

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

Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)

Renata Faier Calegario

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

**Piracicaba
2009**

**Renata Faier Calegario
Engenheira Agrônoma**

**Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do
ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2009**

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

Calegario, Renata Faier

Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) / Renata Faier Calegario. - - Piracicaba, 2009.

123 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009.
Bibliografia.

1. Ácaros 2. Anticorpos 3. Citricultura 4. Fitopatologia 5. Imunohistoquímica 6. Leprose
7. Proteínas 8. Vetores de doenças de plantas 9. Vírus de plantas I. Título

CDD 634.3
C148d

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

DEDICO

***Aos meus pais, Gonzaga e Faier,
à minha filha Pietra e
ao meu companheiro Mateus.***

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Elliot Watanabe Kitajima, por me transmitir o verdadeiro significado do conhecimento, pela orientação, amizade, confiança e brilhante participação neste trabalho.

À Dra. Juliana Freitas-Astúa pela fundamental co-orientação, amizade, ótimos conselhos e discussões, os quais tornaram este trabalho mais rico e substancial.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Marcos A. Machado e ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Labate e à amiga Dra. Mônica T. V. Labate, pelo auxílio na expressão e sequenciamento das proteínas

À Professora Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado pelo auxílio na produção de antissoro e ao Dr. Luís A. Peroni, pela amizade e acompanhamento durante esta etapa do trabalho.

À Dra. Eliane C. Locali-Fabris por gentilmente ceder o antissoro contra a proteína p29 do CiLV-C utilizado neste trabalho.

Ao Professor Dr. Shaker Chuck Farah e ao M.Sc. Maxuel de Oliveira Andrade pelo auxílio na árdua etapa de purificação das proteínas e por contribuírem com boas opiniões.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Rezende pela amizade, auxílio acadêmico e emocional, e por contribuir com ótimas idéias durante os testes dos antissoros.

Às amigas do laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP, Adriana Moreira e Adriana Jadão, e à amiga Ana Paula, pelo carinho, apoio e por sempre me transmitirem pensamentos positivos tornando minha vida mais alegre.

Ao técnico do Laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP, José Edivaldo Buriolla, pelo auxílio nas imunizações dos coelhos.

Aos amigos e professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP.

Ao amigo e técnico do NAP/MEPA-ESALQ/USP, Renato Barbosa Salaroli, pela ajuda técnica, bom humor e por ter me socorrido nas horas difíceis.

Ao amigo e Professor Dr. Francisco André Tanaka por estar sempre ao meu lado apoiando, ajudando e ouvindo.

Às amigas do NAP/MEPA-ESALQ/USP Renata Takassugui Gomes, Renata Antonioli-Luizon e Aline.

Ao meu grande amigo Gleiber, pela maravilhosa e irreverente amizade e, pelo apoio em todos os momentos difíceis e agradáveis que passei em Piracicaba.

Aos meus amigos do coração e ex-viçosenses Felipe, Patrícia, Luan, Flora e Luciana, por me receberem em Piracicaba de braços abertos e por se tornarem a extensão da minha família.

À Escola Waldorf Novalis por terem sempre cuidado da minha filha Pietra com amor, dando-me tranquilidade para poder trabalhar neste projeto.

Aos amigos e Pais Waldorfs Carla, Léo, Janaína, Patrícia, Marcelo, Magali, Reinaldo, Balu e Luciene que me ofereceram apoio cuidando da Pietra nos momentos em que estive trabalhando.

À Pietra, minha filha maravilhosa, grande companheira e incentivadora, pelo amor incondicional e por surpreendentemente compreender a importância do meu trabalho.

Ao meu grande amor Mateus, pelo companheirismo, amizade e compreensão, por sempre me transmitir tranquilidade e paz de espírito, e por cuidar de mim e da Pietra com muito amor e carinho.

À minha irmã Fagoni, por sempre acreditar no meu potencial e à minha maravilhosa sobrinha Natasha, por me proporcionar bons momentos de relaxamento com sua música.

Aos meus pais Gonzaga e Faier que me apoiaram em todos os momentos da minha vida acadêmica me fortalecendo com muito amor.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i>	15
2.2 Leprose dos citros.....	17
2.3 O vetor.....	22
2.4 Expressão de proteínas virais.....	24
2.5 Expressão <i>in vitro</i> de proteínas em <i>E.coli</i>	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Amplificação das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i>	33
3.2 Clonagem das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i>	34
3.3 Subclonagem das ORFs <i>mp</i> e <i>helicase</i> no vetor pDEST TM 17.....	35
3.4 Expressão <i>in vitro</i> das proteínas MP e Helicase.....	37
3.4.1 Transformação.....	37
3.4.2 Expressão em <i>E. coli</i> BL21-AI TM (Tecnologia Gateway).....	38
3.4.3 Expressão em <i>E. coli</i> BL21-DE3, BL21-DE3-pLysS e BL21-DE3-RP.....	39
3.5 Extração de proteínas.....	40
3.5.1 Proteína Helicase.....	40
3.5.2 Proteína de Movimento.....	41
3.6 Espectrometria de Massa.....	42
3.6.1 Digestão das proteínas.....	42
3.6.2 Sequenciamento das proteínas.....	43
3.7 Purificação das proteínas.....	44
3.7.1 Helicase.....	44
3.7.2 Proteína de Movimento.....	45
3.8 Produção dos antissoros.....	47
3.9 Testes Sorológicos dos anticorpos.....	49
3.9.1 PTA-ELISA (“Plate Trapped Antigen - Enzyme Linked Immunosorbent Assay”...)	49

3.9.2 Western Blot.....	50
3.9.3 Tissue Blotting.....	51
3.9.4 Microscopia eletrônica de transmissão do ácaro.....	52
3.9.5 Imunolocalização.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 Amplificação das ORFs <i>helicase</i> e <i>mp</i>	57
4.2 Clonagem das ORFs <i>helicase</i> e <i>mp</i>	58
4.3 Expressão <i>in vitro</i>	64
4.4 Purificação das proteínas.....	72
4.4.1 Helicase.....	72
4.4.2 Proteína de movimento (MP).....	73
4.5 Testes sorológicos dos antissoros.....	77
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Imunolocalização <i>in situ</i>	89
4.6.1 Em planta.....	89
4.6.2 Ácaro vetor <i>Brevipalpus phoenicis</i>	95
4.6.2.1 Discussão sobre o modelo de circulação do CiLV-C no ácaro vetor.....	100
5 CONCLUSÕES.....	107
Referências.....	109

RESUMO

Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae)

A leprose é uma das principais doenças na citricultura brasileira devido à sua ocorrência difundida nos pomares e aos altos custos para o controle químico do ácaro vetor. A doença compromete a produção da planta e sua vida útil, manifestando-se através de lesões locais cloróticas ou necróticas em folhas, ramos e frutos, levando à queda prematura destes órgãos e à seca de ramos. O patógeno, Citrus leprosis virus C (CiLV-C), recentemente classificado como espécie tipo de um novo gênero de vírus de planta, *Cilevirus*, é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Apesar de haver consenso de que a doença tem etiologia viral, ainda existem muitas questões pendentes sobre as interações vírus-planta-vetor, cujas soluções contribuirão para o controle integrado da doença. O presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre a interação do vírus com células hospedeiras através de ensaios de imunolocalização das proteínas MP (putativa proteína de movimento), helicase (associada à replicação) e p29 (putativa proteína capsidial) do CiLV-C. Para tal, as sequências codificadoras das ORFs *mp* e *hel* foram amplificadas via RT-PCR e clonadas em vetor de expressão. Em seguida, promoveu-se a expressão *in vitro* das respectivas proteínas em células de *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica. A proteína MP pura foi utilizada para produção de antissoro policlonal específico que foi testado quanto à especificidade por métodos sorológicos. Os resultados do ELISA mostraram que o antissoro apresentou reação positiva com extratos foliares de lesões lepróticas em todos os estágios de desenvolvimento da doença, quando utilizado em altas concentrações. Além disso, lesões maduras reagiram mais intensamente que lesões mais novas. Por Western Blot, detectou-se somente a proteína pura, não sendo possível obter reação positiva em extrato de lesões foliares. Também não foi possível detectar a MP por imunolocalização *in situ*. Os resultados em conjunto sugerem que ocorre baixo nível de expressão da MP nos tecidos do hospedeiro. Empregando-se anticorpo policlonal contra proteína p29 do CiLV-C, foi possível detectar o CiLV-C em extratos de lesões foliares de leprose por ambos os métodos sorológicos testados e também por Tissue Blotting. Ensaios de imunolocalização *in situ* permitiram confirmar que as partículas baciliformes presentes em cisternas do retículo endoplasmático de tecidos de lesões lepróticas em plantas representam de fato vírions do CiLV-C. Além disso, também demonstrou-se que o viroplasma que ocorre no citoplasma representa o sítio de acúmulo da proteína p29. Este mesmo ensaio revelou que partículas baciliformes que ocorrem entre membranas de células adjacentes (intestino médio, glândulas prosomais, músculos e epiderme) de *B. phoenicis* virulíferos são de fato do CiLV-C. A ausência de viroplasma no ácaro sugere que a relação vírus/vetor seria do tipo circulativo, sem replicação. Baseado neste fato discutem-se alternativas para explicar como o vírus trafegaria do lúmen do intestino até o duto salivar para causar infecção numa planta sadia.

Palavras-chave: Citrus leprosis virus C (CiLV-C); *Brevipalpus phoenicis*; *Citrus sinensis*; Expressão de proteínas; Antissoro policlonal; Imunolocalização *in situ*

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

