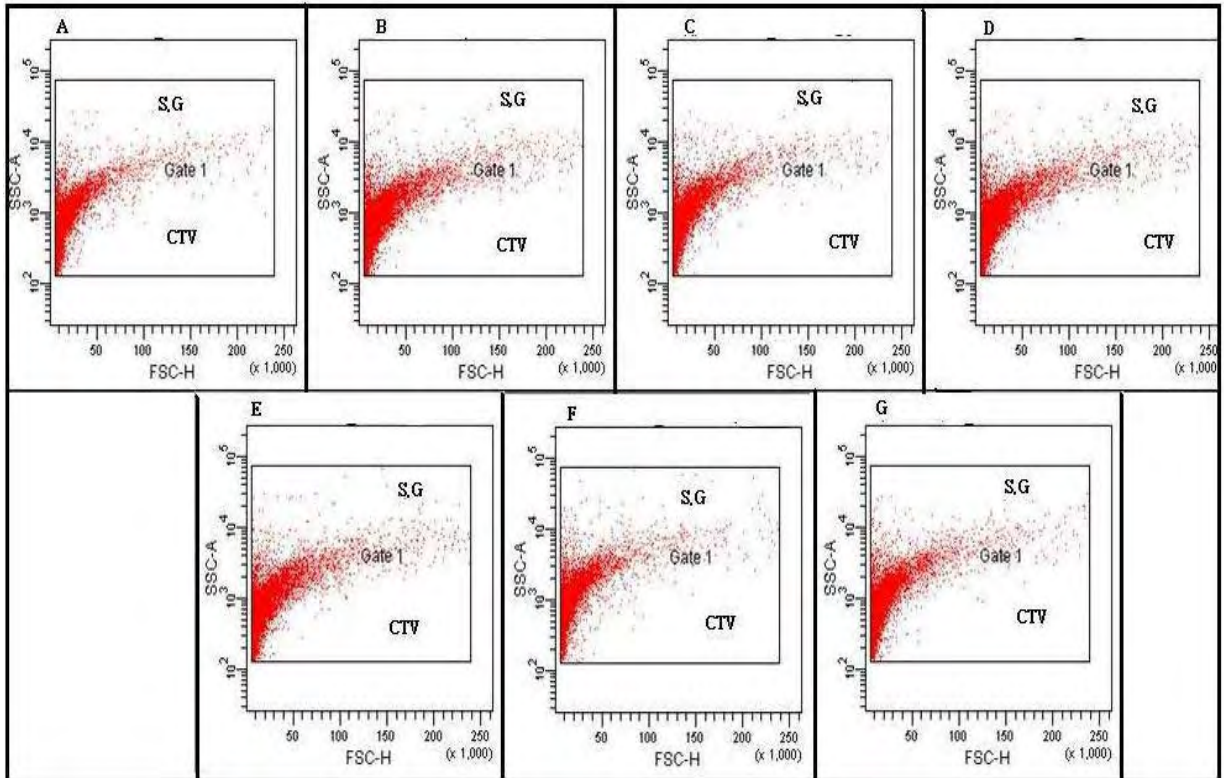


Figura 15. Marcação com Syber Gold das amostras de CTV, obtidas seguindo parcialmente o protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995). Amostras contendo o vírus CTV, marcadas com o fluorocromo Syber Gold, preparadas seguindo apenas a primeira parte do protocolo de purificação segundo KEITH et al.; (1995), tendo assim presente nas amostras: ribossomos, proteínas vegetais e polissacarídeos, onde observamos em cada gráfico a sensibilidade deste fluorocromo utilizando citômetro Facs Canto, cujos parâmetros foram analisados pelo software versão DIVA sendo a coloração vermelha referente a ligação do fluorocromo as partículas de RNA presentes na amostra.

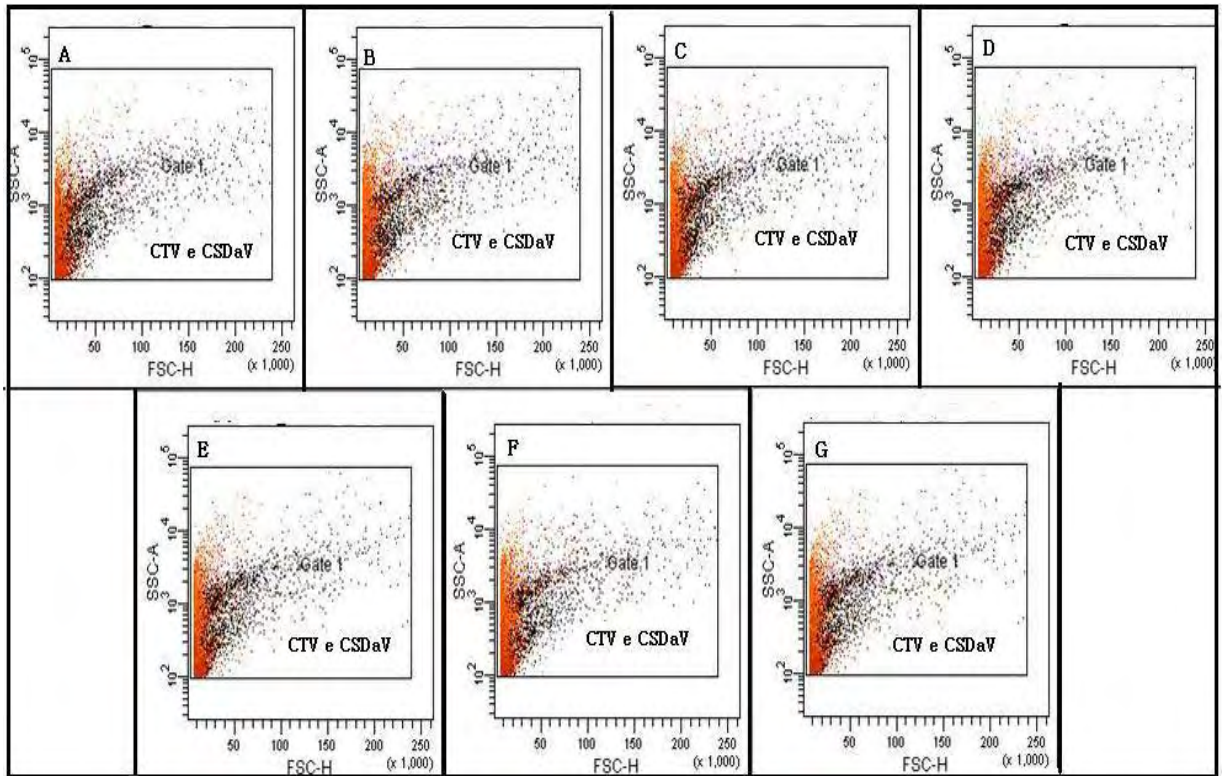


Figura 16. Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV da amostra CTV e CSDaV. Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV referentes as amostras de plantas cítricas com CTV e CSDaV. O FITC se conjuga as proteínas via grupamento amina reagindo com grupos de proteínas com amino terminal ou aminas primarias, ocorrendo a emissão de fluorescência de aproximadamente 520nm, representada nessa figura pela coloração alaranjada.

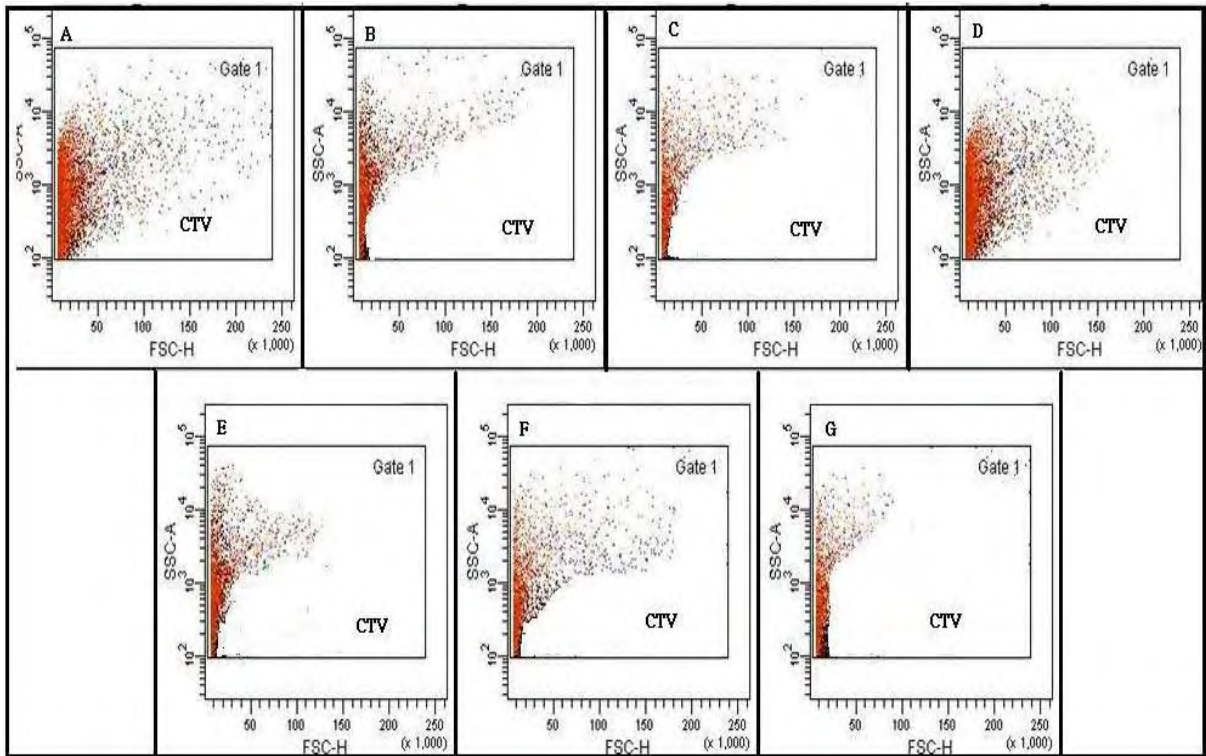


Figura 17. Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV da amostra CTV. Conjugação do fluorocromo FITC ao anticorpo Anti/CTV referentes as amostras de plantas cítricas com CTV. O FITC se conjuga as proteínas via grupamento amina reagindo com grupos de proteínas com amino terminal ou aminas primarias, ocorrendo a emissão de fluorescência de aproximadamente 520nm, representada nessa figura pela coloração alaranjada.

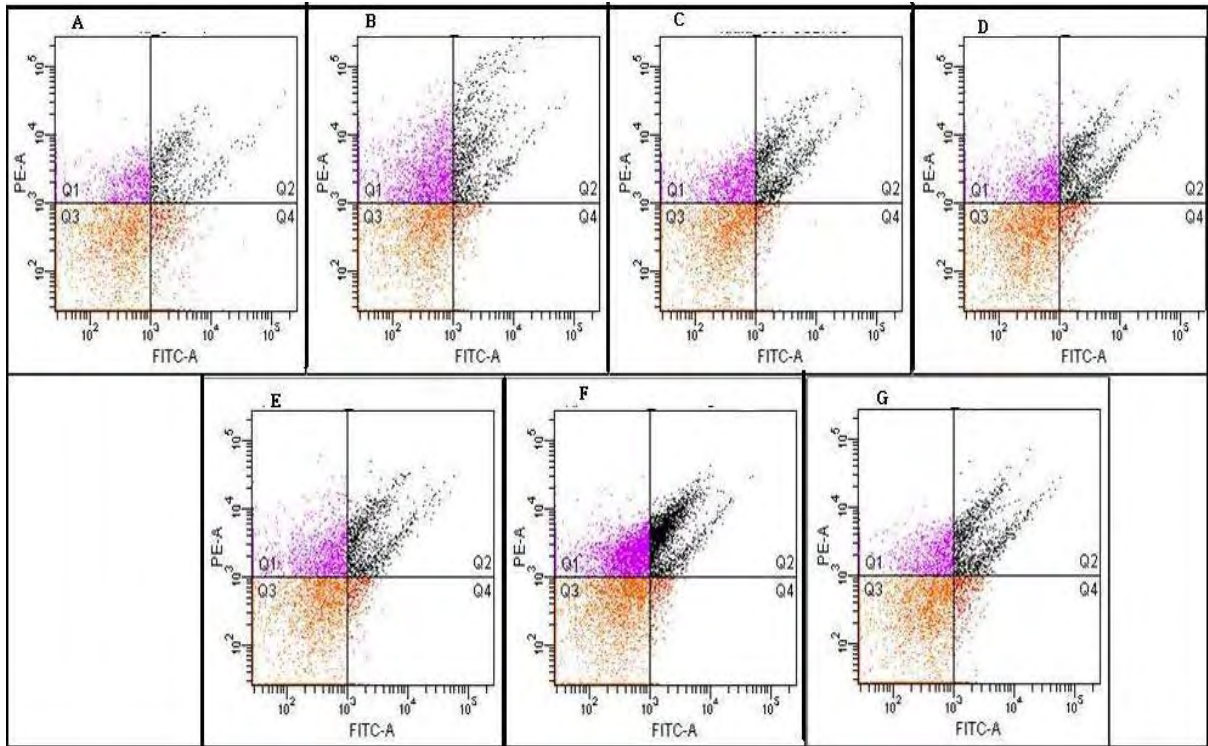


Figura 18. Visualização e identificação dos vírus CSDaV e CTV por citômetro Facs Canto e os parâmetros analisados pelo software versão Diva: Amostras positivas para CSDaV e negativas para CTV no quadrante superior esquerdo Q1. Amostras apresentando dupla positividade para CTV e CSDaV no quadrante superior esquerdo Q2 e amostras apresentando dupla negatividade para os respectivos vírus CTV e CSDaV no quadrante inferior esquerdo Q3. Sendo as amostras positivas para o vírus CTV e negativas para CSDaV no quadrante inferior direito Q4.

Tabela 2. Estatística da visualização e identificação das amostras **A, B, C, D, E, F e G** de plantas com CTV e CSDaV por citômetro Facs Canto, parâmetros analisados pelo software versão Diva

POPULAÇÃO (10.000 eventos)	PORCENTAGEM (%)
A. Q1 (FITC - PI +)	4,0%
A. Q2 (FITC + PI +)	35,0%
A. Q3 (FITC - PI -)	17,7%
A. Q4 (FITC + PI-)	46,9%
B. Q1 (FITC - PI +)	8,0%
B. Q2 (FITC + PI +)	42,7%
B. Q3 (FITC - PI -)	10,8%
B. Q4 (FITC + PI-)	45,7%
C. Q1 (FITC - PI +)	2,2%
C. Q2 (FITC + PI +)	31,1%
C. Q3 (FITC - PI -)	22,6%
C. Q4 (FITC + PI-)	44,0%
D. Q1 (FITC - PI +)	2,7%
D. Q2 (FITC + PI +)	19,0%
D. Q3 (FITC - PI -)	44,9%
D. Q4 (FITC + PI-)	33,4%
E. Q1 (FITC - PI +)	9,0%
E. Q2 (FITC + PI +)	48,3%
E. Q3 (FITC - PI -)	8,4%
E. Q4 (FITC + PI-)	42,5%
F. Q1 (FITC - PI +)	5,1%
F. Q2 (FITC + PI +)	35,3%
F. Q3 (FITC - PI -)	14,4%
F. Q4 (FITC + PI-)	44,1%
G. Q1 (FITC - PI +)	7,1%
G. Q2 (FITC + PI +)	20,3
G. Q3 (FITC - PI -)	42,3%
G. Q4 (FITC + PI-)	30,2%

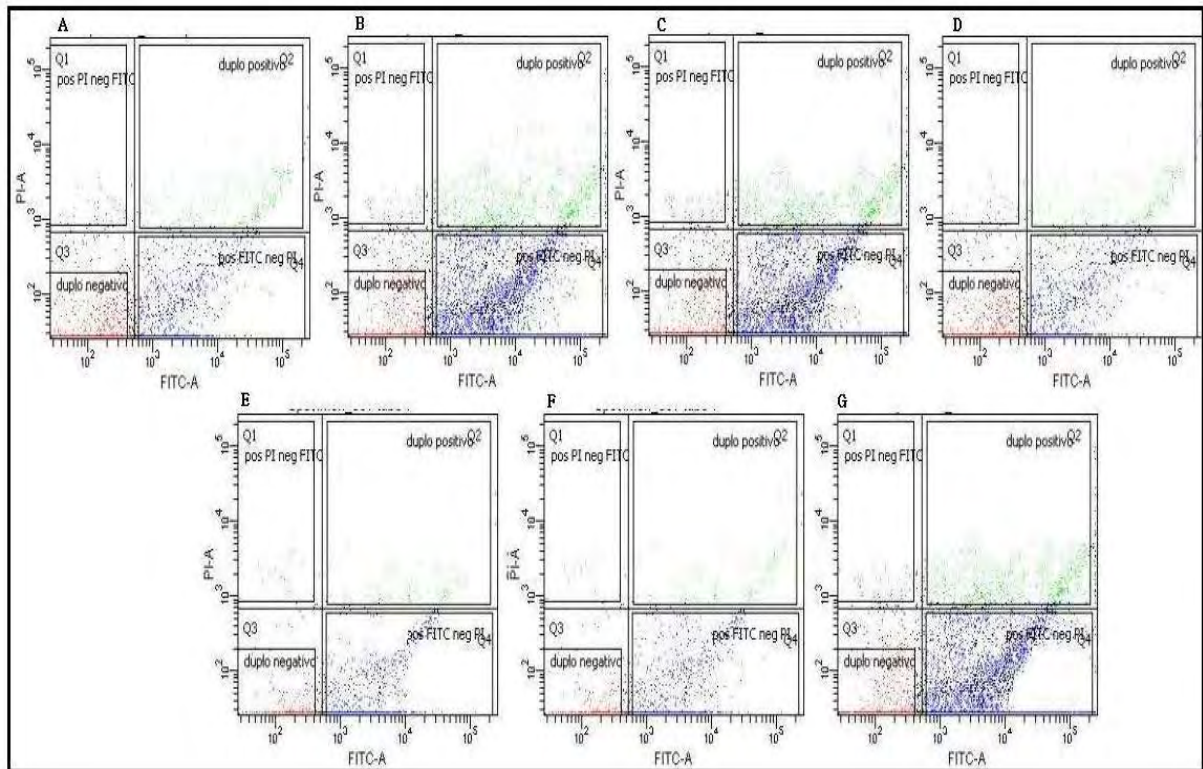


Figura 19. Separação dos vírus CSDaV e CTV por citometria de fluxo : (A), (B), (C), (D), (E), (F) e (G) amostras contendo ambos os vírus CSDaV e CTV, separadas em citômetro FACS Aria acoplado com o software Diva versão 6.1.1, onde as partículas apresentam-se separadas em quadrantes para posterior realização dos “sorting”, obtendo duas frações: sendo uma relativa a partículas de CSDaV presentes no quadrante Q1 e outra relativa a partículas de CTV localizadas no quadrante Q4.

Tabela 3. Estatística da separação das amostras **A, B, C, D, E, F e G** de plantas com CTV e CSDaV por citômetro Facs Aria, parâmetros analisados pelo software versão Diva, versão 6.1.1

POPULAÇÃO (10.000 eventos)	PORCENTAGEM (%)
A. Q1 (FITC - PI +)	3,7%
A. Q2 (FITC + PI +)	27,3%
A. Q3 (FITC - PI -)	45,0%
A. Q4 (FITC + PI-)	22,8%
B. Q1 (FITC - PI +)	4,1%
B. Q2 (FITC + PI +)	14,0%
B. Q3 (FITC - PI -)	39,4%
B. Q4 (FITC + PI-)	33,5%
C. Q1 (FITC - PI +)	4,0%
C. Q2 (FITC + PI +)	14,1%
C. Q3 (FITC - PI -)	33,1%
C. Q4 (FITC + PI-)	41,0%
D. Q1 (FITC - PI +)	5,0%
D. Q2 (FITC + PI +)	17,1%
D. Q3 (FITC - PI -)	30,2%
D. Q4 (FITC + PI-)	40,3%
E. Q1 (FITC - PI +)	2,8%
E. Q2 (FITC + PI +)	30,5%
E. Q3 (FITC - PI -)	41,1%
E. Q4 (FITC + PI-)	21,7%
F. Q1 (FITC - PI +)	1,9%
F. Q2 (FITC + PI +)	13,3%
F. Q3 (FITC - PI -)	30,0%
F. Q4 (FITC + PI-)	47,1%
G. Q1 (FITC - PI +)	3,1%
G. Q2 (FITC + PI +)	13,5%
G. Q3 (FITC - PI -)	30,5%
G. Q4 (FITC + PI-)	47,1%



Figura 20. PCR do Q1 para CSDaV: Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CSDaV, isolado no Q1, utilizando o CSDaV – Primer C1-esp-For. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Correspondente a amostra submetida à PCR. Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 472 pb esperadas

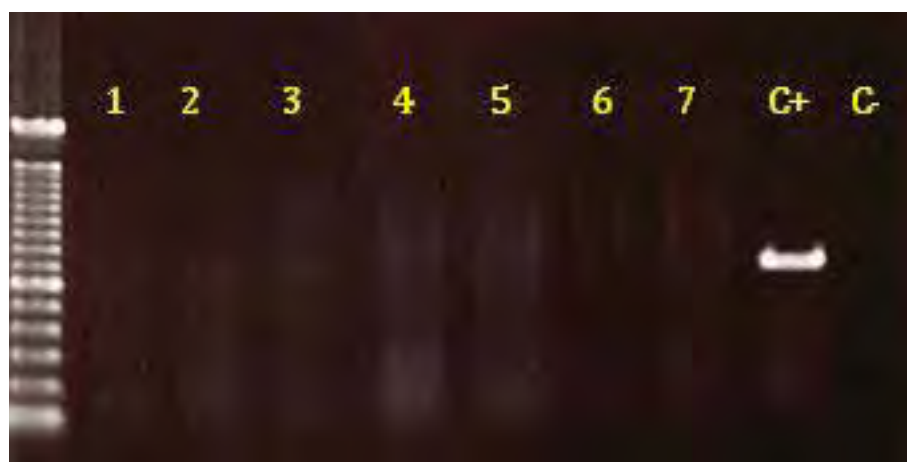


Figura 21. PCR do Q1 para CTV: Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CTV, da amostra do Q1, utilizando CTV – Primer CN119 e CN120. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Isolado correspondente a amostra submetida à PCR. (-) Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 601pb esperadas.

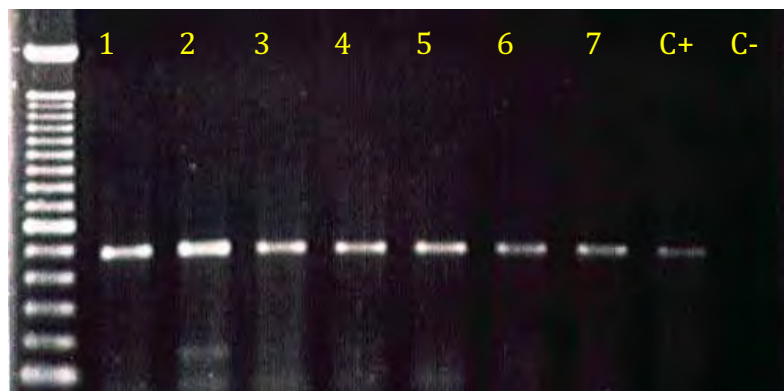


Figura 22. PCR do Q2 para CSDaV: Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CSDaV, isolado no Q2, utilizando o CSDaV – Primer C1-esp-For. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Correspondente a amostra submetida à PCR. Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 472 pb esperadas.

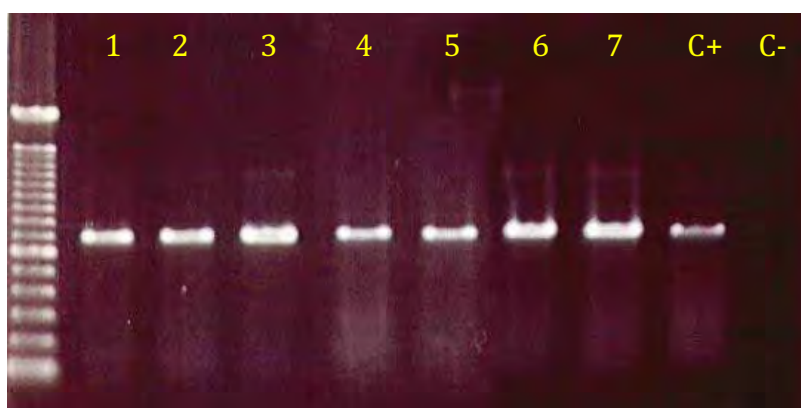


Figura 23. PCR do Q2 para CTV Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CTV, isolado no Q2, utilizando CTV – Primer CN119 e CN120. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Isolado correspondente a amostra submetida à PCR. (-)Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 601pb esperadas.



Figura 24. PCR do Q3 para CSDaV: Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CSDaV, isolado no Q3, utilizando o CSDaV – Primer C1-esp-For. PM: padrão de peso molecular de 100pb. correspondente a amostra submetida à PCR. Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 472 pb esperadas.

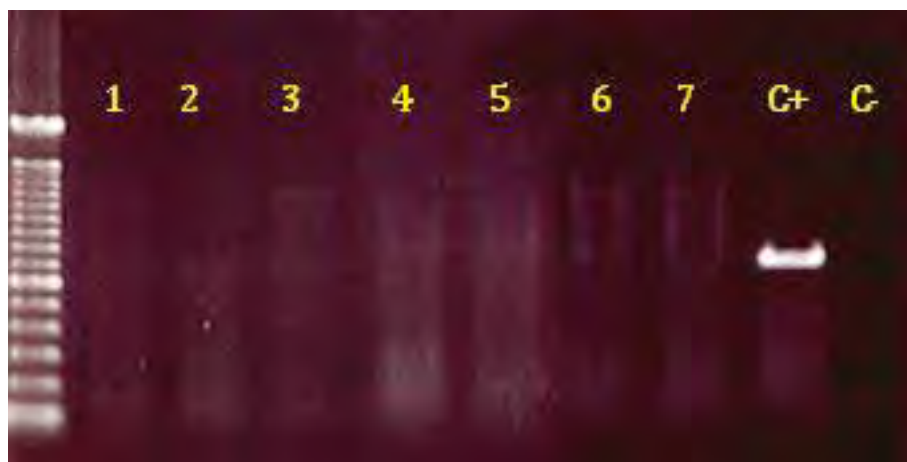


Figura 25. PCR do Q3 para CTV Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CTV, isolado no Q3, utilizando CTV – Primer CN119 e CN120. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Isolado correspondente a amostra submetida à PCR. (-) Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 601pb esperadas.



Figura 26. PCR do Q4 para CSDaV: Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CSDaV, isolado no Q4, utilizando o CSDaV – Primer C1-esp-For. PM: padrão de peso molecular de 100pb. correspondente a amostra submetida à PCR. Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 472 pb esperadas.



Figura 27. PCR do Q4 para CTV Gel de Agarose a 1,2% corrido em TAE 1x mostrando os resultados da reação de PCR para CTV, isolado no Q4, utilizando CTV – Primer CN119 e CN120. PM: padrão de peso molecular de 100pb. Isolado correspondente a amostra submetida à PCR. (-)Controle negativo, reação realizada na ausência de DNA complementar. (+): Controle positivo. Bandas observadas de aproximadamente 601pb esperadas

Tabela 4. Resultado da RT-PCR das amostras separadas por citometria de fluxo obtidas em cada um dos quadrantes originados pelos gráficos em dot plot.

Quadrante	Fluorocromo		RT-PCR	
	PI	FITC	CTV	CSDaV
Q1	+	—	—	+
Q2	+	+	+	+
Q3	—	—	—	—
Q4	—	+	+	—

5. DISCUSSÃO

Pela purificação tradicional empregada com amostras de plantas afetadas pela MSC, obtêm-se simultaneamente partículas de CTV e CSDaV, demonstrando essa técnica não ser útil na purificação do CSDaV. Pelo uso da metodologia desenvolvida neste trabalho através da citometria de fluxo, obteve-se o purificado de CSDaV. O citômetro consegue separar populações presentes em amostras com uma pureza de até 98%. (BERTHO, 2000). Pelo fato das amostras não sofrerem qualquer dano durante a separação, a população obtida pode ser posteriormente utilizada em qualquer outro ensaio experimental “in vitro” ou “in vivo”, já que todo o processo pode ser feito sob condições estéreis. Sendo assim, uma das principais vantagens apresentadas pela citometria é a possibilidade de se analisar um grande número de células rapidamente promovendo estatisticamente dados significativos. (MARIE et al., 1999).

O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para avaliação da emissão de fluorescência das células (FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*) (ROITT et al., 1999). Alguns citômetros são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as características citométricas, como o FACS Aria usando laser de argônio de 15mW de potencia e excitação igual à 488nm Becton Dickinson Biosciences os parâmetros foram analisados pelo software Sorter FACS Diva Version 6.1.1. utilizado nesse trabalho para a efetiva separação dos vírus CTV e CSDaV presentes em plantas cítricas apresentando MSC.

Quanto as amostras agrupadas no quadrante inferior esquerdo (Q3), observamos que quanto mais próximas do eixo y maior negatividade para ambos os

corantes e ambos os vírus apresentaram. Essa negatividade pode ocorrer pelo fato de mesmo se cumprindo todas as etapas relacionadas a purificação, restos celulares vegetais ainda existem na amostra, aos quais, nenhum dos fluorocromos se liga, fazendo com que se tenha amostras então negativas para ambos os vírus ou mesmo partículas virais com características de tamanho e granulosidade diferentes das partículas virais completas de CTV e CSDaV, das quais nenhum dos fluorocromos reconhece e se liga, ou mesmo se ligam mais o tamanho e granulosidade ou complexibilidade interna diferem das partículas padrões.

A análise do quadrante inferior direito (Q4) apresenta positividade para FITC e negatividade para PI, ou seja, positividade para o vírus CTV e negatividade para o vírus CSDaV. Sendo que quanto mais próximas as partículas estiverem no Q4 do eixo x maior número de partículas virais de CTV estavam presentes na amostra.

Observou-se através dos dados estatísticos apresentados nas tabelas 2 e 3 referentes a citometria de fluxo, uma maior quantidade de partículas virais relacionadas ao CTV do que ao CSDaV. Para aumentar a pureza do purificado obtido um novo “sorting”, pode ser feito a partir do material de cada quadrante (ROITT et al., 1999).

A metodologia relacionada a citometria de fluxo, apesar do alto custo e da necessidade de técnicos especializados, permite uma análise rápida, eficiente e quantitativa de partículas em suspensão. Esta técnica emergente já tem ampla aplicação na hematologia veterinária (PEREIRA, 2007) e, na conjugação e validação de controle isotópico de IGG associado ao FITC (GOLIN, 2007).

Durante o processo de purificação quando reduzimos o tempo de preparo, obtivemos uma amostra composta basicamente por vírus, proteínas vegetais,

polissacarídeos, ribossomos e restos celulares, estes componentes não influenciaram na visualização das partículas virais, porém interferiram no processo de separação viral realizado no citômetro, provavelmente pelo fato de haver partículas com tamanho superior a 50 micrômetros, o que inviabiliza o processo de separação através de citometria de fluxo, sendo necessário então o cumprimento de todas as etapas da purificação para a realização do “sorting”.

Quando procedeu-se somente a visualização dos vírus de importância fitopatológica em citros CTV e CSDaV, pelo citometro, a purificação das amostras contendo CTV e CSDaV e somente CTV, pode ser feita em tempo reduzido através da eliminação da segunda parte da purificação, sem qualquer alteração significativa dos resultados, tornando assim o tempo empregado e os custos para realização dos experimentos menor

As amostras de CTV e CSDaV e CTV sem fluorocromo, não apresentaram fluorescência, sendo um indicativo de sua compatibilidade como os fluorocromos específicos utilizados nesse trabalho. A avaliação da intensidade de fluorescência ocorre para detecção de antígenos de superfície diferentes, marcados com anticorpos específicos ligados a compostos químicos fluorescentes ou fluorocromos (GRINDEM, 1996).

Os fluorocromos PI e Syber Gold marcaram os ácidos nucléicos de ambos os vírus CTV e CSDaV. Sendo o Iodeto de Propídeo um corante com elevado peso molecular que se liga a ácidos nucléicos, apresentando excitação com laser argônio a 488nm e emissão de fluorescência de 563 a 623nm. (HAUGLAND, 1996).

Estudos demonstraram que o corante Syber Gold é o mais específico para marcação de ácidos nucléicos (DNA e RNA), quando comparado com Syber Green I

e Syber Green II resultando em uma fluorescência maior, e melhores condições quanto ao armazenamento, condicionamento e marcação de ambos os fluorocromos. (CHEN et al., 2001; BRUSSAARD, 2004). Neste trabalho através dos resultados obtidos pela análise dos gráficos e pela análise de variância de Friedman também pode ser comprovada sua maior eficácia frente ao fluorocromo PI. Entretanto como a emissão de fluorescência relativa ao fluorocromo Syber Gold é de 537nm e a emissão de fluorescência de FITC é de 527nm, não foi possível a utilização de ambos em uma mesma amostra pois ocorreria muita interferência de sinal o que inviabilizaria os resultados obtidos pela citometria. Portanto, mesmo apresentando uma menor eficiência frente ao fluorocromo Syber Gold o iodeto de propídeo foi o fluorocromo utilizado para a separação das amostras virais, por possuir emissão de fluorescência de 623nm não causando nenhuma interferência de sinal quando associado ao uso dos anticorpos conjugados com FITC.

O fluorocromo PI, sendo o mais utilizado em citometria de fluxo por ser de grande eficiência, de baixo custo, além de fácil preparação (DOLEZEL, 1997), foi empregado para marcar os ácidos nucleicos virais CSDaV, enquanto o FITC foi conjugado ao anticorpo anti CTV, sendo possível desta forma a detecção de ambos os vírus. A metodologia apresentada neste trabalho usando citometria de fluxo permitiu resultados inéditos de separação dos vírus CTV e CSDaV em amostras distintas, o que foi comprovado através da RT-PCR .

A purificação do CSDaV é um pré-requisito para se fechar os postulados de Koch necessários para o estabelecimento da relação causal entre a doença MSC e o agente patogênico.

Além do CSDaV, o CTV, vírus da família *Closteroviridae*, responsável pela tristeza dos citros, também é considerado um possível agente causal da MSC (GOMES, et al., 2008). Caso se confirme que a MSC seja transmitida por afídeo, não se pode desconsiderar a possibilidade de o CSDaV estar usando o CTV como *helper* para transmissão da doença (ROMÁN et al., 2004), visto que o CTV é transmitido por várias espécies de afídeos, os quais são encontrados comumente em plantas cítricas. Sendo assim a presença do CTV pode ser necessária para que o CSDaV seja transmitido por afídeo, como é o caso do *Potato aucuba mosaic vírus* (PAMV), um potexvirus, que pode ser transmitido por afídeo a partir de plantas co-infectadas com um potyvirus, *Potato vírus A* ou *Potato vírus Y*, mas não a partir de plantas infectadas apenas com PAMV (KASSANIS, 1961). Outro exemplo é o *Groundnut rossete vírus* (gênero *Umbravirus*) que depende do *Groundnut rossete assistor vírus* para ser transmitido por afídeo (MURANT, 1990). Apesar da maioria dos marafivírus infectarem principalmente nonocotiledôneas, o CSDaV afeta laranjeiras, que são dicotiledôneas (BARROS, 2006)

Visto que o CSDaV utiliza a maquinaria da célula vegetal para expressar suas proteínas virais, a CP é naturalmente expressa sob condições eucarióticas. (BARROS, 2006) Assim o anticorpo a ser utilizado no diagnóstico do vírus deve ser capaz de reconhecer a proteína natural viral podendo ser este anticorpo confeccionado a partir do purificado de CSDaV obtido.

6. Conclusões

- A metodologia desenvolvida nesse trabalho através de citometria de fluxo, mostrou-se eficaz para separação dos vírus CTV e CSDaV.
- O fluorocromo Syber Gold apresentou-se mais eficiente para a marcação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) em comparação com o Iodeto de Propídeo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE CÍTRICOS. **Estatísticas**. 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>. Acesso em: 07 mar. 2009.

BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R. F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Ann. Ver. Phytopathol.**, v. 27, p. 291-316, 1989.

BARRET, H. C.; RHODES, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. **Syst. Botany**, v.1, p.105-136, 1976.

BARROS, C. C. P. **Sequenciamento do genoma completo e expressão heteróloga da capa protéica do marafivirus associado à morte súbita dos citros**. 2006. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Facul, Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2006.

BASSANEZI, R. B. No mesmo lugar. **Rev. Fundecitrus**, v. 22, n. 136, p. 6-7, nov./dez. 2006.

BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; GIMENES-FERNANDES, N. Progresso dos sintomas de "Morte Súbita" em pomares de laranjeiras "Valencia" e "Pêra". In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 25., 2002, Espírito Santo do Pinhal. **Programa e resumos...** Espírito Santo do Pinhal: Grupo Paulista de Fitopatologia/ SBF, 2002, p. 25-42.

BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN 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**, v. 93, p. 502-512, 2003.

BD MEDICAL SUPPLIED. **BioDicas**. Disponível em: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=5693>>. Acesso em: 23 abr. 2010

BERTHO, A. L. **Citometria de fluxo**: história da citometria de fluxo. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002. 10 p. Apostila.

BOTEON, M.; NEVES, E. M. Citricultura brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo / Fundag, 2005. Cap. 2, p.19-36

BRUSSAARD, C. P. D. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 1506-1513, 2004.

BRUSSAARD, C. P. D.; MARIE, D.; BRATBAK, G. Flow cytometric detection of viruses. **J. Virol. Methods**, v. 85, p.175-182, 2000.

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**, v. 98, p.1084-1092, 2008.

CHEN, F.; LU, J. R.; BINDER, B. L.; LIU, Y. C.; HODSON, R. E. Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR Gold. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 539-545, 2001.

DAVIS, F.; ALBRIGO, L. **Citrus**. Wallingford: CAB Internacional, 1994. 245 p.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **J. Appl. Genet.**, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JUNIOR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual de morte súbita dos citros**. Araraquara, 2006. p. 1-11.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: 2007 <<http://www.fundecitrus.com.br>> Acesso em: 12 mar. 2008.

GARNSEY, S. M.; LEE, R. F. Tristeza. In: WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. **Compendium of citrus diseases**. St. Paul: APS Press, 1989. p. 48-50.

GASOL, J. M.; ZWEIFEL, U. L.; PETERS, F.; FURHMAN, J. A.; HAGSTROM, A. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4475-4483, 1999.

GIACOMETTI, D. C. Taxonomia das espécies cultivadas de citrus baseada em filogenética. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.). **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Gargil, 1991. v. 1, p.99-115.

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

GIMENES-FERNANDES, N.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J. Árvores de limoeiro 'Cravo' não mostram sintomas de "morte súbita" em área afetada. **Summa Phytopathol.**, v. 28, p. 72, 2002.

GOLIM, M. A.; DEFFINE, E.; FERREIRA, R. R. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 04, p. 361-368, 2007.

GMITTER JUNIOR, F. G.; HU, X.L. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). **Economic Botany**, v. 44, p. 267-277, 1990.

GOMES, C P; NAGATA, T.; JESUS JUNIOR, W. C.; BORGES NETO, C.R.; PAPPAS JR, G.J. ; MARTIN, D.P. Genetic variation and recombination of RdRp and HSP 70h genes of Citrus tristeza virus isolates from orange trees showing symptoms of citrus sudden death disease. **Virolog. J.**, v. 5, p. 1-7, 2008.

GRINDEM, C. B. Blood cell markers. Veterinary clinics of North America: small animal practice. **Philadelphia**, v. 26, n. 5, p.1043-1065, 1996 .

HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes**. Eugene: Molecular Probes 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA**: banco de dados agregados. 2008. Disponível em: <<http://www.sidraibge.gov.br>>. Acesso em: 31 jan. 2009.

INTRODUÇÃO A CITOMETRIA DE FLUXO. **Manual de Treinamento**, n. 11, p. 1-19, 2000.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. **Fitopatol. Brasil**, v. 29, p. 399-405, 2004.

JESUS JUNIOR, W. C.; BASSANEZI, R. B.; BERGAMIN FILHO, A. **Morte súbita dos citros ainda tem origem desconhecida**. *Visão Agrícola*, n. 2, p. 34-39, 2004.

KASSAMIS, B. The transmission of aucuba mosaic virus by aphid from plants also infected by potato virus A or Y. **Virology**, v. 13, p. 93-97, 1961.

LANGE, M.; GUILLOU, L.; VAULOT, D.; SIMON, N.; ARMANN, R. I.; LUDWIG, W.; MEDLIN, L. K. Identification of the class Prymnesiophyceae and the genus *Phaeocystis* with ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes detected by flow cytometry. **J. Phycol.**, v. 32, p. 58-868, 1996.

LEBARON, P.; SERVAIS, P.; AGOGUE, H.; COURTIES, C.; JOUX, F. Does the high nucleic acid content of individual bacterial cells allows us to discriminate between active cells and inactive cells in aquatic systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 775-1782, 2001.

LINDSTRÖM, E.; WEISSE, T.; STADLER, P. Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. **J. Microbiol. Methods**, v. 9, p. 173-182, 2002.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C.; PIAZZA, J. P.; KAMLA, R. F. Identification and genomic characterization of a new virus Tymoviridae family associated with citrus Sudden death disease. **J. Virol.**, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.

MACHADO, M. A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A. M.; OLIVEIRA, A. C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico / Fundag, 2005. Cap.9, p. 223-277.

MURANT, A. F. Dependence of Groundnut roset virus on its satellite RNA as well as on Groundnut roset assistor luteovirus for transmission by *Asphis craccivora*. **J. Gen. Virol**, v. 71, p. 2163-2166, 1990.

MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença 'tristeza' dos citros. **O Biológico**, v. 12, p. 285-287, 1946.

MARIE, D.; PARTENSKY, F.; JACQUET, S.; VAULOT, D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic-acid dye SYBR Green I. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.186-193, 1997.

MARIE, D.; BRUSSAARD, C.; BRATBAK, G.; VAULOT, D. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 45-52, 1999.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. Citrus tristeza vírus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Mol.Plant Pathol.**, v. 9, p. 251-268, 2008.

MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças causadas por vírus, viroides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAZ, F.; POMPEU JUNIOR, J.; AMARO, A. A. (Ed.) **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargil, 1991. p. 735-762.

MULLER, G. W.; RODRIGUEZ, O.; COSTA, A. S. A Tristeza vírus complex severe to sweet Orange varieties. In: INTERNATIONAL ORGANIZATION CITRUS VIROLOGY, 4., 1966, Roma. **Proceedings...Gainesville**: University of Florida Press, 1968. p. 64-71.

MULLER, G. W.; TARGON, M. L. P. N.; CARVALHO, S. A.; SOUZA, A. A.; RODRIGUEZ, J. C. V. Doenças de citros causadas por vírus e viroides. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: IAC; Fundag, 2005. Cap,19, p.569-604.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; TROMBIN, V. G.; AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; JANK, M. S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 2007. 110 p.

NICOLOSI, E.; DENG, Z. N.; GENTILE, A.; LA MALFA, S.; CONTINELLA, G.; TRIBULATO, E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theor. and Ap. Genetics**, v. 100, p. 1155-1166, 2000.

PEREIRA, J.; BROCARDÓ-LIMA, G. A.; BEITLER, B. Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 29, n. 2, p. 109-113, 2007.

PORTER, J.; DEERE, D.; PICKUP, R.; EDWARDS, C. Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology. **Cytometry**, v. 23, p. 91-96, 1996.

PRESTES R. A.; COLNAGO L. A.; FORATO L. A.; CARRILHO E.; BASSANEZI R. B.; WULFF N. A. Nuclear magnetic resonance characterization of metabolite disorder in orange trees caused by citrus sudden death disease. **Mol. Pl.Path.** v. 10, n. 1, p. 51-57, 2009.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. 424 p.

ROMÁN, M. P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F. O. A.; ALVES, E.; KITAJIMA, E. W.; YAMAMOTO, P. T.; BASSANEZI, R. B.; TEIXIERA, 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. **Pl. Dis.**, v. 88, p. 453-467, 2004.

ROSE, J. M.; CARON, D. A.; SIERACKI, M. E.; POULTON, N. Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry. **Aquat. Microbiol. Ecol.**, v. 34, p. 263-277, 2004.

ROY, A.; RAMACHANDRAN, P. Bi-directional PCR - a tool for identifying strains of *citrus tristeza virus*. **Indian Phytopathology**, v. 55, n. 02, p.182-186, 2002.

SILVA, T.L; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on line em bioprocessos. **Bol. Biotecnol.**, v. 80, p. 32-40, 2005.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.; BATCHELOR, L. [eds.] **The Citrus Industry**, Vol. 1. p. 190 – 430. University of California: USA, 1967.

TOZATTI, G. Novas tecnologias aperfeiçoam a citricultura. **Agriannual 2007**: anuário da agricultura brasileira, p. 284-285, 2007.

UNITED STATES OF AMERICA. Department of Agriculture. **Brazil citrus annual 2008 – GAIN Report BR8021**. 2008. Disponível em: <<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 20 fev. 2009.