



2015

Paulo Ricardo dos Santos Baptista Avaliação Fitossanitária da presença de CTV em viveiros de citrinos na região de Coimbra



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação Fitossanitária da presença de CTV em viveiros de citrinos na região de Coimbra



Paulo Ricardo dos Santos Baptista

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação Fitossanitária da presença de CTV em viveiros de citrinos na região de Coimbra

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal (Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra).

Paulo Ricardo dos Santos Baptista

2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Doutor António Portugal pela oportunidade de realizar este trabalho e também pela orientação, disponibilidade, confiança e dedicação.

À Diana Paiva e Raquel Marques do Fitolab pelos ensinamentos, amizade, simpatia e companheirismo de todos os dias no laboratório, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

A todos os que ajudaram no processamento de amostras quando o número destas não parava de aumentar.

A todo o corpo docente do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal, a quem devo mais este passo da minha formação.

A todos os colegas do Mestrado que desde o primeiro dia me fizeram sentir acolhido na Universidade de Coimbra.

A toda a minha família por ser a constante positiva da minha vida, em especial à minha mãe pelo sacrifício, educação e carinho.

À minha namorada Vânia Sofia pelo amor, apoio e motivação durante mais esta etapa da minha vida.

Muito Obrigado a todos!

RESUMO

O *Citrus tristeza virus* (CTV), pertencente à família *Closteroviridae*, ao género *Closterovirus* é um agente de quarentena A2 causador de várias doenças com impactos dramáticos nas culturas de *Citrus*, uma das espécies frutícolas mais importantes a nível mundial. Este vírus teve origem no sudeste asiático e revelou-se assintomático até ao começo do uso generalizado de *Citrus aurantium* como porta-enxertos na propagação das variedades comerciais de *Citrus*. Os meios de transmissão mais comuns deste vírus são a enxertia com borbulhas infetadas e a disseminação através de afídeos (insetos vetores), sendo o mais eficaz o *Toxoptera citricidus* Kirkaldy. Este vírus tem um impacto negativo bastante importante na actividade viveirista, ao diminuir significativamente a produção de árvores e de frutos, podendo em casos extremos e em caso de estirpes muito agressivas provocar a morte das plantas. Este impacto pode ser atenuado através da utilização dos porta-enxertos *Poncirus trifoliata* e o híbrido Carrizo na propagação de variedades, visto que são tolerantes ao vírus. Foi detetado em Portugal pela primeira vez em 1988 e é na zona do Algarve que tem provocado mais perdas, visto que é zona onde há maior produção de fruto a nível nacional. Desde então tornou-se obrigatório por lei a certificação de borbulhas para enxertia e das plantas de viveiro para venda. Este estudo teve então como objectivo avaliar a ocorrência deste vírus na região de Coimbra, visto que existe uma grande actividade viveirista na zona e por isso, a disseminação do vírus pode levar a perdas económicas bastante grandes se não for correctamente monitorizada. Para isso foram analisadas amostras de vários viveiros de diversos produtores da região, através do diagnóstico pelas técnicas de *Immunoprinting* e RT-PCR de imunocaptura, seguindo os standards da EPPO. Não foram encontrados quaisquer positivos para CTV neste estudo, o que não indica necessariamente que ele não esteja presente, visto que existem já registos da sua ocorrência na região. É contudo necessário continuar a recorrer à certificação do material vegetal para se obter mais informação e continuar as boas práticas no cultivo de citrinos para evitar a disseminação do vírus e reduzir os impactos que esta possa vir a ter.

Palavras-chave: análise; certificação; citrinos; CTV

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV), from the *Closterovirus* genus and Closteroviridae family is an A2 quarantine agent of a devastating epidemics on *Citrus* culture around the world. This virus originated in southeast asia and has proved to be asymptomatic until the widespread of *Citrus aurantium* as rootstock in the propagation of commercial *Citrus* varieties. The most common means of transmission of the virus is the grafting with infected budwood and dissemination via aphids (vetor insects), *Toxoptera citricidus* Kirkaldy being the most effective. This virus has a very important negative impact on the citrus growing industry by reducing the production of trees and fruits, which can in extreme cases cause plant death with severe virus strains. This impact can be mitigated through the use of the tolerant rootstocks *Poncirus trifoliata* and the hybrid Carrizo in the grafting of commercial varieties. CTV was detected in Portugal in 1988 for the first time and it is in the Algarve region it has caused the most losses since it is the principal fruit production area in the country. Since then it became mandatory by law to certify budwoods used in grafting and the plants in nurseries before being sold. This study aimed to assess the occurrence of this virus in the Coimbra region since there's a large citrus growing industry in nurseries in the area and therefore, the spread of CTV can lead to large economic losses if not correctly monitorized. To that end numerous samples from different producers were analyzed through *immunoprinting* and imunocapture RT-PCR diagnosis, following the EPPO standards. Positives for CTV were not found in this study, which does not necessarily indicate that the virus isn't present in the area, since there are already records confirming it's existence in the region. It is however necessary to continue the certification of plant material to obtain more information on the subject and the good practices in citriculture to prevent the spread of the virus and reduce the impact that it is likely to have.

Keywords: diagnosis; certification; citrus; CTV

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	12
1.1 – O vírus CTV.....	12
1.2 – História.....	14
1.2.1 – Origem.....	14
1.2.2 – Disseminação.....	14
1.3 – Patologia, sintomas e espécies afetadas.....	15
1.3.1 – <i>Tristeza</i>	16
1.3.2 – <i>Stem Pitting</i>	16
1.3.3 – <i>Seedling Yellows</i>	17
1.4 – Diagnóstico de CTV.....	18
1.4.1 – Passado e presente.....	18
1.4.2 – Amostragem.....	20
1.5 – Controlo e Certificação.....	21
1.5.1 – Quarentena e monitorização.....	21
1.5.2 – Tolerância e resistência.....	21
1.5.3 – Proteção cruzada.....	22
1.5.4 – Certificação.....	23
1.6 – CTV em Portugal.....	23
1.7 – Objetivos.....	25
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 – Material vegetal.....	27
2.1.1 – Recolha e transporte.....	27
2.1.2 – Amostras.....	27
2.2 – Metodologia.....	37
2.2.1 – <i>Immuno-Tissue Printing</i>	37
2.2.1.1 – <i>Membrane Printing</i>	37

2.2.1.2 – Bloqueio da membrana.....	38
2.2.1.3 – Adição de anticorpos	39
2.2.1.4 – Lavagem das membranas	39
2.2.1.5 – Desenvolvimento das membranas	39
2.2.1.6 – Leitura das membranas.....	39
2.2.2 – IC-RT-PCR.....	39
2.2.2.1 – Macerados e Centrifugação	39
2.2.2.2 – Imunocaptura.....	40
2.2.2.3 – RT-PCR.....	40
2.2.2.4 – Eletroforese dos produtos de RT-PCR	42
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.1 – Caracterização da amostragem.....	44
3.2 – Resultados do immunoprinting	44
3.3 – Resultados do IC-RT-PCR.....	46
4 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	50
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
5.1 – Livros e Artigos.....	53
5.2 – Referências online	60
5.3 – Referências de imagens.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1 – Electro fotomicrografia de partículas purificadas do vírus tristeza coradas negativamente com formato de uranil. A barra representa 100 nm [1].</u>	13
<u>Figura 2 – (A) Infestação de uma planta pelo inseto vetor <i>Toxoptera citricidus</i>, (B) indivíduos adultos em detalhe [2].</u>	13
<u>Figura 3 – Distribuição mundial de <i>Citrus tristeza virus</i> até 2006 [3].</u>	15
<u>Figura 4 – Sintomas de rápido declínio, <i>stem pitting</i> e <i>seedling yellows</i> induzidos por CTV em diferentes variedades e porta-enxertos. (A) Rápido declínio em estado avançado de <i>C. sinensis</i> propagada em <i>C. aurantium</i>, (B) diferentes fases da doença de rápido declínio, (C) (G) <i>stem pitting</i> em troncos de citrinos, (D) frutos com dimensões reduzidas provenientes de <i>Poncirus trifoliata</i> afectada por <i>stem pitting</i> (direita) em comparação com um fruto de uma árvore saudável (esquerda), (E) crescimento curvo e folhas amareladas em <i>C. aurantium</i> com <i>seedling yellows</i>, (F) (H) amarelecimento das veias foliares resultado de <i>seedling yellows</i> [4].</u>	17
<u>Figura 5 – Esquema de deteção e identificação de <i>Citrus tristeza virus</i> [5].</u>	20
<u>Figura 6 – Exemplo de uma amostra embalada em saco plástico, com respetiva identificação.</u>	27
<u>Figura 7 – Diferentes passos da realização da técnica de immunoprinting. (A) Amostra numa folha de papel antes de ser efetuado o corte, (B) amostra após corte com bisturi com os tecidos expostos, (C) realização da impressão dos tecidos expostos na membrana de nitrocelulose.</u>	38
<u>Figura 8 – Membranas de nitrocelulose na tina antes do início do bloqueio.</u>	38
<u>Figura 9 - Parâmetros utilizados na reação de RT-PCR para diagnóstico de CTV.</u>	41
<u>Figura 10 – Esquema gráfico explicativo das diferentes etapas da RT-PCR de imunocaptura. (A) anticorpos aderem às paredes dos tubos após incubação, (B) possíveis partículas virais e restos vegetais existentes na amostra adicionados ao tubo revestido, (C) após incubação apenas as partículas virais ficam aderidas aos anticorpos específicos e os restantes restos vegetais são removidos pela lavagem, (D) adição da <i>mix</i> com todos os reagentes necessários à reação de RT-PCR ao tubo onde já se encontra o <i>template</i> a amplificar, (E) após realização de eletroforese dos produtos de RT-PCR faz-se a visualização dos resultados em gel de agarose por transiluminação UV [6].</u>	42
<u>Figura 11 - Foto parcial de uma das membranas após revelação, referente às amostras de viveiro "O Laranjeiro".</u>	45

Figura 12 - Gel de agarose obtido por eletroforese dos produtos de RT-PCR das amostras 89 (A1) e 153 (A2) dos viveiros António João Almeida Santos, com os controlos positivos (C+) e negativos (C-) e marcador molecular de 50 pb (M). 47

ÍNDICE DE TABELAS

<u>Tabela 1 – Viveiros “O Laranjeiro”</u>	28
<u>Tabela 2 – Viveiros José Maria Alexandre</u>	29
<u>Tabela 3 – Viveiros agrícolas “Citromondego”</u>	29
<u>Tabela 4 – Viveiros Albertino Carvalho & Filhos</u>	30
<u>Tabela 5 – Viveiros “Saro & Sacramento”</u>	31
<u>Tabela 6 – Viveiros Agrícolas Vicentes</u>	32
<u>Tabela 7 – Viveiros Norberto Ferreira dos Santos</u>	32
<u>Tabela 8 – Viveiros Jaime Quatorze Ferreira</u>	33
<u>Tabela 9 – Viveiros Plantosemide</u>	34
<u>Tabela 10 – Viveiros David Catorze do Amaral</u>	35
<u>Tabela 11 – Viveiros António Luís Quatorze Ferreira</u>	35
<u>Tabela 12 – Viveiros António João de Almeida Santos</u>	35
<u>Tabela 13 – Viveiros Plancei, Plantas do Ceira Unipessoal</u>	36
<u>Tabela 14 – Viveiros INPROPLANT</u>	36
<u>Tabela 15 – Número total de amostras</u>	37
<u>Tabela 16 – RT-PCR <i>mix</i></u>	41
<u>Tabela 17 – Listagem das amostras positivas para immunoprinting. Apenas foram listados os viveiros que apresentaram amostras positivas.</u>	45

LISTA DE ABREVIATURAS

- AVDC** – Associação de Viveiristas do Distrito de Coimbra
- BSA** – *Bovine Serum Albumin*
- cDNA** – DNA complementar
- CTV** – *Citrus tristeza virus*
- DAS** – *Double antibody sandwich*
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** – *Deoxyribonucleic acid*
- dNTP** - *Deoxynucleotide Solution Mix*
- DRAPC** – Direcção Regional de Agricultura e Pesca do Centro
- DTBIA** – *Direct Tissue Blot Immunoassay*
- ELISA** - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- EPPO** – *European and Mediterranean Plant Protection Organization*
- gRNA** – *RNA guide*
- IC** - Imunocaptura
- MgCl₂** – Cloreto de Magnésio
- OEPP** – *Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes*
- PBS** – *Phosphate-Buffered Saline*
- QD** – *Quick decline*
- RNA** – *Ribonucleic acid*
- RT-PCR** – *Reverse transcription – Polymerase chain reaction*
- SP** – *Stem pitting*
- SY** – *Seedling yellows*
- TBE** – Tris/Borato/EDTA
- [#]** – Referência de imagem

Capítulo I – Introdução

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O vírus CTV

Os vírus são estruturas núcleo-proteicas de pequenas dimensões, constituídas por uma ou mais moléculas de RNA ou DNA de cadeia simples ou dupla que se encontram geralmente envolvidas por uma capa proteica chamada cápside. Estes agentes não têm capacidade de se dividir, sendo que necessitam de um hospedeiro para se reproduzirem. Os vírus são agentes infecciosos porque utilizam substâncias do organismo hospedeiro durante a multiplicação, ocupam espaços e provocam a disrupção de alguns processos celulares. A capa proteica do vírus fornece protecção ao ácido nucleico e, apesar de não causar infeção, aumenta a capacidade de infeção pelo ácido nucleico, sendo a capacidade de infeção do vírus uma propriedade do seu genoma.

No caso particular da patologia em plantas, os vírus entram nas células destas através de feridas, através da deposição de um grão de pólen contaminado no óvulo ou através de vetores específicos que transportem o vírus. Já nas células, o RNA (ou DNA) é libertado da cápside e induz a célula a formar a RNA polimerase, uma enzima que utiliza o RNA do vírus como módulo para formar RNA complementar. Os vírus podem possuir RNA ou DNA ss (*single stranded* – cadeia simples), ds (*double stranded* – cadeia dupla) e a replicação pode ser + via polimerase ou – via transcriptase reversa.

O *Citrus tristeza virus* (CTV) (Fig. 1), pertencente à família *Closteroviridae*, ao género *Closterovirus* e ao grupo IV ((+)ssRNA) é um agente de quarentena A2 causador de várias doenças com impactos dramáticos nas culturas de *Citrus*, uma das espécies frutícolas mais importantes a nível mundial (OEPP/EPPO, 2004).

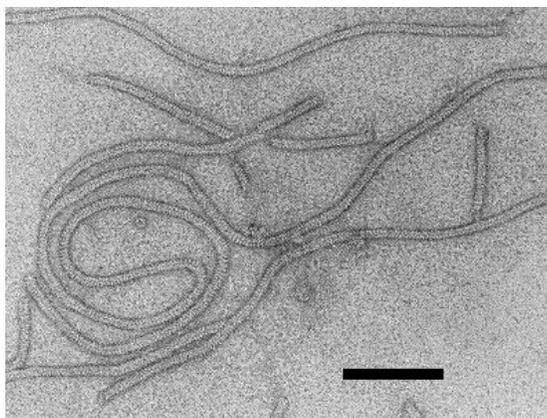


Figura 1 – Electro fotomicrografia de partículas purificadas do vírus tristeza coradas negativamente com formato de uranil. A barra representa 100 nm [1].

Na natureza o nicho ecológico deste vírus é restrito a células de floema de algumas espécies de dois géneros dentro da família Rutaceae (Moreno et al., 2008). A dispersão do CTV não é feita por semente (McClean, 1957) ocorrendo fundamentalmente através do transporte e propagação de plantas infetadas mas pode também ser disseminado através de várias espécies de afídeos, insetos vetores do CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Duran-Vila, Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). O afídeo mais eficaz na transmissão deste vírus é o *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (Brlansky *et al.*, 2003) (Fig. 2), existente em Portugal, detetado em citrinos no norte do país entre 2003 e 2005 (Ilharco *et al.*, 2005).



Figura 2 – (A) Infestação de uma planta pelo inseto vetor *Toxoptera citricidus*, (B) indivíduos adultos em detalhe [2].

1.2 – História

1.2.1 – Origem

O facto da maioria de espécies de *Citrus* cultivados nas suas próprias raízes (sem ser por enxertia) serem hospedeiros assintomáticos de CTV na natureza sugere que este vírus seja originário do Sudeste Asiático e do arquipélago Malaio (centros de origem), evoluindo em conjunto com as espécies de *Citrus* com o decorrer dos anos (Moreno et al., 2008). Como a dispersão do vírus não ocorre por semente, é provável que este tenha saído do centro de origem no final do século XIX através do transporte marítimo de plantas vivas para outras regiões do globo, visto que começou a haver maior interesse comercial em *Citrus* devido aos seus frutos (Roistacher, 1981). O transporte e interação do vírus com novas variedades e espécies de acolhimento sob diferentes condições ambientais e climáticas resultaram então na primeira grande dispersão do CTV (Moreno et al., 2008).

1.2.2 – Disseminação

Em 1836, uma epidemia de podridão do pé causada por oomycetes do género *Phytophthora* originária nos Açores e mais tarde alastrada a países mediterrânicos, dizimou plantações de *Citrus sinensis* (laranjeira) e *C. medica* (cidra) (Zaragoza, 2007). Este desastre forçou a propagação de variedades de citros por enxertia em *C. aurantium* (laranja azeda), por ser um porta-enxerto resistente a esta podridão, altamente adaptável a todos os tipos de solo e por produzir frutos de excelente qualidade (Moreno et al., 2008). *C. aurantium* tornou-se então o porta-enxerto praticamente exclusivo na área do Mediterrâneo e, em seguida, nos Estados Unidos (Moreno et al., 2008). Contudo, o uso de *C. aurantium* foi também o precursor do aparecimento de uma nova epidemia chamada tristeza, resultante da interação do CTV com um novo hospedeiro sensível criado comercialmente após propagação de *C. sinensis*, *C. reticulata* (tangerineira) e *C. paradisi* (toranjeira) neste porta-enxerto (Moreno et al., 2008). Esta epidemia acabou por proliferar um pouco por todo o mundo em todas as regiões produtoras de citrinos (Fig. 3), resultando então numa perda

enorme para a indústria, estimando-se que se tenham perdido mais de 100 milhões de árvores em todo o mundo (Moreno et al., 2008).

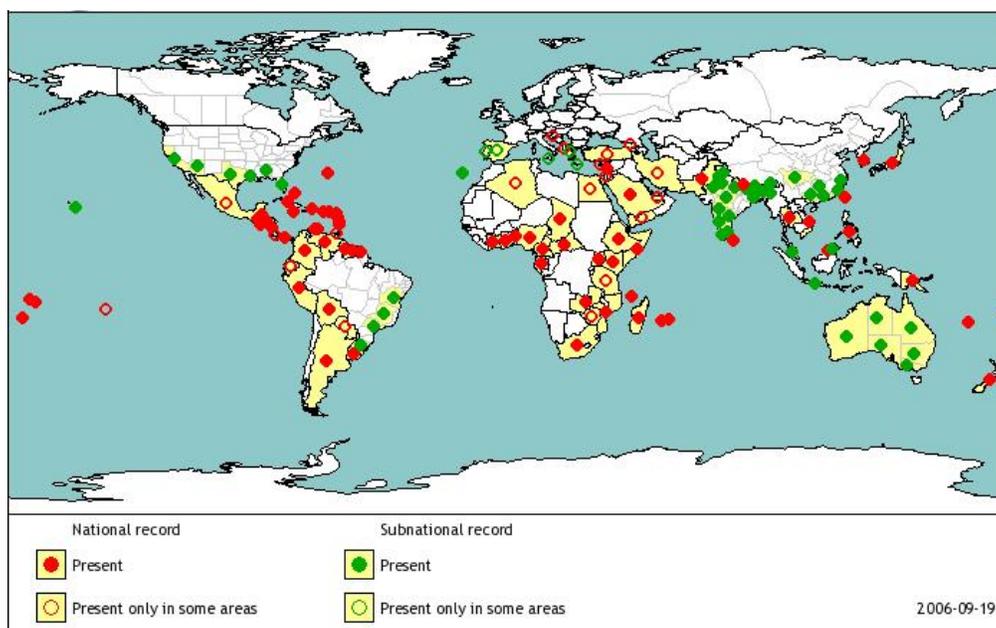


Figura 3 – Distribuição mundial de *Citrus tristeza virus* até 2006 [3].

Toda esta problemática acabou por criar a necessidade de pesquisa e investigação ao nível da patologia em citrinos, originando a descoberta de novos patógenos como os viróides, a confirmação de que as árvores de *Citrus* do centro de origem eram portadoras assintomáticas destes e de outros agentes infecciosos e a criação de métodos de fitossanidade, quarentena e procedimentos de certificação que permitiram o desenvolvimento da citricultura moderna (Duran-Villa, Moreno, 2000; Navarro *et al.*, 2002; Timmer *et al.*, 2000).

1.3 – Patologia, sintomas e espécies afetadas

Diferentes estirpes virais e diferentes combinações entre espécies e porta-enxertos podem causar três tipos de patologias diferentes: *Tristeza* ou QD (*quick decline*), SP (*stem pitting*) e SY (*seedling yellows*) (Moreno et al., 2008).

1.3.1 – *Tristeza*

Tristeza é uma doença de rápido declínio (QD) causada pela infecção de CTV nas seguintes espécies de citrinos: laranja doce, tangerineira, toranjeira, *Fortunella margarita* (kinkan), *C. aurantifolia* (limeira) propagadas em *C. aurantium* ou em *C. lemon* (limoeiro) (Moreno et al., 2008). Os sinais apresentados pela planta são o declínio rápido e murchidão em casos extremos (Fig. 4 A), escurecimento e amarelecimento da folhagem (Fig. 4 B), perda de folhas e de galhos, diminuição do tamanho das folhas e quantidade da sua clorofila devido à deficiência em azoto, diminuição dos frutos e palidez dos mesmos, tornando a sua venda impossível (Moreno et al., 2008). Assim o CTV induz o colapso e a necrose das células dos novos rebentos, produzindo uma grande quantidade de tecidos floémicos não funcionais (Schneider, 1959) o que acaba por causar também uma diminuição progressiva do sistema radicular e consequente diminuição de água e minerais na planta, podendo mesmo resultar na sua morte. Como esta interação específica não acontece em outras espécies de citrinos, a doença de rápido declínio pode ser evitada com a utilização de porta-enxertos tolerantes (Moreno et al., 2008).

1.3.2 – *Stem Pitting*

A doença SP (*stem pitting*) é iniciada pela interrupção da actividade meristemática no câmbio vascular que resulta num crescimento radial irregular com depressão local nos pontos de inatividade (Schneider, 1959) (Fig. 4 C e G), resultando em nanismo, folhagem fina, folhas pequenas e amarelas, frutos pequenos (Fig. 4 D) e com baixo teor de sumo. As espécies mais sensíveis são as limeiras, as laranjeiras e toranjeiras apresentam sensibilidade moderada e as tangerineiras são as mais tolerantes (Duran-Villa, Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). Contrariamente à doença tristeza, a SP raramente causa a morte da planta, embora provoque graves danos na produção, resultando em perdas económicas elevadas (Moreno et al., 2008).

1.3.3 – *Seedling Yellows*

A doença SY provoca também nanismo, produção de folhas pequenas pálidas e amarelas, reduzido desenvolvimento do sistema radicular e por vezes pode mesmo cessar o crescimento da planta, embora por vezes, plantas que apresentem SY possam originar folhas novas normais (Fraser, 1952; McClean, 1960) (Fig. 4 E, F e H). As espécies afetadas por esta variante são a laranjeira azeda, toranjeira e plântulas de limoeiro (Fraser, 1952; McClean, 1960).

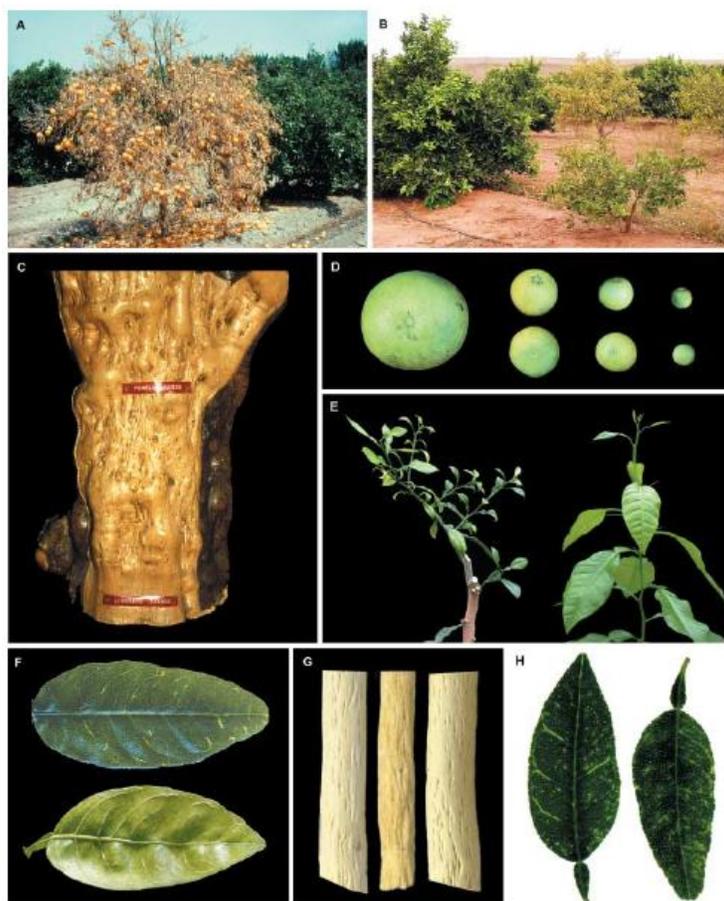


Figura 4 – Sintomas de rápido declínio, *stem pitting* e *seedling yellows* induzidos por CTV em diferentes variedades e porta-enxertos. (A) Rápido declínio em estado avançado de *C. sinensis* propagada em *C. aurantium*, (B) diferentes fases da doença de rápido declínio, (C) (G) *stem pitting* em troncos de citrinos, (D) frutos com dimensões reduzidas provenientes de *Poncirus trifoliata* afectada por *stem pitting* (direita) em comparação com um fruto de uma árvore saudável (esquerda), (E) crescimento curvo e folhas amareladas em *C. aurantium* com *seedling yellows*, (F) (H) amarelecimento das veias foliares resultado de *seedling yellows* [4].

1.4 – Diagnóstico de CTV

1.4.1 – Passado e presente

O diagnóstico da infecção por CTV foi realizado durante anos por indexação biológica em hospedeiros sensíveis que serviam como indicadores, maioritariamente em plântulas de *C. macrophylla* (limeira mexicana) que após infecção apresentavam veias translúcidas e dobras nas folhas, entrenós curtos e *stem pitting* (Roistacher, 1991; Wallace & Drake, 1951). Este processo é hoje em dia utilizado em combinação com pelo menos um teste de laboratório (usualmente serológico, baseado na deteção da cápside proteica do CTV) (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 1991; Garnsey *et al.*, 1993; Gonsalves *et al.*, 1978; Nikolaeva *et al.*, 1998; Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1986).

Com o avanço na disponibilidade da tecnologia ao serviço dos métodos de diagnóstico foi possível a purificação do CTV, e por consequência foram obtidos vários antisera e anticorpos monoclonais para a cápside do vírus que permitiram deteção de CTV através de procedimentos imunoenzimáticos, nomeadamente ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Permar *et al.*, 1990; Vela *et al.*, 1986), sendo a variante DAS-ELISA (*double antibody sandwich*) a técnica mais utilizada para triagem do vírus (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Cambra *et al.*, 1979). Para uma deteção mais rápida é também utilizada a DTBIA (*Direct Tissue Blot Immunoassay*) ou *immunoprinting* que permite a deteção do vírus através da impressão do material vegetal em membranas de nitrocelulose (Cambra *et al.*, 2000; Garnsey *et al.*, 1993). Esta técnica torna possível o teste de milhares de amostras de uma forma simples e sem necessidade de preparar extracções de RNA, mas o facto do período de amostragem ser relativamente curto e a escolha do tipo de tecido para análise ser limitada são limitações para esta técnica. Outra limitação das técnicas serológicas é o facto de não conseguirem diferenciar diferentes estirpes de CTV. A disponibilidade destas ferramentas foi crítica na expansão da investigação da epidemiologia do CTV e da sua caracterização (Cambra *et al.*, 2000; Garnsey *et al.*, 1993).

Os avanços em biologia molecular ao nível da sequenciação acabaram também por ser cruciais no melhoramento das técnicas de deteção de CTV. Após a sequenciação completa de nucleótidos do gRNA do CTV ter sido disponível foram desenvolvidos vários

procedimentos de diagnóstico baseados na detecção específica de RNA viral, incluindo hibridização molecular com sondas de cDNA ou cRNA (Barbarossa & Savino, 2006; Narváez *et al.*, 2000; Rosner & Bar-Joseph, 1984) e vários métodos de amplificação baseados em RT-PCR (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Protocolos de RT-PCR em tempo real vieram aumentar em grande parte a sensibilidade de detecção e vieram permitir a quantificação de cópias de RNA genómico presentes em tecidos de citrinos infetados (Bertolini *et al.*, 2007; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2007; Saponari *et al.*, 2007). Métodos multiplex PCR (mPCR) foram também desenvolvidos devido à necessidade de identificar CTV em conjunto com outros vírus que infetam citrinos sem ser necessário recorrer a uma bateria de testes, com o objetivo da diminuição de custos e de uma maior rapidez no rastreio (Roy *et al.*, 2005). Contudo, em certos casos, alguns destes vírus podem ser difíceis de detetar devido à sua baixa concentração ou distribuição desigual (Roy *et al.*, 2005). Recentemente foram também desenvolvidos ensaios de RT *quantitative* PCR em tempo real extremamente rápidos, específicos e sensíveis (Ananthakrishnan *et al.*, 2010), mas continuam a ter o mesmo problema de serem métodos extremamente caros, quer a nível de maquinaria quer a nível do custo dos químicos, sendo assim necessário o desenvolvimento de mais testes com elevada sensibilidade e que sejam acessíveis em termos económicos, principalmente para laboratórios em países subdesenvolvidos.

No presente, a detecção de CTV em laboratórios acreditados é feita através da conjugação de 2 métodos moleculares: ELISA ou *immunoprinting* seguida por RT-PCR para confirmação total dos positivos (OEPP/EPPO, 2004).

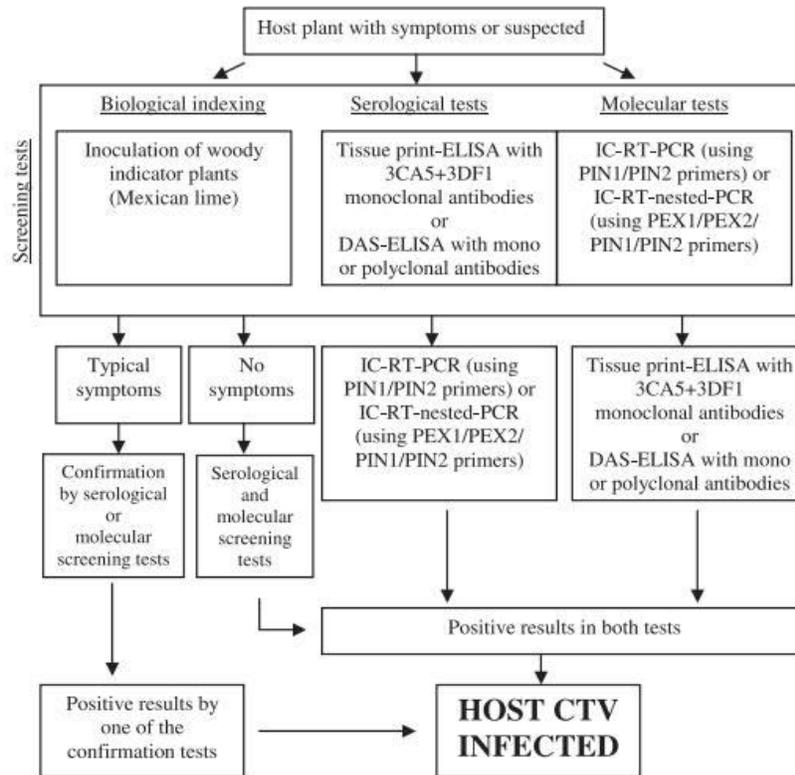


Figura 5 – Esquema de detecção e identificação de *Citrus tristeza virus* [5].

1.4.2 – Amostragem

A amostragem é um processo crítico na detecção rigorosa de CTV em processos serológicos e moleculares. Em plantas adultas podem ser recolhidos 5 rebentos jovens do último rebentamento, 5 pedúnculos frutíferos, 10 folhas com crescimento completo, 5 flores ou 5 frutos (Cambra *et al.*, 2002), todos colhidos em torno da copa de cada árvore individual e de cada andar de ramos (OEPP/EPPO, 2004). As amostras podem ser recolhidas em qualquer altura do ano nas variedades de laranjeira doce, tangerineira, limoeiro e toranjeira na área do Mediterrâneo, embora o CTV apresente maiores concentrações na primavera, sendo então todas as estações vegetativas recomendadas para amostragem com exceção do verão (Julho a Agosto na zona mediterrânica) (OEPP/EPPO, 2004). A amostragem padrão para plantas de viveiro é feita através da recolha de uma

amostra de rebentos jovens por cada indivíduo, sendo que a amostragem engloba 5% da produção total (OEPP/EPPO, 2004).

Posteriormente, todos os tipos de amostra exceto frutos devem ser armazenados a temperatura de 4 °C até um máximo de 7 dias antes das análises, podendo os frutos ser armazenados até um mês também a 4 °C (OEPP/EPPO, 2004).

1.5 – Controle e Certificação

1.5.1 – Quarentena e monitorização

Visto que a doença é transmitida através da enxertia e do inseto vetor, é importante garantir que a propagação em viveiros é feita com material vegetal sã, que as árvores cultivadas são saudáveis e é também importante o controlo do vetor. Para isso é necessário analisar regularmente o material vegetal de pomares e viveiros de citrinos para que as plantas infetadas possam ser rapidamente removidas e o período de quarentena efetuado de forma a prevenir a proliferação do vírus, principalmente em zonas onde os citrinos sejam ainda propagados utilizando *C. aurantium* como porta enxerto, devido à sua suscetibilidade para a doença (Navarro *et al.*, 2002). Daí a necessidade de existirem técnicas altamente específicas, sensíveis rápidas e de confiança para monitorização da ocorrência do CTV. A determinação do tipo de doença é também importante, bem como a identificação e diferenciação das estirpes individuais presentes, para a determinação de estratégias de controlo adequadas a utilizar em pomares e em viveiros (Garnsey *et al.*, 1998).

1.5.2 – Tolerância e resistência

Quando a remoção de árvores infetadas e quarentena se tornam inviáveis devido à elevada proliferação do CTV por parte dos vetores, a propagação de citrinos através de porta-enxertos tolerantes é uma das opções para os produtores reduzirem os impactos da doença, principalmente a de rápido declínio. Entre os mais utilizados encontram-se *Poncirus trifoliata* e os seus híbridos Carrizo e Troyer (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) (Moreno *et al.*, 2008).

O melhoramento com vista a incorporar genes de resistência em espécies comerciais é considerada a melhor abordagem no combate a patógenos. Contudo, a complexidade genética e da reprodução em citrinos em conjunto com o seu elevado cultivo por todo o planeta, tem prejudicado o seu melhoramento através de métodos convencionais. Embora já se tenha observado resistência a determinadas estirpes específicas de CTV em citrinos (Asíns *et al.*, 2004; Fang and Roose, 1999; Garnsey *et al.*, 1987) esta acaba por ser mais comum em parentes dentro da subfamília *Aurantioideae* como algumas espécies de *Fortunella*, *P. trifoliata*, *Severinia buxifolia* e *Swinglea glutinosa* (Garnsey *et al.*, 1987; Mestre *et al.*, 1997a,b; Yoshida, 1996). *P. trifoliata* é especialmente interessante pois para além de mostrar resistência à maior parte das estirpes de CTV, é também sexualmente compatível com *Citrus*. A resistência está associada a um único locus dominante (Ctr) que já foi extensivamente caracterizado e mapeado (Deng *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 1998; Gmitter *et al.*, 1996; Mestre *et al.*, 1997a; Yang *et al.*, 2003; Yoshida, 1985, 1993).

1.5.3 – Proteção cruzada

No caso específico de variedades comerciais sensíveis a *stem pitting*, o único método de combate à doença passa pela proteção cruzada com estirpes fracas de CTV, que ao estarem presentes na planta impedem a sua colonização por estirpes mais severas, reduzindo assim o impacto na produção dos viveiros, quer em quantidade quer no tamanho dos frutos (Moreno *et al.* 2007). Esta técnica não é ainda muito utilizada pois depende de uma conjugação de fatores bastante complexos para o seu sucesso, tais como as variedades de citrinos utilizadas, estirpes de CTV e condições ambientais prevalentes na região (Broadbent *et al.*, 1991; Ieki and Yamaguchi, 1988; Müller *et al.*, 1988). Contudo existem dois casos de sucesso, um proveniente de São Paulo, Brasil, em que a utilização de proteção cruzada nas variedades de laranja Pera aumentou exponencialmente a produção (Costa e Müller, 1980) e outro proveniente da África do Sul utilizando a variedade de toranjeira Marsh (Van Vuuren *et al.*, 1993).

1.5.4 – Certificação

Em Portugal, e segundo o Decreto-Lei n.º 329/2007 de 08-10-2007 anexo IV - Regulamento técnico da produção de materiais citrícolas certificados, parte D, ponto 1.4 publicado em Diário da República n.º 193 Série I de 08/10/2007 temos que “Para além do definido no n.º 1.3, sob coordenação da DGADR, as DRAP procedem, pelo menos, de três em três anos a prospeções oficiais de *Citrus tristeza virus* nas parcelas inscritas para a produção de qualquer categoria de material citrícola.”. Os laboratórios acreditados em Portugal que executam a deteção e *screening* de CTV seguem os EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) standards, protocolos de diagnóstico para pragas regulamentadas.

1.6 – CTV em Portugal

Em Portugal continental o cultivo de citrinos é feito um pouco por todo o país, tendo sido estimada em 2007 uma área de cobertura de cerca de 26,200 ha e sendo a zona sul, nomeadamente Algarve, a que apresenta uma citricultura mais intensiva e dinâmica com cerca de 17,860 ha da fatia total, resultando em 60% da produção nacional de laranja doce, 85% da produção de tangerina e 40% da produção de limão. O incentivo à plantação de citrinos começou em 1980 com a atribuição de fundos monetários por parte da União Europeia para o desenvolvimento da agricultura Portuguesa e também com a crescente procura de frutas cítricas por parte do consumidor (Nolasco, 2009).

Antes de 1980 não tinha sido ainda realizado um levantamento sistemático para CTV, embora esporadicamente pudessem ser encontradas árvores em declínio em pomares, declínio este muitas vezes atribuído a danos nas raízes efetuados por roedores (Nolasco, 2009).

Em 1986 foi realizado o primeiro levantamento prospetivo pelo método ELISA com anticorpos monoclonais, tendo como alvo o material vegetal de árvores velhas em declínio, mas não foram encontrados positivos para o vírus (Nolasco, 2009).

Em 1988, e numa tentativa de modernizar o sector, foi emitida uma autorização especial para importação de citrinos a partir de fontes certificadas, nomeadamente de viveiros em

Valência, Espanha. Chegando a Portugal o material foi novamente testado pelo método ELISA e surpreendentemente alguns lotes apresentavam infecção por CTV (Nolasco, 2009).

De 1989 a 1994, e após a proibição da importação de novas variedades, muitos viveiristas acabaram por importar material para enxertia ilegalmente de Espanha, o que veio a agravar a problemática do CTV e fez com que serviços governamentais começassem a realizar pesquisas em viveiros e pomares. O CTV foi detetado esporadicamente em locais por todo o país, sendo as plantas infetadas destruídas e o CTV em princípio erradicado. Contudo a destruição definitiva do material infetado ocorreu, por vezes, vários meses após a primeira deteção. O CTV foi ainda detetado numa linha de infetados assintomáticos (Genoa lemon) localizados numa coleção de germoplasma em Setúbal. Durante este período foi emitida a primeira legislação sobre certificação de citrinos, (Decreto lei 277/91 e Portaria 416/94), mas com exceção de materiais CAC, não era obrigatória (Nolasco, 2009).

De 1995 a 2000 foram realizadas dois levantamentos novos por ELISA através de amostragens alvo e amostragens aleatórias. No entanto, devido às limitações de logística, apenas uma pequena parte da região do Algarve pode ser testada cada ano, (cerca 775 ha por ano). Os resultados encontrados resultaram na destruição de 31,000 árvores. Os resultados obtidos durante estes anos mostram que o CTV se está a alastrar pelo país e que é disseminado principalmente por práticas agrícolas de baixa qualidade (Nolasco, 2009).

Os anos de 2001 e 2002 marcam o início da transmissão natural de CTV no Algarve. Neste período, cerca de 13,800 árvores foram marcadas para a erradicação, notando-se que, desde o início dos levantamentos sistemáticos de amostragem aleatória realizados em 1995-2002, apenas 40% da área total de citrinos tinha sido vistoriada no Algarve (Nolasco, 2009).

De 2003 a 2005, devido a restrições económicas, os serviços governamentais diminuíram significativamente a intensidade dos levantamentos sistemáticos. A caracterização molecular de novos isolados com base no gene da proteína de revestimento foi realizado. Foi também durante este período que foi encontrado no norte de Portugal o principal inseto vetor do CTV *Toxoptera citricidus* acabando por se realizar pesquisas para CTV em pequenos pomares em zonas próximas no Outono de 2005. Foram então encontradas plantas infetadas e a caracterização molecular dos vírus de duas árvores

separadas por 30 Km mostrou que existia uma mistura de haplótipos que incluía alguns novos em Portugal. Contudo, a estrutura da população de CTV encontrada nas duas árvores não tinha diferenças significativas. Estes resultados sugerem uma outra nova fonte de introdução de CTV na região, através do inseto vetor *T.citricidus*. Tendo em conta todos os haplótipos de genes da cápside que foram detetados, Portugal tem agora todos os haplótipos que podem ser encontrados em outras partes do mundo (Nolasco, 2009).

Em 2009 foram realizadas novas pesquisas para determinar e atualizar a ocorrência e variabilidade do vírus CTV pelas entidades agrícolas Portuguesas em vários pomares do Algarve e de Coimbra. No total foram encontradas 74 amostras positivas, sendo que 70 foram provenientes do Algarve e as restantes 4 tiveram origem na região de Coimbra (Silva, 2013).

A acompanhar os planos de prospeção para o vírus CTV, foram realizados também planos de monitorização e dispersão do inseto vetor *T. citricidus* em todo o território nacional, tendo-se verificado a deslocação deste de norte para o sul do país através da sua deteção no concelho de Cantanhede (concelho limítrofe do distrito de Coimbra) em 2012 e da sua identificação num viveiro de citrinos localizado na freguesia das Gândaras do concelho da Lousã (DRAPC).

1.7 – Objetivos

Os objetivos deste trabalho passam pela avaliação fitossanitária da presença de CTV em viveiros de citrinos na região de Coimbra através da análise e certificação de viveiros de produtores da zona. Pretende-se também observar se o cultivo de citrinos é efetuado de forma responsável e sustentável, quer através da utilização de porta-enxertos resistentes ao vírus, quer através da utilização de material vegetal (borbulhas) saudável no momento de enxertia. Esta avaliação é importante na zona de Coimbra devido ao grande número de produtores e grande produção de árvores de citrinos em viveiros na região (segundo dados da Associação de Viveiristas do Distrito de Coimbra entre 2006/2007 foram vendidas cerca de 80 mil árvores) (agroportal.pt) que posteriormente são utilizadas para plantação e produção de fruto em outras zonas do país, nomeadamente no Algarve.

Capítulo II – Materiais e Métodos

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Material vegetal

2.1.1 – Recolha e transporte

O material vegetal utilizado neste estudo provém da região central de Portugal, mais concretamente e maioritariamente da zona ribeirinha do rio Ceira e do rio Mondego na cidade de Coimbra. A recolha, condicionamento e transporte do material vegetal ficaram a cargo de inspetores fitossanitários especializados para o efeito.

2.1.2 – Amostras

Cada amostra chegou devidamente embalada em sacos plásticos selados e identificada com rótulos exteriores com toda a informação relevante para a análise (nome do produtor, local de recolha, número de amostra, variedade de citrino, porta enxerto) (Fig. 6).



Figura 6 – Exemplo de uma amostra embalada em saco plástico, com respetiva identificação.

Cada amostra vegetal consistiu de um ramo jovem do último rebentamento de cada indivíduo (algumas vezes dois ou mais caso se verificasse que o ramo não continha a quantidade necessária de material) com as folhas presentes. Enquanto as amostras não se encontravam em análise, foram armazenadas à temperatura de 4°C. Ao todo foram amostrados 14 viveiros da região de Coimbra (Tabelas 1 a 14), resultando num total de 7164 amostras (Tabela 15).

Tabela 1 – Viveiros “O Laranjeiro”

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
T.Mondego	29/09/2014	C.Fina	<i>P.trifoliata</i>	50	1 – 50
T.Mondego	29/09/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	50	51 – 100
T.Mondego	29/09/2014	Lane Late	<i>P.trifoliata</i>	50	101 – 150
T.Mondego	29/09/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	75	151 – 225
T.Mondego	29/09/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	100	226 – 325
T.Mondego	29/09/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	75	326 – 400
Portela	29/09/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	100	401 – 500
Portela	29/09/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	100	501 – 600
Portela	29/09/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	65	601 – 665
Portela	29/09/2014	Clemenules	<i>P.trifoliata</i>	33	666 – 698
Portela	29/09/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	65	699 – 763
Portela	29/09/2014	Nova	<i>P.trifoliata</i>	33	764 – 796
Portela	29/09/2014	Lane Late	<i>P.trifoliata</i>	100	797 – 896
Portela	29/09/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	100	897 – 996
Portela	29/09/2014	V. Delta Seedless	<i>P.trifoliata</i>	65	997 – 1061
Portela	29/09/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	33	1062 – 1094
Portela	29/09/2014	Bears	<i>P.trifoliata</i>	30	1095 – 1124
Portela	29/09/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	150	1125 – 1274
Portela	29/09/2014	Star Ruby	<i>P.trifoliata</i>	33	1275 – 1307

Tabela 2 – Viveiros José Maria Alexandre

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Cordeira	1/10/2014	C.Fina	<i>P.trifoliata</i>	13	1 – 13
Cordeira	1/10/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	10	14 – 23
Cordeira	1/10/2014	Lane Late	<i>P.trifoliata</i>	10	27 – 36
Cordeira	1/10/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	25	40 – 64
Cordeira	1/10/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	5	65 – 69
Cordeira	1/10/2014	Bears	<i>P.trifoliata</i>	4	70 – 73
Cordeira	1/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	25	79 – 103

Nota: As amostras 24, 25 e 26 da variedade Encore, as 37, 38 e 39 da variedade Lane Late e as 74, 75, 76, 77 e 78 da variedade Bears não foram amostradas, sendo o número total de amostras 92.

Tabela 3 – Viveiros agrícolas “Citromondego”

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Portela – Polo 2	1/10/2014	C.Fina	Carrizo	45	1 – 45
Portela – Polo 2	1/10/2014	Encore	Carrizo	28	46 – 73
Portela – Polo 2	1/10/2014	Lane Late	Carrizo	20	74 – 93
Portela – Polo 2	1/10/2014	Navelina	Carrizo	50	94 – 143
Portela – Polo 2	1/10/2014	Sanguinelli	Carrizo	15	144 – 158

Portela – Polo 2	1/10/2014	Bears	Carrizo	30	159 – 188
Portela – Polo 2	1/10/2014	Eureka	Carrizo	38	189 – 226

Nota: As variedades Encore e Lane Late não foram amostradas por não possuírem desenvolvimento vegetativo, sendo o número total de amostras 178.

Tabela 4 – Viveiros Albertino Carvalho & Filhos

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Penedo	1/10/2014	C.Fina	<i>C.aurantium</i>	25	1 – 25
Penedo	1/10/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	75	26 – 100
Penedo	1/10/2014	Nova	<i>C.aurantium</i>	10	101 – 110
Penedo	1/10/2014	Lane Late	<i>C.aurantium</i>	10	111 – 120
Penedo	1/10/2014	Eureka	<i>C.aurantium</i>	100	121 – 220
Penedo	1/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	50	221 – 270
Penedo	1/10/2014	L. Bears	<i>P.trifoliata</i>	15	271 – 285
Penedo	1/10/2014	Newhall	<i>C.aurantium</i>	25	286 – 310
Penedo	1/10/2014	Navelina	Carrizo	40	311 – 350
Penedo	1/10/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	30	351 – 380
Penedo	1/10/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	35	381 – 415
Penedo	1/10/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	5	416 – 420
Penedo	1/10/2014	Salustiana	<i>P.trifoliata</i>	5	421 – 425
Penedo	1/10/2014	Star Ruby	<i>P.trifoliata</i>	10	426 – 435

Nota: Após processamento das amostras verificou-se que a número 64 não se encontrava presente, sendo o número total de amostras 434.

Tabela 5 – Viveiros “Saro & Sacramento”

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Estufa 7	1/10/2014	C.Fina	Carrizo	90	1 – 90
Estufa 7	1/10/2014	Encore	Carrizo	60	91 – 151
Estufa 7	1/10/2014	Lane Late	Carrizo	60	152 – 212
Estufa 7	1/10/2014	Navelina	Carrizo	25	213 – 238
Estufa 7	1/10/2014	V.D. Seedless	Carrizo	180	239 – 419
Estufa 7	1/10/2014	V.M. Seedless	Carrizo	115	420 – 535
Estufa 7	1/10/2014	Sanguinelli	Carrizo	30	536 – 566
Estufa 7	1/10/2014	L. Bears	Carrizo	55	567 – 622
Estufa 7	1/10/2014	Eureka	Carrizo	58	623 – 681
Estufa 7	1/10/2014	Nova	Carrizo	35	682 – 717
Bacorinho	1/10/2014	Ortanique	<i>C.aurantium</i>	170	718 – 888
S. Jorge	1/10/2014	C. Fina	<i>C.aurantium</i>	45	889 – 934
S. Jorge	1/10/2014	Newhall	<i>C.aurantium</i>	90	935 – 1024
S. Jorge	1/10/2014	L. Bears	Carrizo	40	1025 – 1064
S. Jorge	1/10/2014	L. Bears	<i>C.aurantium</i>	45	1065 – 1109
S. Jorge	1/10/2014	Eureka	<i>C.aurantium</i>	57	1110 – 1166
S. Jorge	1/10/2014	Eureka	Carrizo	41	1167 – 1207
S. Jorge	1/10/2014	Star Ruby	<i>C.aurantium</i>	50	1208 – 1257
S. Jorge	1/10/2014	Nova	<i>C.aurantium</i>	115	1258 – 1372
S. Jorge	1/10/2014	V.D. Seedless	<i>C.aurantium</i>	120	1373 – 1492
S. Jorge	1/10/2014	Star Ruby	<i>C.aurantium</i>	30	1493 – 1522
V. Gama	1/10/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	115	1523 – 1637
V. Gama	1/10/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	85	1638 – 1722
V. Gama	1/10/2014	L. Bears	<i>P.trifoliata</i>	58	1723 – 1780
V. Gama	1/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	115	1782 – 1895

Tabela 6 – Viveiros Agrícolas Vicentes

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Remolhas	3/10/2014	Lane Late	Desconhecido	75	1 – 75
Remolhas	3/10/2014	Verna	Desconhecido	75	76 – 150
Remolhas	3/10/2014	Valencia Late	Desconhecido	25	151 – 175
Remolhas	3/10/2014	Navelina	Desconhecido	50	176 – 225
Remolhas	3/10/2014	Clemenules	Desconhecido	20	226 – 245
Remolhas	3/10/2014	Star Ruby	Desconhecido	20	246 – 265
Remolhas	3/10/2014	Sanguinelli	Desconhecido	15	266 – 280
Remolhas	3/10/2014	Bears	Desconhecido	8	281 – 288
Remolhas	3/10/2014	Satsuma Owari	Desconhecido	10	289 – 298
Remolhas	3/10/2014	Oronules	Desconhecido	15	299 – 313
Remolhas	3/10/2014	Marisol	Desconhecido	8	314 – 321
Remolhas	3/10/2014	Ortanique	Desconhecido	8	322 – 329
Remolhas	3/10/2014	Loretina	Desconhecido	10	330 – 339

Tabela 7 – Viveiros Norberto Ferreira dos Santos

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Anaguéis	8/10/2014	Sanguinelli	Carrizo	15	1 – 15
Anaguéis	8/10/2014	Navelina	Carrizo	50	16 – 65
Anaguéis	8/10/2014	Eureka	<i>C.aurantium</i>	20	66 – 85
Anaguéis	8/10/2014	M. Seedless	<i>C.aurantium</i>	25	86 – 110
Anaguéis	8/10/2014	Lane Late	<i>C.aurantium</i>	50	111 – 160
Anaguéis	8/10/2014	Lane Late	<i>C.aurantium</i>	35	161 – 195
Anaguéis	8/10/2014	Encore	Carrizo	25	196 – 220
Anaguéis	8/10/2014	Eureka	Carrizo	25	221 – 245

Anaguéis	8/10/2014	C. Fina	Carrizo	65	246 – 310
Anaguéis	8/10/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	13	311 – 323
Anaguéis	8/10/2014	Salustiana	<i>P.trifoliata</i>	5	324 – 328
Anaguéis	8/10/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	45	329 – 373
Anaguéis	8/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	20	374 – 393

Nota: As amostras de 81 a 85, 241 a 245, 389 e 393 não estavam presentes e por conseguinte não foram analisadas, sendo o número total de amostras 381.

Tabela 8 – Viveiros Jaime Quatorze Ferreira

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Semide	10/10/2014	C. Fina	Carrizo	8	1 – 8
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	40	9 – 48
Semide	10/10/2014	L. Bears	Carrizo	13	49 – 61
Semide	10/10/2014	C. Fina	Carrizo	7	62 – 68
Semide	10/10/2014	Navelina	Carrizo	25	69 – 93
Semide	10/10/2014	Newhall	Carrizo	18	94 – 111
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	25	112 – 136
Semide	10/10/2014	Lane Late	Carrizo	75	137 – 211
Semide	10/10/2014	D. Seedless	<i>C.aurantium</i>	80	212 – 291
Semide	10/10/2014	Eureka	<i>C.aurantium</i>	13	292 – 304
Semide	10/10/2014	D. Seedless	<i>C.aurantium</i>	13	305 – 317
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	45	318 – 362
Semide	10/10/2014	D. Seedless	<i>C.aurantium</i>	100	363 – 462
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	33	463 – 495
Semide	10/10/2014	Nova	Carrizo	15	496 – 510
Semide	10/10/2014	Ortanique	Carrizo	5	511 – 515
Semide	10/10/2014	Encore	Carrizo	13	516 – 528
Semide	10/10/2014	Navelina	Carrizo	20	529 – 548

Semide	10/10/2014	Star Ruby	Carrizo	5	549 – 553
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	20	554 – 573
Semide	10/10/2014	Lane Late	Carrizo	25	574 – 598
Semide	10/10/2014	D. Seedless	Carrizo	18	599 – 616
Semide	10/10/2014	Eureka	Carrizo	15	617 – 631

Nota: As amostras de 574 a 598 não estavam presentes e por conseguinte não foram analisadas, sendo o número total de amostras 606.

Tabela 9 – Viveiros Plantosemide

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Crasto	14/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	75	1 – 75
Crasto	14/10/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	5	76 – 80
Crasto	14/10/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	75	81 – 155
Crasto	14/10/2014	Salustiana	<i>P.trifoliata</i>	30	156 – 185
Crasto	14/10/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	40	186 – 225
Crasto	14/10/2014	Star Ruby	<i>P.trifoliata</i>	3	226 – 228
Crasto	14/10/2014	Murcott	<i>P.trifoliata</i>	18	229 – 246
Crasto	14/10/2014	Nova	<i>P.trifoliata</i>	40	247 – 286
Crasto	14/10/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	130	287 – 416
Crasto	14/10/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	35	417 – 451
Crasto	14/10/2014	L. Bears	<i>P.trifoliata</i>	8	452 – 459

Nota: As amostras referentes à variedade Murcott (de 229 a 246) não foram colhidas devido a queimadura por adubo e pouco desenvolvimento, sendo o número total de amostras 441.

Tabela 10 – Viveiros David Catorze do Amaral

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
V. Colmeias	14/10/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	63	1 – 63
V. Colmeias	14/10/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	40	64 – 103
V. Colmeias	14/10/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	63	104 – 166
V. Colmeias	14/10/2014	Lane Late	<i>P.trifoliata</i>	25	167 – 191
V. Colmeias	14/10/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	25	192 – 216
V. Colmeias	14/10/2014	L. Bears	<i>P.trifoliata</i>	5	217 – 221
V. Colmeias	14/10/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	5	222 – 226

Tabela 11 – Viveiros António Luís Quatorze Ferreira

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
V. Colmeias	5/11/2014	C. Fina	Carrizo	83	1 – 83
V. Colmeias	5/11/2014	Newhall	Carrizo	83	84 – 166

Tabela 12 – Viveiros António João de Almeida Santos

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
V. Azenha	15/11/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	20	1 – 20
V. Azenha	15/11/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	15	21 – 35
V. Azenha	15/11/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	25	36 – 60
V. Azenha	15/11/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	30	61 – 90
V. Azenha	15/11/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	10	91 – 100
V. Azenha	15/11/2014	Nova	<i>P.trifoliata</i>	8	101 – 108

V. Azenha	15/11/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	20	109 – 128
V. Azenha	15/11/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	25	129 – 153
V. Azenha	15/11/2014	Salustiana	<i>P.trifoliata</i>	8	154 – 161
V. Azenha	15/11/2014	Bears	<i>P.trifoliata</i>	8	162 – 169
V. Azenha	15/11/2014	Eureka	<i>P.trifoliata</i>	20	170 – 189

Tabela 13 – Viveiros Plancei, Plantas do Ceira Unipessoal

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
V. Gama	21/11/2014	C. Fina	<i>P.trifoliata</i>	75	1 – 75
V. Gama	21/11/2014	Encore	<i>P.trifoliata</i>	40	76 – 115
V. Gama	21/11/2014	Lane Late	<i>P.trifoliata</i>	110	116 – 225
V. Gama	21/11/2014	Navelina	<i>P.trifoliata</i>	70	226 – 295
V. Gama	21/11/2014	Newhall	<i>P.trifoliata</i>	70	296 – 365
V. Gama	21/11/2014	Sanguinelli	<i>P.trifoliata</i>	20	366 – 385
V. Gama	21/11/2014	L. Bears	<i>P.trifoliata</i>	20	386 – 405
V. Gama	21/11/2014	Verna	<i>P.trifoliata</i>	60	406 – 465
V. Gama	21/11/2014	Star Ruby	<i>P.trifoliata</i>	20	466 – 485

Nota: As amostras de 366 a 385 e de 466 a 485 não foram colhidas, sendo o número total de amostras 445.

Tabela 14 – Viveiros INPROPLANT

Local	Data	Variedade	Porta Enxerto	Amostras (5%)	Sequência
Vila Franca	21/05/2015	C.Fina	Carrizo	50	1 – 50
Vila Franca	21/05/2015	Murcott	Carrizo	40	51 – 90
Vila Franca	21/05/2015	L. Bears	Carrizo	25	91 – 115
Vila Franca	21/05/2015	Eureka	Carrizo	25	116 – 140

Vila Franca	21/05/2015	Navelina	Carrizo	50	141 – 190
Vila Franca	21/05/2015	Newhall	Carrizo	50	191 – 240
Vila Franca	21/05/2015	Sanguinelli	Carrizo	15	241 – 255
Vila Franca	21/05/2015	Lanelate	Carrizo	50	256 – 305
Vila Franca	21/05/2015	Encore	Carrizo	50	306 – 355
Vila Franca	21/05/2015	Nova	Carrizo	35	356 – 390
Vila Franca	21/05/2015	D. Seedless	Carrizo	50	391 – 440
Vila Franca	21/05/2015	Star Ruby	Carrizo	25	441 – 465

Tabela 15 – Número total de amostras

Número total de amostras analisadas	7164
--	------

2.2 – Metodologia

A metodologia para teste de CTV utilizada neste estudo foi adaptada da ficha de protocolos de diagnóstico para pestes reguladas da OEPP/EPPO, *bulletin* 34, 155-157 (2004) segundo Wetzel *et al.*, 1992; Nolasco *et al.*, 1993; Rosner *et al.*, 1998 e Olmos *et al.*, 1999 para uso no laboratório Fitolab, Instituto Pedro Nunes.

2.2.1 – *Immuno-Tissue Printing*

2.2.1.1 – *Membrane Printing*

Retirou-se a amostra da embalagem e colocou-se em cima de uma folha de papel (Fig. 7 A). Efectuou-se corte horizontal no raminho jovem de forma a que ficassem expostos os tecidos floémicos (Fig. 7 B). Registou-se numa membrana de nitrocelulose (*Sigma Aldrich*TM 0,45 µm) o número identificativo da amostra e em frente pressionou-se

cuidadosamente as secções expostas na membrana de nitrocelulose de forma a prefazer duas impressões por cada amostra (Fig. 7 C). Entre cada corte em cada amostra, limpou-se o bisturi primeiro em álcool e de seguida em água e posteriormente secou-se em papel absorvente antes de um novo corte. Após completas as membranas, estas guardaram-se numa tina à espera do passo seguinte.

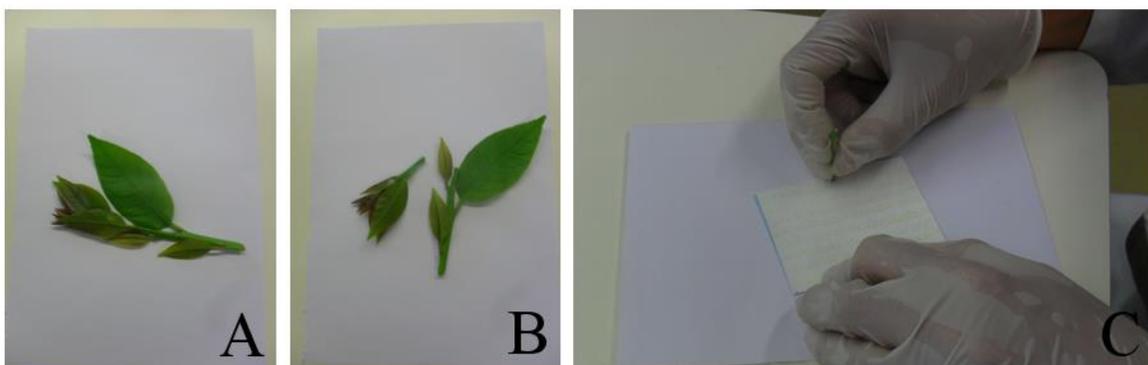


Figura 7 – Diferentes passos da realização da técnica de *immunoprinting*. (A) Amostra numa folha de papel antes de ser efetuado o corte, (B) amostra após corte com bisturi com os tecidos expostos, (C) realização da impressão dos tecidos expostos na membrana de nitrocelulose.

2.2.1.2 – Bloqueio da membrana

Na tina (Fig. 8) bloquearam-se as membranas por imersão numa solução de BSA 1% em PBS durante 1 hora (pode ir até 2 horas) à temperatura ambiente. Durante a incubação agitou-se ocasionalmente a tina. No final, descartou-se o tampão de bloqueamento da tina, mantendo-se as membranas nesta.



Figura 8 – Membranas de nitrocelulose na tina antes do início do bloqueio.

2.2.1.3 – Adição de anticorpos

Adicionou-se à tina a solução de anticorpos que contem o anti-CTV IGs *conjugated* (*Bioreba*TM) (1:1000 * 1µl conjg/ 1ml 1xPBS) em 1x PBS. Tapou-se a tina com alumínio e incubou-se durante 2 a 3 horas à temperatura ambiente. Agitou-se ocasionalmente. No final descartou-se a solução com o conjugado da tina, mantendo-se as membranas nesta.

2.2.1.4 – Lavagem das membranas

Por imersão enxaguaram-se as membranas e o recipiente com o tampão de lavagem (PBS + 0,05% Tween 20) durante 5 minutos com agitação manual ou mecânica e no final descartou-se o tampão de lavagem. Repetiu-se o passo anterior (total duas lavagens).

2.2.1.5 – Desenvolvimento das membranas

Preparou-se o substrato dissolvendo 1 comprimido BCIP/NBT *Alkaline Phosphatase Substrate* (*Sigma*TM) em 10 ml de água MiliQ. Adicionou-se o preparado às membranas na tina e deixou-se incubar entre 10 a 15 minutos ou até aparecer cor púrpura. Descartou-se o preparado e parou-se a reacção por lavagem das membranas com água corrente. Retiraram-se as membranas da tina e deixaram-se secar em papel absorvente.

2.2.1.6 – Leitura das membranas

Após secagem observaram-se as membranas à lupa com uma ampliação de 10 a 20 vezes e identificaram-se as amostras com a presença de um precipitado de cor violeta na região vascular. Remeteram-se todas as amostras que formaram precipitado para análise molecular por IC-RT-PCR.

2.2.2 – IC-RT-PCR

2.2.2.1 – Macerados e Centrifugação

Prepararam-se extratos de cada amostra a testar, através do corte dos ramos jovens com cerca de 1cm de altura de forma a incluir a zona dos feixes vasculares e posterior corte em

pequenos pedaços para maior facilidade de maceração e maior homogeneização. Maceraram-se os fragmentos com almofariz e pilão em 2 ml de tampão de extracção com auxílio de carborundum.

Recolheram-se os macerados para tubos *ependorf* devidamente identificados e efectuou-se centrifugação a 5000 g e 4°C durante 5 minutos (*Centurion Scientific™* K3). Recolheu-se o sobrenadante para novos tubos *ependorf* identificados com os números de amostra e descartou-se o *pellet*. As amostras clarificadas por centrifugação foram guardadas a 4°C no frigorífico até serem utilizadas no passo seguinte da detecção.

2.2.2.2 – Imunocaptura

Revestiram-se microtubos de 0.2 ml com o Anti-CTV IgG (*Bioreba™*) diluído 1:1000 (1:1000 * 1 µl Anti-CTV / 1 ml tampão) em tampão de revestimento (50 µl / tubo) e realizou-se o *coating* deixando-se incubar *overnight* a 4°C ou durante 3 horas a 37 °C (ou 3 horas em gelo) (Fig. 10 A). Após revestimento, descartou-se a solução tampão de cada tubo e efetuaram-se 3 lavagens de 3 minutos cada com 150 µl de PBS-Tween (verificando no final que não ficaram gotas da solução de lavagem nos tubos). Os tubos revestidos foram imediatamente utilizados ou guardados no frio para posterior utilização.

A cada tubo revestido foram adicionados 25 µl do sobrenadante de cada amostra resultante do passo de centrifugação prévio (Fig. 10 B). Preparou-se também um tubo vazio como controlo negativo e um tubo com 25 µl de controlo positivo de CTV (*Bioreba™*). Deixou-se incubar *overnight* a 4°C ou durante 2 horas em gelo (Rosner *et al.*, 1998) ou a 37 °C (Wetzel *et al.*, 1992). Após concluída a fase de imunocaptura, descartou-se o extrato de cada tubo e efetuaram-se duas lavagens com 150 µl PBS-Tween e uma lavagem com 150 µl de água MiliQ (verificando no final que não ficaram gotas de água nos tubos) (Fig. 10 C).

2.2.2.3 – RT-PCR

Preparou-se a mistura para RT-PCR com a *Dream Taq DNA Polymerase* e *Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific™)* e *primers* PIN1 e PIN2 (*Nzytech™*) (Olmos *et*

al., 1999) de acordo com a seguinte tabela (Tabela 16) e no final adicionou-se 25 µl da mistura a cada microtubo.

Tabela 16 – RT-PCR *mix*

Reagentes	Quantidade por amostra (µl)
Água MiliQ	14,30
Tampão Taq 10x	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5 (1,5 mM)
dNTP's (5 mM)	1,25 (250 µM)
4% Triton X-100	2 (0,3%)
Primer PIN 1 (25mM)	1 (1 µM)
Primer PIN 2 (25mM)	1 (1 µM)
DMSO	1,25 (5%)
Reverse Transcriptase (10 U/µl)	0,1
Taq-polimerase (5 U/µl)	0,1

Após a adição da mistura aos microtubos da imunocaptura, estes foram colocados no termociclador (*Applied Biosystems*TM Veriti 96 Well) e executou-se o programa específico (Fig. 9) para realização da reação de RT-PCR (Fig. 10 D) (Olmos *et al.*, 1999).

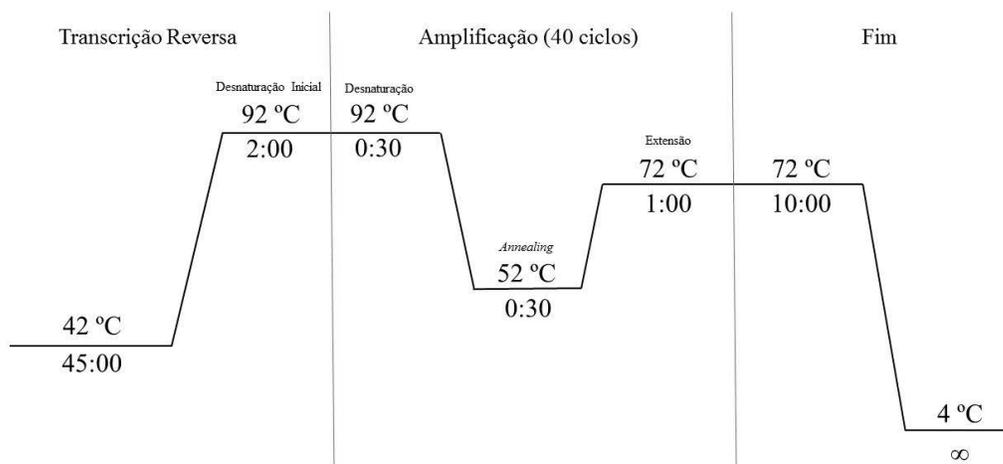


Figura 9 - Parâmetros utilizados na reação de RT-PCR para diagnóstico de CTV.

2.2.2.4 – Eletroforese dos produtos de RT-PCR

Preparou-se um gel de agarose a 2% em tampão TBE (0,6 g de agarose para 50 ml de TBE). Depois de arrefecer um pouco adicionou-se 3 μ l de *Gel Red*, homogeneizou-se e colocou-se na bandeja de eletroforese até solidificar. Cobriu-se o gel com tampão TBE na tina de eletroforese.

Colocou-se uma gotícula de 1 μ l de *loading buffer* sobre *parafilm* por cada uma das amostras a analisar e pelos dois controlos (positivo e negativo) e misturou-se com 6 μ l dos produtos de RT-PCR por aspiração suave com a pipeta. Carregaram-se os poços do gel, o primeiro com 7 μ l do marcador de ADN de 50 pb, nos seguintes os 7 μ l preparados anteriormente das amostras a analisar e nos dois últimos os 7 μ l do controlo positivo e negativo. Executou-se o gel durante 1 hora e 30 minutos a 80 V (fonte de alimentação Electrof. Consort EV 243, *Sigma*TM). Após conclusão da eletroforese, visualizou-se o gel por transiluminação UV (*Biorad*TM *Molecular Imager Gel Doc XR+*) e registaram-se os resultados (Fig. 10 E).

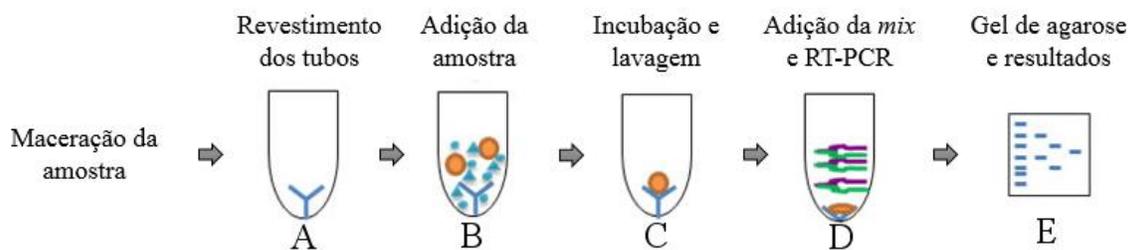


Figura 10 – Esquema gráfico explicativo das diferentes etapas da RT-PCR de imunocaptura. (A) anticorpos aderem às paredes dos tubos após incubação, (B) possíveis partículas virais e restos vegetais existentes na amostra adicionados ao tubo revestido, (C) após incubação apenas as partículas virais ficam aderidas aos anticorpos específicos e os restantes restos vegetais são removidos pela lavagem, (D) adição da *mix* com todos os reagentes necessários à reação de RT-PCR ao tubo onde já se encontra o *template* a amplificar, (E) após realização de eletroforese dos produtos de RT-PCR faz-se a visualização dos resultados em gel de agarose por transiluminação UV [6].

Capítulo III – Resultados e Discussão

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Caracterização da amostragem

As amostras analisadas tiveram origem em vários pontos da região de Coimbra, maioritariamente da margem sul do rio Mondego, mais concretamente nas freguesias de Semide (Miranda do Corvo), Ceira e Almalaguês (Coimbra). Da margem norte do rio Mondego foram amostrados viveiros das freguesias de Torres do Mondego, Santo António dos Olivais (Pólo II, Portela) e São João do Campo, todas do concelho de Coimbra.

A grande totalidade das amostras foram colhidas e analisadas entre finais de Setembro e fim do mês de Novembro, período correspondente ao mês de Outono, tendo havido apenas mais um conjunto de amostras que foi colhido e analisado no final do mês de Maio, correspondente à Primavera. O período aconselhável para amostragem na deteção de CTV inclui todas as estações vegetativas excepto o Verão (de Julho a Agosto na bacia do Mediterrâneo) (OEPP/EPPO, 2004) sendo que todas as amostras recebidas se encontram nesse limite temporal.

Das 7164 amostras analisadas, 1223 (17,1%) foram enxertadas em *C.aurantium*, 3378 (47,2%) foram enxertadas em *P. trifoliata*, 2222 (31%) foram enxertadas no híbrido Carrizo e 339 (4,7%) foram enxertadas em porta-enxerto desconhecido. Estes dados reflectem já uma grande utilização dos porta-enxertos tolerantes a CTV *P. trifoliata* e Carrizo (Moreno et al., 2008) por parte dos produtores na região de Coimbra, embora o porta-enxertos susceptível *C. aurantium* tenha ainda alguma utilização.

3.2 – Resultados do *immunoprinting*

Após realização da técnica de *immunoprinting*, ao visualizar a membrana com ampliação, procurou-se a formação de precipitados com cor roxa-violeta na zona de impressão do material vegetal vascular (Fig. 11), produto da reacção do substrato com o anticorpo-enzima (conjugado) ligado à cápside vírica presente na membrana, sendo este resultado indicador da possível presença de CTV (Garnsey et al., 1993). No total foram encontradas 35 sinais positivos (Tabela 17). As amostras que apresentaram estes

precipitados foram remetidas para análise por RT-PCR de imunocaptura, visto que para plantas assintomáticas é sempre necessária a confirmação de positivos através de duas técnicas de detecção de CTV (EPPO 2004).

Tabela 17 – Listagem das amostras positivas para *immunoprinting*. Apenas foram listados os viveiros que apresentaram amostras positivas.

Viveiro	Nº de Positivos	Porta-enxertos	Nº de Sequência
O Laranjeiro	22	<i>P.trifoliata</i>	425, 426, 433, 462, 467, 468, 477, 658, 659, 662, 711, 740, 770, 889, 1002, 1006, 1033, 1044, 1200, 1203, 1243, 1304
A. Vicentes	5	Desconhecido	26, 73, 128, 178, 332
Plancei	8	<i>P.trifoliata</i>	119, 122, 204, 210, 216, 225, 274, 280



Figura 11 - Foto parcial de uma das membranas após revelação, referente às amostras de viveiro "O Laranjeiro".

Como se pode ver na figura 11, temos as amostras positivas 658, 659, 662 com precipitados cor roxa. Na amostra 658 apenas temos um pequeno ponto com precipitado mas na amostra 659 e 662 o precipitado cor roxa é muito mais evidente, embora na amostra 659 o precipitado esteja localizado na zona da parede celular. Na amostra 662 o precipitado está situado mais no interior do *printing*, na zona correspondente aos tecidos floémicos.

De notar ainda o caso da amostra 734 em que se pode ver uma mancha roxa a atravessar o *printing*. Neste caso a amostra não foi considerada positiva para esta análise devido à mancha se encontrar na sua grande maioria fora do *printing*, podendo esta ter sido resultado de ligação inespecífica do conjugado anti-CTV à membrana após o bloqueio desta. Este facto indica-nos que o bloqueio feito à membrana com a solução de BSA não é 100% eficaz, e havendo sempre a possibilidade de ocorrer ligação inespecífica haverá sempre a possibilidade da existência de falsos positivos. Esta técnica pode também não detetar a presença de CTV quando este está presente em concentrações muito baixas (Hung, 2000). É devido a estas razões que a técnica de *immunoprinting* é apenas utilizada como rastreio primário para redução de volume de amostras a serem confirmadas pelo método de IC-RT-PCR, técnica muito mais sensível e confiável .

3.3 – Resultados do IC-RT-PCR

Todos os 35 sinais positivos para a técnica de *immunoprinting* foram analisados pela técnica de RT-PCR de imunocaptura. Destes 35, todos deram resultado negativo para infeção por CTV, não tendo sido então detetada a presença do vírus.

A necessidade de maior eficácia e rigor levou a que fossem também realizadas análises por IC-RT-PCR a amostras dos restantes viveiros que não apresentaram positivos pela técnica de *immunoprinting*, visto que existe a possibilidade de alguns positivos não apresentarem sinal detetável na técnica serológica, devido a baixas concentrações virais (Hung, 2000), o que torna esta análise bastante importante na deteção rigorosa da presença de CTV, devido à sua sensibilidade e especificidade. Nestas análises foram realizadas amostras simples e compósitas (em cada macerado foi utilizado material vegetal de várias amostras do mesmo viveiro) e também não se encontraram positivos.

Um resultado positivo para IC RT-PCR implica a existência de uma banda específica com tamanho de 131 pb, relativo ao produto da amplificação do RNA viral da cápside com os *primers* PIN1 e PIN2 (OEPP/EPPO, 2004), determinado por comparação com um controlo positivo de CTV funcional testado para o tamanho de 131 pb (Fig. 12).

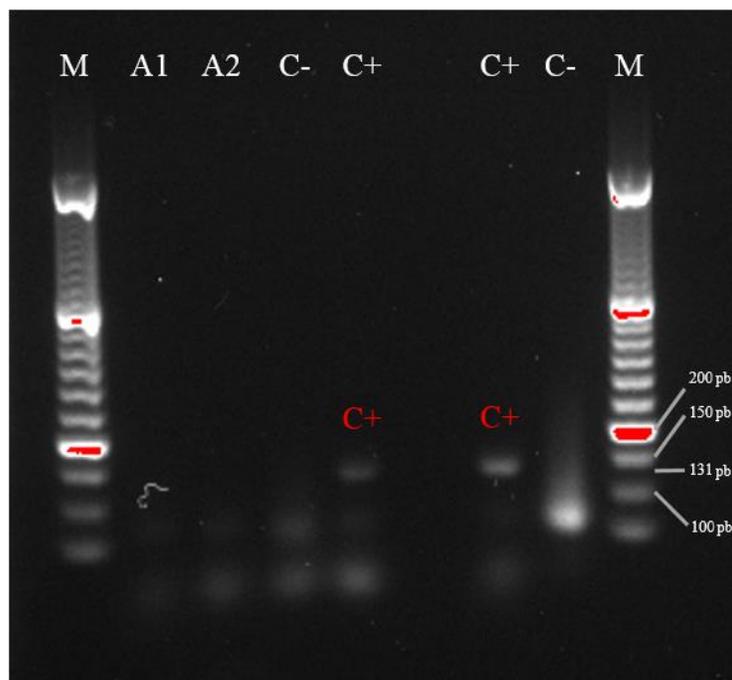


Figura 12 - Gel de agarose obtido por eletroforese dos produtos de RT-PCR das amostras 89 (A1) e 153 (A2) dos viveiros António João Almeida Santos, com os controlos positivos (C+) e negativos (C-) e marcador molecular de 50 pb (M).

Na figura 12 pode ver-se um gel em que se analisaram duas amostras dos viveiros António João Almeida Santos, A1 e A2. Nenhuma destas amostras apresenta a banda específica de 131 pb, facilmente identificável através da observação e comparação com os controlos positivos, o que indica que não existe presença de material vírico de CTV nas amostras. As restantes bandas abaixo dos 131 pb resultam de nucleótidos livres provenientes da RT-PCR *mix* e do seu arrastamento.

Em alternativa ao método convencional de IC-RT-PCR, pode-se efetuar *nested* IC-RT-PCR num único tubo fechado com os *primers* externos PEX1 e PEX2 em conjugação com os *primers* internos PIN1 e PIN2, com vista a reduzir ligações não específicas nos produtos devido à amplificação de zonas inesperadas. São efetuados então dois PCR sucessivos com

dois *sets* de *primers*, sendo que o segundo *set* vai amplificar uma zona alvo dentro dos produtos da primeira amplificação (Olmos *et al.*, 1999).

Este estudo não permitiu confirmar a existência de amostras positivas para CTV em viveiros na região de Coimbra, o que não implica que este não se encontre presente em viveiros ou árvores adultas, pois existem registos de árvores adultas infetadas na região e também foi já detetada a presença do vetor mais eficiente na disseminação do vírus CTV, o *Toxoptera citricidus* (DRAPC; Silva, 2013).

Apesar do rastreio pela técnica de *immunoprinting* e confirmação pela técnica sensível e específica de IC-RT-PCR, nunca nos podemos esquecer que a amostragem é sempre feita a apenas 5% da produção total de cada viveirista, sendo que há sempre a possibilidade da existência de positivos em lotes de plantas não amostradas. O trabalho dos inspetores fitossanitários é então especialmente importante para uma amostragem rigorosa, ainda que haja a possibilidade de existirem plantas infetadas que não apresentem sintomas visto que o vírus por vezes pode estar presente em baixas concentrações, como já anteriormente referido. Por isso é necessário respeitar os períodos recomendáveis de amostragem ou realizar mais do que um período.

O facto das amostras analisadas serem todas originárias de plantas de viveiros pode ser também preponderante no não encontro de positivos, uma vez que estas são jovens e passam relativamente pouco tempo na região até serem vendidas para outras zonas do país, reduzindo a probabilidade de contaminação. Também de realçar que os viveiros localizados em estufas se encontram significativamente mais protegidos do inseto vetor em comparação com os viveiros a céu aberto, aos quais o *Toxoptera citricidus* terá mais fácil acesso. Tudo indica então que a fonte mais provável de contaminação de CTV na região de Coimbra sejam árvores de citrinos adultas, existentes em pomares, terrenos domésticos ou com finalidades ornamentais, o que torna difícil a sua deteção visto que este material raramente é amostrado e analisado (Silva, 2013).

Capítulo IV – Conclusão e Perspetivas Futuras

4 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Ao todo foram analisadas 7164 amostras, correspondentes a 5% da produção total em viveiros dos produtores, o que corresponde à certificação de fitossanidade para CTV de cerca de 143280 plantas em 6 freguesias do distrito de Coimbra. Contudo seria necessária uma maior e mais diversa amostragem para se tirarem dados mais concretos acerca da presença deste vírus na região, visto que as árvores adultas presentes em pomares, terrenos domésticos ou utilizadas ornamentalmente raramente são analisadas e estas podem ser também fonte de contaminação para CTV, como nos indica a bibliografia existente. Para isso é necessário que os produtores cada vez mais recorram à certificação dos seus viveiros e pomares, não só por ser obrigatório por lei mas também para garantir que este vírus não tenha impactos económicos negativos neste sector que é tão importante para a região e país. Devem também ser investigadas e adotadas medidas de controlo viáveis para o inseto vetor *Toxoptera citricidus* quer estas passem pelo uso de inseticidas, introdução de predadores naturais para este inseto ou outras medidas mais viáveis. Será também responsabilidade do estado Português um aumento das prospeções nacionais de deteção de CTV neste tipo de material vegetal para monitorização e erradicação atempada de árvores infetadas, bem como trabalhos de genotipagem para identificação das estirpes virais encontradas.

O uso de porta-enxertos tolerantes na propagação das variedades comerciais de citrinos é já bastante comum nos viveiros analisados mas ainda existe uma percentagem significativa de uso de porta-enxertos suscetível. No futuro é importante também que esta percentagem diminua para reduzir os impactos negativos que uma possível infeção por CTV possa vir a acarretar.

A continuação deste tipo de trabalho é então essencial na perspectiva de controlo da disseminação de CTV, não só na região de Coimbra mas em todo o país, visto que este é um vírus que não conhece fronteiras e toda a informação que se possa obter sobre a sua presença, movimentação e impacto em Portugal é da máxima relevância.

É também necessário não nos esquecermos da emergência de novas ameaças com potenciais impactos na citricultura, como é o caso da bactéria *Candidatus Liberibacter africanus* já na lista A1 da EPPO, que provoca uma doença chamada Huanglongbing (ou

Citrus greening). Esta é vetorizada pelo inseto hemiptera *Triozia erythrae* que foi recentemente detetado na zona da Galiza, Espanha e também na área metropolitana do Porto, tendo já sido tomadas medidas fitossanitárias de prevenção e de deteção para esta bactéria (drapalg.min-agricultura.pt). Esta é então uma nova possível ameaça futura que merece também toda a nossa atenção e dedicação.

Capítulo V – Referências Bibliográficas

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5.1 – Livros e Artigos

Ananthakrishnan, G., Venkataprasanna, T., Roy, A., and Brlansky, R. H. (2010) Characterization of the mixture of genotypes of a *Citrus tristeza virus* isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR. *J. Virol. Methods* 164:75-82.

Asíns, M.J., Bernet, G.P., Ruiz, C., Cambra, M., Guerri, J. and Carbonell, E. (2004) QTL analysis of citrus tristeza virus–citradia interaction. *Theor. Appl. Genet.* 97, 1145–1154.

Barbarossa, L. and Savino, V. (2006) Sensitive and specific digoxigeninlabelled RNA probes for routine detection of Citrus tristeza virus by dotblot hybridization. *J. Phytopathol.* 154, 329–335.

Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F. and Loebenstein, G. (1979) The use of enzymelinked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69, 190–194.

Bar-Joseph, M., Marcus, R. and Lee, R.F. (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 291– 316.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. and Cambra, M. (2007) Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* doi 10.1007/s10658-077-9206-9.

Brlansky, R.H., Damsteegt, V.D., Howd, D.S. and Roy, A. (2003) Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Dis.* 87, 397–401.

Broadbent, P., Bevington, K.B. and Coote, B.G. (1991) Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky, R.H., Lee, R.F. and Timmer, L.W., eds), pp. 64–70. Riverside, CA: IOCV.

Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Garnsey, S.M. and Carbonell, E. (1991) Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky, R.H., Lee, R.F. and Timmer, L.W., eds), pp. 38–45. Riverside, CA: IOCV.

Cambra, M., Gorris, MT., Olmos, A., Martínez, MC., Román, MP., Bertolini, E., López, A. & Carbonell, EA. (2002) European Diagnostic Protocols (DIAG-PRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. *Proceedings 15th International Conference of the Organization of Citrus Virologists*, in press. Riverside (US).

Cambra, M., Gorris, MT., Román, MP., Terrada, E., Garnsey, SM., Camarasa, E., Olmos, A. & Coloner, M. (2000) Routine detection of citrus tristeza virus by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinante antibodies. *Proceedings 14th International Conference of the Organization of Citrus Virologists*, pp. 34-41. IOCV, Riverside (US)

Cambra, M., Moreno, P. & Navarro, L. (1979) [Rapid detection of *Citrus Tristeza Virus* by ELISA.] *Anales INIA, Serie Protección Vegetal* 12, 115-125

Costa, A.S. and Müller, G.W. (1980) Tristeza control by cross protection: a US–Brazil cooperative success. *Plant Dis.* 64, 538–541.

Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Yu, C., Tao, Q., Chen, C., Wendell, M.K., Zhang, H.-B. and Gmitter, F.G. Jr. (2001) Fine genetic mapping and BAC contig development for the

citrus tristeza virus resistance gene locus in *Poncirus trifoliata* (Raf.). *Mol. Genet. Genomics*, 265, 739–747.

Duran-Vila, N. and Moreno, P. (2000) *Enfermedades de los Cítricos*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests (2004) *Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés* PM 7/31. OEPP/EPPO, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 155–157, 239–246.

Fang, D.Q. and Roose, M.L. (1999) A novel gene conferring Citrus tristeza virus resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. *HortScience*, 34, 334–335.

Fang, D.Q., Federici, C.T. and Roose, M.L. (1998) A high-resolution linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics*, 150, 883–890.

Fraser, L. (1952) Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agr. Gaz. N.S. Wales*, 63, 125–131.

Garnsey, S.M., Barrett, H.C. and Hutchinson, D.J. (1987) Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica*, 19, 187–191.

Garnsey, S.M., Gottwald, T.R. and Yokomi, R.K. (1998) Control strategies for citrus tristeza virus. In: *Plant Virus Disease Control* (Hadidi, A., Khetarpal R. and Koganezawa, H., eds), pp. 639–658. St. Paul, MN: APS Press.

Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M. and Henderson, C.T. (1993) Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: *Proceedings of*

the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Moreno, P., da Graça, J. and Timmer, L.W., eds), pp. 39–50. Riverside, CA: IOCV.

Gmitter, F.G. Jr, Xiao, S.Y., Huang, S. and Hu, X.L. (1996) A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. *Theor. Appl. Genet.* 92, 688–695.

Gonsalves, D., Purcifull, D.E. and Garnsey, S.M. (1978) Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 68, 553–559.

Hung TH, Wu ML, Su HJ (2000) A rapid method based on the onestep reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *J Phytopathol* 148, 469–475

Ieki, H. and Yamaguchi, A. (1988) Protective interference of mild strains of citrus tristeza virus against a severe strain in Morita Navel orange. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Navarro, L., eds), pp. 86–90. Riverside, CA: IOCV.

Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R. and Alvarez-Alvarez, A. (2005) First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agron. Lusit.* 51, 19–21.

McClellan, A.P.D. (1957) Tristeza virus of citrus: evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis. Repr.* 41, 821.

McClellan, A.P.D. (1960) Seedling-yellows in South African citrus trees. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 3, 259–279.

Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A., Carbonell, E.A. and Navarro, L. (1997a) Molecular markers flanking citrus tristeza virus resistance gene from *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Theor. Appl. Genetics*, 94, 458–464.

Mestre, P.F., Asins, M.J., Pina, J.A. and Navarro, L. (1997b) Efficient search for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily Aurantioideae. *Theor. Appl. Genetics*, 95, 1282–1288.

Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L. (2008) *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol*, vol. 9, no. 2, pp. 251-268.

Müller, G.W., Costa, A.S., Castro, J.L. and Guirado, N. (1988) Results from preimmunization tests to control the Capao Bonito strain of tristeza. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Navarro L., eds), pp. 82–85. Riverside, CA: IOCV.

Narváez, G., Skander, B.S., Ayllón, M.A., Rubio, L., Guerri, J. and Moreno, P. (2000) A new procedure to differentiate citrus tristeza virus isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J. Virol. Methods*, 85, 83–92.

Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Arregui, J.M., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A. and Zaragoza, S. (2002) The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila, N., Milne, R.G. and da Graça, J.V., eds), pp. 306–316. Riverside, CA: IOCV.

Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Garnsey, S.M. and Lee, R.F. (1998) Serological differentiation of Citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis.* 82, 1276–1280.

Nolasco, G., Deblas, C., Torres, V. and Ponz, F. (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant-viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods*, 45, 201–218.

Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. and Terrada, E. (1999) New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Res.* 27, 1564–1565.

Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. and Lee, R.F. (1990) A monoclonal antibody which discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 80, 224–228.

Roistacher, C.N. (1981) A blueprint for disaster. I. The history of seedling yellows disease. *Citrograph*, 67, 4–24.

Roistacher, C.N. (1991) *Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis*. Rome: FAO.

Rosner, A. and Bar-Joseph, M. (1984) Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology*, 139, 189–193.

Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., Brlansky, R.H., (2005). A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *J. Virol. Methods* 129, 47–55.

Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J. and Ambrós, S. (2007) A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues. *J. Virol. Methods* 145, 96–105.

Saponari, M., Manjunath, K. and Yokomi, R.K. (2007) Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods*, doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.026.

Schneider, H. (1959) The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace, J.M., ed.), pp. 73–84. Berkeley, CA: University of California Division of Agricultural Sciences.

Silva, G., Nolasco, G. (2013) Epidemiological situation of *Citrus tristeza virus* in mainland Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 52, 472–477.

Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Graham, J.H. (2000) *Compendium of Citrus Diseases*. St Paul, MN: APS Press.

Van Vuuren, S.P., Collins, R.P. and da Graça, J.V. (1993) Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Dis.* 77, 24–28.

Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, S.G., Pérez de San Román, C. and Sanz, A. (1986) Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67, 91–96.

Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods* 39, 27–37

Yang, Z.-N., Ye, X.-R., Molina, J., Roose, M.L. and Mirkov, T.E. (2003) Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the Citrus tristeza virus resistance gene (ctv) locus in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Physiol.* 131, 482–492.

Yoshida, T. (1985) Inheritance of susceptibility to citrus tristeza virus in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Bull. Fruit Tree Res. Sta.* 12, 17–25.

Yoshida, T. (1993) Inheritance of immunity to citrus tristeza virus of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids. *Bull. Fruit Tree Res. Sta.* 25, 33–43

Yoshida, T. (1996) Graft compatibility of Citrus with plants in the Aurantoidea and their susceptibility to citrus tristeza virus. *Plant Dis.* 80, 414–417.

Zaragoza, S. (2007) *Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo*. PhD thesis, Universidad Politécnica de Valencia.

5.2 – Referências online

Agroportal.pt, Fruticultura: mais de três milhões de árvores para plantação produzidas anualmente no distrito de Coimbra Disponível em: <http://www.agroportal.pt/x/agronoticias/2007/10/24g.htm> (Acedido em 8 de Julho de 2015).

Drapalg.min-agricultura.pt, Ofício Circular N°3/2015. Disponível em: http://www.drapalg.min-agricultura.pt/downloads/noticias/9mar2015_OfCircDGAV32015_TRIOZA.pdf (Acedido em 24 de Julho de 2015)

DRAPC, Piolho negro dos citrinos e Virus da Tristeza dos Citrinos. Disponível em: http://www.drapc.minagricultura.pt/base/documentos/ficha_tecnica_toxoptera.pdf (Acedido em 4 de Julho de 2015)

5.3 – Referências de imagens

[1]-<http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=353&figno=10> (Acedido em 8 de Julho de 2015).

[2]-<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5194049> (Acedido em 8 de Julho de 2015).

[3]-http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_tristeza/CTV000_map.htm (Acedido em 8 de Julho de 2015).

[4]-**Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J, Peña L.** (2008) *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol*, vol. 9, no. 2, pp. 254.

[5]-**EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests** (2004) *Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés* PM 7/31. OEPP/EPPO, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 252.

[6]-http://www.lynchwood-diagnostics.co.uk/images/PCR_Protocol_Picture.jpg (Acedido em 8 de Julho de 2015).