

**CARLOS ALEXANDRE ZANUTTO**

**CAPACIDADE PROTETIVA DE NOVOS ISOLADOS FRACOS DE *Citrus*  
*tristeza virus* PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMA DE  
PRÉ-IMUNIZAÇÃO DE LARANJA ‘PÊRA’**

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO – 2009**

**CARLOS ALEXANDRE ZANUTTO**

**CAPACIDADE PROTETIVA DE NOVOS ISOLADOS FRACOS DE *Citrus*  
*tristeza virus* PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMA DE  
PRÉ-IMUNIZAÇÃO DE LARANJA ‘PÊRA’**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

**MARINGÁ  
PARANÁ – BRASIL  
DEZEMBRO - 2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Z34c Zanutto, Carlos Alexandre, 1967-  
Capacidade protetiva de novos isolados fracos de *Citrus tristeza virus* para utilização em programa de pré-imunização de laranja 'Pêra' / Carlos Alexandre Zanutto. -- Maringá, 2009.  
xi, 117 f. : figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2009.

1. Tristeza dos citros. 2. Citros - Proteção cruzada. 3. Citros - Análise molecular. 4. Citros - Indexação biológica. 5. *Citrus tristeza virus* (CTV) - Proteção cruzada - Isolados fracos. 6. Citricultura. I. Nunes, William Mário de Carvalho, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 21.ed. 634.30498

CARLOS ALEXANDRE ZANUTTO

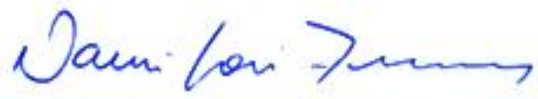
**CAPACIDADE PROTETIVA DE NOVOS ISOLADOS FRACOS DE *CITRUS*  
*TRISTEZA VÍRUS* PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMA DE PRÉ-  
IMUNIZAÇÃO DE LARANJA 'PERA'**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, na área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de dezembro de 2009.



Pesq. Dr. Sérgio Alves de Carvalho



Prof. Dr. Dauri José Tessmann



Prof. Dr. João Batista Vida



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Júlia Gorazza Nunes



Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes  
(Orientador)

*Meu filho, se acolheres minhas palavras e guardares com carinho meus preceitos, ouvindo com atenção a sabedoria e inclinando teu coração para o entendimento, se tu apelares à penetração, se invocares a inteligência, buscando-a como se procura a prata, se a pesquisares como um tesouro, então compreenderás o temor do Senhor, e descobrirás o conhecimento de Deus, porque o Senhor é quem dá a sabedoria, e de sua boca é que procedem a ciência e a prudência.*

*Ele reserva para os retos a salvação e é um escudo para os que caminham com integridade, protege as sendas da retidão e guarda o caminho de seus fiéis. Então compreenderás a justiça e a equidade, a retidão e todos os caminhos que conduzem ao bem.*

*Quando a sabedoria penetrar em teu coração e o saber deleitar a tua alma, a reflexão velará sobre ti, amparar-te-á a razão, para preservar-te do mau caminho, do homem de conversas tortuosas que abandona o caminho reto para percorrer caminhos tenebrosos, que se compraz em praticar o mal e se alegra com a maldade do homem cujos caminhos são tortuosos e os trilhos sinuosos.*

*Ela te preservará da mulher alheia, da estranha que emprega palavras lisonjeiras, que abandona o esposo de sua juventude e se esquece da aliança de seu Deus.*

*Sua casa declina para a morte, seu caminho leva aos lugares sombrios, não retornam os que a buscam, nem encontram as veredas da vida.*

*Assim tu caminharás pela estrada dos bons e seguirás as pegadas dos justos, porque os homens retos habitarão a terra, e os homens íntegros nela permanecerão, enquanto os maus serão arrancados da terra e os pérfidos dela serão exterminados.*

*Provérbios, 2*

À

Minha esposa Elaine,

*“Alegrem-se na esperança, sejam pacientes na tribulação, perseverem na oração.”*

*Romanos 12:12*

Aos

Meus Filhos, Gabriel e Rafael, Alegrias de minha vida,

*“Nunca lhes falte o zelo, sejam fervorosos no espírito, sirvam ao Senhor.”*

*Romanos 12:11*

*“E não nos cansemos de fazer o bem, porque a seu tempo ceifaremos, se não desfalecermos.”*

*Gálatas 6:9*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS porque nos criou à sua imagem e semelhança.

Ao Prof. Dr. Gerd Walter Müller, pela dedicação, pelo exemplo de profissional e pela amizade.

À Profa. Dra. Maria Júlia Corazza, pela orientação, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes, pela orientação, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. João Batista Vida, pelo apoio, colaboração e amizade.

À Universidade Estadual de Maringá, através do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pela oportunidade e disponibilidade para a execução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” pela colaboração.

Aos amigos do NBA, Rúbia, Alessandra, Alcides, Walter, Eduardo, Amalrídio, Osmar, Inaiara, Fernanda e tantos outros que de forma tão importante colaboraram, com a amizade.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao Viveiro de Mudas Pratinha, pelo fornecimento de materiais e mão de obra.

Aos Srs. José Gilberto Pratinha, Benno Roes, José Croce Filho e Dirlene Rinaldi pelo entusiasmo contagiante pela citricultura paranaense.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

OBRIGADO.

*Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.*

*Isaías 41:10*

## **BIOGRAFIA**

CARLOS ALEXANDRE ZANUTTO, filho de Aparecido Antonio Luiz Zanutto (in memoriam) e Anna Maria Ovigli Zanutto (in memoriam), nasceu em Maringá, Paraná, no dia 15 de Fevereiro de 1967.

Em Dezembro de 1992, concluiu o curso de Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em Abril de 1997, concluiu o curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em Agosto de 2002, foi aprovado em Concurso Público para o cargo de Eng. Agrônomo na Universidade Estadual de Maringá.

Em Março de 2006, iniciou o curso de Pós-Graduação em Agronomia, em nível de Doutorado, área de concentração Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá, realizando pesquisas no âmbito da Fitopatologia.

No dia 16 de Dezembro de 2009, submeteu-se à banca para a defesa de doutorado.



## ÍNDICE

### **CAPÍTULO I - CAPACIDADE PROTETIVA DE NOVOS ISOLADOS FRACOS DE *Citrus tristeza virus* PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMA DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO DE LARANJA ‘PÊRA’**

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>1</b>
A Citricultura Brasileira.....	<b>1</b>
A Citricultura no Paraná.....	<b>2</b>
A Tristeza dos Citros.....	<b>5</b>
Um Breve Histórico.....	<b>5</b>
Hospedeiros, Sintomas, Transmissão e Epidemiologia do CTV.....	<b>8</b>
Controle.....	<b>11</b>
O Fenômeno da Proteção Cruzada.....	<b>15</b>
Caracterização e Propriedades Biológicas do CTV.....	<b>19</b>
Justificativas do Trabalho.....	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>27</b>

### **CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DO *Citrus tristeza virus* COM POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO**

<b>RESUMO</b> .....	<b>48</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>49</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
Origem dos Isolados de CTV com Potencial para Pré-Imunização.....	<b>51</b>
Indexação para CVC.....	<b>52</b>
Caracterização Biológica.....	<b>54</b>
Indexação Biológica para Vírus e Viróides.....	<b>54</b>

Caracterização Molecular.....	56
Isolamento e Purificação de dsRNA.....	56
Transcrição Reversa e Amplificação do Gene da Proteína do Capsídeo do CTV (RT-PCR).....	56
Análise RFLP.....	57
Análise SSCP.....	57
Análise dos Dados.....	57
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

**CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROTEÇÃO OFERECIDA POR NOVOS ISOLADOS FRACOS DO *Citrus tristeza virus* SELECIONADOS EM UM PROGRAMA DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>70</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>71</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>76</b>
Inoculação de Desafio Utilizando o Vetor.....	77
Inoculação de Desafio Utilizando a União de Tecidos (enxertia).....	78
Monitoramento da Inoculação de Desafio.....	79
Análise Molecular do Gene do Capsídeo (GCP) do CTV por Meio da Técnica de SSCP.....	79
Avaliação da Proteção Oferecida pelos Isolados Fracos de CTV em Condições de Campo com Alta Pressão de Inóculo Severo.....	81
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>

## RESUMO

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **CAPACIDADE PROTETIVA DE NOVOS ISOLADOS FRACOS DE *Citrus tristeza virus* PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMA DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO DE LARANJA ‘PÊRA’**. Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

Para o controle dos danos induzidos pelo vírus da tristeza dos citros, adotou-se o uso de porta-enxertos tolerantes e a pré-imunização, que utiliza isolados fracos do *Citrus tristeza virus* (CTV) para proteger contra infecções posteriores com isolados severos. Estudos demonstram que isolados fracos selecionados na região de implantação do pomar são superiores em suas características protetivas. Nessa perspectiva, 20 plantas de laranja elite da variedade ‘Pêra’, que se destacavam das demais pela produção e desenvolvimento, foram selecionadas nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná e submetidas à indexação biológica e testes moleculares para detecção de vírus, viróides e bactérias, causadores de doenças em citros. O valor protetivo dos isolados de CTV dessas plantas foi determinado, em uma primeira etapa, por meio da caracterização molecular pelas análises RFLP (restriction fragment length polymorphism) e SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) do gene da proteína do capsídeo, estabelecendo comparações com isolados fracos e severos conhecidos. Na etapa seguinte, esses isolados potencialmente fracos e protetivos foram submetidos a testes de desafio com a inoculação de isolado severo ‘Rolândia’ por meio da união de tecido (enxertia) ou pelo vetor ‘Pulgão Preto dos Citros’ (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). Os resultados mostraram que as plantas selecionadas apresentavam potencial para serem utilizadas em programas de pré-imunização, visto que a indexação biológica e a caracterização molecular através de RFLP e SSCP do gene da capa protéica indicaram a presença de isolados fracos do vírus da tristeza. Dentre esses, alguns isolados se destacavam mostrando um melhor valor protetivo frente ao desafio com isolados severos, evidenciado pela análise SSCP das plantas desafiadas e mantidas em estufa. A análise molecular SSCP

mostrou ser uma excelente ferramenta complementar a experimentos de desempenho a campo para se monitorar a estabilidade do complexo viral presente nas plantas. A avaliação dos isolados através da análise SSCP e em experimento a campo apontou o isolado número 1, coletado no Município de Cruzeiro do Sul (CS-1), como o isolado mais promissor e que pode oferecer melhor proteção a plantas de laranja ‘Pêra’ em pomares comerciais implantados no Norte e Noroeste do Paraná. O isolado severo do CTV, denominado Rolândia, mostrou-se estável e com alta divergência genética em relação aos demais isolados severos utilizados (Capão Bonito e Barão B) e a todos os isolados testados.

Palavras-chave: Tristeza dos citros, proteção cruzada, análise molecular, indexação biológica.

## ABSTRACT

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **PROTECTIVE CAPACITY OF NEW *Citrus Tristeza Virus* MILD ISOLATES FOR A PRE-IMMUNIZATION PROGRAM OF PERA SWEET ORANGE.** Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

For the control of the damages induced by the *Citrus tristeza virus* (CTV), it was adopted the use of tolerant rootstock and the pre-immunization, which uses mild CTV isolates to protect against subsequent infections with severe isolates. Studies have demonstrated that selected mild isolates in the region of orchard are superior in their protective characteristics. In this perspective, 20 plants of elite 'Pêra' sweet orange, which have been standing out for their production and development were selected in the North and Northwest regions of the State of Paraná and subjected to the biological indexation and molecular tests for detection of virus, viroides and bacteria, responsible for the diseases in citrus. The protective value of the isolates of CTV of those plants was determined, in a first stage, through the molecular characterization by the RFLP analyses (restriction fragment length polymorphism) and SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) of the gene of the capsid protein, establishing comparisons between mild and severe isolates. In the next stage, those isolates potentially mild and protective, were subjected to challenge tests with the inoculation of severe isolate 'Rolândia' through the union of tissues (grafting) or through the vector 'Brown citrus aphid' (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). The results showed that the selected plants presented potential to be used in pre-immunization programs, and biological indexation and the molecular characterization through RFLP and SSCP of the gene of the capsid protein indicated the presence of mild isolates of the virus. Among those isolates, some stood out, showing a better protective value, front to the challenge with the severe isolate, evidenced by SSCP analysis of the plants kept in greenhouse. The molecular analysis SSCP showed to be an excellent complementary tool to

experiments of field performance, in order to monitor the stability of the viral complex presented in the plants. The evaluation of isolates through the SSCP analysis and in field experiment, showed the isolate number 1, collected in the Cruzeiro do Sul County (CS-1) as the most promising isolate to the protection of 'Pera' sweet orange on commercial orchards located in northern and northwestern of Paraná. The severe isolate of the CTV called Rolândia, showed itself stable and with high genetic divergence among the others severe isolates used (Capão Bonito and Barão B), as well as all the isolates tested.

Keywords: Citrus Tristeza, cross-protection, molecular analysis, biological indexing.

## INTRODUÇÃO

### A Citricultura Brasileira

Originárias das regiões úmidas tropicais e sub-tropicais do continente asiático e ilhas adjacentes, as plantas cítricas (laranjeiras, limoeiros, tangerineiras, entre outras espécies) foram introduzidas no Brasil, provavelmente, pelo Estado da Bahia, por volta do ano de 1530, permanecendo até 1900 sem se constituir como atividade econômica (PASSOS, 1990). Inicialmente, a citricultura desenvolveu-se mais nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia em plantações de pé franco. Em 1760, no Rio Grande do Sul, foi fundada a Estação Experimental de Pomicultura, principal centro de pesquisa do sul, na época (DONADIO et al., 2005).

O estabelecimento de grandes núcleos populacionais em São Paulo e Rio de Janeiro tornaram possível o plantio em escala pelo consumo garantido nesses centros, determinando, assim, as principais regiões produtoras. A qualidade das frutas produzidas no Rio de Janeiro, graças às condições climáticas favoráveis, contribuiu para tornar famosas as laranjas Pêra e Seleta (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), assim como a Mexerica-do-Rio (*Citrus deliciosa* Ten.). Em São Paulo, já em 1915, mudas de excelente qualidade enxertadas em laranjeira Azeda (*Citrus aurantium* L.) eram comercializadas pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento, e apoiada pelo Governo do Estado, a citricultura paulista expandiu-se (DONADIO et al., 2005).

Atualmente, a citricultura é um dos setores mais competitivos e de maior potencial de crescimento do agronegócio (NEVES et al., 2006). Para a produção brasileira, contribuem quase exclusivamente as laranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), sendo pequena a produção de tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) e limões [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] e menos significativa ainda a de pomelos (*Citrus paradisi* Macfad.). Com cerca de 40% da produção mundial de laranja *in natura* e 60% da produção de suco de laranja concentrado, a citricultura brasileira ocupa aproximadamente um milhão de hectares, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor.

Para esse Estado, a citricultura constitui-se em uma das atividades rurais de maior importância econômica, sendo a base quase total da economia de muitos municípios (FUNDECITRUS, 2001).

O volume movimentado no país pelo agronegócio citrícola supera R\$ 9 bilhões por ano. Só em exportações de suco concentrado e congelado movimenta US\$1,5 bilhão (representando 80% do mercado mundial), e gera 400 mil empregos diretos, com 3 mil frentes de trabalho simultâneas na colheita, e cerca de 3 milhões de empregos indiretos (FUNDECITRUS, 2001; NEVES et al., 2006).

A produtividade brasileira, no entanto, ainda é baixa, apresentando cerca de 1,8 caixas de 40,8 kg/planta/ano (FAO, 2009). Desse modo, a grande expansão dessa agroindústria no Brasil, principalmente nos anos 1960 e 1970, deveu-se muito mais à expansão da área de plantio do que ao aumento da produtividade, sendo esta associada a muitos fatores, dos quais se salientam a expansão simultânea de pragas e doenças, com significativo reflexo nos custos de produção, considerando-se ainda o fato de grande parte dessa produção ser conduzida em áreas não-irrigadas e a estreita base genética utilizada. Essa estreita base genética, por sua vez, utiliza como porta-enxerto poucas espécies, como o limão ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) e tangerina ‘Cleópatra’ (*C. reshni* hort. ex Tanaka), que juntos, representam mais de 72% das mudas formadas no Brasil (POMPEU JUNIOR, 2005). A principal variedade copa é a laranja Pêra, com 37,8%, seguida de Natal e Valência, com 23,9% cada (DONADIO et al., 2005). Portanto, não é surpresa constatar que os desafios da citricultura estão quase todos associados a problemas de ordem fitossanitária.

#### A Citricultura no Paraná

Apesar de as plantas cítricas serem plantadas em todos os 26 Estados da federação, aproximadamente 92% procede dos Estados da Bahia, Sergipe, Minas Gerais e especialmente São Paulo, cuja produção representa 79% do total produzido no país (AMARO e MAIA, 1997; DONADIO et al., 2005).



As estatísticas sobre a produção de citros pouco levam em conta o Estado do Paraná. Nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado, o cultivo de plantas cítricas foi interdito por mais de trinta anos devido à ocorrência da doença cancro cítrico (RINALDI, 1998) causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Isto se deu com a instituição da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), a partir de 1974 (Decreto nº 75061), pelo Ministério da Agricultura, que interditiou essas regiões para o plantio comercial de citros. Seus rígidos critérios da legislação para a liberação de áreas para o plantio alijaram o Estado do Paraná do direito de cultivar frutos cítricos, devido a decisões políticas, já que não havia suficiente embasamento técnico-científico para tal interdição (HATSCHBACH, 1986; LEITE JUNIOR, 1987; DORETTO e SHIKI, 1987; MORIMOTO, 1990).

Essa interdição restringiu o cultivo de plantas cítricas à região do Alto Ribeira, principalmente nos municípios de Adrianópolis e Cerro Azul, profissionalizando-se na produção de tangerina, da qual é atualmente o segundo maior produtor (28% da produção nacional) (DONADIO et al., 2005). Embora livre de cancro cítrico, esta região apresenta topografia acidentada, não permitindo a mecanização e manejo adequado do solo (DORETTO e SHIKI, 1987).

Com a liberação das áreas interditiadas, a citricultura paranaense iniciou seu desenvolvimento apenas no final da década de 1980, e as condições de clima e solo favoráveis, que têm alçado o Paraná aos primeiros lugares na produção nacional de grãos, têm possibilitado também, nos últimos anos, o incremento da fruticultura.

Dentro dessa atividade agrícola, a citricultura vem apresentando uma evolução positiva na área de plantio, produção e exploração industrial de suco concentrado e pronto para beber. O apoio governamental, as perspectivas de exportação de sucos, o crescente interesse dos agricultores e cooperativas, uma campanha de controle do cancro cítrico mais confiável e aceita, aliados ao desenvolvimento de pesquisas objetivas, têm viabilizado a implantação de um parque citrícola tecnificado e intensivo nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do

Estado (LEITE JUNIOR, 1987). A área de plantio de laranjas passou de 6.617 ha em 1992 para 15.000 ha em 2005. Nesse mesmo período, sua produção evoluiu de 100.932 ton. para 390.000 ton. anuais (DERAL, 2000; IBGE, 2005).

Atualmente, para o Paraná, o levantamento sistemático da produção agrícola, divulgado pelo IBGE (2008), mostra que a área cultivada com laranja está em torno de 20.000 ha e produção de 390.000 toneladas ou 9,56 milhões de caixas de 40,8 kg, o que representa uma produtividade próxima a 26 ton/ha (637 cxs/ha), o que posiciona o Paraná como o quinto maior produtor de laranja dentre as unidades da federação, participando com 2,1% da produção brasileira (BOTEON e NEVES, 2005).

O cultivo de laranja passou a ter maior relevância com a implantação do Plano Estadual de Citricultura, coordenado pela Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), que obteve como resultado um significativo aumento da área cultivada e da produção nos últimos anos. A maior expansão ocorreu na região Noroeste, eixo Maringá, Paranavai e Umuarama, que representa 60% da área cultivada e 68% da produção paranaense (HATSCHBACH, 1986; LEITE JUNIOR, 1987; GUSI et al., 1998)

As regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado do Paraná apresentam as melhores condições de solo e clima para o cultivo de citros. O clima é subtropical, com precipitação média anual entre 1400 e 1800 mm e temperatura média anual variando de 21°C a 22°C na região Norte, 22°C a 23°C na região Noroeste e de 18°C a 21°C na região Oeste. O relevo dessas regiões apresenta-se suavemente ondulado a ondulado, com predomínio de Latossolos Roxos e Terra Roxa Estruturada nas regiões Norte e Oeste e solos derivados do Arenito Caiuá na região Noroeste do Estado (CAVIGLIONE et al., 2000).

No Paraná, existem três indústrias processadoras de suco em funcionamento, a Paraná Citrus (Cocamar - Cooperativa Agroindustrial), a Citri em Paranavaí (Citri Agroindustrial S/A) e a Corol (Cooperativa Agroindustrial de Rolândia), todas elas com capacidade ociosa de processamento.

O destaque é o Noroeste do Estado, sobretudo a região de Paranavaí, que apresenta um polo industrial voltado à exportação e a citricultura ocupa uma área

de 7 mil hectares de uma região que abrange cerca de 150 municípios (BOTEON e NEVES, 2005). É intenção do setor de ampliar os plantios, o que, por sua vez, pressupõe a existência de mudas de alta qualidade e um programa fitossanitário que atenda a essa expansão, visto que a grande maioria dos problemas fitossanitários que atualmente desafiam a citricultura reflete uma estratégia de expansão acelerada, muitas vezes sem a devida atenção quanto a fatores de ordem biótica (pragas e doenças) e abióticas (solo, água, clima, etc.).

## A Tristeza dos Citros

### Um Breve Histórico

As plantas cítricas estão sujeitas a vários problemas de ordem fitossanitária, os quais podem ser limitantes à produção, representando efetiva ameaça econômica aos citros. Dentre estes, destacam-se vírus e viróides que, pela dificuldade de controle e facilidade de transmissão, têm seu controle baseado na utilização de material sadio ou tolerante (MÜLLER et al., 2005).

As variedades cítricas foram cultivadas por quase dois mil anos através do uso de plantas de pé franco, no Oriente e no Mediterrâneo. Entretanto, no século XIX, uma podridão de raízes tornou-se epidêmica, causada pelo fungo *Phytophthora* sp., a qual destruiu as árvores de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) e levou à utilização da laranja Azeda (*Citrus aurantium* L.) como porta-enxerto, uma vez que era tolerante ao patógeno (MÜLLER et al., 2005).

De forma semelhante, em São Paulo, por volta de 1915, na então emergente citricultura paulista, por intermédio da Secretaria de Agricultura e Abastecimento, mudas cítricas de ótima qualidade enxertadas em laranja Azeda eram produzidas e vendidas aos citricultores pioneiros, passando a dominar as novas plantações (DONADIO et al., 2005).

As tentativas de se utilizar o porta-enxerto laranja Azeda em Java, África do Sul e Austrália resultaram em fracasso, devido à presença de um vírus que mais tarde foi denominado *Citrus tristeza virus* (CTV) (MENEHINI, 1946;

BENNET e COSTA, 1949; COSTA, 1956), ao qual esse porta-enxerto se mostrou intolerante (MÜLLER, 1996).

Espécies do gênero *Citrus* são consideradas nativas das regiões tropicais e subtropicais da Ásia e do arquipélago Malaio, locais de origem também da tristeza dos citros. Acredita-se que o vírus e seu vetor, *Toxoptera citricida* Kirk., tenham sido transportados para a África do Sul, vindo da Índia, no século XVII, daí sendo levado para outras áreas, entre essas, os países da Costa Atlântica da América do Sul nas primeiras décadas do século XX (MÜLLER et al., 2005).

A tristeza dos citros teve seu primeiro registro quando ocorria o desenvolvimento da citricultura na África do Sul, observando-se que variedades de laranja doce, quando enxertadas em laranja Azeda, não tinham desenvolvimento satisfatório. Por vários anos acreditou-se que esse problema ocorreria devido à incompatibilidade entre o porta-enxerto e a copa (BORDIGNON et al., 2003).

Na Argentina, em 1930, havia 19 milhões de árvores produtivas. Quinze anos depois, mais de 10 milhões foram perdidas devido à tristeza dos citros (BAR-JOSEPH et al., 1989). Em 1937, no Vale do Paraíba, ocorreu o primeiro relato de tristeza no Brasil (BENNETT e COSTA, 1949). O alastramento da doença era fulminante, logo atingindo todas as zonas citrícolas do país. Assim, em 12 anos, 10 milhões de árvores foram destruídas no País. Estima-se que, no mundo, algo em torno de 100 milhões de plantas foram aniquiladas ou tornaram-se improdutivas (BAR-JOSEPH et al., 1989; MORENO et al., 2008). Além do Brasil e Argentina, também a Califórnia (1939), Flórida (1951), Espanha (1957), Israel (1970) e Venezuela (1980) relataram epidemias destrutivas causadas pelo CTV. Perdas significativas devido ao vírus também ocorreram em Cuba (1992), México (1995), República Dominicana (1996) e Itália (2002) (BAR-JOSEPH et al., 1989; GARNSEY et al., 2000; DAVINO et al., 2003; DAVINO et al., 2005; MORENO et al., 2008).

Após a descoberta da doença no Brasil, várias teorias foram formuladas para explicar seus efeitos, como incompatibilidade fisiológica, acidez e alto teor de umidade no solo, seca prolongada, organismos patogênicos e infecção por

vírus. Seguiram-se muitos trabalhos no sentido de se desvendar o verdadeiro agente causal da doença (BENNETT e COSTA, 1949; BAR-JOSEPH et al., 1989). A primeira suposição de que se tratava de um vírus foi proposta por Bitancourt (1944), entretanto a primeira evidência experimental que apontava para uma infecção viral foi desenvolvida por Meneghini (1946), quando conseguiu transmitir a doença através do pulgão preto dos citros *Toxoptera citricida* (Kirkaldy).

No Brasil, esses resultados foram confirmados por Bennett e Costa (1949), que conseguiram transmitir a tristeza através do pulgão preto dos citros e também por enxertia de borbulhas infectadas, repetindo os dados obtidos por Fawcett e Wallace (1946) na transmissão por borbulhas infectadas.

A confirmação da natureza viral da tristeza dos citros se deu pela microscopia eletrônica, por meio da qual Kitajima et al. (1964) observaram partículas virais (Figura 1) em plantas afetadas pela tristeza, as quais não foram encontradas em plantas saudáveis.

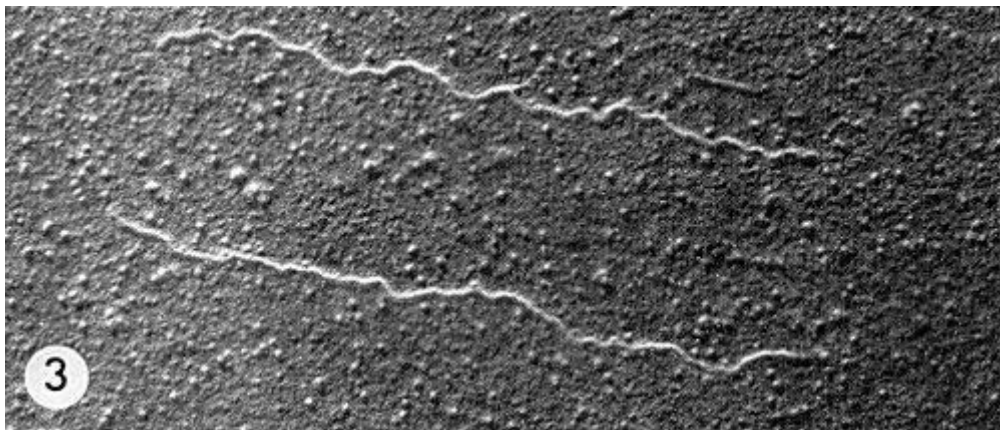


Figura 1- Eletromicrografia de duas partículas filamentosas (2000x12 nm) obtidas de folhas de citros infectadas com *Citrus tristeza virus*. Adaptado de Bar-Joseph et al. (1972).

Em resumo, as epidemias de CTV que ocorreram pelo mundo levaram a grandes perdas de árvores produtivas, mas, além disso, as perdas indiretas foram também muito grandes, com a eliminação do porta-enxerto laranja Azeda que até

hoje não encontrou substituto à altura de suas qualidades agronômicas, visto a produtividade e qualidade de frutos.

Ademais, outros problemas surgiram devido ao uso de porta-enxertos tolerantes ao CTV, tais como baixa resistência à seca, problemas com salinidade ou acidez do solo, sensibilidade a patógenos do solo ou transmissíveis pela enxertia, tais como vírus, viróides e outros agentes infecciosos (BAR-JOSEPH et al., 1989; ROMÁN et al., 2004; MORENO et al., 2008).

### Hospedeiros, Sintomas, Transmissão e Epidemiologia do CTV

Muitas espécies, variedades e híbridos do gênero *Citrus*, como outros membros da família Rutaceae, são infectados pelo CTV, sendo que as únicas hospedeiras não Rutaceae conhecidas são *Passiflora gracilis* Jacq. (MÜLLER et al., 1974; MÜLLER e GARNSEY, 1984) e *P. coerulea* L. (MÜLLER et al., 1974; ROISTACHER e BAR-JOSEPH, 1987; MORENO et al., 2008). A reação dos citros a infecção pelo CTV depende da severidade do isolado, da multiplicação do vírus na planta e da tolerância dos tecidos da planta ao CTV (BENNET e COSTA, 1949; SALIBE, 1973; MÜLLER e GARNSEY, 1984). Segundo estes autores, pomelos, limas ácidas e algumas variedades de laranja doce apresentam-se parcialmente intolerantes a isolados severos, enquanto as tangerinas, a maioria das laranjas doce, os tangelos, o limão Rugoso, o limão Cravo e o Volkameriano, são classificados como tolerantes, já *Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos são considerados resistentes ou imunes.

O CTV causa nas plantas cítricas sintomas que variam de acordo com a espécie copa e porta-enxerto, assim como com a severidade do isolado do vírus e condições climáticas locais. Na condição clássica, ou seja, tendo o porta-enxerto a laranja Azeda, os sintomas são folhas bronzeadas, coriáceas e quebradiças, com um possível amarelecimento da nervura principal, declínio rápido da planta, morte de extremidades (dieback), obstrução, colapso e necrose dos tubos crivados e células companheiras próximas ao ponto de enxertia, produzindo elevada quantidade de floema não funcional nesse ponto, podridão de radículas e

redução do sistema radicular, levando a deficiência no suprimento de água e minerais, o que pode conduzir à morte das plantas na maioria dos casos, sendo denominada ‘declínio rápido’ ou ‘quick decline’ (BENNET e COSTA, 1949; SCHNEIDER, 1959; BAR-JOSEPH et al., 1989; ROMÁN et al., 2004; MORENO et al., 2008).

Outra reação observada do CTV em plântulas de laranja Azeda, limões (*C. limon* (L.) Burm. f.) e lima ácida Galego é um tipo de sintoma denominado amarelecimento do pé franco (seedling yellows), que ocorre quando essas espécies são infectadas com isolados severos do CTV (basicamente em experimentos, sendo raro ocorrer naturalmente). Observam-se forte amarelecimento nas folhas novas, folhas pequenas e retorcidas, com crescimento lento ou paralisadas (MÜLLER et al., 2005).

Com a utilização de porta-enxertos tolerante, como por exemplo, o limão Cravo, danos consideráveis podem ocorrer com isolados que causam caneluras (stem pitting), que são depressões que se formam no lenho, causadas por uma interrupção da atividade meristemática em áreas limitadas do câmbio que resulta em crescimento radial irregular com depressões nos pontos inativados (SCHNEIDER, 1959). Esse sintoma é quase sempre acompanhado de redução do porte da planta, folhas de tamanho reduzido e com clorose, frutos miúdos chamados popularmente de frutos ‘coquinho’, com albedo espesso, elevada acidez e baixo teor de suco. Todavia, as formas de CTV que causam caneluras normalmente não levam a planta à morte. Sintomas assim podem ser observados em espécies cítricas mais intolerantes, tais como a laranja Pêra, as limas ácidas, como o Galego (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) e Tahiti (*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka), pomelos (*C. paradisi* Macfad.) e outros de menor importância (MÜLLER e GARNSEY, 1984; MÜLLER et al., 2005).

O vírus da tristeza pode ser transmitido com facilidade quando uma união vascular for estabelecida, o que ocorre quando se pratica a enxertia.

Experimentalmente, borbulhas, garfos, partes de folhas e raízes podem servir como inóculo com sucesso, podendo ser transmitido também pela cuscuta (*Cuscuta subinclusa* e *C. americana*), mecanicamente por ferimentos no floema e

com certa dificuldade a partir de purificações parciais do vírus (GARNSEY et al., 1977; MÜLLER e GARNSEY, 1984; MÜLLER et al., 2005; HERRON et al., 2006).

Algumas observações, como, por exemplo, a não transmissibilidade através de sementes infectadas (McCLEAN, 1956), e por ser um vírus ter seu nicho ecológico restrito às células do floema de seus hospedeiros, além de que plantas de pé franco não apresentam sintomas para a maioria dos isolados de CTV, levam a deduzir que o CTV apareceu há muitos anos nos centros de origem dos citros e coevoluiu com seus hospedeiros. Como a técnica de enxertia somente foi utilizada a partir do início do plantio comercial de citros, o que antes somente era feito através de sementes (e estas não transmitem o CTV), sugere que uma adaptação à transmissão por afídeos ocorreu durante a evolução, sendo esta a única forma de transmissão e sobrevivência do CTV antes do advento do plantio comercial de citros e sua dispersão pelo mundo (MORENO et al., 2008).

Vários afídeos podem atuar como vetores do vírus da tristeza dos citros com eficiência variável, tais como *Toxoptera citricida*, *T. aurantii*, *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Mysus persicae* e *Dactynotus jaca*. O pulgão preto dos citros, contudo, é praticamente o único vetor eficiente nas condições brasileiras (LEE et al., 1994; BATISTA et al., 2008a; BATISTA et al., 2008b). *Aphis gossypii*, o segundo vetor em termos de eficiência, é o principal vetor do CTV no Mediterrâneo e algumas áreas da América do Norte (CAMBRA et al., 2000). Experimentos de transmissão comparativa de vários isolados de CTV com esses dois vetores (*T. citricida* e *A. gossypii*) mostraram que o *T. citricida* pode transmitir o CTV de 6 a 25 vezes mais eficientemente que *A. gossypii* (YOKOMI et al., 1994).

O pulgão preto dos citros é um inseto com dimensões de 1,5 a 2,4 mm, coloração marrom escura a preta brilhante, diferenciado pelas antenas e asas da fêmea alada. Foi introduzido no Brasil juntamente com o vírus da tristeza dos citros em material propagativo, originário da África do Sul ou Austrália. É a mais eficiente espécie de afídeo vetor do CTV, transmitindo o vírus de forma semipersistente. Pulgões preto individuais virulíferos são capazes de transmitir o



CTV em 30 minutos, necessitando de pelo menos 20 minutos de alimentação para adquiri-lo, sendo que a infectividade é perdida em 24 horas de alimentação em planta sadia (MÜLLER, 1996).

Vários fatores influenciam na taxa de dispersão do CTV em uma determinada área, incluindo-se o tipo e densidade da população de afídeos (HERRERA-ISIDRÓN et al., 2009), condições ambientais que favoreçam o aparecimento de novas brotações e aumento da população de afídeos, como temperatura, precipitação/irrigação e fertilização (CAMBRA et al., 2000). A distribuição espacial e temporal do CTV tem sido estudada em muitos países e utilizando diferentes ferramentas (GOTTWALD et al., 1996b).

Um dos fatores que determinam o padrão de dispersão é o vetor predominante na área. Nas áreas em que o *A. gossypii* predomina, a incidência do CTV aumentou de 5% para 95% o número de árvores infectadas em 8 a 15 anos e estas apresentaram uma agregação limitada e novas plantas infectadas não foram associadas com a proximidade de árvores existentes infectadas, mas na maioria, com árvores distantes. Em contraste, em áreas onde o *T. citricida* é predominante, para o mesmo incremento da doença (5% para 95%), o tempo necessário foi reduzido para 2 a 4 anos, e um rápido e contínuo aumento e agregados de árvores infectadas foram comuns, visto que o padrão de dispersão foi frequentemente de uma árvore infectada existente para outra imediatamente adjacente sadia (GOTTWALD et al., 1995; GOTTWALD et al., 1996a; GOTTWALD et al., 1996b; GOTTWALD et al., 1998; MORENO et al., 2008; BATISTA et al., 2008b).

## Controle

O controle dos danos causados pelo CTV depende em grande escala da incidência da doença, dos isolados de CTV presentes na área, da presença e eficiência do vetor e das variedades cítricas cultivadas. Sendo o CTV uma doença causada por vírus, para os quais não existem métodos curativos econômicos, a estratégia a ser adotada deve ser preventiva.

Desta forma, programas que incluam o uso de quarentena e certificação de mudas e borbulhas parecem a melhor forma de se prevenir a introdução ou a dispersão do CTV em áreas livres do patógeno, principalmente em locais onde ainda se utiliza o porta-enxerto laranja Azeda (NAVARRO et al., 2002).

Nas condições brasileiras, onde o CTV está presente em todas as áreas citrícolas, a recuperação da citricultura nacional foi possível, sobretudo pela utilização de porta-enxertos tolerante (infectados pelo CTV, mas não afetados pelo patógeno). A presença do patógeno terá que ser levada em consideração sempre no planejamento de novos pomares e no desenvolvimento de novos porta-enxertos.

A partir do descobrimento que o agente causal da tristeza dos citros era um vírus transmitido pelo pulgão preto dos citros e por enxertia de material infectado, como medida de controle, no Brasil, foi adotado o uso de porta-enxertos tolerantes em substituição à laranja Azeda, o que não se mostrou completamente viável para algumas variedades de citros (principalmente laranja Pêra, Lima ácida Galego e Grapefruits) (MÜLLER e COSTA, 1977).

Deste modo, outras medidas de controle foram desenvolvidas, como a pré-imunização ou proteção cruzada, conduzidas pela primeira vez no Brasil a partir de 1961 (GRANT e COSTA, 1951; COSTA e MÜLLER, 1966; MÜLLER et al., 1968; MÜLLER, 1972; MÜLLER e COSTA, 1977; COSTA e MÜLLER, 1980; PASSOS, 1997), quando verificaram que a infecção das plantas com isolados fracos do vírus da tristeza protegiam contra infecções posteriores por isolados severos (MÜLLER, 1980). Ou seja, para as variedades copa, que são afetadas por isolados severos, mesmo em porta-enxertos tolerantes o controle baseia-se na pré-imunização, que consiste em promover a infecção de uma planta com uma estirpe fraca do vírus da tristeza, que venha a oferecer proteção contra a infecção com estirpes severas, oferecendo, desta forma, um controle das manifestações fortes da doença (CORAZZA-NUNES et al., 2001; MÜLLER et al., 2005).

Como resultado, no fim do século XX cerca de 80 milhões das plantas de laranja Pêra plantadas no Brasil originou-se desse programa, que distribuiu

material pré-imunizado com isolados fracos protetivos, os quais demonstram ainda hoje sua capacidade protetiva após sucessivas gerações clonais (MÜLLER e COSTA, 1993; MÜLLER et al., 1999; BORDIGNON et al., 2003).

A tristeza dos citros é considerada uma das mais importantes doenças que atingiram a cultura nos últimos 90 anos (TARGON, 1997). A ausência de sintomas em uma planta não implica que o vírus não esteja presente. A maioria das variedades é considerada tolerante pela sua capacidade de conviver com o vírus sem expressiva redução de produção ou desenvolvimento de sintomas (BAR-JOSEPH et al., 1989).

No entanto, não é descartado o perigo da ocorrência de isolados severos do vírus que poderiam quebrar a proteção conferida às plantas pelo isolado fraco, acarretando prejuízos inestimáveis. Desta forma, a seleção de diferentes isolados fracos do vírus para serem utilizados nos trabalhos de pré-imunização de variedades susceptíveis de laranjas é de extrema importância (TARGON, 1997; MÜLLER et al., 1999).

Uma das maiores limitações para o ressurgimento da citricultura paranaense, a partir da década de 1980, consistiu na necessidade de um grande número de mudas para a instalação de pomares comerciais de laranjas nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado, anteriormente interditadas ao plantio. Para contornar tal situação, lançou-se mão de material oriundo de São Paulo, muitas vezes, sem um controle rígido da qualidade das mudas (LEITE JUNIOR, 1992).

A introdução de material contaminado, aliada à possibilidade de reinfecção nos próprios viveiros paranaenses produtores de mudas, são hipóteses consideradas para explicar a presença de haplótipos severos de CTV, infectando plantas de laranja Pêra, principalmente na região Norte do Estado, identificados em estudos de caracterização sintomatológica e molecular, comparativa, de isolados do vírus (CARRARO et al., 2003; ZANINELI-RÉ, 2004).

Dessa maneira, é arriscado o Paraná basear a sua citricultura em material oriundo de fora, pois a experiência tem demonstrado que os melhores resultados têm sido obtidos para uma determinada região quando os isolados do CTV são

selecionados na região em questão. Essa suposição foi verificada inicialmente em um experimento instalado em 1971 na antiga Estação Experimental de Limeira (atual CCSM/IAC), compreendendo 13 clones de laranja Pêra, a maioria tendo sido selecionada na região de Bebedouro, norte do Estado, com clima mais quente, distando cerca de 250 km de Limeira. Os resultados mostraram que dentre as melhores combinações (tecido vegetal e isolado protetivo do CTV) estavam aqueles selecionados na região onde se situa o CCSM (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1977). Em 1977, foi introduzido na Estação Experimental de Itajaí/SC, Epagri, material proveniente do CNPMF/ Embrapa, Cruz das Almas, BA. Em 1994, foi verificado que do material introduzido, dois clones de Valência, apresentavam sintomas de infecção pelo vírus da tristeza; ananicamento, palidez de nervuras, frutos miúdos e caneluras acentuadas (KOLLER et al., 1994).

Uma das possíveis explicações para os dois casos supracitados é de que o complexo viral existente originalmente nas plantas não foi capaz de protegê-las contra os variantes severos das regiões de introdução. Finalmente, um experimento de 27 clones de laranja Pêra instalado na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Capão Bonito (São Paulo), avaliado por SSCP do gene do capsídeo, mostrou que embora possa ser deduzida a ocorrência de um isolado comum em todas as plantas, existem variações entre eles possivelmente associadas à inoculação cruzada pelo pulgão vetor. Padrões de isolados considerados protetivos também já se apresentam misturados com outros componentes (DODDS, 1982; MÜLLER et al., 2000; TARGON et al., 2001).

Atualmente, a tristeza ainda representa uma ameaça para a citricultura nacional em virtude de seu caráter endêmico, pela presença cosmopolita do vetor *Toxoptera citricida* Kirk, o pulgão preto, e da plasticidade do CTV, resultando na ocorrência de uma grande diversidade de haplótipos, muitos dos quais apresentam elevado potencial destrutivo para as espécies cítricas sensíveis.

No Paraná, estudos baseados em levantamentos sintomatológicos (NAKATANI et al., 1997), diagnóstico imunológico e análise SSCP (single strand conformational polymorphism) (CARRARO et al., 2003), análise RFLP

(restriction fragment length polymorphism) associada à sintomatologia (ZANINELI-RÉ, 2004) revelaram a ocorrência de isolados severos de CTV em pomares de laranja Pêra da região Norte do Estado, demonstrando que nem sempre os clones de matrizes pré-imunizadas ou naturalmente selecionadas em outros estados têm se comportado de maneira satisfatória em relação à tristeza. Dessa maneira, é conveniente aprofundar-se na caracterização dos isolados de CTV existentes no Paraná com vistas à seleção de material protetivo da própria região.

### O Fenômeno da Proteção Cruzada

É conceitual que o melhoramento genético visando a se incorporar genes de resistência em cultivares comerciais é a melhor forma para se evitar perdas econômicas pelo ataque de patógenos. No caso dos citros, todavia, algumas de suas características biológicas, especialmente reprodutivas, impedem ou dificultam extremamente o melhoramento convencional. Tais impedimentos são devidos à heterozigose, poliembrião, poliploidia, embrião nucelar, assim como as características da fase juvenil das plantas nascidas de sementes (em torno de 5 anos para floração e ainda mais para atingir a maturidade), além de incompatibilidade e esterilidade de óvulo e/ou pólen (MOREIRA e PIO, 1991; MÜLLER et al., 2005; MORENO et al., 2008).

Desta forma, a estratégia mais eficiente para proteger variedades comerciais contra isolados do CTV que causam caneluras ainda é a proteção cruzada ou pré-imunização com isolados fracos (COSTA e MÜLLER, 1980).

Um isolado fraco candidato a ser um isolado protetivo deve apresentar algumas características, tais como ser bem distribuído em todas as partes da planta, movendo-se rapidamente através dos novos lançamentos para preencher os tecidos novos; apresentar alto título com anticorpos universais, ou seja, alta concentração nos tecidos; ser facilmente transferido por enxertia, uma vez que é desse modo que será transferido para as plantas que se deseja conferir proteção,

ou pelo vetor, já que os isolados diferem na transmissibilidade pelo afídeo (LEE et al., 1994).

Várias foram as teorias para tentar se explicar o mecanismo pelo qual a inoculação de um isolado fraco pode conferir proteção contra a infecção de isolados severos. Entre essas teorias, encontram-se as seguintes: a) formação de substâncias de proteção, semelhantes aos anticorpos nos animais; b) adsorção das partículas do segundo vírus, após estas penetrarem nas células já ocupadas pelo vírus protetor; c) competição para precursores ou para sítios de multiplicação; d) teorias envolvendo a capa protéica do vírus; e) captura da fita negativa do ácido nucléico do segundo vírus (válido apenas para vírus de fita simples de RNA, senso positivo, como o CTV, e para viróides) e f) inibição do movimento sistêmico do segundo vírus (REZENDE e MÜLLER, 1995; REZENDE et al., 2000).

Dentre todas as teorias levantadas para explicar o mecanismo da proteção cruzada, a que aponta para o envolvimento da capa protéica já foi demonstrada experimentalmente, e portanto, não pode ser posta de lado (SHERWOOD e FULTON, 1982). No entanto, mais recentemente o mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), um processo induzido pelo dsRNA (double stranded-RNA, RNA de fita dupla), foi levantado como sendo o mecanismo mais provável para explicar a defesa da planta contra infecções virais (LÓPEZ et al., 2009) e para a proteção cruzada entre estirpes de vírus geneticamente próximos (RATCLIFF et al., 1997; RATCLIFF et al., 1999; REZENDE et al., 2000).

O processo de replicação do CTV envolve a formação de dsRNA, os quais podem desencadear as defesas da planta via PTGS. Além disso, tem sido observado que em lima ácida Galego inoculado com CTV ocorre um alto acúmulo de si-RNAs (RNA de interferência), indicando uma natural e forte resposta antiviral mediada pelo PTGS no hospedeiro. Assim, pode-se especular que nas plantas submetidas à proteção cruzada, os si-RNAs gerados pela estirpe fraca poderiam prevenir subseqüentes infecções por variantes agressivas tendo como alvo para degradação o RNA genômico e subgenômico destes. Porém, a observação de que isolados fracos podem falhar na proteção ou propiciar uma

proteção apenas temporária sugere que o CTV seja capaz de superar o PTGS ou que outros fatores possam ser importantes para uma proteção durável (SAMBADÉ et al., 2002; MORENO et al., 2008).

Outra possibilidade, também baseada em PTGS, para se conferir resistência ao CTV pelos citros é a resistência derivada do patógeno (PDR). O uso de plantas transgênicas expressando genes virais ou sequências capazes de interromper o ciclo de infecção pode representar a melhor forma de se alcançar uma resistência durável ao CTV em citros (DOMÍNGUEZ et al., 2002). A primeira demonstração de PDR para CTV se deu pela incorporação de genes da proteína do capsídeo (CP) de isolados fracos ou severos em lima ácida Galego.

A inoculação do CTV em linhagens transgênicas produziu dois tipos de resposta: a) a maioria das linhagens produziu sintoma semelhante ao controle não transgênico, e b) algumas linhagens exibiram uma tendência à resistência, 10% - 33% das plantas foram imunes ao CTV, outras mostraram um retardamento na acumulação do vírus e início de sintomas. Em algumas das linhagens resistentes, a CP acumulou em altos níveis, sugerindo que o mecanismo de PDR estava operante nessas linhagens, enquanto em outras não resistentes a CP se apresentava apenas detectável (DOMÍNGUEZ et al., 2002; MORENO et al., 2008).

Quando essa técnica foi utilizada para a transformação de outras variedades de citros, os resultados não foram claros ou não se obtiveram os efeitos esperados (DOMÍNGUEZ et al., 2002; FEBRES et al., 2003; HERRON et al., 2006; MORENO et al., 2008).

Recentemente, Gal-On (2009) propôs um novo modelo para explicar o fenômeno da proteção cruzada ou pré-imunização, no qual ele sugere que este seja mediado pela combinação de dois mecanismos, ou seja, pela soma da resistência mediada pela capa protéica do vírus (SHERWOOD e FULTON, 1982) e pelo silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (RATCLIFF et al., 1999), explicando de uma maneira mais completa o fenômeno da proteção cruzada para viroses de RNA e DNA; entretanto, resta ser demonstrada na prática.

De acordo com Gal-On (2009), no futuro, ‘smart viruses’ os quais serão fracos, clonados, não transmissíveis por vetores, oferecerão proteção contra vários vírus simultaneamente, como uma alternativa até se obter plantas transgênicas resistentes.

No entanto, mesmo com todo o avanço alcançado atualmente em relação aos estudos do genoma e da biologia molecular, a única técnica prática que permanece ainda hoje, após mais de 35 anos de sucessivas multiplicações clonais, assegurando um bom efeito protetivo e estabilidade duradoura, foi obtida através da pré-imunização ou proteção cruzada. Estima-se a existência de 100 milhões de pés de laranja Pêra IAC pré-imunizadas, em diferentes estágios de desenvolvimento, atestando desempenho altamente satisfatório (MÜLLER et al., 1999).

O controle dos danos induzidos pelo vírus da tristeza sobre a variedade Pêra, no Brasil, foi satisfatoriamente conseguido pelo uso de um ‘único’ isolado fraco protetivo, obtido entre as décadas de 60 e 70 do século passado, que assegurou um bom efeito protetivo. Destarte, basear a proteção contra o CTV em todo o parque citrícola de Pêra brasileiro em um único isolado fraco pode representar um grande risco. Existem relatos sobre plantas de Pêra que vêm apresentando sintomas severos do vírus. Isto pode ser atribuído a uma exaustão do isolado protetivo ou ao surgimento de novos isolados severos capazes de suplantar a proteção obtida.

Além disso, como já mencionado anteriormente, a experiência tem demonstrado que os melhores resultados são obtidos para uma determinada região quando os isolados do CTV são selecionados na região em questão (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1977; SANTOS FILHO et al., 1991; KOLLER et al., 1994; MÜLLER et al., 2000).



## Caracterização e Propriedades Biológicas do CTV

Karasev (2000), revisando a classificação da família *Closteroviridae*, propôs que seus membros fossem classificados especificamente de acordo com o seu inseto vetor e não mais pelo seu genoma mono ou bipartido.

Assim, além dos gêneros *Closterovirus* e *Crinivirus*, foi proposto o gênero *Ampelovirus*. Os representantes do gênero *Closterovirus* são transmitidos somente por afídeos de maneira semipersistente (MARTELLI et al., 2002).

O CTV pertence à família *Closteroviridae* e gênero *Closterovirus*, sendo que nessa família se agrupam uma série de vírus compostos por uma única molécula linear (monopartido), com genoma constituído de RNA de cadeia simples (ssRNA) e de polaridade positiva, com aproximadamente 6% do conteúdo em RNA, em forma helicoidal com passo básico de 3,7 nm. É um vírus limitado ao floema, mostrando partículas virais longas, flexuosas e filamentosas de aproximadamente 10-12 nm de diâmetro e 2.000 nm de comprimento (KITAJIMA, 1964; BAR-JOSEPH et al., 1989; KARASEV, 2000).

Como outros membros da família *Closteroviridae*, as partículas virais do CTV são bipolares e encapsuladas por duas proteínas do capsídeo de 25 kDa (p25 – CP) e 27 kDa (p27 – CPM) que encapsulam aproximadamente 97% e 3% do comprimento da partícula viral, respectivamente (SATYANARAYANA et al., 2004). O tamanho do genoma desse vírus é aproximadamente três vezes maior que o tamanho médio do genoma de outros vírus de planta conhecidos, o que pode, em parte, justificar a diversidade genética existente nesse vírus (TARGON et al., 2003).

Apresentando aproximadamente 19,3 kb, o RNA genômico (gRNA) do CTV teve a sequência nucleotídica completamente determinada de vários isolados distintos e amplamente divulgada na literatura especializada (KARASEV et al., 1995; MAWASSI et al., 1996; VIVES et al., 1999; YANG et al., 1999; ALBIACH-MARTÍ et al., 2000; SUASTIKA et al., 2001; VIVES et al., 2005; RUIZ-RUIZ et al., 2006; HARPER et al., 2009).

O gene da proteína do capsídeo do CTV tem sido caracterizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida, *western blotting*, mapeamento de polipeptídeo em gel SDS-PAGE, e por técnicas sorológicas diversas, com base na especificidade dos epitopos de vários isolados de plantas cítricas (BAR-JOSEPH et al., 1989; NIBLETT et al., 2000).

Até o presente, não existe um método universal para detectar e diferenciar estirpes do CTV, apesar de serem usados variedades e clones diferenciais, imunodiagnose, hibridização, RT-PCR (reverse transcriptase – polymerase chain reaction), SSCP e RFLP (MACHADO et al., 1997; SUNNUCKS et al., 2000; BORDIGNON et al., 2003; D'URSO et al., 2003; ZHOU et al., 2007).

O gRNA do CTV (Figura 2) é organizado em 12 ORFs (Open Reading Frames) codificando pelo menos 19 proteínas e duas regiões não traduzidas (UTRs) de aproximadamente 107 e 273 nucleotídeos na extremidade 5' e 3' respectivamente (KARASEV et al., 1998; SATYANARAYANA et al., 2004).

As ORFs 1a e 1b codificam proteínas do complexo da replicase, enquanto que as ORFs 2-11, compondo a extremidade 3' e comportando a metade do gRNA, codifica as proteínas p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 e p23 (DOLJA et al., 2006). A região codificante do gRNA do CTV compreende o módulo de replicação (ORFs 1a e 1b) e o módulo de cinco genes (p6, p65, p61, p27 e p25), codificando proteínas envolvidas na montagem e no movimento da partícula viral (DOLJA et al., 2006).

Na extremidade 5' proximal, a ORF 1a de 9351 nucleotídeos (nt), codifica uma poliproteína de aproximadamente 349 kDa, a qual apresenta três domínios funcionais característicos, protease semelhante a papaína (papain-like protease – PRO), metiltransferase (MTR) e helicase (HEL), já a ORF 1b codifica uma proteína de 54 kDa, a qual contém a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (SUASTIKA et al., 2001).

O módulo de cinco genes codifica a proteína transmembrana (do retículo endoplasmático) considerada proteína responsável pelo movimento célula a célula, (p6), uma proteína homóloga a HSP70 (heat-sock protein – p65), as duas

cópias das proteínas do capsídeo (p25 e p27) e uma proteína adicional também considerada uma cópia divergente do capsídeo (p61) (DOLJA et al., 2006; FOLIMONOVA et al., 2008; GOMES et al., 2008).

A ação coordenada da p65 e p61, além da p25 e p27, é necessária para a correta montagem da partícula viral. As proteínas p20, p23 e p25 atuam como supressores do silenciamento do RNA. Já as proteínas p33, p18 e p13 permanecem ainda sem ter suas funções biológicas totalmente determinadas (VIVES et al., 1999; LU et al., 2004; DOLJA et al., 2006), com indicativo que estariam envolvidas na infecção e movimento do vírus na planta, em alguns hospedeiros (TATINENI et al., 2008).

A replicação do gRNA do CTV envolve a síntese de fitas negativas que servirão de molde para novas fitas positivas. As ORFs 1a e 1b são traduzidas diretamente do gRNA. Os dez genes na metade terminal 3' do gRNA do CTV (p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 e p23) são expressos pela síntese de RNAs subgenômicos (sgRNA) 3' co-terminal, que agem como RNAs mensageiros (Figura 2). Um 'set' adicional e similar de sgRNA de fita negativa também é produzido nas células infectadas, mas sua acumulação é muito inferior (VIVES et al., 2005; DOLJA et al., 2006; MORENO et al., 2008).

Um 'set' menos abundante de sgRNA de fita positiva 5' coterminar é também produzido, provavelmente pela terminação prematura da transcrição do gRNA (Figura 2). Embora a importância funcional, se existir alguma, desse 'set' de sgRNA 5' coterminar, no CTV permanece desconhecido. Uma das possíveis explicações para esse caso seria a coexistência em células infectadas de múltiplas e abundantes espécies de RNAs, favorecendo a formação de moléculas de RNA recombinante (DOLJA et al., 2006).

Plantas infectadas com closterovirus apresentam, ainda, RNAs defectivos (dRNA), alguns dos quais parecem ser resultado de recombinações entre sgRNAs e seus equivalentes produzidos a partir da região 5' terminal (GOWDA et al., 2001; DOLJA et al., 2006).

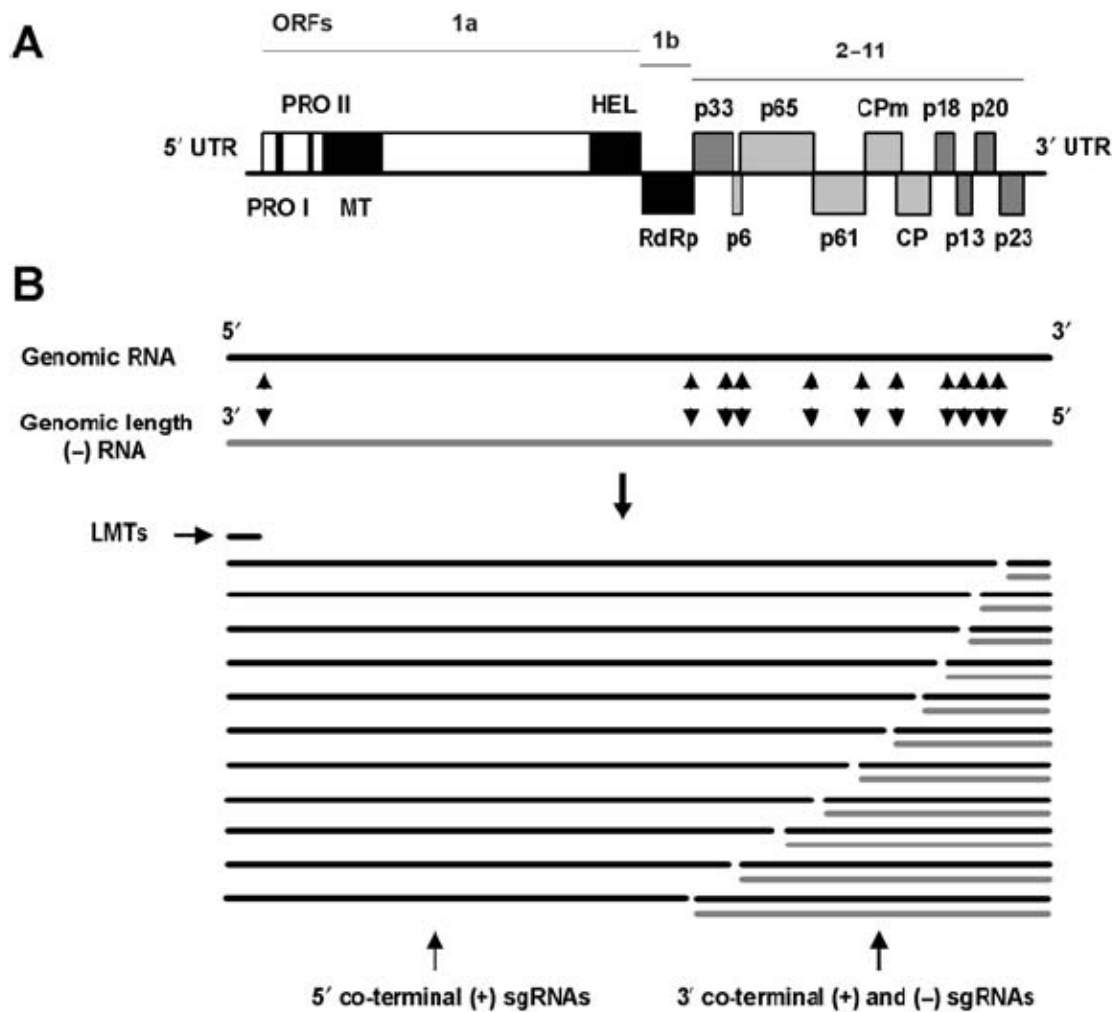


Figura 2. Organização e expressão do RNA genômico do *Citrus tristeza virus*. (A) Esboço do genoma do CTV. Caixas indicam ORFs e, proteínas codificadas pelas diferentes ORFs estão indicadas. Nas ORFs 1a e 1b: PRO-I e PRO-II são proteases semelhantes a Papaina; MT, Metiltransferase; HEL, Helicase; RdRp, domínio da RNA polimerase dependente de RNA. CPm e CP são a menor e maior, proteínas do capsídeo, UTR indicam regiões não transcritas. (B) Principais espécies de RNA produzidos para replicação e expressão do genoma. Linhas preta representam as fitas positivas e as linhas cinza as fitas negativas do RNA genômico ou subgenômico (sgRNAs). LMTs são sgRNAs de baixo peso molecular. As cabeças de setas ( $\blacktriangledown$  $\blacktriangle$ ) marcam, aproximadamente, a posição dos elementos de controle que induzem a formação dos sgRNAs (MORENO et al., 2008).

A comparação da sequência do gene da capa protéica do CTV de isolados biológica e geograficamente distintos mostrou uma homologia de 90% a 100% na sequência de ácidos nucléicos e aminoácidos (NIBLETT et al., 2000). Por outro lado, análises moleculares revelaram substanciais sequências heterogêneas, acima de 40%, entre diferentes isolados, em certas regiões do genoma do CTV (KARASEV et al., 1998).

Febres et al. (1996) demonstraram que a partícula do CTV possui duas proteínas no capsídeo e que estas estão associadas. Na forma replicativa do vírus ocorre a formação de RNA de fita dupla (dsRNA) e vários RNAs subgenômicos (VALVERDE et al., 1990).

O CTV não ocorre como um único vírus, mas sim um complexo de vírus, ou seja, o isolado viral é composto por dois ou mais haplótipos geneticamente diferentes e relacionados imunologicamente (POWELL, 1992; BAR-JOSEPH et al., 2002), podendo ou não desenvolver sintomas em função das variedades copa e porta-enxerto. Esse fato tem sido comprovado mediante o emprego de análise de dsRNA, RFLP e SSCP (SOUZA et al., 2002).

Historicamente, a diagnose da infecção por CTV foi conduzida por meio da indexação biológica, utilizando-se para tanto hospedeiras indicadoras sensíveis à infecção, particularmente a lima ácida Galego, que sob infecção por CTV mostra clareamento das nervuras em folhas jovens, acanoamento das folhas, internódios curtos e caneluras (ROISTACHER, 1991; MÜLLER et al., 2000).

Com a purificação do vírus, diferentes antisoros e anticorpos monoclonais para a capa protéica foram obtidos, permitindo uma rotina de detecção do CTV por procedimentos imunoenzimáticos, tal como a detecção por ELISA, que possibilitou grandes avanços nos estudos da epidemiologia, movimento do vírus ou caracterização de isolados (CAMBRA et al., 1991; GOTTWALD et al., 1996a; GOTTWALD et al., 1996b; LBIDA et al., 2005).

Depois que a sequência completa de nucleotídeos do gRNA do CTV foi obtida, uma variedade de procedimentos de diagnóstico baseada na detecção específica do RNA viral foi desenvolvida (MORENO et al., 2008).

Alguns desses procedimentos mais amplamente utilizados incluem: 1) diferenças nos padrões de dsRNA entre isolados (DODDS et al., 1987), que mais tarde mostraram ser devido à presença de dRNAs (MORENO et al., 1996); 2) padrões de hibridização com sondas de cDNA ou cRNA de várias regiões do gRNA (ALBIACH-MARTÍ et al., 2000); 3) análise por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene da capa protéica (ROY et al., 2003; JIANG et al., 2008); 4) Padrões de amplificação por RT-PCR com iniciadores (primers) específicos para muitos genótipos de CTV (RUIZ-RUIZ et al., 2006) e 5), análise do polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) de diferentes regiões do gRNA (AYLLÓN et al., 1999; MORENO et al., 2008).

Esta última tem sido utilizada também para caracterizar estrutura de populações de isolados de CTV e selecionar variantes específicas para sequenciamento, permitindo estimar a diversidade genética dentro e entre isolados (RUBIO et al., 2001).

Entre isolados de CTV de diferentes origens geográficas e características de patogenicidade distintas, a comparação de suas sequências tem mostrado resultados diversos, tais como um alto grau de conservação entre os genomas separados no tempo e espaço, com limitado repertório de genótipos, e ainda uma estrutura de população variável entre isolados, com alguns mostrando uma sequência predominante, outros com variantes relacionadas intimamente e outros ainda tendo uma estrutura complexa, com variantes de sequência altamente divergente (VIVES et al., 2005; AYLLÓN et al., 2006; RUIZ-RUIZ et al., 2006).

Os fatores que moldam a população de CTV a campo incluem mutações originadas de erros naturais (error-prone) da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (DOMINGO e HOLLAND, 1994; SAMBADE et al., 2007), eventos de recombinação entre variantes de sequências divergentes (VIVES et al., 2005; MARTÍN et al., 2009), diferentes pressões de seleção (SENTANDREU et al., 2006), complexidade genética e fluxo gênico devido a repetidas inoculações das plantas a campo pelo vetor e o movimento de borbulhas infectadas entre regiões (RUBIO et al., 2001; PAPAYIANNIS et al., 2007).

Em resumo, embora o CTV pareça ser estável geneticamente em alguns hospedeiros, a interferência do homem interagindo com diferentes combinações de copa e porta-enxerto sob diferentes condições ambientais pode ter gerado variabilidade genética, que mais tarde foi modulada por outros fatores, tais como recombinação, seleção ou fluxo gênico entre regiões (MORENO et al., 2008).

#### Justificativas do Trabalho

Os pomares de laranja Pêra das regiões Norte e Noroeste do Paraná, implantados a partir da década de 80 do século passado, foram formados por mudas ou borbulhas originadas de sucessivas gerações clonais de clones pré-imunizados ou naturalmente selecionados no Estado de São Paulo, e com menor frequência, da Bahia. No Estado do Paraná, estudos recentes de plantas infectadas pelo CTV revelaram a ocorrência de isolados severos em pomares de laranja Pêra da região Norte do Estado, demonstrando que nem sempre os clones de matrizes pré-imunizadas ou naturalmente selecionadas em outros Estados se comportam de maneira satisfatória em relação à tristeza.

Frente a todos os argumentos citados e com a constatação da presença de isolados severos do CTV afetando pomares paranaenses, é arriscado para a citricultura do Paraná basear-se em clones oriundo de outros estados brasileiros, porque de acordo com alguns estudos, resultados mais satisfatórios podem ser obtidos quando os isolados fracos e protetivos de CTV são selecionados na própria região.

Esse fato levou à instalação de um programa de pré-imunização a partir de 2003 por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da UEM, visando à obtenção de plantas matrizes de laranja Pêra, pré-imunizadas com isolados fracos do vírus selecionados nas condições do Norte e Noroeste paranaense.

Diante disso, selecionar isolados fracos com comprovada capacidade protetiva constitui uma das etapas fundamentais de qualquer programa de pré-imunização. Para tanto, levantamentos em pomares comerciais das regiões Norte

e Noroeste do Paraná foram efetuados, com a finalidade de selecionar plantas de laranja 'Pêra' que apresentassem alto vigor e produtividade.

Os isolados de CTV dessas plantas foram submetidos à indexação biológica conduzida em casa de vegetação e à caracterização molecular pelas análises RFLP e SSCP do gene da proteína do capsídeo (GCP), estabelecendo comparações com isolados reconhecidamente fracos e severos. Os estudos dessa etapa constituíram o primeiro artigo abordado na tese, intitulado "caracterização biológica e molecular de isolados do *Citrus tristeza virus* com potencial para utilização em programas de pré-imunização".

Vencida essa etapa, o valor protetivo desses isolados virais foram determinados pelo desafio com a inoculação de isolado severo 'Rolândia' através da união de tecido (enxertia) ou pelo vetor 'Pulgão Preto dos Citros' (*Toxoptera citricida* Kirkaldy), assunto que constituiu o segundo artigo da tese intitulado "avaliação da capacidade de proteção oferecida por novos isolados fracos do *Citrus tristeza virus* selecionados em um programa de pré-imunização".

Os isolados que se destacaram, mostrando um melhor valor protetivo frente ao desafio com isolados severos, evidenciado pela análise SSCP das plantas desafiadas e mantidas em estufa e confirmados pela análise do desenvolvimento vegetativo e de intensidade de caneluras observados em plantas a campo sob alta pressão de inóculo do isolado severo do CTV, poderão ser utilizados como matrizes para os futuros pomares cítricos de laranja Pêra a serem instalados no Paraná.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIACH-MARTI, M.R.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; HILF, M.E.; SHANKER, S.; ALMIRA, E.C.; VIVES, M.C.; LÓPEZ, C.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. **Journal of Virology**. v.74, n.15, p.6856-6865, 2000.

AMARO, A.A. e MAIA, M.L. Produção e comércio de laranja e de suco no Brasil. **Laranja**, v.18, p.1-26, 1997.

AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. **Virology**. v.255, p.32-39, 1999.

AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; SENTANDREU, V.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. Variations in two gene sequences of citrus tristeza virus after host passage. **Virus Genes**. v.32, p.119-128, 2006.

BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. **Virology**. v. 50, p. 821-828, 1972.

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

BAR-JOSEPH, M.; CHE, X.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; AYLLÓN, M.A.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* molecular research. In: **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.1-7. IOCV, Riverside, CA. 2002.

BATISTA, L.; BASSANEZI, R.B.; LARANJEIRA, F.F. Comparative epidemiology of citrus triteza in Cuba and citrus sudden death in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. v.33, n.5, p.348-355, 2008a.

BATISTA, L.; VELÁZQUEZ, K.; ESTÉVEZ, I.; PEÑA, I.; LÓPEZ, D.; REYES, M.L.; RODRÍGUEZ, D.; LARANJEIRA, F.F. Spatiotemporal dynamics of *Citrus tristeza virus* in Cuba. **Plant Pathology**. v.57, p.427-437, 2008b.

BENNETT, C.W. e COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, n.8, p.207-237, 1949.

BITANCOURT, A.A. Um teste para identificação precoce da tristeza dos citros. **O Biológico**, v.10, p.169-175, 1944.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n.3, p.345-355, 2003.

BOTEON, M. e NEVES, E.M. Citricultura Brasileira: aspectos econômicos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. 2005, p. 21-36.

CAMBRA, M.; CAMARASA, E.; GORRIS, M.T.; GARNSEY, S.M.; CARBONELL, E. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. In: **Proceedings of the 11<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.38-45. IOCV, Riverside, CA. 1991.

CAMBRA, M.; GORRIS, M.T.; MARROQUIN, C.; ROMÁN, M.P.; OLMOS, A.; MARTÍNEZ, P.C.; HERMOSO DE MENDONZA, A.H.; LÓPEZ, A.; NAVARRO, L. Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. **Virus Research**. v.71, p.85-95, 2000.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**. Maringá, v.25, n.2, p.269-273, 2003.

CAVIGLIONE, J.H.; KIIHL, L.R.B.; CARAMORI, P.H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná** - IAPAR, 2000. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677> (Acessado em 20/08/2008).

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of citrus tristeza vírus (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, n.27, p.11-16, 2001.

COSTA, A.S. Present status of the tristeza disease of Citrus in South America. **FAO Plant Protection Bulletin**. 4: 97-105, 1956.

COSTA, A.S. e MÜLLER, G.W. Studies on interference between strains of the tristeza virus. **Project No. S3-CR-2, Grant No. FG-Br.-107, Seção de Virologia**, Instituto Agrônômico, Campinas, SP. 1966.

COSTA, A.S. e MÜLLER, G. W. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative successes. **Plant Disease**, n. 64, p.538-541, 1980.

DAVINO, S.; DAVINO, M.; SAMBADE, A.; GUARDO, M.; CARUSO, A. The first *Citrus Tristeza virus* outbreak found in a relevant citrus producing area of Sicily, Italy. **Plant Disease**, v.87, p.314-320, 2003.

DAVINO, S.; RUBIO, L.; DAVINO, M. Molecular analysis suggests that recent *Citrus tristeza virus* outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions. **European Journal of Plant Pathology**. v.111, p. 289-293, 2005.

DERAL, (Departamento de Economia Rural) - Estimativas de produção agrícola do Paraná. Deral-Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, 2000.

DODDS, J.A. Cross-protection and interference between eletrophoretically distinct strains of cucumber mosaic virus in tomato. **Virology** 118: 235-24, 1982.

DODDS, J.A.; JARUPAT, T.; LEE, J.G.; ROISTACHER, C.N. Effect of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. **Phytopathology**. v.77, p.442-447, 1987.

DOLJA, V.V.; KREUZE, J.F.; VALKONEN, J.P.T. Comparative and functional genomics of closteroviruses. **Virus Research**. v.117, p.38-51, 2006.

DOMINGO, E. e HOLLAND, J.J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: MORSE, S.S. (Ed.) **The evolutionary biology of viruses**. Raven Press, New York, p. 161-184, 1994.

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. **Molecular Breeding**. v.10, p.1-10, 2002.

DONADIO, L.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 1-18, 2005.

DORETTO, M. e SHIKI, S. Considerações sócio-econômicas. In: **Regionalização da citricultura para o Estado do Paraná**. Londrina, PR: 1987. 28p. (IAPAR – Circular n. 55).

D'URSO, F.; SAMBADE, A.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. Variation of haplotype distributions of two genomic regions of *Citrus tristeza virus* populations from eastern Spain. **Molecular Ecology**. v.12, p.517-526, 2003.

FAO. Food And Agriculture Organization Of The United Nations. **FAOSTAT Database gateway**. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (acessado em Novembro de 2009).

FAWCETT, H.S. e WALLACE, J.M. Evidence of the virus nature of citrus quick decline. **California Citrograph**. n. 32, p. 88-89, 1946.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one of *Citrus tristeza virus* particles. **Phytopathology**. v.86, n.12, p.1331-1335, 1996.

FEBRES, V.J.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. **Plant Cell Reports**. v.21, n.5, p.421-428, 2003.

FOLIMONOVA, S.Y.; FOLIMONOV, A.S.; SATYANARAYANA, T.; DAWSON, W.O. *Citrus tristeza virus*: Survival at the edge of the movement continuum. **Journal of Virology**. v.82, n.13, p.6546-6556, 2008.

FUNDECITRUS. **Cancro cítrico**. Disponível em <http://www.fundecitrus.com.br/cancro.html> (acessado em Janeiro de 2001).

GAL-ON, A. Viral cross protection: new insight into an well-known phenomenon. **Tropical Plant Pathology**, palestra 7, v.34 (supl.), p.XVII-XVIII.

GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. **Phytopathology**. v. 67, p. 965-968, 1977.

GARNSEY, S.M.; GOTTWALD, T.R.; HILF, M.E.; MATOS, L.; BORBÓN, J. Emergence and spread of severe strains of Citrus Tristeza Virus in the Dominican Republic. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.57-68. IOCV, Riverside, CA. 2000.

GOMES, C.P.C.; NAGATA, T.; JESUS JUNIOR, W.C.; BORGES NETO, C.R.; PAPPAS JUNIOR, G.J.; MARTIN, D.P. Genetic variation and recombination of RdRp and HSP 70h genes of *Citrus tristeza virus* isolates from Orange trees showing symptoms of citrus sudden death disease. **Virology Journal**. v.5, n.9, doi: 10.1186/1743-422X-5-9, 2008.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBÓN, J.; SEDILES JEAN, A.; ROJAS SOLIS, A. Rate of disease increase and patterns of spread of CTV when vectored by *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii*. In: **Third International Workshop (Final Report). Proceedings**. University of Florida. p.44-49, 1995.

GOTTWALD, T.R.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; CAMARASA, E.; PIQUER, J. Spacial and temporal analyses of Citrus tristeza virus in Eastern Spain. **Phytopathology**. v.86, p.45-55, 1996a.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBÓN, J. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spacial patterns of spread of citrus tristeza. In: **Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.120-129. IOCV, Riverside, CA. 1996b.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; BORBÓN, J. Increase and patterns of spread of Citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida*. **Phytopathology**. v.88, n.7, p.621-636, 1998.

GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; AYLLÓN, M.A.; ALBIACH-MARTI, R.; MAWASSI, M.; RABINDRAN, S.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Characterization of *cis*-Acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: Production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. **Virology**. v.286, p.134-151, 2001.

GRANT, T.J. e COSTA, A.S. A mild strain of the Tristeza Virus of Citrus. **Phytopathology**. v.41, n.2, p.114-122, 1951.

GUSI, L.D.; LEITE JUNIOR, R.P.; ANDRADE, P.F.S. Estudo de cadeias produtivas do agronegócio paranaense. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Departamento de Economia Rural. **Laranja**. Curitiba – PR, 1998.

HARPER, S.J.; DAWSON, T.E.; PEARSON, M.N. Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. **Archives of Virology**. v.154, n.9, p.1505-1510, 2009.

HATSCHBACH, L.C. Legislação da campanha de erradicação do Cancro cítrico. In: **1º Encontro Paranaense de Citricultura**. Londrina. Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná. Anais. p.111-129, 1986.

HERRERA-ISIDRÓN, L.; OCHOA-SÁNCHEZ, J.C.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. **Virology Journal**, v.6, n.116, 2009.

HERRON, C.M.; MIRKOV, T.E.; DA GRAÇA, J.V.; LEE, R.F. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. **Journal of Virological Methods**. v.134, p.205-211, 2006.



Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (Rio de Janeiro – RJ). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, RJ: Setembro de 2005. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl1.asp?z=&i=P> (acessado em 21/09/2005).

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). (Rio de Janeiro – RJ). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, RJ: Dezembro de 2008. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl1.asp?z=&i=P> (acessado em 10/12/2008).

JIANG, B.; HONG, N.; WANG, G-.; HU, J.; ZHANG, J-.; WANG, C-.; LIU, Y.; FAN, X-. Characterization of *Citrus tristeza virus* strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. **Virus Genes**. v.37, p.185-192, 2008.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON, W.O. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. **Virology**, v.208, p.511-520, 1995.

KARASEV, A.V.; DAWSON, W.O.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M. Molecular biology of *Citrus tristeza virus*: implications for disease diagnosis and control. **Acta Horticulturae**, v.472, p.333-337, 1998.

KARASEV, A.V. Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. **Annual review of phytopathology**. v.38, p.293-324, 2000.

KITAJIMA, E.W.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, A. R.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A.S. Electron microscopical investigations of tristeza. In: **Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.1-9. IOCV, Riverside, CA. 1964.

KOLLER, O .L.; SOPRANO, E.; VERONA, L.A.F.; COSTA, A.C.Z. Quebra de tolerância a tristeza em dois clones de laranja 'Valencia'. In: **XIII Cong. Bras. de Frut.** Salvador, BA. vol. 2, p. 372-373, 1994 (resumos).

LBIDA, B.; BENNANI, A.; SERRHINI, M.N.; ZEMZAMI, M. Biological, serological and molecular characterization of three isolates of *Citrus tristeza closterovirus* introduced into Morocco. **OEPP/EPPO Bulletin**. v.35, p.511-517, 2005.

LEE, R.F.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA, M.A. The Citrus Tristeza Virus (CTV). An introduction to corrent priorities, with special reference to the worsening situation in Central America and the Caribbean. **International Institue of Biological Control – FAO**. Berks, UK, 197p., 1994.

LEITE JUNIOR, R.P. Restrições fitossanitárias. In: **Regionalização da citricultura para o Estado do Paraná**. Londrina, PR: 1987. 28p. (IAPAR – Circular n. 55).

LEITE JUNIOR, R.P. **A Citricultura no Paraná**. Londrina, PR: 1992. (IAPAR – Circular n. 72).

LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology**, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00566.X, 2009.

LU, R.; FOLIMONOV, A.; SHINTAKU, M.; LI, W-.; FALK, B.W.; DAWSON, W.O.; DING, S-. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. **PNAS**. v.101, n.44, p.15742-15747, 2004.

MACHADO, M. A.; STACH-MACHADO, D.R.; TARGON, M.L.P.N.; BAPTISTA, C R.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G W. Diagnóstico do vírus da tristeza dos citros com diferentes anticorpos monoclonais. **Fitopatologia Brasileira**, n.22, p.191-194, 1997.

MARTELLI, G.P.; AGRANOVSKY, A.A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R.H.A.; DOLJA, V.V.; FALK, W.B.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.V.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; VETTEN, H.J.; WISLER, G.C.; YOSHIKAWA, N. The family *Closteroviridae* revised. **Archives of Virology – Virology Division news** (ICTV study group on closteroviroses and allied viroses). v.147, n.10, p.2039-2044, 2002.

MARTÍN, S.; SAMBADE, A.; RUBIO, L.; VIVES, M.C.; MOYA, P.; GUERRI, J.; ELENA, S.F.; MORENO, P. Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. **Journal of General Virology**. v.90, p.1527-1538, 2009.

MAWASSI, M.; MIETHIEWSKA, E.; GOFMAN, R.; YANG, G.; BAR-JOSEPH, M. Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. **Journal of General Virology**. v.77, p.2359-2364, 1996.

MCCLEAN, A.P.D. Tristeza and stem pitting diseases of citrus in South Africa. **FAO Plant Protection Bulletin**. v.4, p.88-94, 1956.

MENEGHINE, M. Sobre la naturaleza y transmissibilidad de la doencia “Tristeza” de los citros. **O Biológico**, v.12, p.285-287, 1946.

MOREIRA, C.S. e PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A.A. (Eds.). **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargil, Campinas – SP. 2º Ed. v. 1, 1991.

MORENO, P.; GUERRI, J.; ALBIACH, M.R.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; MARTÍNEZ, M.E. Interference between *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates detected by analysis of double stranded RNA (dsRNA). In: **Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.54-63. IOCV, Riverside, CA. 1996.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**. v.9, n.2, p. 251-268, 2008.

MORIMOTO, F. Situação atual da Citricultura. In: GARCIA JR., J.B.; CROCE FILHO, J.; ANDRADE, J.M.B.; STENZEL, N.M.C.; LEITE JR, R.P.; CARVALHO, S.L.C. eds. **2º Encontro Paranaense de Citricultura**, Maringá: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná. Anais. p.51-56, 1990.

MÜLLER, G.W.; RODRÍGUEZ, O.; COSTA, A.S. A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. In: **Proceedings of the 4<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.64-71. IOCV, Riverside, CA. 1968.

MÜLLER, G.W. **Estudos sobre a interação entre isolados do vírus da Tristeza dos citros, e controle da moléstia em lima ácida Galego por premunização**. Piracicaba-SP. 68p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo – ESALQ, 1972.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; KITAJIMA, E.W.; CAMARGO, I.J.B. Additional evidence that tristeza virus multiplies. In: *Passiflora* spp. In: **Proceedings of the 6<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 75-78. IOCV, Riverside, CA. 1974.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. In: **Proc. Int. Soc. Citriculture**, n. 3, p. 868-872, 1977.

MÜLLER, G.W. Use of mild strains of citrus tristeza virus (CTV) to reestablish commercial production of Pera sweet orange. In: São Paulo, Brazil. In: **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.93, p.62-64, 1980.

MÜLLER, G.W. e GARNSEY, S.M. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives and non-Rutaceous plant to slash cut machanical inoculation with citrus tristeza virus (CTV). In: **Proceedings of the 9<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.33-40. IOCV, Riverside, CA. 1984.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETI, V.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. (eds). **Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e virus**. Campinas: Fundação Cargill, v.2, p. 55-84, 1993.

MÜLLER, G.W. Pulgão e tristeza dos citros no Brasil. **Laranja**, v.17, n.1, p.292-293, 1996.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré- imunizado “Pêra” IAC na citricultura paulista. **Laranja**, v.20, n. 2, p. 399-408, 1999.

MÜLLER, G.W., MACHADO, M.A., SOUZA, A.A., CORAT, M.A.F.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Padrões de SSCP do CTV em clones de laranja 'Pera' desafiados com o complexo 'Capão Bonito' no campo. **Fitopatologia Brasileira**, 25:445, 2000 (Suplemento).

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 567-604, 2005.

NAKATANI, A.K.; PINTO, J.H.M.; LEITE-JÚNIOR, R.P. Avaliação de clones de laranja 'Pêra' em relação à tristeza dos citros na região norte do Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 30, Poços de Caldas. Resumos, **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, p.340, 1997.

NAVARRO, L.; PINA, J.A.; JUÁREZ, J.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; ARREGUI, J.M.; ORTEGA, G.; NAVARRO, A.; DURAN-VILA, N.; GUERRI, J.; MORENO, P.; CAMBRA, M.; MEDINA, A.; ZARAGOZA, S. The citrus variety improvement program in Spain in the period 1975-2001. In: **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.306-316. IOCV, Riverside, CA. 2002.

NEVES, M.F.; JANK, M.S.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G. Ações para aumentar a competitividade da cadeia da laranja no Brasil. **Laranja**, v.27, n. 02, p. 213-229, 2006.

NIBLETT, C.L.; GENC, H.; CEVIK, B.; HALBERT, S.; BROWN, L.; NOLASCO, G.; BONACALZA, B.; MANJUNATH, K.L.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.R.; LEE, R.F. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. **Virus Research**. v.71, p.97-106, 2000.

PAPAYIANNIS, L.C.; SANTOS, C.; KYRIAKOU, A.; KAPARI, T.; NOLASCO, G. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Cyprus on the basis of the coat protein gene. **Journal of Plant Pathology**. v.89, n.2, p.291-295, 2007.

PASSOS, O.S. Citricultura na Flórida – Um desafio. **Laranja**, v.02, n. 11, p. 429-453, 1990.

PASSOS, O.S. Premunização contra Tristeza (CTV) como técnica obrigatória no melhoramento de citros – uma experiência vivida nos trópicos. In: **Curso Internacional de Citricultura - Manejo Integral Fitossanitário 2**. EMBRAPA. p. 56-64, 1997

POMPEU JUNIOR, J. Porta-enxertos. In: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 61-104, 2005.

POWELL, C.A. Progress on CTV strain Differentiation: Serological methods. In: ***Citrus tristeza virus and Toxoptera citricida in Central America: Development of managements strategies and use of biotechnology for control***, pp. 111-113. Maracay, Venezuela, 1992.

RATCLIFF, F.G.; HARRISON, D.B.; BAULCOMBE, D.C. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. **Science**. v.276, p.1558-1560, 1997.

RATCLIFF, F.G.; MACFARLANE, S.A.; BAULCOMBE, D.C. Gene silencing without DNA: RNA-Mediated cross-protection between viruses. **The Plant Cell**. v.11, p.1207-1215, 1999.

REZENDE, J.A.M. e MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. In: LUZ, W.C. (ed.) **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo-RS, V.3:185-226, 1995.

REZENDE, J.A.M.; DIAS, P.R.P.; NOVAES, Q.S. Premunização: Perspectivas e aplicações no controle de fitoviroses. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo Integrado – Doenças, pragas e plantas daninhas**. Universidade Estadual de Viçosa. Viçosa – MG, p. 209-243, 2000.

RINALDI, D.A.M.F. **Estudo da sensibilidade a cobre e estreptomicina e caracterização do perfil de plasmídeos em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Maringá, 1998. 66p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Maringá.

ROISTACHER, C.N. e BAR-JOSEPH, M. Transmission of *Citrus tristeza virus* by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and from *Passiflora* spp. **Phytophylactica**. v.19, p.179-182, 1987.

ROISTACHER, C.N. e MORENO, P. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. In: **Proceedings of the 11<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p.7-19. IOCV, Riverside, CA. 1991.



ROMÁN, M.P.; CAMBRA, M.; JUÁREZ, J.; MORENO, P.; DURAN-VILA, N.; TANAKA, F.A.O.; ALVES, E.; KITAJIMA, E.W.; YAMAMOTO, P.T.; BASSANEZI, R.B.; TEIXEIRA, D.C.; JESUS JUNIOR, W.C.; AYRES, A.J.; GIMENES-FERNANDES, N.; RABENSTEIN, F.; GIROTTO, L.F.; BOVÉ, J.M. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. **Plant Disease**. v. 88, n. 5, p. 453-467, 2004.

ROY, A.; RAMACHANDRAN, P.; BRLANSKY, R.H. Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. **Archives of Virology**. v.148, p.707-722, 2003.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDEZ, A.; POLEK, M.; GUERRI, J.; MORENO, P.; FALK, B.W. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. **Journal of Virology**. v.75, n.17, p.8054-8062, 2001.

RUIZ-RUIZ, S.; MORENO, P.; GUERRI, J.; AMBRÓS, S. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. **Archives of Virology**. v.151, p.387-398, 2006.

SALIBE, A.A. The tristeza disease. In: **International Citrus Short Course**, 1. Gainesville, Proceedings, p. 68-76, 1973.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**. v.51, p.257-265, 2002.

SAMBADE, A.; AMBRÓS, S.; LÓPEZ, C.; RUIZ-RUIZ, S.; HERMOSO DE MENDONZA, A.; FLORES, R.; GUERRI, J.; MORENO, P. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. **Archives of Virology**. v.152, p.1115-1126, 2007.

SANTOS FILHO, H.P.; SILVA, M.J.; PAGUIO, O.R. Comportamento de diferentes porta-enxertos inoculados com uma nova variante do vírus da Tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.4, p.271-273, 1991.

SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; AYLLÓN, M.A.; DAWSON, O. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. **PNAS**. v.101, n.3, p.799-804, 2004.

SCHNEIDER, H. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: WALLACE, J.M. **Citrus Virus Disease**. Berkeley, CA. University of California Division of Agricultural Sciences. p.73-84, 1959.

SENTANDREU, V.; CASTRO, J.A.; AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; GUERRI, J.; GONZÁLES-CANDELAS, F.; MORENO, P.; MOYA, A. Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* (CTV) after host passage. **Archives of Virology**, v.151, p.875-894, 2006.

SHERWOOD, J.L. e FULTON, R.W. The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross protection. **Virology**. v.119, n.1, p.150-158, 1982.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de Haplótipos do Gene do Capsídeo do Vírus da Tristeza dos Citros em plantas pré-imunizadas com Sintomas de Tristeza. **Summa Phytopathologica**. v.28, p.154-159, 2002.

SUASTIKA, G.; NATSUAKI, T.; TERUI, H.; KANO, T.; IEKI, H.; OKUDA, S. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. **Journal of General Plant Pathology**. v.67, p.73-77, 2001.

SUNNUCKS, P.; WILSON, A.C.C.; BEHEREGARAY, L.B.; ZENGER, K.; FRENCH, J.; TAYLOR, A.C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. **Molecular ecology**. v.9, p.1699-1710, 2000.

TARGON, M.L.P.N. **Expressão e análise do gene do capsídeo de isolados do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros**. Campinas, 142p. Tese (Doutorado)-Universidade de Campinas, 1997.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; LOCALI, E.C.; CRISTOFANI, M. Complete genome sequence of the citrus tristeza virus 'Pera IAC' protective isolate. In: **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, November, 11–16, 2001 (Programme & Abstracts).

TARGON, M.L.P.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W. Ocorrência do complexo Capão Bonito do *Citrus Tristeza Virus* (CTV) em tangerina "Ponkan" sobre limão "Cravo" em plantio comercial em Campanha (MG). **Laranja**, v.24, n.1, p.157-164, 2003.

TATINENI, S.; ROBERTSON, C.; GARNSEY, S.M.; BAR-JOSEPH, M.; GOWDA, S.; DAWSON, W.O. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus. **Virology**, v.376, p.297-307, 2008.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; FIGUEIREDO, J.O.; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranjeira 'Pêra' no Estado de São Paulo. **Anais do IV Congresso Brasileiro de Fruticultura**, p.111-116, 1977.

VALVERDE, R.A.; NAMETH, S.T.; JORDAN, R.L. Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**. v.71, p.255-258, 1990.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; LÓPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTI, M.R.; DAWSON, W.O.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P. The complete genome sequence of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. **Journal of General Virology**. v.80, p.811-816, 1999.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; SAMBADE, A.; MIRKOV, T.E.; MORENO, P.; GUERRI, J. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. **Virology**. v.331, p.232-237, 2005.

YANG, Z.; MATHEWS, D.M.; DODDS, J.A.; MIRKOV, T.E. Molecular characterization of an isolate of Citrus tristeza virus that causes severe symptoms in sweet Orange. **Virus Genes**. v.19, n.2, p.131-142, 1999.

YOKOMI, R K. The Brown citrus Aphid and *Citrus tristeza virus*. **Citrograph**, v.6, p.14-18, 1994.

ZANINELI-RÉ, M.L.Z. **Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná pela sintomatologia da tristeza e análise de RFLP do gene do capsídeo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2004.

ZHOU, Y.; ZHOU, C.; SONG, Z.; LIU, K.; YANG, F. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by indicators and molecular biology methods. **Agricultural Sciences in China**. v.6, n.5, p.573-579, 2007.

## RESUMO

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DO *Citrus Tristeza Virus* COM POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO EM PROGRAMAS DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO.** Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

A pré-imunização vem oferecendo um controle satisfatório da tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza vírus* (CTV). Um programa dessa natureza vem sendo desenvolvido no Estado do Paraná, Brasil, visando à obtenção de plantas matrizes de laranja Pêra. Para tanto, efetuou-se um levantamento em pomares comerciais dessas regiões, buscando plantas de laranja Pêra que apresentavam alto vigor e produtividade. Foram selecionadas 20 plantas, sendo que a caracterização biológica dos isolados de CTV destas plantas foi conduzida por meio da indexação biológica em lima ácida Galego e a caracterização molecular pelas análises RFLP e SSCP do gene da proteína do capsídeo (GCP), estabelecendo comparações com isolados reconhecidamente fracos e severos. O genoma viral, extraído de tecidos infectados pelo CTV, foi empregado na amplificação do GCP por meio das reações de transcriptase reversa e polimerase em cadeia. Em seguida, o GCP foi digerido com enzimas de restrição para a análise RFLP e sofreu desnaturação para a análise SSCP. Os resultados da indexação biológica apontaram um crescimento regular das plantas, acompanhadas de reações fracas de clorose de nervuras e sintomas fracos a moderados de caneluras. As análises moleculares revelaram que quase todos os isolados, com exceção dos isolados 6 e 8, agruparam-se com o controle fraco. Esses resultados sugerem que as plantas selecionadas estão infectadas por haplótipos fracos de CTV, revelando que estas apresentam potencial para serem utilizadas como matrizes.

Palavras-chave: *Citrus tristeza virus*, pré-imunização, caracterização biológica.

## ABSTRACT

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Citrus Tristeza Virus* ISOLATES WITH POTENTIAL TO BE USED IN PRE-IMMUNIZATION PROGRAMS.** Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

The pre-immunization has offered a satisfactory control of citrus tristeza disease, caused by *Citrus tristeza virus* (CTV). A pre-immunization program has been developed in the Parana State, Brazil, aiming to obtain Pêra sweet orange mother plants. To reach that point, it was done a survey in the orange commercial fields of that region, looking for Pêra orange plants which featured high vigour and productivity. Thus, 20 plants were found in such condition. The biological characterization of the CTV isolates of those plants was conducted by biological indexing using Mexican lime and the molecular characterization by RFLP and SSCP analysis of the coat protein gene (GCP). Comparisons using mild and severe pattern isolates were made. The viral genomic RNA was extracted from CTV infected tissues and utilized at the GCP amplification through reverse transcription and polymerase chain reaction. Thereafter, the GCP was digested by restriction enzyme for RFLP analysis and suffered denaturing for SSCP analysis. The results of the biological indexing showed regular growth of the plants, accompanied by mild chlorosis reactions and weak-to-moderate stem pitting symptoms. In the molecular analyses, the great majority of the isolates, except for the isolates 6 and 8, grouped up with the mild control isolate. These results suggest that the selected plants are infected by CTV mild haplotypes showing that they have mother plant potential.

Keywords: *Citrus tristeza virus*, cross-protection, biological characterization

## INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira baseia-se no cultivo das variedades Pêra, Valência e Natal, com atual destaque para a Valência por seu progressivo aumento na produção de mudas. Apesar disso, a variedade de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] mais importante ainda é a Pêra devido sua grande aceitação no mercado de fruta fresca e suco concentrado. Uma das características da laranja Pêra é a sua elevada sensibilidade ao vírus da tristeza dos citros, *Citrus tristeza virus* (CTV), que afetou seriamente o setor citrícola nacional nos anos de 1930 a 1940 (SALIBE et al., 2002; POMPEU JUNIOR et al., 2004).

A recuperação dos pomares de laranja Pêra somente foi possível com a implantação de medidas de controle com base no uso de porta-enxertos tolerantes, limpeza clonal e, principalmente, na pré-imunização com isolados fracos do vírus (MÜLLER e COSTA, 1977). O primeiro material pré-imunizado desta variedade, denominado Pêra IAC (Instituto Agrônômico de Campinas), vem sendo utilizado até hoje pelos citricultores, não só do Estado de São Paulo, mas também, de outros estados, posicionando-se entre os melhores selecionados para a variedade (MÜLLER et al., 1999).

Adicionalmente, os clones pré-imunizados de laranja Pêra, denominados D-6 e D-9, produzidos posteriormente por pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical da Embrapa de Cruz das Almas no Estado da Bahia, vêm oferecendo resultados satisfatórios nas regiões Norte e Nordeste do País (PASSOS, 1997). Além desses materiais, outros clones dessa variedade foram selecionados de plantas vigorosas e naturalmente infectados por isolados fracos de CTV em pomares de diversas localidades, especialmente do Estado de São Paulo (TEÓFILO SOBRINHO et al., 2001).

Para a implantação dos pomares de laranja Pêra das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, realizada a partir do final da década de 80 do século passado, foram trazidas mudas ou borbulhas originadas de sucessivas gerações clonais desses materiais pré-imunizados ou naturalmente selecionados no Estado de São Paulo e, com menor frequência, na Bahia.



No Paraná, estudos baseados em levantamentos sintomatológicos (NAKATANI et al., 1997), diagnóstico imunológico e análise SSCP (single strand conformational polymorphism) (CARRRARO et al., 2003), análise RFLP (restriction fragment length polymorphism) associada à sintomatologia (ZANINELI-RÉ, 2004) revelaram a ocorrência de isolados severos de CTV em pomares de laranja Pêra da região Norte do Estado, demonstrando que nem sempre os clones de matrizes pré-imunizadas ou naturalmente selecionadas em outros estados têm se comportado de maneira satisfatória em relação à tristeza, nessa região do Estado.

Dessa maneira, é arriscado para a citricultura paranaense continuar baseando-se em material oriundo de fora, pois segundo alguns estudos, resultados mais satisfatórios podem ser obtidos quando os isolados de CTV são selecionados na própria região em questão (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1977).

Esse fato levou à instalação de um programa de pré-imunização a partir de 2003 por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), visando à obtenção de plantas matrizes de laranja Pêra, pré-imunizadas com isolados fracos do vírus, selecionados nas condições do Norte e Noroeste paranaense.

Diante disso, selecionar isolados fracos com capacidade protetiva constitui uma das etapas fundamentais de qualquer programa de pré-imunização. Auxiliando essa etapa, o presente estudo teve como objetivo caracterizar os isolados de CTV, obtidos de árvores vigorosas e produtivas de pomares das regiões Norte e Noroeste do Estado, por meio da indexação biológica, análises RFLP e SSCP do gene da proteína do capsídeo, estabelecendo comparações com isolados reconhecidamente fracos e severos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Origem dos Isolados de CTV com Potencial para Pré-Imunização**

Em uma etapa inicial, vinte plantas de laranja doce da variedade Pêra, enxertadas sobre limão Cravo (*Citrus limonia* Osb) aparentemente sem sintomas

de tristeza foram selecionadas em quatro pomares comerciais em municípios das regiões Norte (Prado Ferreira e Arapongas) e Noroeste (Nova Esperança e Cruzeiro do Sul) do Estado do Paraná.

De cada pomar foram selecionadas cinco plantas de elite (Tabela 1), utilizando como critérios para essa seleção o porte vigoroso da árvore, a ausência de caneluras no lenho, o tamanho dos frutos, o histórico de produtividade e as características próprias da variedade (MÜLLER, 2004; MÜLLER, 2006). Os isolados de CTV analisados foram obtidos de ramos novos, coletados das quatro faces da planta, formando assim uma amostra distinta para cada planta candidata a matriz.

Como controles foram utilizados o isolado fraco Pêra IAC (PIAC) e os isolados severos Barão B (BB) e Capão Bonito (CB), oriundos de materiais cedidos pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, IAC - Cordeirópolis/SP, além do isolado Rolândia (ROL), coletado de uma planta de laranja da variedade Pêra, com severos sintomas de tristeza, em um pomar do município de Rolândia, na região Norte do Paraná.

#### Indexação para CVC

O levantamento da possível presença nas amostras coletadas da Clorose Variegada dos Citros (CVC) foi considerado tão importante que, apesar de os quatro pomares selecionados estarem aparentemente livres da bactéria, procedeu-se em primeiro lugar aos testes das árvores selecionadas para detectar o patógeno, na medida em que não faria sentido trabalhar com material infetado pela CVC.

Utilizou-se a técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) para detecção da bactéria *Xylella fastidiosa* (Wells et al.), com o uso de primers específicos. A metodologia para utilização desses primers, nessas condições, para diagnose de CVC em citros foi desenvolvida por Coletta Filho et al. (1996), na qual faz-se a extração de DNA total de pecíolos de folhas.

Tabela 1: Isolados do *Citrus tristeza virus* e controles utilizados, submetidos à análise de indexação biológica e avaliação das características moleculares, provenientes de pomares de laranja Pêra (*C. sinensis* L. Osb.) da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná.

Isolado	Cultivares	Municípios / Região
NE 1	'Pêra'	Nova Esperança / Noroeste
NE 2	'Pêra'	Nova Esperança / Noroeste
NE 3	'Pêra'	Nova Esperança / Noroeste
NE 4	'Pêra'	Nova Esperança / Noroeste
NE 5	'Pêra'	Nova Esperança / Noroeste
CS 1	'Pêra'	Cruzeiro do Sul / Noroeste
CS 2	'Pêra'	Cruzeiro do Sul / Noroeste
CS 3	'Pêra'	Cruzeiro do Sul / Noroeste
CS 4	'Pêra'	Cruzeiro do Sul / Noroeste
CS 5	'Pêra'	Cruzeiro do Sul / Noroeste
PF 1	'Pêra'	Prado Ferreira / Norte
PF 2	'Pêra'	Prado Ferreira / Norte
PF 3	'Pêra'	Prado Ferreira / Norte
PF 4	'Pêra'	Prado Ferreira / Norte
PF 5	'Pêra'	Prado Ferreira / Norte
ARA 1	'Pêra'	Arapongas / Norte
ARA 2	'Pêra'	Arapongas / Norte
ARA 3	'Pêra'	Arapongas / Norte
ARA 4	'Pêra'	Arapongas / Norte
ARA 5	'Pêra'	Arapongas / Norte
P IAC	'Pêra' IAC	Controle Fraco
CB	'Capão Bonito'	Controle Forte
BB	'Barão B'	Controle Forte
ROL	'Rolândia'	Controle Forte
G	'Galego'	Controle Sadio
G50	'Galego 50'	Controle Fraco

## Caracterização Biológica

Na estufa com tela anti-afídica, foi instalado material propagativo sadio, das indicadoras biológicas para o vírus da tristeza, sorose, exocorte e xiloporose. Procedeu-se, também, ao estabelecimento (enxertia) em porta-enxerto de limão Cravo, dos controles, a saber, Pêra pré-imunizada (PIAC) e lima ácida Galego (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) acesso n° 50 (Galego 50), isolados fracos de tristeza e como controle negativo, a lima ácida Galego sadio, livre de vírus.

Como isolado severo de CTV foram utilizadas as variantes Capão Bonito e Barão B, além de uma obtida de uma árvore de laranja Pêra com acentuados sintomas de CTV coletado na região Norte do Paraná, denominado Rolândia.

Para a indexação biológica do vírus da sorose (*Citrus psorosis virus* – CPsV) e galha lenhosa (*vein-enation* – *Woody gall*) e para os viróides da exocorte (*Citrus exocortis viroid* - CEVd) e cachexia ou xiloporose (*Citrus IIB viroid* – CVD-IIB), utilizaram-se como controles positivos fontes sabidamente infetadas com os respectivos patógenos, obtidos do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/ IAC – Cordeirópolis-SP.

## Indexação Biológica para Vírus e Viróides

As estacas de borbulhas, das quais foram retiradas as folhas para detecção de CVC, foram mergulhadas em solução de hipoclorito comercial a 10% por 10 minutos e secas ao ar. As indexações biológicas, realizadas no período de maio de 2004 a janeiro de 2005, foram conduzidas em casa de vegetação com tela anti-afídio e temperatura variando de 18 a 36 °C. Empregou-se o método de dupla enxertia, na forma de T invertido, utilizando como porta-enxerto o limão Cravo, e como indicadora a lima ácida Galego, ambos livres de vírus.

Sobre cada porta-enxerto foram inoculadas duas borbulhas da planta a ser testada (enxertia de inoculação) e uma borbulha sadia da variedade indicadora.

Os testes foram realizados em três repetições, utilizando como controle sadio a Pêra livre de vírus (microenxertada), como controles fracos os isolados

Pêra IAC (pré-imunizada) e Galego 50 e, como controles severos os isolados Rolândia, Barão B e Capão Bonito.

As leituras dos sintomas nas brotações das indicadoras foram realizadas no período de setembro de 2004 e janeiro de 2005. A intensidade dos sintomas é indicativa da estirpe de tristeza existente na planta a ser testada (MÜLLER et al., 1999). Durante a avaliação, foram observados os sintomas de palidez, suberificação das nervuras, acanoamento das folhas, intensidade de caneluras no lenho e crescimento da indicadora. A severidade do CTV em relação aos sintomas de palidez das nervuras e acanoamento das folhas foram caracterizadas pela seguinte escala: + para sintoma fraco como os da Pêra IAC, ++ para sintoma forte e +++ para sintoma muito forte, com suberificação das nervuras (CARVALHO et al., 1997).

À sintomatologia de canelura observada nos ramos (aproximadamente 15 cm de comprimento e diâmetro de 5 a 7 mm) da lima ácida Galego foram atribuídos valores de zero a cinco baseando-se na escala diagramática utilizada por Meissner-Filho et al. (2002), com algumas modificações, nas quais: 0 = nenhuma canelura, 1 = raras caneluras superficiais, 2 = um número moderado de caneluras, 3 = um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte, 4 = muitas caneluras superficiais e algumas profundas e 5 = superfície inteiramente coberta de caneluras superficiais ou profundas.

O crescimento foi medido por meio de uma trena atribuindo se valores de um a cinco: 1 = até 40 cm, 2 = de 41 a 60 cm, 3 = de 61 a 80 cm, 4,0 = de 81 a 100 cm e 5 = acima de 100 cm.

A planta indicadora para o vírus da sorose em nossas condições é a laranja do Céu (*C. sinensis* Osb.), que reage à infecção do vírus com sintomas que são áreas cloróticas alongadas de cor verde clara, paralelas às nervuras secundárias e, mais facilmente visíveis contra a luz. Os testes de indexação biológica para a sorose dos citros estão baseados em sintomas foliares que se expressam em temperaturas mais amenas (GREVE et al., 1991). A galha lenhosa foi avaliada observando-se a ocorrência de galhas (intumescências) no tronco das indicadoras,

as quais foram o limão Volkameriano (*Citrus volkameriana* V. Ten. & Pasq.) e Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) (MÜLLER et al., 2005).

A cidra Etrog (*Citrus medica* L.) para o viróide da exocorte que reage à infecção com sintomas de encarquilhamento e epinastia das folhas e rachaduras da parte inferior das nervuras principal, manchas amarelas e rachaduras nos ramos e paralisação do crescimento da planta (GREVE et al., 1991). O híbrido Clemelin 11-20, o melhor indicador da presença do viróide da xiloporose, apresentando sintomas precoces visualizados sob a casca no tronco da indicadora na região da enxertia, sob forma de poros e exsudação de goma (CARVALHO et al., 2003).

## Caracterização Molecular

### Isolamento e Purificação de dsRNA

O dsRNA (RNA de dupla fita) dos isolados de CTV de cada uma das amostras foi isolado a partir de 1g de tecido liofilizado, baseando-se no procedimento de cromatografia descrito por Valverde et al. (1990). O dsRNA foi purificado em dois ciclos de cromatografia em coluna de celulose CF-11 (Celulose Fibrosa – Whatman).

### Transcrição Reversa e Amplificação do Gene da Proteína do Capsídeo do CTV (RT-PCR)

O dsRNA extraído dos isolados de CTV serviu de molde para as reações de transcriptase reversa para se obter o DNA complementar (cDNA). Alíquotas da primeira fita de cDNA foram utilizadas na amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) por PCR (reação da polimerase em cadeia) através dos primers CN-119 (5'AGA TCT ACC ATG GAC GAC GAA ACA AAG 3') e CN-120 (5' GAA TTC GCG GCC GCT CAA CGT GTG TTA AAT TTC C 3').

Os produtos das reações de amplificações foram analisados em gel de agarose a 1,0%, de acordo com o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações.

### Análise RFLP

Os produtos da amplificação do GCP dos isolados de CTV foram digeridos pelas enzimas de restrição Rsa I e Hinf I, em consonância com as instruções do fabricante. Após a incubação a 37°C por 4 horas, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese, conforme procedimento proposto por Gillings et al. (1993), em gel não desnaturante de poliacrilamida a 8%. A corrida foi realizada a 200 V por 4 horas a 25°C. Os géis foram corados com nitrato de prata segundo o procedimento descrito por Beidler et al. (1982).

### Análise SSCP

Para a análise SSCP (BAILEY, 1995), alíquotas do produto da amplificação do GCP foram misturadas com igual volume de solução desnaturante (95% de formamida, 2mM de EDTA e 0,05% azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos e, em seguida, colocadas imediatamente no gelo (RUBIO et al., 1996; CORAZZA-NUNES et al., 2001). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 10%. A corrida foi feita a 200V por 16 horas a 25°C. A coloração dos géis foi realizada como descrito acima na análise RFLP.

### Análise dos Dados

Para a análise dos dados RFLP e SSCP, os fragmentos obtidos nos géis foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência de bandas. A variabilidade genética entre os isolados de CTV das plantas selecionadas foi avaliada através da análise de componentes principais (PCA - Principal Components Analysis), um método estatístico multivariado, no qual se empregou a matriz de dados binários, utilizando o programa Canoco For Windows 4.5. A partir dessa matriz, também foi gerado um dendrograma de divergência genética com base na distância euclidiana, adotando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages) para agrupamento. O dendrograma foi construído utilizando o software Statistica 6.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observações regularmente realizadas não detectaram sintomas de sorose, exocorte ou xiloporose nas brotações (observações efetuadas ao longo de 12 meses) de nenhuma das indicadoras inoculadas a partir de cada uma das 20 candidatas a matrizes, enquanto que os controles positivos para cada um dos patógenos testados, isto é, aqueles inoculados a partir de fontes portadoras dos patógenos, apresentaram os sintomas típicos de cada doença.

Tais resultados indicaram que as árvores candidatas a matrizes estão livres dos patógenos em questão. Os resultados obtidos pela técnica de PCR revelaram a ausência da bactéria *Xylella fastidiosa* em todas as 20 amostras das plantas candidatas avaliadas (dados não mostrados).

Os resultados da indexação biológica nas indicadoras de lima ácida Galego, inoculadas com borbulhas das plantas selecionadas nos pomares, em três repetições, encontram-se resumidos na Tabela 2. Como mostrado nessa tabela, os valores atribuídos ao crescimento das plantas variaram de 2,0 (valor também atribuído às plantas inoculadas com os controles fortes) a 4,0 (valor próximo aos atribuídos às plantas inoculadas com os controles fracos).

Na avaliação da sintomatologia de CTV (Tabela 2), os resultados apontaram para reações fracas de palidez de nervuras e sintomas fracos a moderados de caneluras em todas as indicadoras inoculadas com as borbulhas das plantas selecionadas. Esses resultados são condizentes com as condições estabelecidas nas etapas iniciais de um programa de pré-imunização (MÜLLER e COSTA, 1973; REZENDE e MÜLLER, 1995).

As enzimas de restrição utilizadas, Hinf I e Rsa I, apresentaram sítios de restrição no gene da proteína do capsídeo de todos os isolados de CTV analisados, gerando grupos polimórficos entre os mesmos, como observado por Roy et al. (2003) e Valle et al. (2000).



O polimorfismo foi observado a partir das bandas geradas pela digestão com ambas as enzimas em gel de poliacrilamida (dados não apresentados). Pela visualização do gel observou-se que a digestão por essas enzimas geraram vários fragmentos; entretanto, um maior número de sítios de restrição foi observado para a enzima Rsa I, gerando um maior polimorfismo entre os isolados quando comparada com a enzima Hinf I.

Uma melhor discriminação entre isolados analisados também foi obtida por Zanineli-Ré (2004) utilizando a enzima Rsa I em comparação com a enzima Hinf I.

Nos padrões eletroforéticos SSCP, grande variação no número e posição de bandas também pode ser verificada em gel de poliacrilamida (dados não apresentados), sugerindo alta variabilidade genética entre isolados de uma mesma região e, principalmente, de regiões diferentes. O perfil eletroforético SSCP de cada uma das amostras apresentou mais de duas bandas, indicando, como já constatado em outros estudos (CARRARO et al., 2003; CORAZZA-NUNES et al., 2006), que o isolado de uma planta pode ser constituído por mais de um haplótipo de CTV.

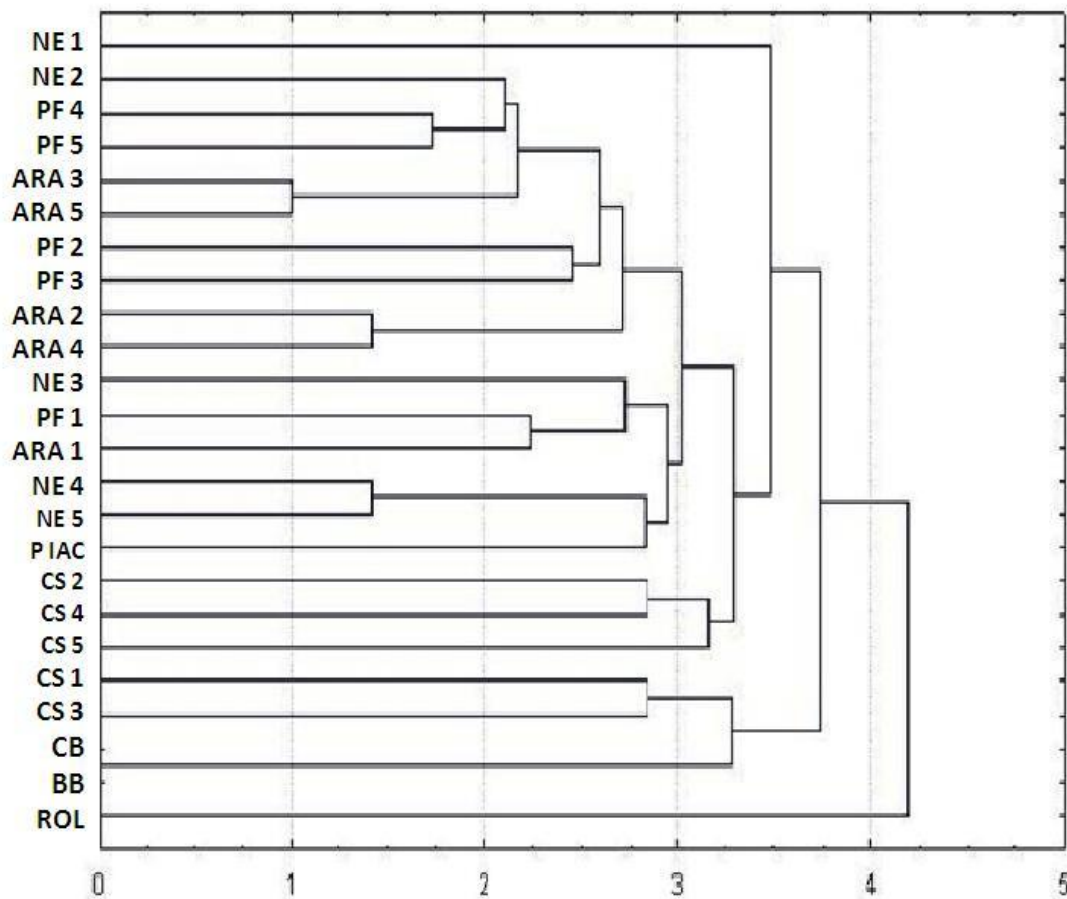
Com base nas bandas polimórficas obtidas pelas análises RFLP e SSCP do gene da capa protéica foi calculada a distância genética entre os isolados selecionados. O dendrograma gerado pelo coeficiente de dissimilaridade genética revelou a formação de três grupos. O grupo 1 é formado apenas pelo isolado Rolândia que divergiu de todos os demais isolados analisados, não se agrupando aos mesmos (Figura 1)

O grupo 2 é formado pelos isolados utilizados como controles fortes Capão Bonito e Barão B e pelos isolados CS 1 e CS 3 da região Noroeste (Figura 1). Portanto, os isolados CS 1 e CS 3 apresentaram relativa similaridade genética em relação aos controles fortes, apesar de terem sido extraídos de plantas pertencentes a essa região, onde as plantas encontram-se infectadas por uma mistura de haplótipos fracos a moderados de CTV (ZANINELI-RÉ, 2004), e a avaliação sintomatológica indicar reações fracas ao vírus.

**Tabela 2:** Resultados (notas atribuídas) dos testes de indexação biológica para Tristeza (CTV) das plantas selecionadas em pomares da região Norte e Noroeste do Estado do Paraná e controles utilizados.

Isolado	Palidez de Nervuras	Canelura no Lenho	Crescimento da indicadora
NE 1	+	1,0	2,5
NE 2	+	1,0	3,5
NE 3	+	1,0	3,5
NE 4	+	1,0	4,0
NE 5	+	1,0	4,0
CS 1	+	1,0	3,5
CS 2	+	1,0	2,5
CS 3	+	1,0	4,0
CS 4	+	2,0	3,0
CS 5	+	1,0	3,5
PF 1	+	2,0	3,0
PF 2	+	1,0	2,0
PF 3	+	1,0	3,0
PF 4	+	1,0	3,0
PF 5	+	1,0	3,0
ARA 1	+	1,0	3,0
ARA 2	+	1,0	2,5
ARA 3	+	1,0	3,0
ARA 4	+	2,0	2,5
ARA 5	+	1,0	3,0
P IAC	+	1,0	3,0
CB	+++	5,0	2,0
BB	+++	4,0	2,0
ROL	+++	4,0	2,0
G	+	0,0	2,0
G50	+	1,0	5,0

Apesar de estarem infectadas por isolados severos de CTV, muitas plantas, podem não expressar os sintomas por vários anos (POWELL et al., 1999; PELOSI et al., 2000). Resultado semelhante foi encontrado por Targon et al. (2000) ao caracterizar o complexo Capão Bonito visando a auxiliar a identificação de isolados fracos do vírus usados na pré-imunização. O dendrograma gerado naquele estudo revelou que o isolado Capão Bonito (CB3-22) apresentou elevada similaridade genética com o isolado fraco T-30 da Flórida.



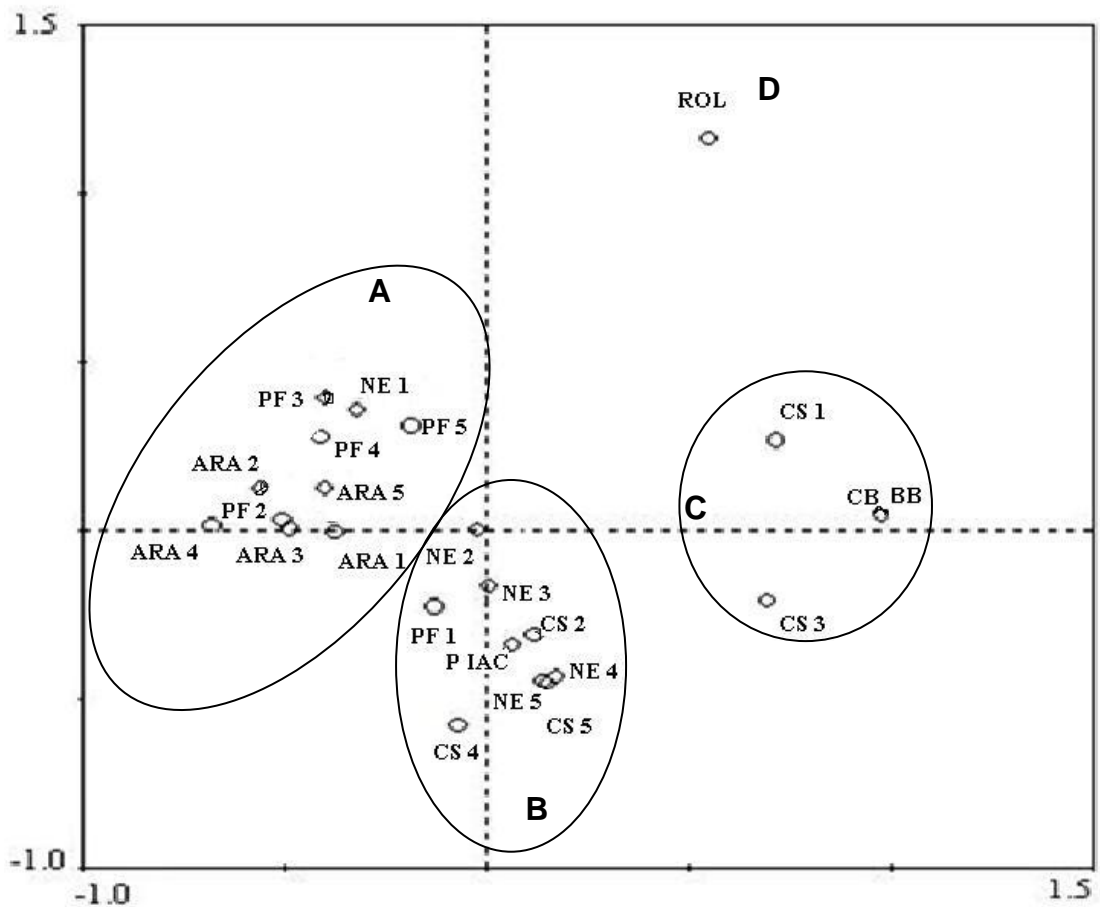
**Figura 1:** Dendrograma gerado pelo método de análise UPGMA a partir de uma matriz de distância euclidiana. O agrupamento dos isolados de CTV foi realizado de acordo com a diversidade genética expressa pela distância euclidiana.

O grupo 3 é formado por isolados de ambas as regiões Norte e Noroeste, juntamente com o controle fraco utilizado Pêra IAC (Figura 1). Portanto, as plantas selecionadas da região Norte apresentaram complexos virais constituídos por haplótipos fracos a moderados do vírus, com perfis eletroforéticos semelhantes ao do controle fraco utilizado, apesar de estudos demonstrarem que existem variantes severos do vírus, que induzem depressões no lenho, fazendo parte dos complexos virais presentes nas plantas daquela região (CARRARO et al., 2003; ZANINELI-RÉ, 2004).

Na Figura 2, é apresentado um diagrama de ordenação, construído com os dados da matriz binária utilizando a análise de componentes principais, com base nas bandas polimórficas obtidas das análises RFLP e SSCP. Esse diagrama pode ser utilizado para verificação da significância dos grupos formados pelo método de agrupamento. Essa ordenação representa a variância dos dados em um sistema de componentes principais (eixo), de forma mais simples de analisar os agrupamentos. Para esse conjunto de dados, 35,4% da variância total foi explicada pelos dois primeiros componentes (componente um responsável por 22,2% da variação e o componente dois por 13,2%).

O diagrama (Figura 2) gerado pela análise de componentes principais possibilitou uma melhor visualização do agrupamento entre os isolados das plantas selecionadas com o controle fraco Pêra IAC mostrando a proximidade genética existente. Pode-se observar um agrupamento semelhante ao já verificado pelo dendrograma (Figura 1).

Nessa análise, o grupo 3 do dendrograma subdividiu-se em 2 grupos no diagrama (grupos A e B), separando os isolados das duas regiões, Norte (grupo A) e Noroeste (grupo B), tendo como exceção os isolados NE 1 (Noroeste) e PF 1 (Norte), os quais se agruparam de forma invertida (Figura 2). Outro fato observado é quanto ao agrupamento do controle fraco Pêra IAC juntamente com os isolados da região Noroeste (grupo B), mostrando maior proximidade com esses isolados. Esse fato pode indicar que os isolados da região Noroeste do Paraná apresentem as melhores características esperadas para um isolado fraco protetivo contra os complexos virais de CTV que ocorrem no Estado do Paraná.



**Figura 2:** Análise de componentes principais dos isolados de CTV selecionados, com base nos dados da matriz binária das análises RFLP e SSCP, mostrando a ordenação dos acessos. As letras A, B, C e D representam os grupos formados pela análise.

Os isolados do grupo 2 (Figura 1) ficaram distante dos demais grupos no diagrama (C) (Figura 2). O isolado Rolândia, pertencente ao grupo 1 (Figura 1), apresenta características sintomáticas semelhantes aos outros controles fortes utilizados. No entanto, este apresenta padrões eletroforéticos distintos dos demais (D) (Figura 2).

## CONCLUSÕES

A indexação biológica apontou reações fracas de CTV nas indicadoras de lima ácida Galego, similares às dos controles fracos, que, somados aos resultados das análises de RFLP e SSCP, sugeriu que as plantas elite selecionadas nos pomares das regiões Norte e Noroeste do Paraná estão infectadas por haplótipos fracos de CTV, podendo, assim, apresentar potencial para serem utilizadas como matrizes. Destaca-se que as plantas elite selecionadas na região Noroeste do Estado, por terem se agrupado com o controle fraco Pêra IAC observado na análise de componentes principais, podem ser consideradas mais promissoras e apresentar as características esperadas para um isolado fraco protetivo contra os complexos virais de CTV presentes no Estado do Paraná.

Os isolados CS 1 e CS 3 da região Noroeste apresentaram relativa proximidade genética com os controles severos do CTV, Capão Bonito e Barão B, apesar de também terem mostrado reações fracas na indicadora lima ácida Galego, semelhantes às aquelas observadas nos controles fracos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, A.L. Single-stranded conformational polymorphisms. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J. **PCR Strategies**. Academic Press. San Diego, CA, p.121-129, 1995.

BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, Maryland ,v. 126, p. 374-380, 1982.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, p.269-273, 2003.

COLETTA-FILHO, H. D.; MACHADO, M.A.; TARGON, M.L.P.N. Detecção de *Xylella fastidiosa* da Clorose Variegada dos Citros através de PCR. **Fitopatologia brasileira**, v.21 (supl.), p.343, 1996.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of citrus tristeza vírus (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, n.27, p.11-16, 2001.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of Citrus Active Germplasm Bank. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.322-327, 2006.

CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W.; SILVERIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, p.79-84, 1997.

CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W. Avaliação de plantas indicadoras e porta-enxertos na indexação biológica do viróide da xiloporose em citros. **Laranja**, Cordeirópolis - SP, v.24, n.1, p.145-155, 2003.

GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J.; LEE, R. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v.44, p.305-317, 1993.

GREVE, A.; PRATES, H.S.; MÜLLER, G.W. Produção de borbulhas certificadas de citros no Estado de São Paulo. In: Rodriguez, O. e Viegas, F. **Citricultura Brasileira**. Fundação Cargil, Campinas, 2ed., v.1, p.302-317, 1991.

MEISSNER-FILHO, P.E; SOARES-FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C; DIAMANTINO, E.; DIAMANTINO, M.S.A. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.312-315, 2002.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. Métodos de seleção de estirpes fracas do vírus da Tristeza. In: **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, 2, Viçosa. **Anais...**Viçosa: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 287-295, 1973.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. In: **Proceedings of International Society of Citriculture**. n.3, p. 868-872, 1977.



MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré- imunizado “Pêra” IAC na citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, p. 399-408, 1999.

NAKATANI, A.K.; PINTO, J.H.M.; LEITE JUNIOR, R.P. Avaliação de clones de laranja ‘Pêra’ em relação à tristeza dos citros na região norte do Estado do Paraná. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 30, Poços de Caldas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, p.340, 1997 (Resumo).

PASSOS, O. S. Premunização contra tristeza (CTV) como técnica obrigatória no melhoramento de citros – uma experiência vivida nos trópicos. In: **Curso internacional de citricultura, Manejo Integral Fitossanitário 2**. EMBRAPA. p. 56-64, 1997.

PELOSI, R.R.; RUNDELL, P.A.; COHEN, M.; POWELL, C.A. Evaluation of a sixteen-year *Citrus tristeza virus* cross-protection trial in Florida. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.111-114, Riverside, CA. 2000.

POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.25, p.413-426, 2004.

POWELL, C.A.; PELOSI, R.R.; RUNDELL, P.A.; STOVER, E.; COHEN, M. Cross protection on grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus*. **Plant Disease**, St. Paul v.87, p.989-991, 1999.

REZENDE, J.A.M. e MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. In W.C. Luz (ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo-RS, v.3, p.185-226, 1995.

ROY, A.; RAMACHANDRAN, P.; BRLANSKY, R.H. Grouping and comparison of India *Citrus tristeza virus* isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. **Archives of Virology**, v.148, p.707-722, 2003.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; GUERRI, J.; PAPPU, H.; NIBLETT, C.; MORENO, P. Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, London, v.129, p.479-489, 1996.

SALIBE, A.A.; TEÓFILO-SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'. **Laranja**, v.23, p.231-245, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; COLETTA-FILHO, H.D.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F. Sequence of coat protein gene of the severe *Citrus tristeza virus* complex Capão Bonito. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.121-126, Riverside, CA. 2000.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; RODRIGUEZ, O.; FIGUEIREDO, J.O.; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranjeira 'Pêra' no Estado de São Paulo. In: **Congresso Brasileiro De Fruticultura - 4**, Cruz das Almas. **Anais...**Cruz das Almas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 111-116,1977.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W.; FIGUEIREDO, J.O.; LARANJEIRA, F.F.; SALIBE, A.A. Laranja 'Pêra IAC 2000'. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, p.469-494, 2001.

VALLE, V.G.R.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; TEOFILLO-SOBRINHO, J.; LEE, R.F. Characterization of citrus tristeza virus isolates by RFLP analysis of the coat protein gene. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.175-181, 2000.

VALVERDE, R.A.; NAMETH, S.T.; JORDAN, R.L. Analysis of double strand RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.255-258, 1990.

ZANINELI-RÉ, M.L.Z. **Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná pela sintomatologia da tristeza e análise de RFLP do gene do capsídeo**. 2004. 57 f. Dissertação (Mestrado/Agronomia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

## RESUMO

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROTEÇÃO OFERECIDA POR NOVOS ISOLADOS FRACOS DO *Citrus tristeza virus* SELECIONADOS EM UM PROGRAMA DE PRÉ-IMUNIZAÇÃO.** Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

O uso de porta-enxertos tolerante e a pré-imunização para o controle dos danos induzidos pelo *Citrus tristeza virus* (CTV) têm apresentado resultados satisfatórios, com algumas exceções. Estudos demonstram que isolados fracos de CTV, selecionados na própria região citrícola de interesse, são superiores em suas características protetivas. Assim, 20 plantas elite, selecionadas nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná, com potencial para serem utilizadas em programas de pré-imunização, foram submetidas a testes para se avaliar a real potencialidade de proteção oferecida pelo complexo viral presente nessas plantas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o valor protetivo desses isolados virais, determinado pelo desafio com a inoculação do isolado severo 'Rolândia', por meio da união de tecido (enxertia) ou pelo vetor 'Pulgão Preto dos Citros' (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). Alguns isolados se destacaram, mostrando um melhor valor protetivo, frente ao desafio com o isolado severo, evidenciado pela análise SSCP das plantas desafiadas e mantidas em estufa. A análise molecular SSCP mostrou ser uma excelente ferramenta complementar a experimentos de desempenho a campo para se monitorar a estabilidade do complexo viral presente nas plantas. A avaliação dos isolados através da análise SSCP e em experimento a campo apontaram o isolado CS-1, coletado no Município de Cruzeiro do Sul, como o isolado mais promissor e que pode oferecer melhor proteção às cultivares de laranja Pêra em pomares comerciais implantados no Norte e Noroeste do Paraná. O isolado severo do CTV denominado Rolândia mostrou-se estável e com alta divergência genética em relação aos demais isolados severos utilizados (Capão Bonito e Barão B), assim como de todos os isolados testados.

Palavras-Chave: Proteção Cruzada, Tristeza dos Citros, SSCP.

## ABSTRACT

ZANUTTO, Carlos Alexandre, Dr., Universidade Estadual de Maringá, Dezembro de 2009. **EVALUATION OF THE CAPACITY OF PROTECTION OFFERED BY NEW MILD ISOLATES OF *Citrus tristeza virus* SELECTED FROM A PRE-IMMUNIZATION PROGRAM.** Orientador: Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Conselheiros: Prof. Dra. Maria Júlia Corazza e Prof. Dr. João Batista Vida.

The use of tolerant rootstocks and pre-immunization to control damages induced by the *Citrus tristeza virus* (CTV) have showed satisfactory results, with some exceptions. Studies have demonstrated that mild isolates chosen in the region are superior in their protective characteristics. Thus, 20 plants of elite Pêra sweet orange, which are detached for the production and development were selected in the regions North and the Northwest of Paraná State, and submitted to the biological indexing and molecular tests for citrus virus, viroides and bacteria detection. The results showed that the selected plants present potential to be used in pre-immunization programs, since the biological indexing and the molecular characterization through RFLP (restriction fragment length polymorphism) and SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) of the gene of capsid protein pointed to infected plants with mild isolates of the CTV. Won this stage, those potentially mild and protective isolates, were submitted to the challenge inoculation with the severe isolate 'Rolândia' through the tissue union (grafting) or by the vector 'Brown citrus aphid' (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) which revealed more efficient in the transmission of the virus. Some isolates were detached, showing better protective value front to the challenge with severe isolates, evidenced by SSCP analysis of the plants kept in greenhouse. Molecular analysis SSCP proved to be an excellent complementary tool to the performance experiments in the field, to monitor the stability of the viral complex in plants. The evaluation of isolates by SSCP analysis and field experiment, showed the isolate number 1, collected in the Cruzeiro do Sul County (CS-1) as the most promising isolate and may offer better protection for Pera sweet orange on commercial orchards located in northern and northwestern of Paraná. The severe

CTV isolate called Rolândia, was stable and with high genetic divergence between the severe isolates used (Capão Bonito and Barão B), as well as all isolates tested.

Keywords: Cross-Protection, Citrus Tristeza, SSCP

## INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira ocupa lugar de realce no cenário mundial, sendo uma importante atividade do agronegócio (NEVES et al., 2006). Entretanto, a produtividade ainda é baixa e está relacionada à expansão de pragas e doenças, dentre estas a tristeza dos citros, considerada mundialmente uma das mais importantes viroses que atingiram a cultura nos últimos 90 anos (TARGON, 1997; HARPER et al., 2009).

A tristeza dos citros tem como agente causal o *Citrus tristeza virus*, um Closterovirus pertencente à família *Closteroviridae*. Limitado ao floema dos hospedeiros, mostra partículas longas, flexuosas e filamentosas de 10-12 nm de diâmetro e 2.000 nm de comprimento (KITAJIMA, 1964; BAR-JOSEPH et al., 1989; FEBRES et al., 1996). O CTV apresenta um RNA genômico de fita simples, senso positivo, de aproximadamente 19,3 kb, contendo 12 ORF's, as quais podem codificar, pelo menos, 19 proteínas (KARASEV et al., 1995; TARGON et al., 2003; MARTÍN et al., 2009).

Após o descobrimento que a tristeza dos citros era causada por um vírus transmitido pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) e por enxertia de material infectado, como medida de controle, no Brasil, foi adotado o uso de porta-enxertos tolerantes em substituição à laranja Azeda (*Citrus aurantium* L.), o que não se mostrou completamente viável para algumas espécies de citros, especialmente laranja Pêra (*C. sinensis* L.), lima ácida Galego (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) e Pomelos (*C. paradisi* Macfad.). Diante desse fato, estudos sobre a proteção cruzada ou pré-imunização com isolados fracos do vírus passaram a ser conduzidos nas condições brasileiras (MÜLLER et al., 1968; MÜLLER, 1972, 1980; MÜLLER e COSTA, 1977).

Como resultado do programa de pré-imunização instituído, no fim do século XX cerca de 50 milhões das plantas de laranja Pêra plantadas no Brasil originaram-se desse programa, que distribuiu material pré-imunizado com isolado fraco protetivo, que demonstra ainda hoje, sua capacidade protetiva após

sucessivas gerações clonais (MÜLLER e COSTA, 1993; BORDIGNON et al., 2003).

Entretanto, têm sido observadas plantas pré-imunizadas apresentando sintomas severos de tristeza em vários pomares comerciais do país. Dentre os isolados de CTV, o denominado Capão Bonito é considerado um dos mais severos, afetando praticamente todas as variedades de laranja doce e porta-enxertos tolerantes, como limão Cravo (*C. limonia* Osbeck). O isolado protetivo da laranja Pêra IAC tem se mostrado ineficiente na proteção contra esse isolado severo (SOUZA et al., 2002). Os riscos da expansão de estirpes severas do vírus, seja pela ampliação do plantio em áreas de maior risco, seja pela movimentação dessas estirpes através de mudas ou do vetor para outras regiões (HERRERA-ISIDRÓN et al., 2009) somente poderão ser efetivamente reduzidos com um eficiente sistema de proteção cruzada contra essas estirpes (SAMBADE et al., 2002; MORENO et al., 2008).

Estudos recentes apontam a existência de isolados severos na região Norte do Paraná, causando prejuízos consideráveis nos pomares comerciais dessa região (CARRARO et al., 2003; ZANINELI-RÉ, 2004). Dessa maneira, é arriscado o Paraná basear a sua citricultura em material oriundo de fora, pois alguns estudos têm demonstrado que os melhores resultados têm sido obtidos para uma determinada região, quando os isolados protetivos do CTV são selecionados na região em questão.

Tal fato foi verificado inicialmente em um experimento instalado em 1971 no Centro de Citricultura Sylvio Moreira – CCSM, o qual compreendia 13 clones de laranja Pêra, a maioria tendo sido selecionada na região de Bebedouro, Norte do Estado, com clima mais quente, distando cerca de 250 km do CCSM. Os resultados mostraram que dentre as melhores combinações (tecido vegetal e isolado protetivo do CTV) estavam aqueles selecionados na região onde se situa o CCSM (TEÓFILO SOBRINHO et al., 1977).

Em 1977, foi introduzido na Estação Experimental de Itajaí/SC, EPAGRI, material proveniente do CNPMF/Embrapa, Cruz das Almas, BA. Em 1994, verificou-se que do material introduzido, dois clones de laranja Valência (*C.*



*sinensis* L.) apresentavam sintomas de infecção pelo vírus da tristeza; ananicamento, palidez de nervuras nas folhas, frutos miúdos e caneluras acentuadas (KOLLER et al., 1994). Uma das explicações é de que o vírus existente originalmente nas plantas não foi capaz de protegê-las contra os fortes existentes nas regiões de introdução.

Finalmente, um experimento de 27 clones de laranja Pêra instalado na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Capão Bonito, SP, avaliado por SSCP do gene do capsídeo, mostrou que embora possa ser deduzida a ocorrência de um isolado comum em todas as plantas, existem variações entre eles possivelmente associadas à inoculação cruzada por pulgões. Padrões de isolados considerados protetivos também já se apresentavam misturados com outros componentes (MÜLLER et al., 2000).

Dessa maneira, é conveniente aprofundar-se na caracterização dos isolados de CTV existentes no Paraná, visando a selecionar alguns com características protetivas. Com esse objetivo, o Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá, iniciou, em 2003, um experimento cuja primeira etapa foi selecionar plantas de elite, isto é, plantas que se destacavam das demais pela produção e desenvolvimento, nas regiões Norte e Noroeste do Estado. Essas plantas foram submetidas à indexação biológica e testes moleculares para detecção de vírus, viróides e bactérias, causadores de doenças em citros.

Os resultados obtidos mostraram que as plantas selecionadas tinham potencial para serem utilizadas em programas de pré-imunização, visto que os resultados da indexação biológica e da caracterização molecular através de RFLP (restriction fragment length polymorphism) e SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) do gene da proteína do capsídeo (GCP) apontaram para plantas infectadas com isolados fracos do vírus da tristeza dos citros (CTV) (MÜLLER, 2004; MÜLLER, 2006).

Dando prosseguimento a essas investigações, o presente estudo teve como objetivo testar o valor protetivo dos isolados selecionados em condição de casa de vegetação, pelo desafio por inoculação (união de tecido e por vetor) de

um isolado severo, e a campo sob alta pressão de inóculo do mesmo isolado severo, verificando dentre os isolados selecionados aqueles que podem propiciar uma proteção efetiva e estável. As análises foram conduzidas por meio da técnica molecular SSCP e observação da sintomatologia de tristeza apresentada pelas plantas nas condições de campo, comparando os isolados selecionados com outros isolados fracos e severos de outras regiões citrícolas do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de CTV analisados foram coletados em pomares comerciais de laranja da variedade Pêra, localizados nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná. Em cada região, foram selecionadas duas propriedades distintas, sendo coletadas amostras de cinco plantas elite de cada pomar, constituindo, assim, 20 isolados. As propriedades amostradas na região Norte localizam-se no município de Prado Ferreira e Araongas. Na região Noroeste, as plantas elite, das quais se coletaram amostras, pertenciam aos pomares do município de Nova Esperança e Cruzeiro do Sul (MÜLLER, 2004).

Os isolados de CTV selecionados a campo de plantas de elite (MÜLLER, 2004) foram submetidos ao desafio com o isolado severo, visando a testar sua capacidade protetiva. Para esse procedimento, foram utilizados como controles clones de laranja doce da variedade Pêra livres de vírus, clones dessa variedade pré-imunizados com o isolado Pêra IAC (PIAC) e clones de uma cultivar de Pêra Bianchi denominada “Superplanta”, que vem fornecendo excelentes resultados no sudoeste do Estado de São Paulo, onde ocorre o complexo severo Capão Bonito do CTV (SALIBE et al., 1992). Dois métodos de desafio foram empregados: inoculação pelo vetor *Toxoptera citricida* e por união de tecido (enxertia). Como porta-enxerto, foi utilizado o limão Cravo livre de vírus. Todas as plantas, inclusive os porta-enxertos, foram mantidas em casa-de-vegetação à prova de afídeos.

As enxertias foram efetuadas quando os porta-enxertos de limão Cravo tinham 5–7 mm de diâmetro, conforme segue: (1) preparou-se seis combinações

de cada fonte de isolado a ser testado, totalizando 120 plantas; (2) seis combinações do controle fraco Pêra IAC e seis do controle “Superplanta”; (3) como controle forte (6 plantas), foi utilizado material de uma planta de laranja Pêra enxertada em limão Cravo, localizada na região de Rolândia, Norte do Estado, a qual apresentava acentuados sintomas de tristeza. Esse isolado, denominado Rolândia, foi posteriormente utilizado como desafiante; (4) finalmente, como controle negativo, foi utilizada a Pêra sadia (livre de vírus) (6 plantas). No total, o experimento consistiu de 144 plantas (Quadro 1).

### Inoculação de Desafio Utilizando o Vetor

Para se conseguir as colônias virulíferas do inseto vetor do CTV, o pulgão preto dos citros (*T. citricida*), em número suficiente, inicialmente podou-se a árvore fonte do isolado severo Rolândia e duas outras situadas próximas no mesmo talhão, com sintomas de CTV e perfil eletroforético idênticos (Figura 7). Nas brotações formadas nas árvores fonte de vírus, cerca de duas semanas após, já se observavam colônias do vetor em formação. Um mês após as podas, os ramos com insetos foram coletados, colocados em caixas de isopor com gelo e separados do material vegetal por folhas de papel.

O procedimento adotado foi considerado adequado, pois os insetos ficam imóveis nas brotações por várias horas devido à baixa temperatura, o que torna viável o seu transporte em boas condições. Uma vez no laboratório, a inoculação foi efetuada colocando-se, em média, uma brotação ou folhas, com cerca de 50 insetos, em duas plantas de cada um dos tratamentos, conforme detalhamento no Quadro 1.

Os insetos permaneceram por um período de 72 horas nas plantas, tempo suficiente para que passassem dos galhos ou folhas onde estavam para as plantas em questão e começassem a se alimentar das mesmas, assegurando uma boa inoculação do CTV. Duas inoculações foram realizadas para assegurar o desafio máximo das plantas. As inoculações de desafio foram efetuadas quando as

plantas apresentaram cerca de 50 – 70 cm de altura e diâmetro de tronco de aproximadamente 0,5 cm.

Todas as plantas a serem desafiadas foram colocadas em uma caixa de papelão coberta com tela anti-afídeo, permitindo seu isolamento. Nos dois casos, ao final do período de 72 horas, os afídeos foram eliminados com um inseticida e as plantas retornadas à casa-de-vegetação.

#### Inoculação de Desafio Utilizando a União de Tecidos (enxertia)

Para o desafio por união de tecidos, outras duas plantas de cada um dos tratamentos foram inoculadas, utilizando-se duas gemas portadoras do isolado severo do CTV Rolândia, previamente coletadas das plantas doadora dos pulgões virulíferos (Quadro 1).

Quadro 1 - Legendas: Para os testes, cada clone selecionado com as potenciais estirpes fracas ( $f^1$  a  $f^{20}$ ), foi multiplicado em uma linha de seis plantas (O). Quatro plantas foram desafiadas com o isolado severo (s); respectivamente, duas através do vetor pulgão preto (V) e duas por intermédio da enxertia de borbulhas (B). No esquema estão representados os clones com os isolados de 1 a 5. Os mesmos tratamentos foram realizados nos clones com os isolados de 6 a 20. Controles fracos e livres de vírus (c) receberam o mesmo tratamento

O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O	O <sup>sB</sup>
O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O <sup>sB</sup>	O	O <sup>sB</sup>
O	O	O	O	O	O	O
O	O	O	O	O	O	O
O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O	O <sup>sV</sup>
O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O <sup>sV</sup>	O	O <sup>sV</sup>
F <sup>1</sup>	f <sup>2</sup>	f <sup>3</sup>	f <sup>4</sup>	f <sup>5</sup>	s	c

## Monitoramento da Inoculação de Desafio

Para a verificação da efetiva inoculação do isolado severo Rolândia nas plantas do experimento, foram realizadas análises, por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a intervalos regulares de 30 dias, utilizando as plantas livres de vírus (controle negativo), livres de vírus submetidas à inoculação por vetor e livres de vírus submetidas a inoculação por união de tecido (enxertia).

Esse procedimento foi utilizado também como indicativo do tempo latente necessário para a efetiva distribuição e colonização da planta pelo vírus, levando-se em consideração o método de inoculação. Desta forma, foi possível determinar o momento a partir do qual era possível efetuar as coletas de material para a análise SSCP. Após a comprovação da inoculação e colonização efetiva das plantas pelo vírus foi realizada a coleta de material de todas as plantas do experimento. O intervalo entre as inoculações e a coleta do material foi de sete meses.

## Análise Molecular do Gene do Capsídeo (GCP) do CTV por Meio da Técnica de SSCP

A avaliação do SSCP teve o objetivo de verificar a estabilidade do isolado protetivo, ou seja, se os haplótipos que constituem o isolado protetivo se mantiveram estáveis mesmo após a inoculação do isolado severo. Assim, esse procedimento feito após o desafio visa a verificar se o padrão do isolado protetivo continua o mesmo ou se o isolado severo foi capaz de colonizar a planta pré-imunizada. Se o padrão do isolado protetivo continua o mesmo após o desafio, tal fato indica que ele continua estável e apresenta potencial para “proteger” a planta frente aos isolados severos. No entanto, se o isolado em teste não foi estável, ou seja, não foi capaz de impedir a colonização dos variantes do isolado severo, este pode não ter sido efetivo na proteção e, assim, não ser incorporado no programa de pré-imunização.

O material para a análise SSCP, constituído da casca de ramos e das nervuras centrais de folhas, foi acondicionado em sacos individuais, previamente etiquetados, e congeladas até o momento de uso.

Inicialmente, foi feito o isolamento do RNA total do vírus por meio de ciclos de extração, utilizando o reagente Trizol, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen).

O RNA viral serviu de molde para a síntese da primeira fita de cDNA, realizada em termociclador a uma temperatura de 37°C por duas horas, semelhante ao procedimento descrito por Sambrook et al. (1989).

A amplificação do gene da proteína do capsídeo viral (GCP) por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction) também seguiu o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. A amplificação foi conduzida utilizando-se dois primers específicos: CN119 (5'AGA TCT ACC ATG GAC GAC GAA ACA AAG 3') e CN120 (5'GAA TTC GCG GCT CAA CGT GTG TTA AAT TTC C 3'), derivados do haplótipo T36 da Flórida.

As análises SSCP foram realizadas em conformidade com a metodologia usada por Rubio et al. (1996) e adaptada por Corazza-Nunes et al. (2001). Do produto de amplificação do GCP purificado foram utilizadas alíquotas posteriormente misturadas com igual volume de solução desnaturante (95% de formamida, 2 mM de EDTA, e 0,05% de azul de bromofenol). O GCP desnaturado foi submetido à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 8%, temperatura de 25 °C, por um período de 16 horas e uma corrente de 200V. O gel foi corado com nitrato de prata segundo a metodologia descrita por Beidler et al. (1982).

O estudo dos perfis eletroforéticos da análise SSCP foi conduzido por meio de observações do número e posição das bandas. Foram estabelecidas comparações entre os isolados de CTV obtidos das plantas do mesmo tratamento, entre tratamentos, com os controles fracos (Pêra IAC e Superplanta), e com os controles severos Rolândia, Capão Bonito e Barão B. O material livre de vírus foi utilizado como controle (branco) para possíveis contaminações.

Para avaliação da similaridade genética entre os isolados de CTV, foram calculados coeficientes de Jaccard. A análise de agrupamento UPGMA (unweighted pair – group method with arithmetic averages) foi utilizada para agrupar os isolados de CTV a partir dos coeficientes de similaridade. O programa utilizado foi o Phylip (PHYLogeny Inference Package), versão 3.68 (FELSENSTEIN, 2008). O suporte estatístico para o agrupamento foi determinado por meio da análise “bootstrap” com 1000 repetições.

#### Avaliação da Proteção Oferecida pelos Isolados Fracos de CTV em Condições de Campo com Alta Pressão de Inóculo Severo

Uma repetição do experimento conduzido em casa-de-vegetação foi instalada a campo, no município de Arapongas, região Norte do Estado do Paraná. O local foi selecionado tendo em vista a alta pressão de inóculo severo observado (CARRARRO et al., 2003; ZANINELI-RÉ, 2004; MÜLLER, 2006) e por apresentar um pomar comercial com mais de 12 anos, onde foi possível instalar o experimento em local próximo a plantas mais velhas.

As plantas do experimento foram submetidas aos mesmos tratamentos culturais aplicados às demais plantas do pomar, estando expostas à livre infecção pelo vírus da tristeza, através da presença do vetor pulgão preto (*T. citricida*) na área estudada. O clima dessa região é do tipo subtropical, com temperaturas médias anual variando de 20°C a 21°C e solo do tipo Latossolos Roxos e Terra Roxa Estruturada (CAVIGLIONE et al., 2000).

As avaliações do experimento nesse pomar foram realizadas quando as plantas completaram 42 meses de idade a campo e consistiu da avaliação do crescimento, sintomatologia de tristeza e de intensidade de caneluras (stem pitting) provocadas pela presença do vírus nos tecidos das plantas.

Para a avaliação da intensidade de canelura, foram coletados ramos maduros, porém não suberificados, dos quadrantes das plantas. Retirou-se a casca desses ramos e se atribuíram notas de zero a cinco para a intensidade de canelura observada, baseando-se na escala diagramática utilizada por Meissner-Filho et al.

(2002), com algumas modificações, em que: 0= nenhuma canelura; 1= raras caneluras superficiais; 2= um número moderado de caneluras; 3= um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte; 4= muitas caneluras superficiais e algumas profundas e 5= superfície inteiramente coberta de caneluras superficiais ou profundas.

O desenvolvimento vegetativo das plantas a campo foi avaliado observando-se a altura, diâmetro e volume das copas, tomando como máxima nota (5) a planta com maior desenvolvimento e mínima nota (1) a planta com menor desenvolvimento, dentre as plantas do experimento.

Para a avaliação de sintomatologia de tristeza, foram observados os sintomas típicos provocados pela doença na variedade em questão, destacando-se nanismo, palidez de nervuras e presença de caneluras no tronco. Com base na intensidade desses sintomas, atribuíram-se notas de 0 (ausência de sintomas) a 5 (planta extremamente afetada pela doença, com sintomas evidentes).

Os resultados obtidos para o desenvolvimento vegetativo, intensidade de caneluras e sintomatologia de tristeza foram analisados utilizando-se o software SISVAR, versão 5.1, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras (UFLA). O teste utilizado para a comparação das médias dos parâmetros avaliados foi o de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das avaliações preliminares, por PCR, obtidos quanto à eficiência das inoculações desafiadas, efetuadas a cada 30 dias, mostraram que somente após 90 dias da inoculação por meio do vetor foi possível verificar a presença do vírus nos tecidos das plantas livres de vírus desafiadas.

Como pode ser observado na Figura 1, as colunas 2 e 7 mostraram um segmento de aproximadamente 670 pb, correspondente ao tamanho do GCP, semelhante ao mostrado pelo isolado severo Rolândia (coluna 8), indicando que a inoculação desafiante pelo vetor foi bem sucedida.



A ausência de segmentos nas colunas 3 e 6 aponta para o fato de que, na ocasião da coleta do material, o CTV existente nas borbulhas inóculo não tinha ainda sido transferido para as plantas inoculadas ou que o vírus não havia se multiplicado o suficiente para ser detectado em gel de agarose. Fatores como tempo necessário ao pegamento, brotação das borbulhas e latência temporária do vírus podem explicar a ausência de resultados nesse intervalo de tempo.

Somente aos 180 dias após a inoculação, foi possível verificar a presença do vírus nos tecidos das plantas inoculadas por união de tecido, definindo, dessa forma, a época para a coleta do material vegetal para extração do RNA viral das plantas, o qual foi efetuado aos sete meses após a inoculação, para uma margem de segurança de mais 30 dias.

Sambade et al. (2002) chegaram a resultados semelhantes quando trabalhavam com plantas pré-inoculadas com um isolado fraco e desafiadas com um isolado severo por meio da inoculação por união de tecidos de borbulhas infectadas. Os autores verificaram, através da análise SSCP das plantas, que com o passar do tempo pós-desafio o perfil do isolado fraco alterou para o perfil do isolado severo. O período de tempo para essa observação variou de 3 a 6 meses, não se constatando variação nos perfis eletroforéticos após este período.

A eletroforese dos produtos da PCR obtidos após a síntese da primeira fita de cDNA dos isolados de tecidos infectados das plantas avaliadas e suas repetições, realizada em gel de agarose 1%, revelou um segmento de aproximadamente 670 pb, que corresponde ao tamanho do GCP do vírus (SEKIYA et al., 1991). No gel de agarose foram observadas variações na intensidade das bandas do produto da PCR amplificados (Figura 2), revelando diferenças na sua concentração. Targon (1997) relatou que essa diferença pode ocorrer devido a diferentes concentrações de cDNA utilizadas nessas reações.

Na análise SSCP do gene da proteína do capsídeo do CTV verificou-se o número de bandas e suas posições em cada perfil eletroforético (Figuras 3 a 7). Um complexo padrão de bandas é observado em cada perfil (SOUZA et al., 2002; CARRARO et al., 2003; CORRAZA-NUNES et al., 2001; CORRAZA-NUNES et al., 2006).

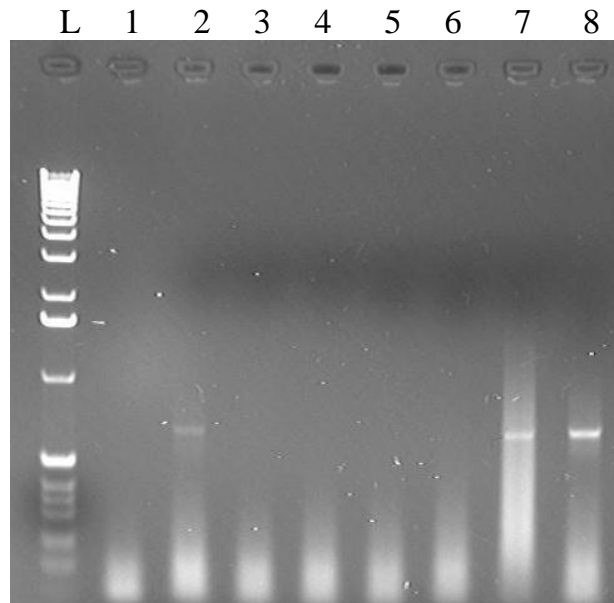


Figura 1 - Produtos da amplificação por PCR do gene da proteína do capsídeo de isolados de CTV, revelados em gel de agarose a 1%, das seguintes plantas: 3 e 6 Plantas sadias desafiadas por união de tecido com o isolado severo Rolândia; 2 e 7 Plantas sadias desafiadas pelo vetor com o mesmo isolado; 4 e 5 Plantas sadias não desafiadas; 1 Controle negativo; 8 Controle positivo (isolado Rolândia) e L Marcador de DNA de 1Kb.

Os perfis verificados revelaram a ocorrência de duas a oito bandas nos géis, sugerindo a presença de um a quatro haplótipos em cada isolado de CTV. Como descrito por Gillings et al. (1996), Corazza-Nunes et al. (2001) e Souza et al. (2002), as plantas geralmente são infectadas por isolados constituídos por uma mistura de haplótipos (Figuras 3 a 7).

A composição ou o balanço dos isolados de CTV dentro da hospedeira pode ser alterado por fatores como cultivar, ambiente e infecções múltiplas por afídeos. Isto pode significar que um isolado de CTV, exibindo sintomas fracos quando indexado biologicamente, pode conter haplótipo severo que, sob certas condições, passam a expressar sintomas fortes (VAN DER VYVER et al., 2002; RUBIO et al., 2002; VELAZQUEZ-MONREAL et al., 2009).

Em muitos casos, a presença do isolado fraco não previne o aparecimento de sintomas, uma vez que a acumulação de variantes de sequências características do isolado severo foi apenas retardada em plantas pré-inoculadas (SAMBADE et al., 2002).

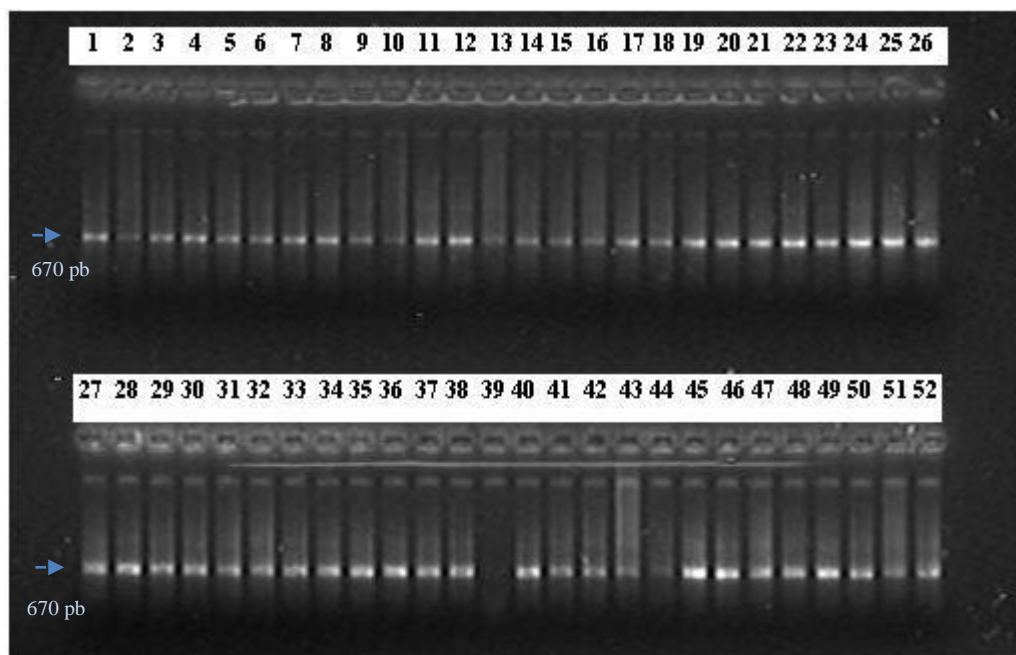


Figura 2 - Gel de agarose 1% mostrando produto de amplificação por PCR do gene do capsídeo do CTV extraído das plantas do experimento. As bandas visualizadas no gel apresentaram segmento de aproximadamente 670 pb, que corresponde ao tamanho do GCP do vírus.

Os padrões SSCP de cada isolado para o gene da capa protéica são mostrados nas Figuras 3 a 7. Como pode ser observado, os padrões SSCP dos isolados fracos (Pêra IAC e Superplanta) apresentaram-se mais simples que o padrão observado para os isolados severos (Barão B, Capão Bonito e Rolândia).

Observação semelhante foi registrada por Sambade et al. (2002) ao verificarem perfis SSCP consistentes na maioria dos isolados, resultando em padrões moleculares característicos do isolado correspondente ao GCP do vírus nas plantas não desafiadas. Já nas plantas desafiadas com a inoculação do vírus severo por união de tecidos ou pelo vetor, os autores observaram novas composições de padrões SSCP, constituídas por bandas provenientes de isolados fracos e severos, ou ainda resultantes da deleção ou inclusão de bandas em seus respectivos padrões SSCP.

Os perfis eletroforéticos obtidos para os cinco isolados do Município de Cruzeiro do Sul (região Noroeste do Paraná) mostraram alta complexidade, indicando serem compostos de uma mistura de 2 a 4 haplótipos (Figura 3). Dentre os cinco isolados, apenas o isolado Cruzeiro do Sul 1 (CS-1) não apresentou alteração no padrão SSCP, sendo que os demais isolados apresentaram alguma alteração devido ao desafio com o isolado severo através de união de tecido ou pelo vetor.

O perfil eletroforético do isolado CS-2 (Figura 3) mostra que as plantas desafiadas por união de tecido (9B e 10B) e a planta desafiada pelo vetor (7V) tiveram seu perfil alterado pelo desafio com o isolado severo. Exceção desse caso foi o isolado desafiado por vetor (8V), que não mostrou alteração em seu perfil eletroforético mesmo após o desafio com o isolado severo. Isto pode ter ocorrido por um escape na inoculação pelo vetor, visto que as demais repetições mostraram que o isolado anteriormente presente nas plantas não evitou a colonização de haplótipos do isolado severo desafiante nos tecidos da planta.

Situação semelhante ocorreu com o isolado CS-3 (Figura 3), na qual o desafio provocou alterações nos perfis das plantas 15V, 16B e 18V, mas não no isolado da planta 13B, cujo perfil permaneceu inalterado após o desafio, novamente indicando um escape na inoculação por borbulha. Os perfis das amostras 16B e 18V apresentaram-se semelhantes ao perfil do isolado severo Rolândia, demonstrando que este prevaleceu na colonização dos tecidos das plantas.

Teoricamente, esperava-se que a inoculação por união de tecido fosse mais efetiva na transferência do vírus desafiante em comparação ao desafio por inoculação através de vetor (MÜLLER e COSTA, 1977), porque vários trabalhos apontam para uma seleção de haplótipos transferidos pelo vetor (BROADBENT et al., 1996; SOUZA et al., 2000; SAMBADE et al., 2002; MORENO et al., 2008). Entretanto, em alguns casos e para as plantas mantidas em casa-de-vegetação, aparentemente a inoculação do isolado desafiante foi mais efetiva quando se utilizou o vetor pulgão preto dos citros.

Isto pode ser observado nos isolados CS-4 e CS-5 (Figura 3), para os quais a inoculação do isolado desafiante através do vetor produziu o aparecimento de uma banda que só se repete nessas condições (19V, 20V, 26V e 28V), ou seja, com a inoculação do isolado desafiante por meio do vetor (ver também planta 47V – Figura 4). Nesses dois isolados, a inoculação desafiante resultou em alteração nos perfis eletroforéticos das plantas em relação àquelas que não foram desafiadas. Isso levanta a hipótese de que esses isolados podem não ser efetivos na proteção das plantas contra o isolado severo utilizado no desafio, podendo mostrar a campo sintomas severos de tristeza.

Esse tipo de análise, em que o perfil eletroforético gerado por isolados fracos e severos são monitorados durante o desafio de um pelo outro, foi utilizado com sucesso por Sambade et al. (2002). Estes pesquisadores verificaram que as diferenças encontradas nos padrões SSCP poderiam ser utilizadas com sucesso para se monitorar a evolução de uma população viral em plantas pré-inoculadas com um isolado fraco e desafiadas por um isolado severo, permitindo avaliar a estabilidade do isolado fraco protetivo. Os resultados foram confirmados pela análise de sintomas nas plantas, as quais foram monitoradas por três anos sob condições controladas (casa-de-vegetação).

A observação dos perfis eletroforéticos obtidos para os cinco isolados do Município de Nova Esperança (região Noroeste do Paraná) mostraram alta complexidade e resultantes da mistura de 2 a 3 haplótipos (Figura 4). Dentre os cinco isolados, observou-se que os isolados Nova Esperança 1, 2 e 3 (NE-1, NE-2 e NE-3) apresentaram alterações no padrão SSCP, sendo que os isolados NE-4 e NE-5 não apresentaram alteração devido ao desafio com o isolado severo através de união de tecido ou pelo vetor.

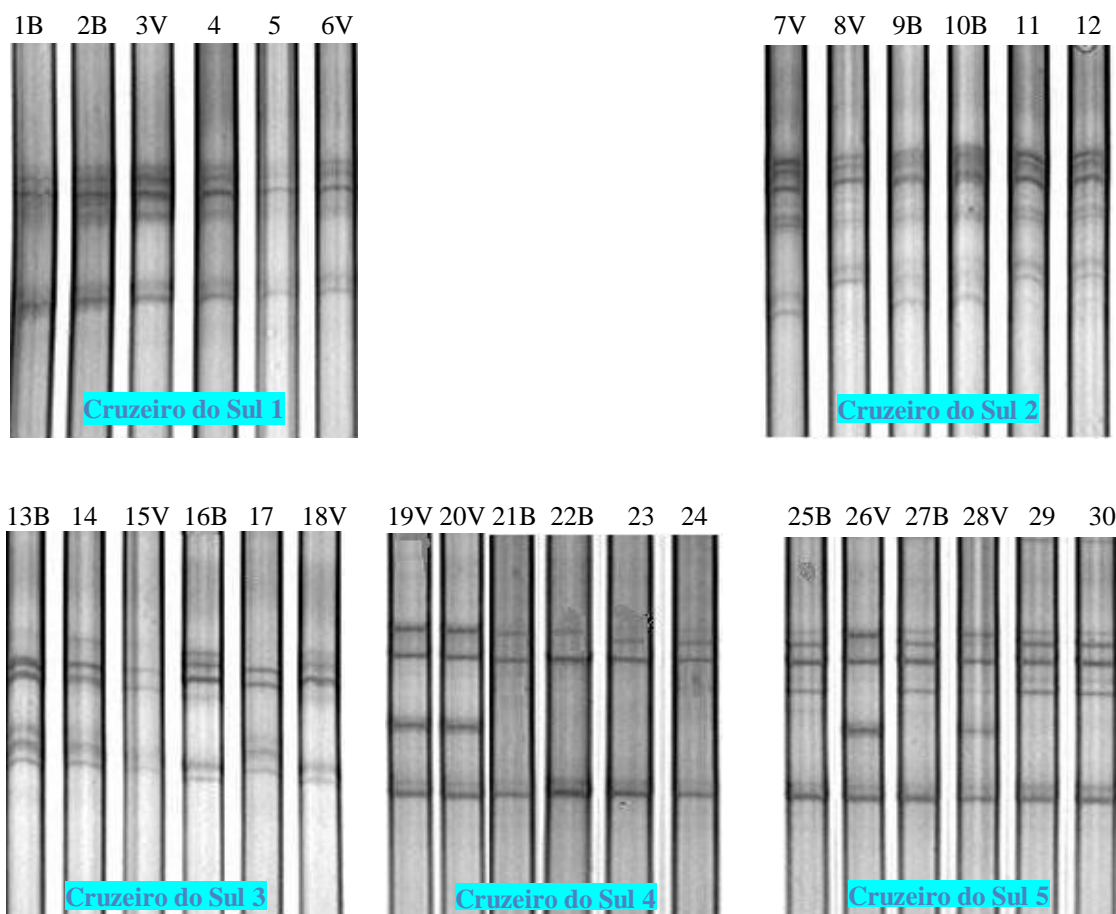


Figura 3 - Padrões SSCP dos cinco isolados de CTV provenientes das plantas selecionadas na região Noroeste do Paraná, Município de Cruzeiro do Sul, em gel de poliacrilamida a 8%. Cada conjunto de 6 plantas representam um isolado desta região e, dentro destes isolados, os números e letras representam os tratamentos, onde B representa a planta desafiada por união de tecido (enxertia) com duas Borbulhas infectadas com o vírus severo e, V representa a planta desafiada através da inoculação do vírus severo pelo Vetor, o pulgão preto dos citros. Plantas mantidas em casa-devegetação com tela anti-afídeo.

O isolado NE-1 mostrou que a inoculação desafiante provocou alteração em seu perfil eletroforético com a adição de uma banda (ssDNA – DNA de fita simples), resultando em um padrão semelhante àquele produzido pelo isolado severo Rolândia. Situação inversa ocorreu com o isolado NE-2, em que a inoculação do isolado severo desafiante provocou a deleção de uma banda na

parte superior do perfil e o aparecimento de outra banda na parte inferior deste (Figura 4).

No caso do isolado NE-3, apenas em uma das plantas foi observada alteração no perfil eletroforético, a planta 47V, desafiada através do vetor, mostrou duas banda de maior intensidade, aparentemente subjugando o perfil original, o qual parece estar perdendo intensidade. Situação semelhante foi descrita também por Sambade et al. (2002), para o qual na maioria das plantas o perfil de SSCP característico do isolado severo tornava-se progressivamente predominante, substituindo o perfil do isolado fraco pré-inoculado, sendo que esse processo ocorreu dentro de um período de tempo que variou de 3 a 6 meses, não se observando alteração após este período.

Para os isolados NE-4 e NE-5 (Figura 4), não foram observadas alterações nos perfis eletroforéticos das plantas, além de que os dois isolados mostraram perfis idênticos para todas as plantas, indicando a presença de um isolado comum entre estas, sendo que esse isolado apresentou-se estável mesmo após a inoculação do isolado severo Rolândia, tanto por união de tecidos quanto pelo vetor. Entretanto, o perfil SSCP dessas plantas não foi semelhante a nenhum dos controles fracos utilizados (Pêra IAC e Superplanta).

Por outro lado, o perfil dessas plantas foi idêntico ao perfil observado para o isolado severo Barão B (planta BB - Figura 7), podendo indicar a presença de um isolado severo que não desenvolveu sintomas devido a outros fatores, tais como pela idade das plantas, condições ambientais do Noroeste Paranaense ou pela presença de tecidos mais tolerantes nos clones de laranja Pêra estudados ou, ainda, pela combinação desses fatores. O variante severo de CTV, chamado Barão B, foi coletado em 1948 de plantas de laranja doce da variedade Barão enxertada sobre laranja Caipira (*Citrus sinensis*) no Município de Campinas – SP, sendo, desde então, utilizada em experimentos com citros, como controle severo de CTV que induz acentuados sintomas de caneluras e redução do tamanho dos frutos em laranja Pêra (GRANT e COSTA, 1951). Esse isolado, porém, não foi ainda caracterizado nas condições paranaenses.

Os isolados coletados no Norte do Paraná nos Municípios de Arapongas e Prado Ferreira mostraram padrões de bandas SSCP com as menores alterações após a inoculação com o isolado severo desafiante Rolândia (Figuras 5 e 6). Os isolados do Município de Arapongas (Ara) mostraram perfis distintos entre si, exceto os isolados Ara 3 e 4, que apresentaram o mesmo perfil, evidenciando um isolado comum, o qual não foi alterado pela inoculação de desafio, sugerindo que esses isolados foram estáveis, impedindo a multiplicação do vírus desafiante nas plantas (Figura 5). Já os isolados Ara 1, 2 e 5 foram distintos entre si, mas de forma semelhante não sofreram alterações em seus perfis devido à inoculação desafiante, resultando, também, com possibilidades de oferecer proteção adequada às plantas contra o isolado severo, impedindo a colonização dos tecidos das plantas por este.

A análise dos perfis SSCP dos isolados provenientes do Município de Prado Ferreira (PF) (Figura 6) mostrou a similaridade entre três desses isolados, ou seja, PF-1, 3 e 4, os quais exibiram um perfil simples composto por dois haplótipos, que se apresentaram estáveis mesmo após a inoculação de desafio com isolado severo através de união de tecido ou por vetor, mostrando, desta forma, possibilidade de apresentar uma capacidade protetiva às plantas.

Entretanto, esses isolados exibiram perfis eletroforéticos idênticos a aqueles mostrados pela Pêra IAC. Já os isolados PF-2 e PF-5 apresentaram perfis mais complexos resultantes da mistura de até quatro haplótipos. Esses isolados sofreram alterações em seus padrões SSCP após a inoculação com o isolado desafiante, resultante em uma possível quebra da proteção oferecida. No isolado PF-2, somente as plantas 97B e 100V mostraram alterações, já no isolado PF-5 todas as plantas mostraram algum tipo de alteração em relação às plantas não inoculadas com o isolado severo.



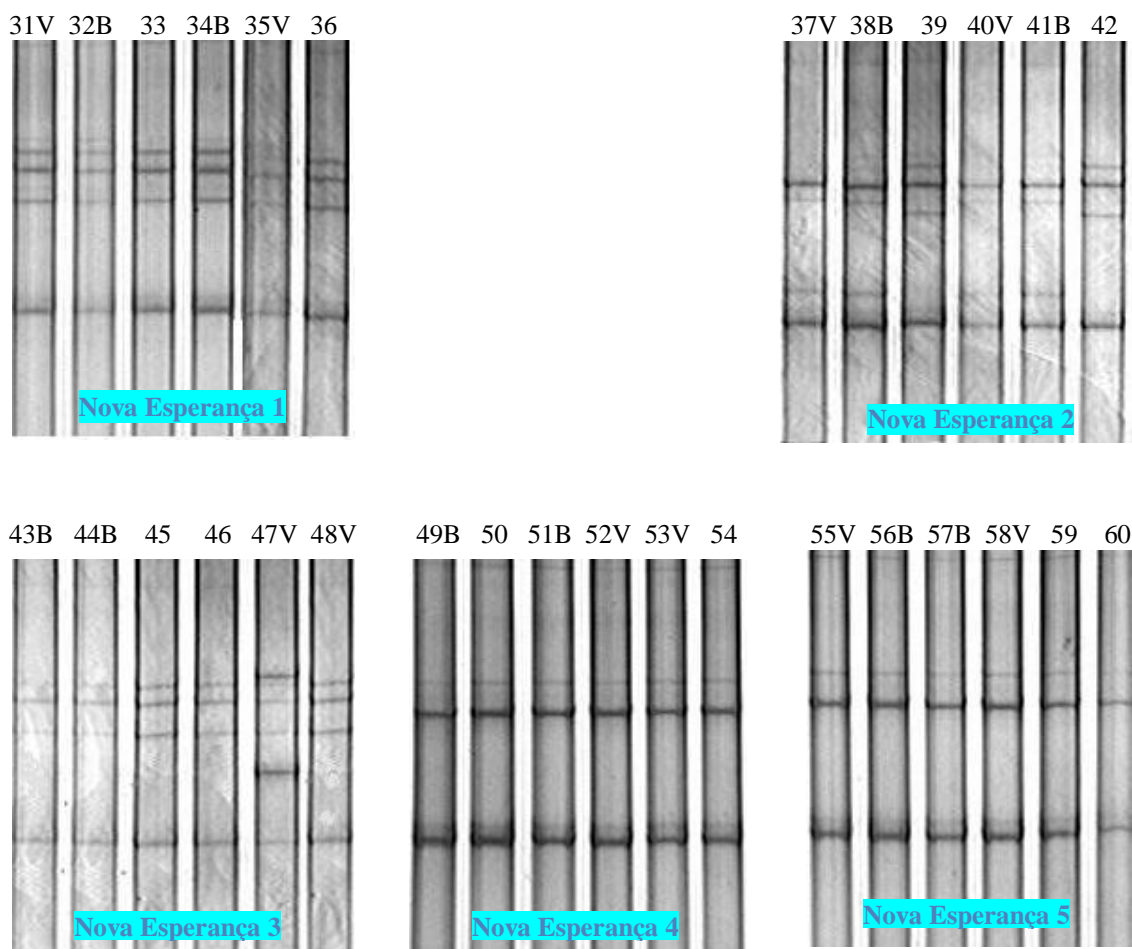


Figura 4 - Padrões SSCP dos cinco isolados de CTV provenientes das plantas selecionadas na região Noroeste do Paraná, Município de Nova Esperança, em gel de poliacrilamida a 8%. Cada conjunto de 6 plantas representam um isolado desta região e, dentro destes isolados, os números e letras representam os tratamentos, onde B representa a planta desafiada por união de tecido (enxertia) com duas Borbulhas infectadas com o vírus severo e, V representa a planta desafiada através da inoculação do vírus severo pelo Vetor, o pulgão preto dos citros. Plantas mantidas em casa-devegetação com tela anti-afídeo.

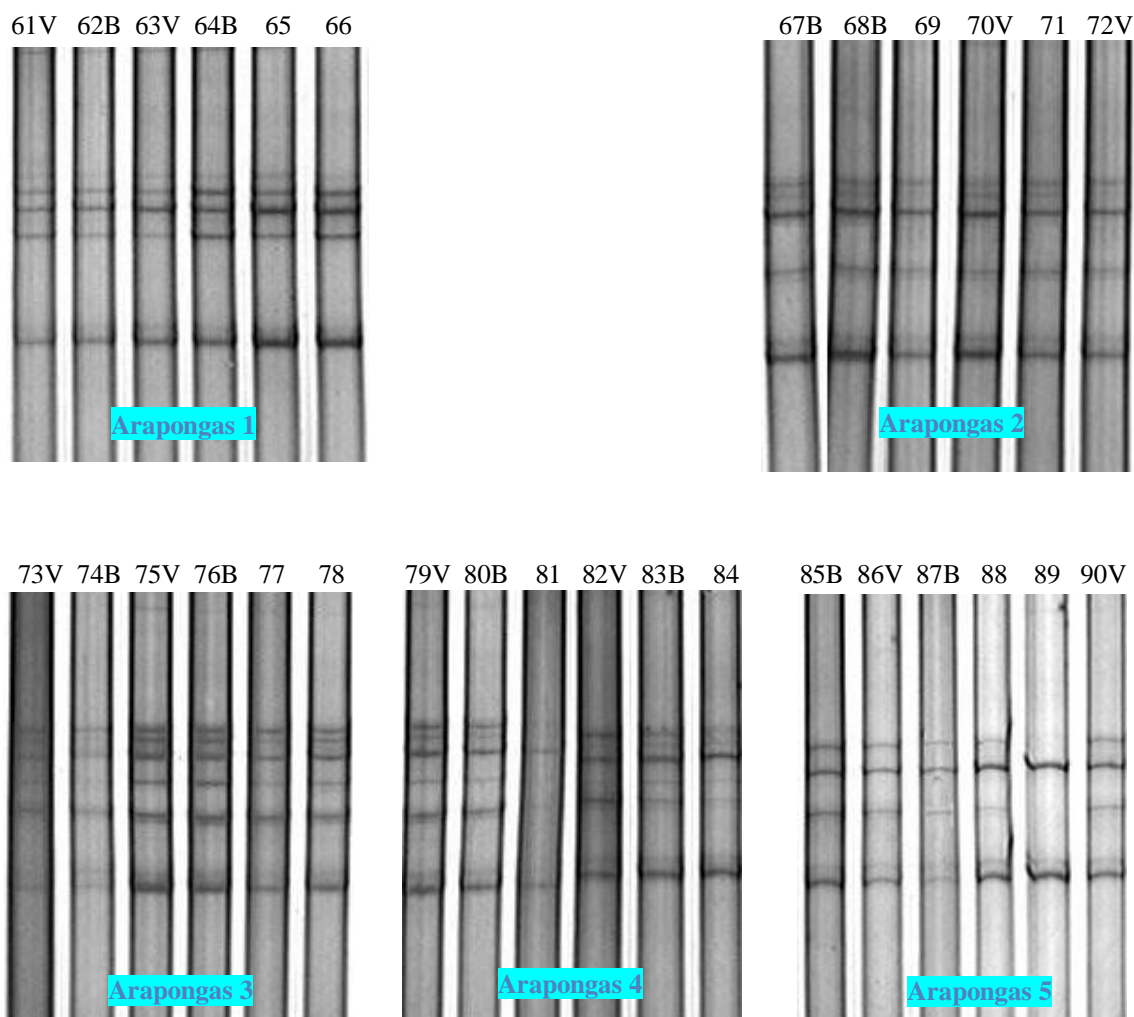


Figura 5 - Padrões SSCP dos cinco isolados de CTV provenientes das plantas selecionadas na região Norte do Paraná, Município de Arapongas, em gel de poliacrilamida a 8%. Cada conjunto de 6 plantas representam um isolado desta região e, dentro destes isolados, os números e letras representam os tratamentos, onde B representa a planta desafiada por união de tecido (enxertia) com duas Borbulhas infectadas com o vírus severo e, V representa a planta desafiada através da inoculação do vírus severo pelo Vetor, o pulgão preto dos citros. Plantas mantidas em casa-devegetação com tela anti-afídeo.

Quanto aos controles utilizados, estes mostraram resultados consistentes, conforme pode ser observado nas imagens da Figura 7. As plantas de Pêra livre de vírus, utilizadas também no monitoramento da eficiência de inoculação do isolado severo pelo vetor e por união de tecidos, através da técnica de PCR, mostrou claramente o perfil do isolado severo Rolândia, como pode ser visto quando em comparação ao isolado original coletado diretamente das plantas a campo e identificado como Rolândia na Figura 7, como também junto aos controles (Rol), os quais foram mantidos juntamente com todas as plantas do experimento em casa-de-vegetação.

Isto demonstra que a inoculação, tanto por vetor como por união de tecidos, foi eficiente na transferência do complexo viral completo, mostrando que o isolado não sofreu alteração devido ao período transcorrido no experimento, apresentando-se estável quando comparado com o perfil eletroforético original das plantas a campo. Por outro lado, em comparação com as plantas pré-inoculadas com isolados a testar, a inoculação do isolado desafiante resultou em um rearranjo nos perfis eletroforéticos em muitos casos, levando ao aparecimento de novas bandas ou à deleção de bandas pré-existentes. Fato semelhante foi verificado por Sambade et al. (2002).

O controle Pêra IAC, reconhecido como um complexo viral estável e com alta capacidade de proteção oferecida às plantas, sobretudo nas regiões citrícolas tradicionais do Estado de São Paulo (MÜLLER et al., 1999), mostrou-se parcialmente estável também nesse experimento, sofrendo alterações no padrão de bandas SSCP em duas plantas submetidas a inoculação desafiante através do vetor pulgão preto dos citros (Figura 7, plantas 122V e 124V).

A quebra da proteção em pomares paulistas constituídos de clones de Pêra IAC foi demonstrada por meio de estudo, empregando análise do SSCP e RFLP (Polimorfismo por Comprimento de Fragmentos de Restrição), realizado por Souza et al. (2002). Os clones de laranja Pêra IAC não têm se comportado satisfatoriamente em pomares comerciais da região Sudeste paulista, os quais apresentam alta incidência de plantas afetadas pelo variante severo denominado Capão Bonito (MÜLLER et al., 1988; MÜLLER et al., 1999).

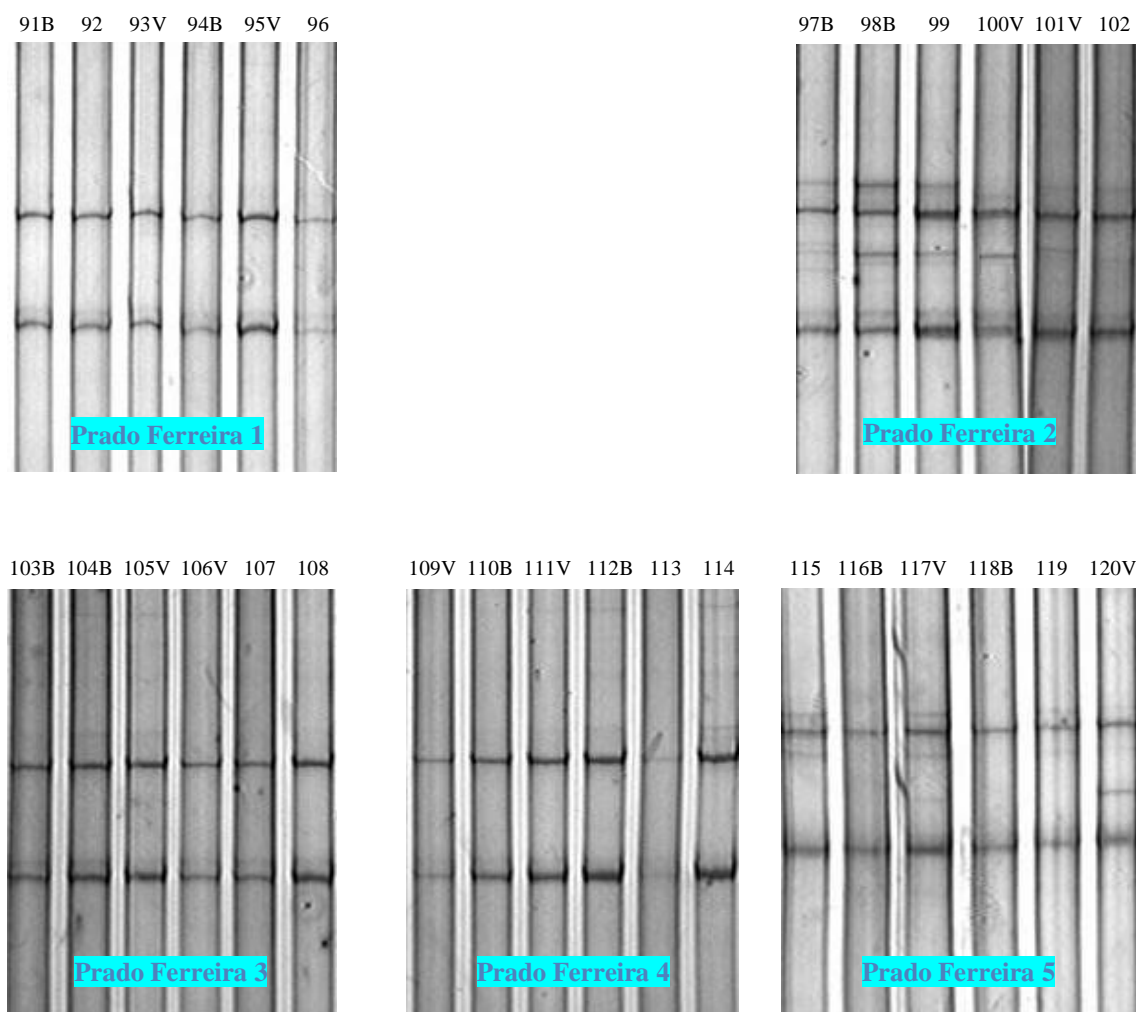


Figura 6 - Padrões SSCP dos cinco isolados de CTV provenientes das plantas selecionadas na região Norte do Paraná, Município de Prado Ferreira, em gel de poliacrilamida a 8%. Cada conjunto de 6 plantas representam um isolado desta região e, dentro destes isolados, os números e letras representam os tratamentos, onde B representa a planta desafiada por união de tecido (enxertia) com duas Borbulhas infectadas com o vírus severo e, V representa a planta desafiada através da inoculação do vírus severo pelo Vetor, o pulgão preto dos citros. Plantas mantidas em casa-devegetação com tela anti-afídeo.

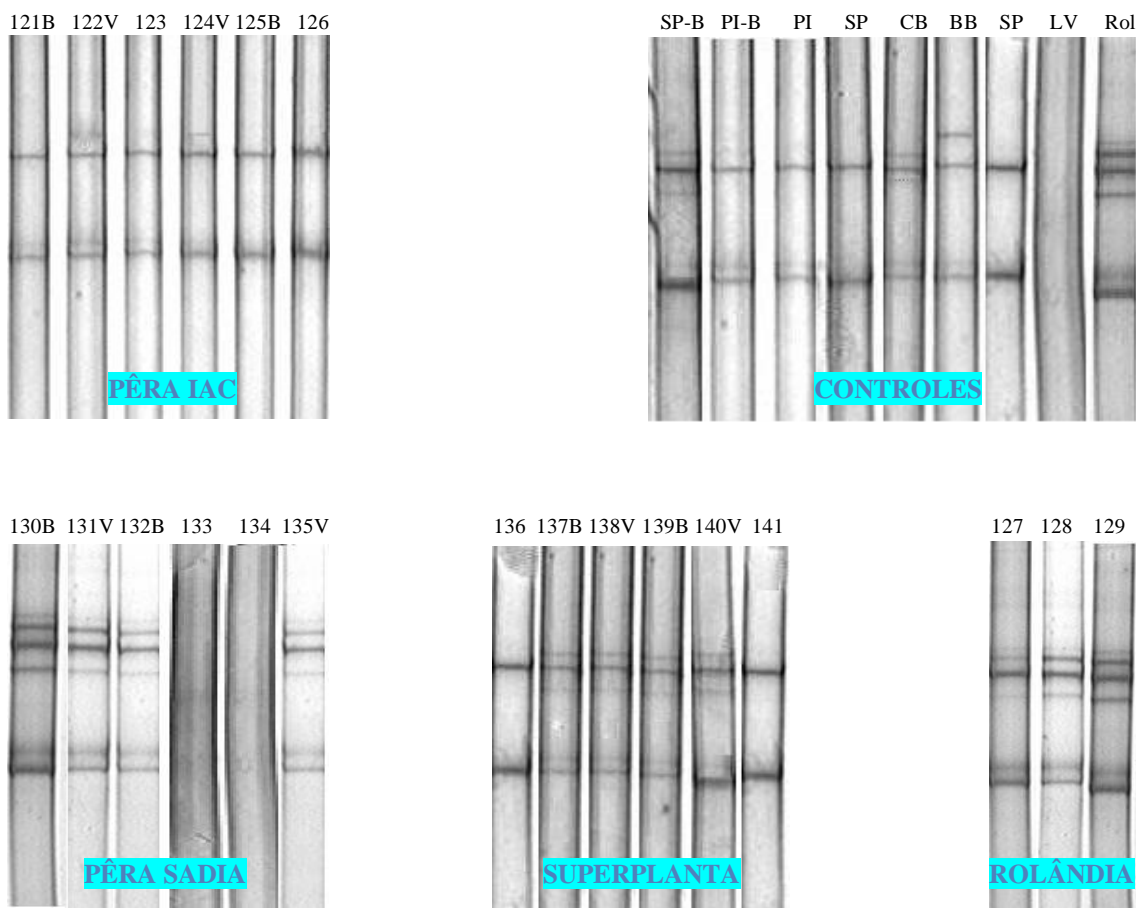


Figura 7 - Padrões SSCP dos controles de CTV utilizados: PÊRA IAC, plantas pré-imunizadas com vírus fraco protetivo e desafiadas com isolado severo Rolândia através de Borbulhas (B) ou pelo Vetor (V); CONTROLES, SP-B, Superplanta desafiada com isolado severo Rolândia através de Borbulha, PI-B, Pêra IAC desafiada com isolado severo Rolândia através de Borbulha, PI, Pêra IAC sem desafio, SP, Superplanta sem desafio, CB, Isolado severo Capão Bonito, BB, Isolado severo Barão B, LV, Planta Livre de Vírus, Rol, Isolado severo Rolândia mantido em estufa; PÊRA SADIA, Plantas livres de vírus desafiadas pelo isolado severo Rolândia através de Borbulhas (B) ou pelo Vetor (V); SUPERPLANTA, plantas com isolado fraco protetivo e desafiadas com isolado severo Rolândia através de Borbulhas (B) ou pelo Vetor (V); ROLÂNDIA, Isolado severo proveniente de plantas de um pomar comercial de laranja Pêra da região Norte do Paraná, Município de Rolândia. Plantas mantidas em casa-devegetação com tela anti-afídeo.

A região Sudeste de São Paulo apresenta condições climáticas semelhantes às observadas na região Norte do Paraná, especialmente as que se referem à temperatura média durante o inverno. Alguns estudos demonstram que altas temperaturas podem suprimir os sintomas severos do CTV e até mesmo inativar o vírus, enquanto que temperaturas mais baixas, como as observadas para ambas as regiões, tendem a acentuar os sintomas (MÜLLER, 1972; ROISTACHER et al., 1974).

Um isolado de CTV é formado por uma mistura de haplótipos que variam em suas propriedades biológicas, como, por exemplo, a patogenicidade. Plantas a campo são frequentemente infectadas por uma mistura de haplótipos. A predominância de um haplótipo em uma planta determina a sintomatologia do complexo. Mudanças no balanço de haplótipos podem alterar vários aspectos, como a patogenicidade ou a eficiência de transmissão do isolado pelo vetor (ALBIACH-MARTI et al., 2009; VELAZQUEZ-MONREAL et al., 2009). Exemplo desse fato é o que ocorre com o complexo Capão Bonito, que afeta várias combinações de copa e porta-enxerto, as quais são consideradas tolerantes em outras regiões (MÜLLER, 1996; NICKEL et al., 1996).

Outro exemplo semelhante ocorreu na Bahia, onde um novo variante de CTV foi descrito causando severos sintomas de tristeza ao popular porta-enxerto limão Cravo (SANTOS FILHO et al., 1991). Ayllón et al. (1999), ao considerar a distribuição da variabilidade genética total entre populações e dentro de uma população de isolados do CTV sugerem que a adaptação a um novo hospedeiro ou a uma nova condição ambiental pode ser tão ou mais importante que a origem geográfica do isolado.

Esse fato poderia explicar a ocorrência de plantas mostrando sintomas severos de tristeza na região Norte do Paraná (CARRARO et al., 2003; ZANINELI RÉ, 2004), onde a soma dos fatores, tais como a temperatura, presença de um complexo viral severo (Rolândia), presença do eficiente vetor pulgão preto dos citros e clones de laranja Pêra pré-imunizadas com um isolado selecionado em outra região poderiam expor a citricultura norte-paranaense a graves problemas.

Situação semelhante à ocorrida com a Pêra IAC foi também observada para o controle fraco Superplanta, porém de forma mais acentuada, mostrando alteração no perfil eletroforético em todas as plantas que sofreram inoculação de desafio (Figura 7). Essa seleção de laranja Pêra Bianchi, microenxertada e pré-imunizada com isolado de tristeza protetivo, denominada Superplanta (SALIBE et al., 1992; MÜLLER et al., 1999), vem fornecendo excelentes resultados no Sudoeste do Estado de São Paulo, onde ocorre o complexo severo Capão Bonito do CTV (MÜLLER et al., 1999). Os resultados apontados neste trabalho mostram que o isolado protetivo dessas plantas, frente ao desafio com o isolado severo Rolândia, sofreu alteração em seu padrão SSCP (Figura 7).

Desta forma, pela avaliação dos perfis eletroforéticos gerados pela análise SSCP, pode-se supor que os isolados CS-1, NE-4 e NE-5, Ara-1, Ara-2, Ara-3, Ara-4 e Ara-5, PF-1, PF-3 e PF-4 poderiam apresentar alguma capacidade protetiva, uma vez que não sofreram alterações em seus perfis eletroforéticos mesmo após o desafio pelo isolado severo Rolândia. Todavia, mesmo que a caracterização de isolados do CTV pela sequência do gene da capa protéica do vírus venha sendo amplamente utilizada, a comparação de sequências de um único gene ou região, podem refletir diferenças somente dessa região, esquecendo-se do restante do genoma (BRLANSKY et al., 2003), que pode esconder diferenças muito maiores que estariam se expressando em determinadas condições. Com o intuito de adicionar informações, verificou-se como esses isolados se agrupam na análise UPGMA e se comportam nas condições de campo.

O dendrograma UPGMA (Figura 8), gerado pelos coeficientes de Jaccard, calculados a partir dos dados obtidos da análise de SSCP apresentou um número razoável de ramificações em função da alta diversidade observada entre os isolados em estudo. No dendrograma, pode-se verificar a formação de cinco grupos bem definidos, dos quais o mais numeroso foi o grupo V. Esse grupo foi o que mais se dividiu em subgrupos relacionados, nos quais foram encontrados isolados de todas as regiões, além de alguns controles utilizados.

Os Grupos I e II constituíram-se de apenas três isolados cada um, pertencentes à região Noroeste do município de Cruzeiro do Sul (7V, 16B e 15V – Grupo I; 8V, 10B e 9B – Grupo II), que mostraram alta similaridade entre si dentro dos respectivos grupos (Figura 8).

Já no Grupo III ficaram todos os isolados severos do variante Rolândia (Figura 8), provenientes das plantas livres de vírus desafiadas com esse isolado, por enxertia ou pelo vetor, das plantas a campo fornecedoras do isolado Rolândia e ainda pelo controle severo mantido em casa de vegetação (130B, 131V, 132B, 129, 127, 128, 135V e Rol). O fato do isolado severo Rolândia se apresentar em um único grupo distinto foi também observado por Müller (2004; 2006), indicando baixa similaridade em relação aos demais isolados utilizados neste trabalho. Por outro lado, no Grupo IV, que se subdividiu em duas ramificações (Figura 8), ficaram, em uma delas, o controle fraco Superplanta não desafiado (SP2, SP, 136 e 141) e as seis repetições do isolado PF-5, proveniente da região Norte, município de Prado Ferreira (117V, 115, 119, 116B, 120V e 118B), enquanto que a outra ramificação mostrou-se constituída pelas seis repetições do isolado CS-1 da região Noroeste, município de Cruzeiro do Sul (5, 6V, 1B, 2B, 4 e 3V). O isolado CS-1 apresentou perfis eletroforéticos estáveis mesmo após o desafio com o isolado severo Rolândia (Figura 3), fato que, adicionado a sua separação em uma ramificação única (Figura 8), pode dar uma indicação de estabilidade protetiva a esse isolado.

O grande Grupo V (Figura 8) apresentou várias ramificações primárias e outras secundárias que englobaram todos os demais isolados e controles, incluindo os isolados do controle fraco Superplanta, que teve seu perfil eletroforético alterado com a inoculação do isolado severo Rolândia (138V, SP-B, 140V, 137B e 139B), assim como o controle fraco Pêra IAC, que também teve seu perfil alterado após a inoculação com o isolado severo Rolândia (124V e 122V), além dos controles severos Capão Bonito e Barão B.

Por outro lado, também se observa a presença do controle fraco Pêra IAC entre os isolados desse grupo (Figura 8). Destaca-se que na maioria não se observa a formação de ramificações exclusivas para um determinado isolado;



outrossim, uma grande mistura de isolados de todas as regiões, distribuídos pelas ramificações do grupo.

Exceção a esse dado é a primeira ramificação do Grupo V, na parte superior do dendrograma (Figura 8), a qual se subdivide em duas ramificações secundárias, sendo que a primeira reúne os isolados do controle fraco Pêra IAC não desafiados ou desafiados, mas que não tiveram seus perfis alterados, juntamente com isolados da região Norte do município de Prado Ferreira (PF-1, PF-3 e PF-4). Esses isolados apresentaram perfis eletroforéticos idênticos aos apresentados pelo controle fraco Pêra IAC. Já na outra ramificação secundária, fato semelhante se observa; entretanto, reunindo o isolado severo Barão B e os isolados da região Noroeste município de Nova Esperança (NE-4 e NE-5), agrupados pelo mesmo motivo alegado acima, ou seja, por apresentar perfis eletroforéticos iguais.

Já os isolados Ara-1, Ara-2, Ara-3, Ara-4 e Ara-5, os quais não sofreram alterações nos perfis eletroforéticos de SSCP, também aqui mostram, pelo seu agrupamento, a possibilidade de apresentar características de proteção.

Ara-1 foi o único isolado dessa série que se agrupou em uma ramificação separada, enquanto que os demais constituíram uma única ramificação. Porém em nenhum dos casos os isolados ficaram separados de outros isolados, incorporando na mesma ramificação isolados de outras regiões. Desta forma, após a análise do agrupamento UPGMA representada no dendrograma (Figura 8), restam com possibilidades de apresentar capacidade protetiva os isolados de Arapongas (Ara-1 a Ara-5) e o isolado CS-1, de Cruzeiro do Sul, porque os demais isolados ou se agruparam com o isolado Pêra IAC, mostrando serem iguais e assim não sendo interessantes ao objetivo deste trabalho (busca-se um isolado superior ao isolado Pêra IAC), ou foram iguais ao controle severo Barão B, impedindo sua utilização como isolado fraco protetivo em programas de proteção cruzada (isolado reconhecidamente severo do CTV). O experimento instalado a campo foi então decisivo para confirmar os resultados obtidos através do estudo molecular dos isolados selecionados.



Os resultados obtidos na análise estatística para intensidade de caneluras, desenvolvimento vegetativo e sintomatologia de tristeza, submetidos ao teste de Scott-Knott, são mostrados no Quadro 2. Pode-se observar que os resultados se mostraram consistentes, revelando que os isolados CS-1 e CS-5 foram os únicos presentes, dentre aqueles significativamente apontados como superiores, em todos os parâmetros avaliados. Entretanto, o isolado CS-5 teve seu perfil alterado quando foi desafiado com o isolado severo Rolândia, na análise SSCP.

A constatação de que os isolados Ara-1 a Ara-5 não tiveram um desempenho satisfatório no experimento de campo, não tendo apresentado diferença significativa, em alguns casos, até mesmo com o isolado severo Rolândia (Quadro 2), mostra que, possivelmente, alterações devam ter ocorrido na composição do complexo pré-existente na planta após a inoculação desafiante, mas a análise molecular por SSCP do gene da capa protéica não evidenciou, uma vez que os perfis eletroforéticos dessas plantas, antes e após o desafio, são muito próximos àqueles observados para o isolado severo desafiante, impossibilitando uma leitura conclusiva dos perfis. Outra possibilidade é a das possíveis alterações terem ocorrido em outras regiões do genoma e terem sido expressas somente quando submetidas às condições de campo.

Esse fato está em consonância com o observado por Brlansky et al. (2003) ao apontarem que a caracterização de isolados do CTV pela sequência do gene da capa protéica do vírus permite a comparação de sequências de um único gene ou região e podem refletir diferenças somente dessa região, esquecendo-se do restante do genoma, que pode esconder diferenças muito maiores que estariam se expressando em determinadas condições. Somando a essa observação, D'Urso et al. (2000) citam que os isolados de CTV que estariam infectando uma planta poderiam não estar homogeneamente distribuídos por todos os tecidos dessa planta, de modo que as borbulhas utilizadas no processo de enxertia poderiam não conter o complexo viral inteiro que estaria infectando a planta.

Sabe-se também que a composição ou o balanço dos isolados de CTV dentro da hospedeira pode ser alterado pela interação do genoma viral, variedade cítrica hospedeira, condições ambientais e infecções múltiplas por afídeos. Isto

pode significar que um isolado de CTV, exibindo sintomas fracos quando indexado biologicamente, pode conter haplótipo severo que, sob certas condições, passam a expressar sintomas fortes (VAN DER VYVER et al., 2002; RUBIO et al., 2002; BRLANSKY et al., 2003; FOLIMONOVA et al., 2009; ROY e BRLANSKY, 2009; VELAZQUEZ-MONREAL et al., 2009).

No caso da transmissão por afídeos virulíferos, sabe-se que estes podem segregar haplótipos do vírus e modificar geneticamente a composição do isolado (VELAZQUEZ-MONREAL et al., 2009), fato que pode explicar também a alta variabilidade genética observada a campo e aqui neste trabalho, assim como alterações na patogenicidade, como maior severidade de isolados (AYLLÓN et al., 1999; ALBIACH-MARTÍ et al., 2000; BRLANSKY et al., 2003; VELAZQUEZ-MONREAL et al., 2009).

As avaliações realizadas no experimento a campo apontaram que a inoculação por união de tecido com o isolado severo Rolândia levou as plantas submetidas a esse tratamento a mostrar sintomas de tristeza muito mais graves, não raro com notas altas em intensidade de caneluras e sintomatologia de tristeza, assim como notas baixas para o desenvolvimento vegetativo (Quadro 2).

Essa observação mostra que, apesar da transmissão por vetor ter sido detectada primeiro nas plantas monitoradas e ter alterado o perfil eletroforético de SSCP de um maior número de plantas do que a inoculação por união de tecido, nas condições de casa-de-vegetação, no campo, esses resultados foram contraditórios. Quando esses dados foram submetidos à análise estatística, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância (Quadro 3), observou-se que apenas a inoculação por união de tecido mostrou diferença significativa para todos os parâmetros avaliados, enquanto que a inoculação por vetor não mostrou diferenças em relação ao tratamento não inoculado.

Müller e Costa (1977) realizaram testes com a finalidade de estudar o efeito protetivo de isolados fracos em copas de laranja Pêra, lima ácida Galego e pomelo Ruby Red, verificando que a pré-imunização ofereceu proteção satisfatória e praticamente permanente quando as plantas eram expostas ao desafio natural ou experimental por meio do pulgão vetor, ocorrendo, todavia,

quebra de proteção quando a planta era desafiada por união de tecidos, podendo haver ou não mistura de estirpes (blending).

Esse fato está em conformidade com os resultados encontrados por Brlansky et al. (2003) sobre a transmissão seletiva de componentes do complexo viral pelo vetor, o qual foi capaz de transmitir estirpes severas que faziam parte de um isolado considerado fraco. Situação inversa foi observada por Velazquez-Monreal et al. (2009).

A presença de haplótipos severos escondidos dentro de um isolado fraco foi encontrada em isolados provenientes da Austrália, Flórida e Córsega (França) utilizando-se a transmissão pelo pulgão preto com um único afídeo, como ferramenta para a separação. Os perfis genotípicos de três isolados da Flórida foram estudados em três espécies cítricas hospedeiras e os perfis não sofreram alterações devido à transmissão por união de tecidos (BROADBENT et al., 1996; BRLANSKY et al., 2003; ROY e BRLANSKY, 2009).

Considerando essa observação, pode-se supor que o menor tempo transcorrido, neste trabalho, entre a inoculação pelo vetor e a coleta das amostras para as análises moleculares, quando comparada ao tempo de exposição das plantas no campo, levou a uma observação mais rápida de alterações nos perfis eletroforéticos das plantas quando submetidas ao desafio pelo vetor.

Por outro lado, com a inoculação por união de tecido provavelmente se obtém uma melhor transferência do complexo viral inteiro, mas requer um intervalo de tempo maior para que a distribuição e equilíbrio dos componentes do complexo viral se estabeleçam dentro das plantas inoculadas, resultando finalmente na reprodução mais fiel do complexo viral original inoculado na planta.

Desta forma, um isolado severo, como o isolado Rolândia, levaria um maior tempo para se distribuir e se estabilizar na planta inoculada e expressar sintomas severos na planta, evidenciando a quebra da proteção desta.

Quadro 2 – Médias observadas à campo para os parâmetros estudados dos grupos de 6 plantas que compõem os isolados, submetidas ou não à inoculação desafiante com o isolado severo Rolândia, através de união de tecido ou pelo vetor.

Parâmetros Avaliados (Médias)*			
Isolado	Intensidade de Caneluras	Desenvolvimento Vegetativo	Sintomatologia de Tristeza
CS-1	1,25 a	4,67 a	0,25 a
PF-5	1,45 a	3,00 b	0,64 a
PF-2	1,50 a	3,00 b	0,30 a
PF-3	1,58 a	3,00 b	0,25 a
NE-5	1,60 a	3,10 b	0,50 a
NE-1	1,73 a	3,27 b	0,45 a
NE-4	1,78 a	2,67 b	0,78 a
CS-5	1,82 a	3,73 a	0,64 a
LV	1,82 a	2,82 b	1,27 a
CS-2	1,89 b	3,33 b	0,89 a
ARA-5	2,00 b	2,80 b	0,30 a
CS-4	2,00 b	4,10 a	0,60 a
ARA-1	2,00 b	3,17 b	0,50 a
ARA-2	2,11 b	2,89 b	0,33 a
SP	2,11 b	2,78 b	0,56 a
PF-4	2,20 b	3,00 b	0,50 a
P IAC	2,20 b	3,00 b	1,00 a
PF-1	2,20 b	2,60 b	0,40 a
CS-3	2,30 b	4,30 a	1,00 a
NE-2	2,36 b	2,82 b	0,64 a
NE-3	2,55 c	2,91 b	0,91 a
ARA-3	2,78 c	2,89 b	0,33 a
ARA-4	3,22 d	2,33 b	0,33 a
ROL	3,78 d	1,78 b	3,11 b

\* Médias nas colunas seguidas por letras diferentes, diferem pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ),  $CV = 32,24$ .

Já as plantas desafiadas pelo vetor podem ter recebido apenas parte das estirpes que compõem o complexo viral, constituindo um novo complexo em desequilíbrio. Esse complexo viral formado pode ter se multiplicado rapidamente, mas com o tempo decorrido no campo pode ocorrer, também, um reequilíbrio do novo complexo formado, o qual nem sempre apresenta a severidade observada no complexo original que se tentou inocular. Observações similares a esta foram verificadas nos trabalhos de Souza et al. 2000, Sambade et al. 2002, Brlansky et al. 2003 e Velazquez-Monreal et al. 2009.

Os isolados fracos Pêra IAC e Superplanta mostraram desempenho inferior a alguns isolados, com diferença significativa para os parâmetros intensidade de caneluras e desenvolvimento vegetativo, contudo sem diferença significativa entre esses controles (Quadro 2).

Quadro 3 – Médias observadas para o efeito do método de inoculação do isolado severo desafiante, sobre os parâmetros avaliados, intensidade de caneluras, desenvolvimento vegetativo e sintomatologia de tristeza.

Parâmetros avaliados*			
Método de Inoculação	Intensidade de Caneluras	Desenvolvimento Vegetativo	Sintomatologia de Tristeza
União de Tecido	3,02 a	2,58 a	1,81 a
Vetor	1,85 b	3,09 b	0,41 b
Sem Inoculação	1,75 b	3,32 b	0,30 b

\*- Médias nas colunas seguidas por letras diferentes, diferem pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ),  $CV = 25,55$ .

Pelos resultados apontados no experimento de campo e avaliados pela análise estatística, verificou-se que em comparação com os isolados fracos utilizados como controles, vários isolados se mostraram melhores, com exceção do parâmetro sintomatologia de tristeza, que apresentou diferença estatística apenas para o isolado severo Rolândia.

O isolado CS-1, apontado como o isolado mais promissor dentre os isolados avaliados, recebeu altas notas de desenvolvimento vegetativo (média 4,67), aproximando-se da nota máxima 5,0 e para o parâmetro de sintomatologia de tristeza, a nota média foi 0,25, sendo que zero traduz-se em ausência de sintomas. Já para intensidade de caneluras a nota média foi 1,25 que reflete em rara presença de caneluras superficiais, considerada uma reação fraca de CTV, obtida com isolados fracos protetivos como a Pêra IAC (SOUZA e MÜLLER, 2006).

O experimento a campo foi muito importante na complementação dos resultados obtidos pela análise molecular SSCP, mostrando que realmente o fator ambiental (ou adaptação a uma nova condição ambiental) poderia ser tão ou mais importante que a origem geográfica do isolado, como sugerido por Ayllón et al. (1999).

Dos 20 isolados selecionados, o isolado CS-1 foi o mais promissor até o momento, no entanto, propõe-se que esse trabalho tenha prosseguimento, avaliando-se o comportamento deste e dos demais isolados instalados a campo, verificando-se principalmente dados de produção e de sintomas de tristeza (intensidade de caneluras, desenvolvimento vegetativo e sintomatologia de tristeza). Resultados semelhantes foram obtidos por Müller e Costa (1977) em seu programa de pré-imunização, o qual resultou na seleção do isolado fraco protetivo denominado Pêra IAC. De um total de 83 isolados selecionados de plantas de elite a campo, somente três isolados tiveram bom desempenho e logo após, apenas um se destacou.

Além disso, ressalta-se a importância de se acompanhar, por meio da análise molecular SSCP para o gene da capa protéica e outros genes relacionados com a patogenicidade e com a supressão do silenciamento de RNA (genes codificantes para as proteínas p20, p23 e p25), uma vez que a pesquisa vem demonstrando o envolvimento destes genes no fenômeno da proteção cruzada (ALBIACH-MARTÍ et al., 2009; GAL-ON, 2009; LÓPEZ et al., 2009) e, abrangendo-se assim uma porção maior do genoma viral.



## CONCLUSÕES

Os resultados apontaram como isolado promissor e que pode oferecer proteção às plantas de laranja Pêra em pomares comerciais implantados no Norte e Noroeste do Paraná o isolado número 1, coletado no Município de Cruzeiro do Sul (CS-1). Demonstrou ainda que a hipótese inicial deste trabalho, que isolados selecionados na mesma região onde serão cultivados são superiores àqueles introduzidos provenientes de outras regiões citrícolas foi confirmada, visto o melhor desempenho observado em relação aos controles fracos utilizados, Pêra IAC e Superplanta. Nem todos os isolados que se mostraram promissores em casa de vegetação tiveram um bom desempenho a campo, evidenciando a importância desta última etapa dentro de um programa de proteção cruzada.

A inoculação do isolado severo desafiante nas plantas infectadas por isolados fracos mostrou que o desafio por união de tecido foi efetiva, levando à quebra da proteção de vários isolados. Por outro lado, o desafio pelo vetor não influenciou os resultados de desempenho a campo.

O isolado severo do CTV denominado Rolândia mostrou-se estável e com alta divergência genética com os demais isolados severos utilizados (Capão Bonito e Barão B), assim como da maioria dos isolados testados. A reprodução dos sintomas típicos de um isolado severo foi verificada em todas as plantas livres de vírus que foram inoculadas com esse isolado, reproduzindo os sintomas observados nas plantas a campo, doadoras das borbulhas

A análise molecular SSCP mostrou ser uma excelente ferramenta para se monitorar a estabilidade do complexo viral presente nas plantas, principalmente em trabalhos de proteção cruzada. Entretanto, para o monitoramento da estabilidade seria apropriado avaliar uma região maior do genoma do vírus, focando a análise em vários genes, principalmente aqueles relacionados com a patogenicidade e com a supressão do silenciamento de RNA, além do gene da capa protéica (genes codificantes para as proteínas p20, p23 e p25). Outro ponto a se considerar no monitoramento da estabilidade de isolados do CTV é observar o comportamento destes também em condições de campo e com maior período de tempo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIACH-MARTI, M.R.; MAWASSI, M.; GOWDA, S.; SATYANARAYANA, T.; HILF, M.E.; SHANKER, S.; ALMIRA, E.C.; VIVES, M.C.; LÓPEZ, C.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. **Journal of Virology**. v.74, n.15, p.6856-6865, 2000.

ALBIACH-MARTI, M.R.; ROBERTSON, C.; GOWDA, S.; TATINENI, S.; BELLIURE, B.; GARNSEY, S.M.; FOLIMONOVA, S.Y.; MORENO, P.; DAWSON, W.O. The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. **Molecular Plant Pathology**, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00572.X, 2009.

AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. **Virology**. v.255, p.32-39, 1999.

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

BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, Maryland ,v. 126, p. 374-380, 1982.

BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO,H.P.; MÜLLER,G.W.; SIQUEIRA, W.J. A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n.3, p.345-355, 2003.

BRLANSKY, R.H.; DAMSTEEGT, V.D.; HOWD, D.S.; ROY, A. Molecular analyses of *Citrus tristeza virus* subisolates separated by aphid transmission. **Plant Disease**, v.87, n.4, p.397-401, 2003.

BROADBENT, P. BRLANNSK, R.H.; INDSTO, J. Biological characterization of Australia isolates of *Citrus tristeza virus* and separation by single aphid transmissions. **Plant Disease**. v.80, p.329-333,1996.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**, v.25, p.269-273, 2003.

CAVIGLIONE, J.H.; KIIHL, L.R.B.; CARAMORI, P.H.; OLIVEIRA, D. **Cartas climáticas do Paraná - IAPAR**, 2000. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=677> (Acessado em 20/08/2008).

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W.; STACH-MACHADO, D.R.; SOUZA, A.A.; NUNES, W.M.C. Evaluation of citrus tristeza vírus (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, n.27, p.11-16, 2001.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of Citrus Active Germplasm Bank. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.322-327, 2006.

D'URSO, F.; AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; SAMBADE, A.; HERMOSO DE MENDONZA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) within the plant to change in the viral population following aphid transmission. **Plant Pathology**, v.49, p.288-294, 2000.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one of *Citrus tristeza virus* particles. **Phytopathology**. v.86, n.12, p.1331-1335, 1996.

FELSENSTEIN, J. **Phylip – Phylogeny Inference Package – version 3.68**. Department of Genoma Science and Department of Biology – University of Washington. 2008. Disponível em <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>

FOLIMONOVA, S.Y.; ROBERTSON, C.J.; SHILTS, T.; FOLIMONOV, A.S.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Strains of *Citrus tristeza virus* do not exclude superinfection by other strains of the virus. **Journal of Virology**, DOI:10.1128/JVI.02075-09, 2009.

GAL-ON, A. Viral cross protection: new insight into a well-known phenomenon. **Tropical Plant Pathology**, palestra 7, v.34 (supl.), p.XVII-XVIII, 2009.

GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J. Restriction analysis of amplified CTV coat protein cDNA is a sensitive and rapid method for monitoring and controlling CTV infections. In: **Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.25-27. IOCV, Riverside, CA. 1996.

GRANT, T.J. e COSTA, A.S. A mild strain of the Tristeza Virus of Citrus. **Phytopathology**. v.41, n.2, p.114-122, 1951.

HARPER, S.J.; DAWSON, T.E.; PEARSON, M.N. Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. **Archives of Virology**. v.154, n.9, p.1505-1510, 2009.

HERRERA-ISIDRÓN, L.; OCHOA-SÁNCHEZ, J.C.; RIVERA-BUSTAMANTE, R.; MARTÍNEZ-SORIANO, J.P. Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. **Virology Journal**, v.6, n.116, 2009.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON, W.O. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. **Virology**, v.208, p.511-520, 1995.

KITAJIMA, E.W.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, A. R.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A.S. Electron microscopical investigations of tristeza. In: **Proceedings of the 3<sup>rd</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**. p.1-9. IOCV, Riverside, CA. 1964.

KOLLER, O .L.; SOPRANO, E.; VERONA, L.A.F.; COSTA, A.C.Z. Quebra de tolerância a tristeza em dois clones de laranja 'Valência'. **XIII Cong. Bras. de Frut**. Salvador, BA.vol. 2, p. 372-373, 1994 (resumos).

LÓPEZ, C.; CERVERA, M.; FAGOAGA, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against *Citrus tristeza virus* in transgenic Mexican lime. **Molecular Plant Pathology**, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2009.00566.X, 2009.

MARTÍN, S.; SAMBADE, A.; RUBIO, L.; VIVES, M.C.; MOYA, P.; GUERRI, J.; ELENA, S.F.; MORENO, P. Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. **Journal of General Virology**. v.90, p.1527-1538, 2009.

MEISSNER-FILHO, P.E; SOARES-FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C; DIAMANTINO, E.; DIAMANTINO, M.S.A. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.312-315, 2002.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**. 9 (2), p. 251-268, 2008.

MÜLLER, G.W.; RODRÍGUEZ, O.; COSTA, A.S. A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. In: **Proceedings of the 4<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 64-71. IOCV, Riverside, CA. 1968.

MÜLLER, G.W. **Estudos sobre a interação entre isolados do vírus da Tristeza dos citros e controle da moléstia em lima ácida Galego por premunização**. Piracicaba-SP. 68p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo – ESALQ, 1972.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. **Proc. Int. Soc. Citriculture**, n. 3, p. 868-872, 1977.

MÜLLER, G.W. Use of mild strains of citrus tristeza virus (CTV) to reestablish commercial production of Pera sweet orange in São Paulo, Brazil. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v.93, p.62-64, 1980.

MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; GUIRADO, N. Results from premmunization tests to control the Capão Bonito strain of Tristeza. In: **Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 82-85. IOCV, Riverside, CA. 1988.

MÜLLER, G.W. e COSTA, A.S. **Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros**. In: ROSSETI, V.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. (eds). *Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e virus*. Campinas: Fundação Cargill, v.2, p. 55-84, 1993.

MÜLLER, G.W. Pulgão e tristeza dos citros no Brasil. **Laranja**, v.17, n.1, p.292-293, 1996.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré- imunizado “Pêra” IAC na citricultura paulista. **Laranja**, v.20, n. 2, p. 399-408, 1999.

MÜLLER, G.W., TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M. A. Thirty years of preimmunized pera sweet orange in the citriculture in São Paulo, Brazil. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 400-402. IOCV, Riverside, CA. 2000.

MÜLLER, G.W. Caracterização biomolecular e biológica dos isolados do vírus da tristeza dos citros (CTV) de árvores destacadas de laranja doce, selecionadas na região noroeste do Paraná, com vistas a sua utilização como matrizes desde que livres de outros patógenos. **Relatório de atividades – Processo 305344/76-5 (NV) – modalidade PV – CNPq**. 2004.

MÜLLER, G.W. Caracterização molecular e biológica dos isolados do *Citrus tristeza virus* (CTV) de árvores de laranja doce selecionadas na região noroeste do Paraná, visando sua utilização como matrizes. **Relatório de atividades – Processo 305344/76-5 (NV) – modalidade PV – CNPq**. 2006.

NEVES, M.F.; JANK, M.S.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G. Ações para aumentar a competitividade da cadeia da laranja no Brasil. **Laranja**, v.27, n. 02, p. 213-229, 2006.

NICKEL, O.; SANTOS FILHO, H.P.; VILARINHOS, A.D. Segregation of citrus tristeza virus strains by graft propagation. In: **Proceedings of the 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 64-70. IOCV, Riverside, CA. 1996.

ROISTACHER, C.N.; BLUE, R.L.; NAUER, E.M.; CAVALAN, E.C.. Suppression of tristeza virus symptoms in mexican lime seedlings grown at warm temperatures. **Plant Disease Reporter**, v.58, n.8, p.757-760, 1974.

ROY, A.; BRLANSKY, R.H. Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: Identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. **Phytopathology**, v.99, n.11, p.1297-1306, 2009.



RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; GUERRI, J.; PAPPU, H.; NIBLETT, C.; MORENO, P. Differentiation of citrus tristeza virus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, London, v.129, p.479-489, 1996.

RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. Detection of divergent sequence variants within *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In: **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 60-67. IOCV, Riverside, CA. 2002.

SALIBE, A.A.; TUBELIS, A.; CROCOMO, O.J.; GALLO, L.A.; OLIVEIRA, E.T. A Super Planta matriz de citros. **Laranja**, v.13, n.1, p.261-273, 1992.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**. v.51, p.257-265, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANTOS FILHO, H.P.; SILVA, M.J.; PAGUIO, O.R. Comportamento de diferentes porta-enxertos inoculados com uma nova variante do virus da Tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, n.4, p.271-273, 1991.

SEKIYA, M. E.; LAWRENCE, S.D.; MCCAFFERY, M.; CLINE, K. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. **Journal of General Virology**. v. 72 p.1013-1020, 1991.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Evaluation of changes which occurred in a mild protective citrus tristeza virus isolate in Pêra sweet orange by using RFLP and SSCP analysis of the coat protein gene. In: **Proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 136-140, Riverside, CA. 2000.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de Haplótipos do Gene do Capsídeo do Vírus da Tristeza dos Citros em plantas pré-imunizadas com Sintomas de Tristeza. **Summa Phytopathologica**. v.28, p.154-159, 2002.

SOUZA, A.A. e MÜLLER, G.W. A premunização no controle da tristeza dos citros. **Laranja**, v.27, n.1, 2006.

TARGON, M.L.P.N. **Expressão e análise do gene do capsídeo de isolados do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros**. Campinas, 142p. Tese (Doutorado)-Universidade de Campinas, 1997.

TARGON, M.L.P.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W. Ocorrência do complexo Capão Bonito do *Citrus Tristeza Virus* (CTV) em tangerina “Ponkan” sobre limão “Cravo” em plantio comercial em Campanha (MG). **Laranja**, v.24, n.1, p.157-164, 2003.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J.; RODRIGUEZ, O.; FIGUEIREDO, J.O.; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranjeira ‘Pera’ no Estado de São Paulo. Anais do **IV Congresso Brasileiro de Fruticultura**. p. 111-116, 1977.

VAN DER VYVER, J.B.; VAN VUUREN, S.P.; LUTTIG, M.; DA GRAÇA, J.V. Changes in the *Citrus tristeza virus* status of pre-immunized grapefruit Field trees. In: **Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists - IOCV**, p. 175-185, Riverside, CA. 2002.

VELAZQUEZ-MONREAL, J.J.; MATHEWS, D.M.; DODDS, J.A. Segregation of distinct variants from *Citrus tristeza virus* isolate SY568 using aphid transmission. **Phytopathology**, v.99, n.10, p.1168-1176, 2009.

ZANINELI-RÉ, M.L.Z. **Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros das regiões Norte e Noroeste do Estado do Paraná pela sintomatologia da tristeza e análise de RFLP do gene do capsídeo**. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Maringá, 2004.