

WALTER MAGRI TEMPORAL

**ANÁLISE DE SSCP DE ISOLADOS DO *CITRUS TRISTEZA VIRUS* E SUA  
SINTOMATOLOGIA EM CLONES DE LARANJA PÊRA EM TRÊS REGIÕES DO  
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte das exigências do  
programa de Pós-Graduação em  
Agronomia para obtenção do título de  
mestre.

Maringá  
Paraná – Brasil  
Fevereiro de 2009

WALTER MAGRI TEMPORAL

**ANÁLISE DE SSCP DE ISOLADOS DO *CITRUS TRISTEZA VIRUS* E SUA  
SINTOMATOLOGIA EM CLONES DE LARANJA PÊRA EM TRÊS REGIÕES DO  
ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada à  
Universidade Estadual de Maringá  
como parte das exigências para  
obteção do título de mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Júlia Corazza

---

Dr. Sérgio Alves de Carvalho

---

Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes

Maringá  
Paraná – Brasil  
Fevereiro de 2009

À

Minha mãe Sônia Maria Magri pelo amor, carinho e paciência sempre dispensados a mim e pelas oportunidades que, com muito esforço, pode me proporcionar. Pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos em que mais precisei e pelos conselhos que sempre me ajudaram a crescer e a ter forças para continuar prosperando.

Ao

Grande amigo Paulo Beresford, pelas conversas, conselhos e carinho.

A

Todos meus familiares, em especial minhas irmãs Raquel Magri Temporal e Fernanda Beresford Rocha, por sempre estarem ao meu lado torcendo por mim e pela oportunidade de aprender com cada um deles.

À professora Dra. Maria Júlia Corazza, pela paciência e credibilidade. Obrigado por ter ampliado minha visão de como a ciência é encantadora e, principalmente, pela disposição em sanar minhas dúvidas.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Msc. Carlos Alexandre Zanutto, técnico e amigo do laboratório, pelos ensinamentos, amizade e por auxiliar no meu desenvolvimento acadêmico.

Aos Professores Dr. Sérgio Alves de Carvalho e Dr. William Mário de Carvalho Nunes por se disponibilizarem a me auxiliar em qualquer questão no laboratório, em campo e nas dúvidas durante a dissertação.

Aos amigos funcionários Eduardo, Amaurídio e Osmar, pela amizade, conselhos e ensinamentos.

A Rúbia Oliveira Molina, Luciano Grillo e Renata Mesquini, pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos Cássius Santana, Fernando Sarpa Brigante, Guilherme Matsushita, Júnior Severino, Thaís Cappi, Janaína Gazarini, Murilo Sarpa Brigante, Eliel Balbino, João Monelli Neto, Tátia Leika, Paulo Takishita e Cássio Eduardo, pela amizade e incentivo.

Aos meus colegas de Maringá, Santa Cruz e aeroclube, que sempre estiveram ao meu lado, pelo companheirismo, alegria e por todos os momentos que compartilhamos juntos.

À Universidade Estadual de Maringá, professores da graduação e pós-graduação por terem me proporcionado condições para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada pela oportunidade de desenvolver o presente estudo.

Ao Centro Apta Citros Sylvio Moreira, IAC e empresas parceiras, pelo fornecimento de apoio técnico e material para as coletas.

À Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma forma, ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

## **BIOGRAFIA**

WALTER MAGRI TEMPORAL, filho de Waldo Fonseca Temporal e Sônia Maria Magri, nasceu em Recife, no Estado de Pernambuco, aos três dias do mês de setembro de 1984.

Graduou-se em Ciências Biológicas, em dezembro de 2006, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2007 iniciou o curso de mestrado, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

## ÍNDICE

<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. A citricultura no Estado de São Paulo.....	3
2.2. A tristeza dos citros .....	7
2.3. Modo de transmissão e epidemiologia.....	9
2.4. Hospedeiros e sintomatologia.....	11
2.5. Características morfológicas e estrutura genética do CTV .....	12
2.6. Métodos para estudo do CTV .....	18
2.7. O controle da tristeza .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Material vegetal e isolados de CTV .....	23
3.2. Avaliação da sintomatologia da tristeza, intensidade de caneluras, produção e teste biológico.....	27
3.3. Coleta de material para análise molecular.....	29
3.4. Análise Molecular do Gene do Capsídeo (GCP) do CTV por meio da técnica de SSCP .....	29
3.5. Extração do RNA viral .....	29
3.6. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa .....	30
3.7. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) por meio da PCR.....	30
3.8. Análise de SSCP .....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1. Avaliação da sintomatologia induzida pelo CTV .....	32
4.2. Caracterização Molecular dos isolados de CTV por meio da Análise SSCP.....	45
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

TEMPORAL, Walter Magri, M. Sc., Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2009. **ANÁLISE DE SSCP DE ISOLADOS DO *CITRUS TRISTEZA VIRUS* E SUA SINTOMATOLOGIA EM CLONES DE LARANJA PÊRA EM TRÊS REGIÕES DO ESTADO DE SÃO PAULO.** Professor Orientador Dr. William Mário de Carvalho Nunes. Professores Conselheiros: Dra. Maria Júlia Corazza e Dr. Sérgio Alves de Carvalho.

O *Citrus tristeza virus* (CTV), apresenta uma grande diversidade biológica, podendo induzir os mais variados sintomas, dependendo da sua interação com a planta hospedeira e condições ambientais, destacando-se a temperatura. O presente estudo teve o objetivo de avaliar o desempenho de diferentes combinações de cultivares de laranja Pêra e isolados de CTV, em pomares experimentais das regiões norte, central e sul do Estado de São Paulo. As combinações foram avaliadas por meio da análise da sintomatologia, produção, indexação biológica e análise de SSCP do gene da proteína do capsídeo do vírus. Os tratamentos consistiram de clones de quatro cultivares, Pêra IAC, Pêra IAC 2000, Pêra Olímpia e Ipiguá, originais e microenxertados pré-imunizados com o complexo PIAC. Os dados referentes à sintomatologia, produção e teste biológico revelaram que as plantas instaladas nos pomares das regiões noroeste e central do Estado, com médias mais altas de temperatura, apresentaram melhor desempenho em relação à tristeza do que as plantas instaladas em pomares da região Sul, sugerindo uma correlação entre sintomas severos de tristeza e decréscimo de temperatura. A análise de SSCP revelou que, apesar da mudança do perfil original, a capacidade protetiva do vírus fraco utilizado na pré-imunização foi mantida nos pomares dos municípios de Cajobi e Cordeirópolis, regiões noroeste e central do estado, com a maioria das plantas apresentando um perfil semelhante ao PIAC.

**Palavras-chave:** Citros, CTV, proteção cruzada, haplótipos, RT-PCR



## ABSTRACT

TEMPORAL, Walter Magri, M. Sc., Universidade Estadual de Maringá, february, 2009. **SSCP ANALYSIS OF STRAINS OF *CITRUS TRISTEZA VIRUS* AND ITS SYMPTOMATOLOGY IN CLONES OF SWEET ORANGES IN THREE REGIONS OF SÃO PAULO STATE.**

The Citrus tristeza virus (CTV) presents a vast biological diversity and it may cause different symptoms according to its interaction with the host plant and due to environmental conditions, especially temperature. The present study aims to evaluate the performance of different combinations of sweet orange cultivars and strains of CTV in experimental fields located in the northern, central and southern regions of São Paulo state. The combinations were evaluated through the analysis of symptomatology, crops, biological indexing and the SSCP analysis of the virus capsid protein gene. The treatments consisted of clones of four cultivars, Pêra IAC, Pêra IAC 2000, Pêra Olímpia and Ipiguá, original ones and shoot tip grafted that were pre-immunized with the PIAC complex. The data referring to symptomatology, crops and biological testing revealed that the plants belonging to fields located both in the northwestern and central regions of the state, where averages of temperature were higher, seemed to be more resistant to the tristeza than the plants located in the southern fields, what suggests a correlation between severe symptoms of tristeza and lower temperatures. The SSCP analysis revealed that, in spite of the change in the original profile, the protective capacity of the weak virus used in the pre-immunization was maintained in the fields from the cities of Cajobi and Cordeirópolis, located in the northwestern and central regions of the state. In addition to that, the majority of the plants presented a profile that was similar to the PIAC.

**Key-words:** Citrus, CTV, cross protection, haplotypes, RT-PCR

## 1. INTRODUÇÃO

Em decorrência da epidemia causada pela tristeza dos citros, registrada no Brasil nas décadas de 1930 e 1940, da eficiência do afídeo vetor *Toxoptera citricida* Kirk e da distribuição de material infectado, o *Citrus tristeza virus* (CTV) tornou-se endêmico em todas as regiões citrícolas do país (MÜLLER e COSTA, 1991).

A produção de laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck), principalmente da variedade Pêra, um dos materiais de citros mais sensíveis ao CTV, tornou-se possível pelo controle da doença por meio da substituição de porta-enxertos, seleção de copas promissoras e distribuição de material nucelar ou microenxertado pré-imunizados (GREVE et al., 1991; CARVALHO et al., 2001).

Dentre os materiais de 'Pêra', utilizados para a implantação e restauração de pomares comerciais brasileiros, os clones das cultivares Ipiгуá e Olímpia, selecionadas naturalmente em pomares da região de Bebedouro, e principalmente da cultivar IAC (PIAC), produzida por meio de material livre de vírus e pré-imunizado com estirpes fracas do CTV, têm-se destacado pela alta produtividade e boa qualidade dos frutos (TEÓFILO SOBRINHO et al., 2001; SALIBE et al., 2002).

Dessa forma, a citricultura tornou-se nas últimas décadas um dos principais agronegócios brasileiros graças à constante seleção de materiais de qualidade superior, aos tratamentos culturais, e ao controle e monitoramento de patógenos nas áreas que conduzem a cultura.

Em se tratando da tristeza dos citros, toda estratégia de controle e monitoramento dos pomares requer estudos de caracterização de isolados de CTV, uma vez que o vírus apresenta uma grande diversidade biológica, devido a facilidade da ocorrência de mutação e recombinação, podendo induzir os mais variados sintomas nos diferentes hospedeiros, dependendo da sua interação com a planta e ambiente (BALLESTER-OLMOS et al., 1993; MORENO et al., 2008).

Com o intuito de selecionar, em nível regional, clones mais produtivos de laranja doce da cultivar Pêra e com boa interação entre isolado protetivo do vírus

da tristeza e adaptados a diferentes condições ambientais, deu-se início, na década de 1990, ao “Programa Rede de Experimentos de Seleção de Novos Clones de Laranjeira Pêra”, desenvolvido por pesquisadores do Centro Apta Citrus Sylvio Moreira. Nesse programa foram instalados experimentos em municípios representativos das regiões norte, centro e sul do Estado de São Paulo, nas quais são observadas diferentes condições edafo-climáticas (CARVALHO et al., 2006).

O presente estudo, como parte desse programa, buscou avaliar, por meio da sintomatologia, produção e análise de SSCP do gene da proteína do capsídeo do CTV, as combinações de cultivar Pêra e isolado do vírus com desempenho satisfatório nos pomares experimentais dos municípios de Cajobi, Cordeirópolis, Itapetininga e Capão Bonito, incluindo materiais originais e microenxertados pré-imunizados.

#### **OBJETIVOS:**

- Avaliar o desempenho agrônômico e em relação à tristeza apresentado por clones originais e microenxertados pré-imunizados em diferentes regiões de São Paulo, por meio da sintomatologia desenvolvida.

- Caracterizar os isolados de CTV presentes nessas plantas por meio da análise de SSCP, comparando os padrões eletroforéticos com aqueles exibidos por controles fracos e fortes conhecidos.

- Relacionar os dados moleculares com a sintomatologia desenvolvida pelos diferentes clones analisados.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A citricultura no Estado de São Paulo

Por seu amplo espaço geográfico, o Brasil apresenta vários tipos de ambientes, propiciando as mais diversas culturas. Uma das atividades é o cultivo de frutas cítricas, que tem a temperatura como um dos principais elementos meteorológicos-climáticos a influenciar a distribuição geográfica da cultura. A temperatura do ar exerce influência sobre todas as fases de desenvolvimento das plantas cítricas, desde a germinação e crescimento das mudas até a maturação dos frutos (SENTELHAS, 2005).

Nas regiões de clima tropical úmido, onde a amplitude térmica anual é menor, os frutos tendem a ser maiores, com casca verde e mais fina e com mais suco, porém com menor total de sólidos solúveis e concentração de ácidos no suco do que os produzidos em regiões de clima subtropical. Pesquisas realizadas na região de Bebedouro, no Estado de São Paulo, apontaram que a principal variável que influencia a concentração de sólidos solúveis e acidez do suco das laranjeiras Valência e Natal, é a temperatura do ar, expressa em termos de graus-dia (SENTELHAS, 2005).

O Estado de São Paulo abrange sete tipos climáticos distintos, a maioria correspondente a clima úmido, segundo a classificação climática de Koeppen, baseada em dados pluviométricos e termométricos mensais. A maior área corresponde ao clima de **Cwa**. Essa área, que abrange os municípios de Cordeirópolis, Itapetininga e Capão Bonito, caracteriza-se por apresentar clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno, sendo a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. A região noroeste, onde se localiza o município de Cajobi, é considerada a mais quente do Estado de São Paulo, apresentando clima do tipo **Aw**, tropical chuvoso, com inverno seco e mês mais frio com temperatura média superior a 18°C. O mês mais seco tem precipitação inferior a 60 mm, ocorrendo o período chuvoso no outono (Cepagri - Unicamp).



**Figura 1:** Representação do Estado de São Paulo, com destaque para os municípios que tiveram plantas avaliadas.

Nesse cenário, o Estado de São Paulo destaca-se na produção de laranjas, limas ácidas Tahiti e de tangerinas, sendo responsável por quase 80% da produção nacional de citros, de acordo com levantamento do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2003). A proximidade das metrópoles nacionais e a instalação de um parque industrial voltado à exportação fizeram com que se tornasse o maior expoente no setor (BOTEON et al. 2005).

Dentro do Estado, em cada região, pode-se observar tendências na produção. Assim, as regiões norte e central, com maior volume de produção, especializaram-se para fins industriais, concentrando as principais unidades processadoras. Já na região sudeste, localizam-se os pomares voltados ao

consumo de frutos frescos, destacando-se as tangerinas e as laranjas de mesa (BOTEON et al. 2005).

Atualmente, estatísticas de produção apontam que o sul do Estado tem aumentado sua participação desde o final da década de 1990. Essa região caracteriza-se por ter um regime mais regular de chuva, o que torna mais atrativos o investimento e a ampliação no setor de citros. Nessa vertente, em Capão Bonito o desenvolvimento das tangerinas sem sementes pelo IAC pôde favorecer a exportação de frutas frescas (BOTEON et al. 2005).

Embora apresente excelentes qualidades agronômicas, houve uma queda no interesse em produzir a variedade de laranja Pêra, uma vez que as variedades Natal e Valência são mais produtivas (FIGUEIREDO, 1991). Outras hipóteses para esse fato são de que a 'Pêra' apresenta surtos vegetativos e é mais atrativa para cigarrinhas transmissoras da clorose variegada dos citros (CVC). Além disso, o fato de apresentar até quatro floradas por ano, com produção praticamente durante o ano todo, leva a um maior gasto com pulverizações e colheitas, podendo afetar a qualidade do fruto.

Um levantamento para estimar como estão estruturados os pomares paulistas foi feito pelo Fundecitrus, levando em conta a porcentagem de mudas existentes por variedades. Em setembro de 2004, o levantamento mostrou que de um total de 14 milhões de mudas, 33% eram de Valência e 28% da variedade Pêra (PIO et al. 2005). No entanto, ainda permanece o interesse na variedade 'Pêra', devido à necessidade de frutos para as indústrias na época conhecida como meia-estação. (PIO et al. 2005).

Com o advento da tristeza dos citros, programas para a seleção de variedades que convivem bem com a doença foram desenvolvidos. Desse modo, seleções de 'Pêra' têm sido realizadas nos últimos trinta anos com o objetivo de escolher material superior para utilização comercial. Inicialmente, plantas com potencial para matrizes foram selecionadas na região de Bebedouro e, posteriormente, levadas para estudo em pomares da Estação experimental de Limeira (atual Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC - CCSM), localizada em Cordeirópolis. Dentre os materiais selecionados nessa região, destacaram-se as

cultivares Ipiгуá e Olímpia que apresentaram bom desempenho em campo e passaram a fazer parte das matrizes do CCSM para distribuição comercial de mudas.

Não resta dúvida, no entanto, que um dos materiais que tem se revelado mais promissor para ser utilizado como matriz fornecedora de borbulhas é a cultivar Pêra IAC (PIAC). Essa cultivar foi desenvolvida pela Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), a partir de um programa de proteção cruzada contra isolados severos do *Citrus tristeza virus*, iniciado em 1961 (MÜLLER, 1980; MÜLLER et al., 1999). Clones de PIAC foram utilizados para constituir e restabelecer muitos dos pomares de São Paulo, sendo propagados até os dias atuais, não só nesse estado como em outros do Brasil (MÜLLER et al., 1999).

Nos anos recentes, planta de PIAC, com bom desempenho em pomar comercial, foi microenxertada e novamente inoculada com isolado fraco do vírus, dando origem a cultivar 'Pêra IAC 2000'. As características favoráveis da 'PIAC 2000' foram observadas em uma propriedade particular do município de Cordeirópolis. De acordo com Teófilo Sobrinho et al. (2001), as plantas destacavam-se em um lote de plantas vigorosas e com alta produção, sendo iniciada a distribuição de mudas para produção comercial em junho de 2000, pelo CCSM.

As cultivares IAC e IAC 2000, avaliadas no presente estudo, destacam-se por apresentarem alta produtividade e boa qualidade dos frutos, sendo cultivadas em escala comercial somente no Brasil (SALIBE et al., 2002).

## 2.2. A tristeza dos citros

Acredita-se que o CTV tenha surgido em regiões tropicais da Ásia e arquipélago Malaio, centro de origem dos citros, disseminando-se junto com seu principal afídeo vetor, o pulgão preto (*Toxoptera citricida* Kirk), para Índia e África do Sul, ainda no século XVII, por colonizadores (MÜLLER; COSTA, 1991). Da África do Sul, provavelmente, o CTV foi introduzido em outras áreas citrícolas do mundo, incluindo a América do Sul, por meio de material vegetativo infectado (ROCHA-PENÑA et al., 1995; MÜLLER et al. 2005).

Os primeiros registros da incompatibilidade da combinação de copa de laranja doce enxertada em laranja 'Azeda' foram obtidos no início do século XX na África do Sul, por meio da sintomatologia da tristeza (MÜLLER; COSTA, 1991).

A natureza virótica da doença foi reconhecida apenas em 1946 por meio da transmissão do vírus por afídeos vetores e, posteriormente, por enxertia de borbulhas (BAR - JOSEPH et al., 1989). Posteriormente, o uso da microscopia eletrônica colaborou com o avanço da pesquisa ao permitir a purificação da partícula viral (KITAJIMA et al., 1965).

Acredita-se que o CTV e seu principal vetor, o pulgão preto, foram introduzidos na América do Sul por volta de 1927, por meio de um carregamento de borbulhas e mudas contaminadas proveniente da África do Sul. Milhões de árvores de laranja doce enxertadas em laranja Azeda foram afetadas (ROCHA - PENÑA et al., 1995).

No Brasil, a virose foi observada em 1937, no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. O nome tristeza foi adotado para designar os sintomas desenvolvidos por combinações de laranjas-doces (*Citrus sinensis* L.) enxertadas em laranja 'Azeda'. Os sintomas são caracterizados pelo amarelecimento da nervura principal ou total das folhas, que se tornam ligeiramente bronzeadas e quebradiças, seca gradativa dos galhos a partir das extremidades, frutos miúdos, necrose do floema na região da enxertia e podridão das radículas, levando muitas vezes a planta à morte (MÜLLER et al. 2005). Nos anos de 1930 e 1940 o CTV dizimou milhões de



árvores enxertadas em laranja 'Azeda' nos pomares dos parques citrícolas do Brasil, Argentina e Paraguai e Uruguai (ROCHA-PEÑA et al., 1995).

Outras epidemias marcantes ocorreram também na Califórnia (1939), Flórida (1951), Espanha (1957), Israel (1970), Venezuela (1980), Chipre (1989), Cuba (1992), México (1995), República Dominicana (1996) e Itália (2002) (MORENO et al. 2008).

Para o controle da tristeza, no primeiro instante, um grande número de medidas foi tomado, desde erradicação e substituição individual das plantas afetadas, até substituição da copa. No Brasil, a principal forma de evitar perdas com a doença foi a substituição do porta-enxerto por variedades resistentes, o que levou ao abandono do porta-enxerto de laranja Azeda. A enxertia de clones já existentes em porta-enxertos tolerantes ao CTV, dentre os quais se destacou o limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osb.), fez com que esses clones ficassem conhecidos como clones velhos, uma vez que eram de origem desconhecida e, muitas vezes, propagados sem o controle de patógenos (MÜLLER e COSTA, 1993).

Posteriormente, copas com tecidos intolerantes ao vírus como pomelos (*C. paradisi* Macf.), limão Galego (*Citrus aurantifolia* Christm.), limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tan.) e algumas variedades de laranja doce (*C. sinensis* L.), como a laranja Pêra – principal cultivar comercializado do país –, começaram a apresentar problemas (PASSOS et al., 1997).

Os clones velhos começaram a ser substituídos pelos clones novos, de origem nucelar. Indiretamente, os problemas causados pelo CTV ajudaram a estimular muitas pesquisas na fitopatologia. Nesse período, houve tanto a descoberta de novos patógenos como os viróides, quanto a confirmação de que clones de árvores mais velhas eram carregadoras assintomáticas desses e de outros agentes infecciosos. Além disso, ocorreu a implantação de medidas sanitárias, quarentena e procedimentos certificados de enxertos livres de doenças (SALIBE, 1986).

Os clones nucleares, produzidos pelo Instituto Agrônomo (IAC) na Estação Experimental de Limeira, atualmente Centro APTA Citros Sylvio Moreira, permitiram a implantação, em 1969, do Programa de Registro de Plantas Matrizes

de Citros do Estado de São Paulo (GREVE et al., 1991). Posteriormente, ocorreu a implantação do sistema de borbulheiras adensadas e a reestruturação dos Programas de Registro de Matrizes, Fiscalização e Certificação de Mudas, favorecendo a propagação de material com pureza varietal, sanidade para patógenos e alta produtividade (CARVALHO, 2003).

Pode-se observar que, além da perda de árvores, houve importantes danos indiretos associados à epidemia de CTV, sendo o principal deles, talvez, a perda do porta-enxerto de laranja Azeda, cujas qualidades agrônômicas são consideradas insuperáveis (MORENO et al., 2008; BAR-JOSEPH et al., 1989).

Atualmente, a obtenção de plantas sadias e geneticamente idênticas vem sendo realizada através da técnica de microenxertia de ápices caulinares, seguida da pré-imunização, possibilitando a produção de plantas matrizes de citros com alta qualidade fitossanitária (CARVALHO, 2003).

### **2.3. Modo de transmissão e epidemiologia**

O CTV pode ser transmitido por enxertia, se uma união vascular for estabelecida entre tecidos doadores e receptores, e por diferentes espécies de afídeos vetores (MÜLLER e COSTA, 1991). A eficiência da transmissão varia com a espécie do afídeo, o isolado, hospedeira doadora e receptora. O pulgão preto, *T. citricida* Kirk, é o mais eficiente vetor no Brasil. Em outros países, outras espécies de afídeos são, também, eficientes.

O *T. citricida* apresenta coloração marrom escura, na forma jovem, e preta brilhante quando adulto, e varia de 1,5 a 2,4 mm. As fêmeas alcançam maturidade reprodutiva aos 12 dias e podem produzir cerca de 40 a 50 jovens indivíduos de rápido desenvolvimento. O CTV não se multiplica no pulgão e não há período latente (LEE et al., 1994). Pulgões individuais são capazes de transmitir o CTV em 30 minutos após aquisição e permanecem inoculativos por até 48 horas após o período de aquisição (MÜLLER, 1996).

A partir de intenso estudo sobre a disseminação do CTV, soube-se que diversos fatores influenciam na taxa de disseminação do vírus numa determinada área, sendo, alguns desses elementos, a composição da fauna de afídeos, sua densidade populacional, suscetibilidade de variedades de citros predominantes e transmissibilidade dos isolados de CTV dominantes (BAR - JOSEPH e LOEBENSTEIN, 1973). Sabe-se que um período de tempo entre a introdução e disseminação no campo é necessário, sugerindo que o isolado de CTV deve adaptar-se às populações de vetores locais (BAR - JOSEPH et al., 1989; RACCAH et al., 1980; ROISTACHER et al., 1987).

Estudos sobre dispersão espacial e temporal do CTV mostraram que os padrões de dispersão dependem se *T. citricida* ou *A. gossypii* é a espécie vetora predominante. Em locais onde *A. gossypii* é predominante, a incidência de árvores infectadas com CTV aumenta de 5 a 95% em 8 a 15 anos. Árvores infectadas mostraram uma agregação limitada e novas infecções são associadas com intervalos de distância. Nas áreas em que *T. citricida* é predominante, a mesma taxa de doenças é atingida de 2 a 4 anos com aumento rápido e contínuo, e agregados de árvores infectadas são comuns devido às árvores adjacentes infectadas. Isso pode ser explicado pela biologia e métodos de alimentação de ambas as espécies vetoras (GOTTWALD et al., 1996).

Em relação à evolução da doença após transmissão por afídeos, Albiach-Martí et al. (2000) observou que essa transmissão freqüentemente altera as populações de RNA genômico e RNAs defectivos. Em seu estudo, de 14 isolados, 9 apresentaram diferenças nas novas plantas em relação ao original, após inoculação por vetor. Esses achados sugerem que esses novos fatores, induzidos pela modificação causada pelos afídeos vetores, possam alterar o padrão de isolados de CTV em áreas de citros onde antes se observavam isolados mais brandos. Isso ocorre possivelmente por uma seleção pelo vetor de variantes genômicas e de D-RNAs.

Devido à ampla distribuição e alta eficiência do *T. citricida* Kirk, a tristeza é endêmica no Brasil, não havendo possibilidade de manter plantas sadias

suscetíveis à infecção pelo vírus em condições de campo, sendo infectadas em menor ou maior espaço de tempo (MÜLLER e COSTA, 1991).

#### **2.4. Hospedeiros e sintomatologia**

O vírus da tristeza infecta praticamente todas as espécies, cultivares e híbridos de citros, sendo que a única hospedeira não Rutácea é uma *Passifloraceae* (ROISTACHER e BAR – JOSEPH, 1987).

A expressão dos sintomas do CTV nos citros depende da constituição genética da copa e do porta-enxerto, da multiplicação do vírus na planta, da severidade do isolado e do ambiente, recebendo influência principalmente da temperatura (ROCHA-PEÑA et al., 1995).

Quanto à reação ao CTV, os tecidos das plantas cítricas podem ser resistentes (*Poncirus trifoliata* e alguns de seus híbridos), tolerantes (tangerinas, o limão 'Cravo', o limão 'Rugoso', o 'Volkameriano' e a maioria das laranjas doces), parcialmente tolerantes e intolerantes (pomelos, as limas ácidas, algumas variedades de laranja doce e alguns limões verdadeiros). São consideradas tolerantes as plantas que possibilitam a multiplicação do vírus em seus tubos crivados sem que estes entrem em colapso na região da enxertia (necrose), não afetando o crescimento e a produção, e resistentes, as plantas que não permitem a multiplicação do vírus (MÜLLER e COSTA, 1991).

Devido à intensa multiplicação viral nos tecidos, haplótipo viral e alterações fisiológicas causadas pelo estresse, alguns sintomas são mais severos em plantas mais sensíveis. A intensidade de sintomas deve-se, principalmente, às variações genéticas, à variedade e às influências do ambiente. Apenas isolados severos ocasionam caneluras em algumas variedades de laranja doce, pomelos e toranjas, independente do porta-enxerto, sendo que caneluras variam de acordo com o haplótipo do vírus e planta hospedeira. Caneluras são depressões rasas e alongadas, também denominadas "stem-pittings", impregnadas por uma substância marrom, observadas quando retiramos casca do tronco e ramos. Os

isolados de caneluras causam também clorose das folhas, produção de frutos miúdos e perda do vigor da planta (MÜLLER e COSTA, 1991). Porém, o conceito de isolado fraco é muito relativo e deve ser avaliado para cada variedade e cultivar cítrica, de acordo com Rezende e Müller (1995).

O CTV induz obstrução, colapso e necrose dos tubos da seiva e células companheiras perto da união de enxertia, produzindo uma excessiva quantidade de floema não funcional. Isto causa redução progressiva do sistema radicular com déficit no suprimento hídrico e de minerais, que resulta em seca, clorose e sintomas de morte dos ponteiros (MORENO et al. 2008).

O sintoma de caneluras é, provavelmente, iniciado pela interrupção da atividade meristemática de áreas limitadas do câmbio, que resulta em crescimento radicular irregular, com depressão local nos pontos inativos. Depressões extensivas podem impedir o crescimento radial e produzir crescimento deficiente, folhagem fina com folhas pequenas e amareladas e frutos pequenos com baixo teor de suco que não são comercializáveis (MORENO et al. 2008).

Alguns isolados severos de CTV induzem declínio rápido das plantas. Sintomas de declínio podem estar associados a outras doenças, como a gomose, ataque de nematóides, viroses, e também à falta de água. O declínio causado pelo CTV afeta o floema, restringido o crescimento e desenvolvimento da planta. Os sintomas se caracterizam pelo amarelecimento da nervura principal ou total das folhas, que se tornam ligeiramente bronzeadas e quebradiças, seca gradativa dos galhos a partir das extremidades, frutos miúdos, necrose do floema na região da enxertia e podridão das radículas, o que pode levar a planta à morte (MÜLLER e COSTA, 1993).

## **2.5. Características morfológicas e estrutura genética do CTV**

O CTV, pertencente ao gênero Closterovírus, é considerado o maior vírus de planta já detectado. Apresenta-se constituído por longas partículas

filamentosas e flexuosas com dimensões de 2000 nm de comprimento e 12 nm de diâmetro (BAR - JOSEPH e LEE, 1989).



**Figura 2:** Microscopia eletrônica exibindo partículas de CTV (KITAJIMA et al., 1965).

As partículas virais localizam-se no floema, formando corpos e inclusões, embora estes agregados já tenham sido detectados em parênquimas do floema, mesófilos e células de epiderme. O número de inclusões observadas nos tecidos de plantas infectadas pode ser relacionado à severidade do vírus. Agregados da proteína do p20 são os maiores componentes dos corpos de inclusões característicos que aparecem nas microscopias eletrônicas (GOWDA et al., 2000).

De acordo com Moreno et al. (2008) e Ayllón et al., (1999), análises de variações genéticas em isolados de CTV revelaram (1) conservação do genoma em distantes regiões geográficas, com um limitado repertório de genótipos, (2) distribuição desigual de variação ao longo do gRNA, (3) eventos de recombinação

freqüentes e (4) diferentes pressões de seleção moldando as populações de CTV. Nas estruturas de populações entre isolados, algumas consistem de uma seqüência predominante e algumas variantes relacionadas; em outras apresentam estruturas complexas, com seqüências variantes divergentes (AYLLÓN et al., 2006; MORENO et al.; 2008).

Fatores moldando as populações de CTV no campo incluem mutações, eventos de recombinação entre seqüências variantes divergentes, seleção, deriva genética e fluxo gênico, devido às repetidas inoculações de árvores de campo e movimento de porta enxertos infectados entre regiões (DOMINGO; HOLLAND, 1994).

Ayllón (1999) e Rubio (2001), juntamente com seus colaboradores, sugerem que recombinações homóloga e não homóloga podem ser fenômenos freqüentes no CTV. Admite-se que em vírus de RNA, a recombinação seria um meio de regenerar genomas funcionais, como mutações deletérias acumuladas, como resultado da falha da atividade da RNA polimerase RNA dependente. Além disso, poderia ser também um meio de aumentar a diversidade genética e a adaptabilidade. Mutação devido a erro natural da RNA polimerase RNA dependente é o mecanismo básico de geração de diversidade (DOMINGO; HOLLAND, 1994).

Alguns vírus têm desenvolvido genomas segmentados que podem reunir-se, como o CTV. Evidências de muitos eventos de recombinação entre duas seqüências variantes de RNA de CTV têm sido estudadas (BAR - JOSEPH et al., 1989; MORENO et al., 2008).

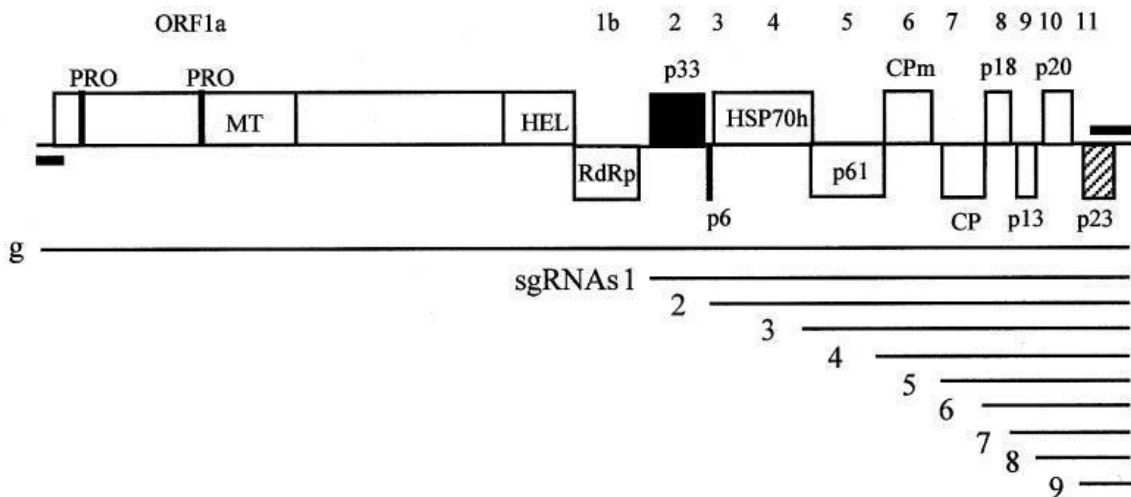
Como as plantas cítricas possuem vida longa, há a possibilidade de serem inoculadas repetidamente por afídeos com diversas dessas variantes de CTV, aumentando a diversidade genética de isolados (RUBIO et al., 2001).

A partícula do CTV parece ser geneticamente estável em alguns hospedeiros. As interferências do homem com diferentes porta-enxertos e enxertos, sob as mais diversas condições ambientais, podem ter auxiliado na geração de variabilidade genética. Uma vez formadas as condições adequadas,

outros fatores, como recombinação, seleção, deriva genética ou fluxo gênico entre regiões podem ter sido determinantes para tal variação (MORENO et al. 2008).

Quanto à sua organização, o genoma é monopartido, constituído por uma fita simples de RNA (ssRNA) de sentido positivo, não segmentado, com aproximadamente 20 Kb e peso molecular em torno de  $6.5 \times 10^3$  KDa. É organizado em 12 ORFs (open reading frames), que podem codificar aproximadamente 17 produtos protéicos e duas regiões não traduzíveis (KARASEV et al., 1995, 1997, 2000). ORFs 1a e 1b codificam proteínas do complexo de replicase, enquanto ORFs 2 a 11 incluem a metade do genoma, a partir da extremidade 3', codificam as proteínas p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20 e p23.

A região codificante do genoma de RNA compreende: o módulo de replicação (ORFs 1a e 1b); um módulo de 5 genes (p6, p65, p61, p27 e p25), codificando proteínas envolvidas na formação do vírion e no transporte, que é conservado em todos os membros da família Closteroviridae; o gene p20; um homólogo do gene p21 do vírus do *Beet yellow virus* (BYV); e quatro genes codificantes de proteínas sem homólogos em outros closterovírus (p33, p18, p13 e p23) (DOLJA et al., 2006).



**Figura 3:** Representação do genoma do CTV (adaptação de Moreno et al, 2008).



Em vírions normais de CTV, a capa protéica (CP) (p25) pode cobrir a maior parte do gRNA, e a capa protéica menor (CPm) (p27) somente uma pequena porção do gRNA no terminal 5', mas, na ausência da p65 ou p61, a CPm pode cobrir grandes segmentos ou mesmo o gRNA completo. Essas duas proteínas provavelmente ligam a zona de transição entre a CP e a CPm e restringem a CPm à cauda do vírion (MORENO et al. 2008).

As funções das proteínas produzidas pelos genes p33, p18 e p13 ainda são desconhecidas, pois, em mutantes com essas regiões suprimidas, o vírus pode se replicar e ocorrer a montagem da partícula infecciosa (SATYANARAYANA et al., 1999, 2000, 2004; MORENO et al. 2008).

Outra proteína produzida é a p23, uma proteína de ligação de RNA que regula acumulação desigual de fitas positivas e negativas durante replicação de RNA. Experimentos conduzidos por Lu e colaboradores (2004) sugerem que as proteínas p20 e p23, juntamente com a CP, podem atuar como supressoras de silenciamento de RNA, com p23 inibindo silenciamento intercelular, a CP no silenciamento intracelular, e p20 em ambos silenciamentos: inter e intracelulares. Dois supressores de silenciamento adicionais, codificados pelo genoma do CTV, admitem a existência de outros determinantes de patogenicidade, além do p23 (LU et al., 2004).

A expressão do genoma de CTV inclui no mínimo 3 mecanismos usados por vírus de RNA fita positiva: processo proteolítico, frameshifting ribossomal e formação de porções de 3'- coterminais subgenômicos que atuam paralelamente aos gRNAs (AYLLÓN et al., 2004; GOWDA et al., 2001). A replicação do gRNA do CTV envolve síntese de fitas negativas que vão servir de molde para a geração de novas fitas positivas, que se acumulam de 10 a 20 vezes mais que fitas negativas (SATYANARAYANA et al., 2002). ORFs 1a e 1b são diretamente traduzidas do gRNA. A primeira produz uma poliproteína de aproximadamente 349 kDa, enquanto que tradução da ORF 1b ocorre por ocasional frameshifting ribossomal para fazer uma proteína de aproximadamente 400 kDa, que é posteriormente processada proteoliticamente (KARASEV et al., 1995). Os 10 genes na metade 3' do gRNA do CTV são expressos pela síntese do sgRNAs coterminais, que agem

como RNA mensageiros (HILF et al., 1995). De maneira similar sgRNAs de fitas negativas também são produzidas em células infectadas, mas acumulam de 40 a 50 vezes menos que as fitas positivas de sgRNAs (SATYANARAYANA et al., 2002).

Em diversos trabalhos, utilizando isolados de campo em que se faz uso de corridas eletroforéticas, é comum observar-se pequenas bandas com as terminações 3' e 5' do gRNA, mas com as regiões centrais com falhas, geradas por diferentes fatores (MORENO et al., 1990, AYLLÓN et al., 1999; YANG et al., 1997). Pequenos fragmentos (sgRNAs), contendo genes codificantes da região 3', estão presentes e são responsáveis pela produção de mRNAs. Frequentemente, tecidos infectados por CTV também acumulam grande quantidade dessas fitas defectivas positivas e negativas (D-RNAs). A maioria de D-RNAs é de 2.0–5.0 kb, mas grandes D-RNAs que possuem ORFs 1a e 1b na sua porção 5', ou ORFs de 2 a 11 na porção terminal 3' foram reportadas (CHE et al., 2002, 2003). Estudos indicam que a produção de sgRNAs está relacionada à sua posição no genoma, sendo as mais próximas do terminal 3' aquelas que têm maior taxa de produção (GOWDA, 2001).

A interação do CTV com o hospedeiro ainda não é muito compreendida, sendo que o papel biológico do D-RNAs é um dos principais fatores que não está muito claro, mas sua distribuição em isolados de CTV sugere que eles podem fornecer alguma vantagem. Assim é em um caso, em que a presença de um D-RNA foi reportada para modular a expressão do sintoma do CTV (YANG et al., 1999). Nos trabalhos de Gandía et al., (2007), verificou-se que as análises do transcriptoma da lima mexicana, usando um microarranjo para citros, mostraram alteração na expressão de 334 genes depois da infecção com isolado severo de CTV, com metade delas sem similaridade significativa com outras proteínas conhecidas.

## 2.6. Métodos para estudo do CTV

Vários procedimentos podem ser utilizados para estudar a variação do CTV, identificar isolados específicos, ou para associar características de patogenicidade com diferentes marcadores moleculares (MORENO e GUERRI, 1997). Alguns desses procedimentos detectam diferenças na CP, usando uma variedade de anticorpos monoclonais e policlonais, ou pela análise de mapas de peptídeos gerados com endoproteases (ALBIACH - MARTÍ et al., 2000), e também por meio de testes biológicos.

Por meio da indexação biológica, há a garantia de que material propagativo seja sadio, evitando, assim, os danos causados pelos vírus e viróides. De forma geral, amostras das plantas estudadas são enxertadas em plantas sensíveis ao patógeno, apresentando sintomas em maior ou menor intensidade (GREVE, A. et al., 1991).

Nos métodos moleculares, a comparação de seqüências de nucleotídeos é um método preciso para comparações de isolados, mas leva tempo. Em contraste, reação com anticorpos monoclonais é rápido e prático para múltiplas comparações, mas cada anticorpo monoclonal detecta somente um epitopo, sendo que uma simples mudança de aminoácido pode modificar o epitopo (MORENO et al., 2008).

Outros procedimentos detectam variações em RNA viral, incluindo: (1) diferenças em padrão do dsRNA entre isolados (MORENO et al., 1993), sendo que estas, como já descrito, se devem a presença de D-RNAs em isolados de CTV; (2) padrão de hibridização com cDNA ou cRNA de muitas regiões do gRNA; (3) restriction fragment length polymorphism (RFLP) para análise do gene da capa protéica; (4) ampliações de padrões por RT-PCR com primers específicos para muitos genótipos de CTV; (5) análise de single-strand conformation polymorphism (SSCP) de diferentes regiões do gRNA (AYLLÓN et al., 1999; D'URSO et al., 2000, 2003; SAMBADE et al., 2002, 2007). Esta técnica tem sido usada para caracterizar a estrutura da população de isolados de CTV e selecionar variantes específicos para sequenciamento, para estimar a diversidade dentro e entre

isolados (AYLLÓN et al., 2006; SAMBADE et al., 2003). A técnica de SSCP baseia-se no anelamento da fita simples de cDNA sobre si mesma e no conseqüente rearranjo conformacional da molécula, após tratamento especial de desnaturação. A migração eletroforética das fitas simples de cDNA em gel não desnaturante de poliacrilamida depende da seqüência de nucleotídeos e da conformação adquirida pela molécula, sob as condições da eletroforese. Pequenas variações seqüenciais alteram a conformação da fita simples de cDNA e, conseqüentemente, seu perfil eletroforético, resultando em diferentes padrões de bandas. Isso permite que diferentes complexos, mesmo que apresentando sintomas idênticos, sejam identificados por padrões de bandas diferenciados (RUBIO et al., 1996).

Outro método é o PCR em tempo real para detecção e quantificação do CTV em diferentes tecidos de plantas. Os estudos conduzidos por Ruiz-Ruiz et al. (2007) indicam que esse procedimento pode ser útil não somente para diagnose e discriminação de linhagem, mas também para estudar diferentes aspectos da biologia do CTV, como diferenças de tamanho ou tropismo para diferentes órgãos da planta cítrica, efeito potencial da acumulação viral em ramos jovens, e na expressão de sintomas e transmissão de afídeos, ou resistência relativa de diferentes cultivares ou plantas transgênicas específicas a certas linhagens de CTV. Essa pode ainda ser uma importante ferramenta nos experimentos para detectar determinantes de patogenicidade, em que um clone de cDNA infeccioso de algum RNA genômico é montado em laboratório e precisa ter seu novo genoma estudado e avaliado.

## **2.7. O controle da tristeza**

Tratando-se de doença causada por vírus, não há método curativo economicamente viável; portanto, é utilizado o método de combate a doença de natureza preventiva ou indireta, e a escolha depende de cada caso (MÜLLER et al. 2005).

Além do uso de porta-enxertos tolerantes, outra medida adotada é a da pré-imunização. A proteção cruzada, ou pré-imunização, é um fenômeno que ocorre quando um vírus, já estabelecido na planta hospedeira, impede a manifestação de outros vírus relacionados posteriormente inoculados (REZENDE e MÜLLER, 1995). Esta técnica tem sido utilizada para controlar os danos causados por haplótipos severos de CTV em espécies e/ou variedades suscetíveis, e consiste na infecção de clones nucelares saudáveis ou microenxertados de copas de variedades cítricas sensíveis ao CTV, com isolados fracos do vírus. Juntamente com a pré-imunização e uso dos clones nucelares, a implantação de medidas sanitárias, quarentenárias e procedimentos certificados de enxertos livres de doenças garantem a distribuição de mudas saudáveis e produtivas para os produtores (CARVALHO et al. 2001).

O silenciamento de RNA tem como forma de atuação uma série de processos nucleares e citoplasmáticos envolvidos na regulação da expressão gênica pós transcricional. Age por meio da degradação seqüência-específica de mRNAs alvos ou do bloqueio de sua tradução, eficiente na defesa de plantas contra vírus e retrotransposons (ZERBINI et al., 2005).

Fagoaga et al. (2005) observaram, em seus estudos, acumulação de pequenos interferentes virais específicos em inoculados de CTV em lima Mexicana, indicando uma resposta natural pós transcricional antiviral neste hospedeiro. Especula-se que em plantas com proteção cruzada esses interferentes gerados por isolados brandos possam prevenir infecção subsequente por variantes agressivas, marcando para degradação seu RNA genômico e subgenômico.

No entanto, a observação de que isolados brandos de CTV freqüentemente falham na proteção, ou conferem apenas proteção temporária para plantas pré inoculadas (SAMBADE et al., 2007), sugere que CTV é capaz de contornar o silenciamento pós transcricional ou que outros fatores podem ser importantes para uma proteção cruzada durável. O sucesso limitado em outras áreas ou outras variedades (MÜLLER et al., 1988) indica que a proteção cruzada

provavelmente depende da variedade, linhagens de CTV e condições ambientais prevalentes em cada região.

Em todo o mundo, isolados de CTV que causam fracos ou moderados sintomas de caneluras em pomelos e laranja doce têm sido investigados e selecionados para serem utilizados em programas de pré-imunização. No Brasil, programas semelhantes foram desenvolvidos na Estação experimental de Limeira (atual Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC), em Cordeirópolis, e também no Instituto de Pesquisa Agropecuária do Leste, em 1964, no município de Cruz das Almas, Bahia, hoje pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. A pré-imunização também tem sido utilizada com sucesso para controlar a tristeza na Austrália, no Japão, na África e no Peru (MÜLLER e COSTA, 1991).

Estudos para produção de mudas livres de patógenos surgiram com as pesquisas com embrionia nucelar, que consiste no uso de embriões desenvolvidos sem a participação direta do gameta masculino. Nesse processo, o embrião forma-se a partir de tecido somático na estrutura do óvulo, possuindo, assim, características genéticas da planta mãe (GREVE et al., 1991). Segundo o mesmo autor, o embrião desenvolvido dessa forma em meios controlados normalmente não permite a entrada de microrganismos na semente. Essa medida serviu, num primeiro instante, para livrar plantas infectadas pelo exocorte e vírus severos em clones velhos de algumas variedades (SALIBE, 1987). No entanto, com o desenvolvimento da técnica de microenxertia, o uso de embriões nucleares praticamente caiu em desuso (GREVE et al., 1991)

A Microenxertia é uma técnica que emprega o cultivo de tecidos para livrar de doenças plantas de interesse. Para a cultura de citros, é acompanhada de cultivo de sementes do porta-enxerto “*in vitro*”. Nesse porta-enxerto é feita a decapitação e uma incisão em “T” invertido no topo, onde é colocado o micro enxerto da planta de interesse. Esse método garante alta qualidade fitossanitária, garantia de que não há infecção por doenças para obtenção de mudas, e possibilidade de aumento da produtividade (CARVALHO et al. 2005).

Atualmente, novas formas de controle vêm sendo estudadas para contornar os problemas causados por isolados severos do CTV. No entanto, ainda hoje, a melhor forma de se evitar perdas na produção por patógenos em qualquer cultura é por meio da obtenção de genes de resistência com o uso de cruzamentos. No entanto, para a cultura de citros, a maior dificuldade pelos métodos convencionais deve-se, em parte, ao seu grande porte, sua genética complexa e formas de reprodução. Para a seleção de variedades, é necessário um estudo demorado porque, para a análise de todas as características desejáveis, deve-se esperar o longo período juvenil, que pode ser de cinco anos, para começar a florescer, além do tempo de obtenção de frutos maduros (MACHADO et al. 2005)

No campo da biotecnologia, alguns genes foram identificados como possíveis focos de interesse nos melhoramentos. Linhagens de resistência específicas ao CTV têm sido observadas em algumas espécies de citros, entre elas, *P. trifoliata*, que mostrou resistência à maioria das linhagens de CTV. A resistência é associada com um único locus dominante (Ctv), que tem sido caracterizado e mapeado, sendo restrito a um segmento de 121 kb no genoma de *Poncirus*, compreendendo 10 genes (RAI, 2006). Linhagens de pomelos transgênicos, carregando qualquer um dos 10 genes candidatos, foram suscetíveis à infecção por CTV, sugerindo que mais de um gene no locus pode estar envolvido na resistência do CTV ou que outros loci foram subestimados.

Apesar da grande quantidade de informações já disponíveis sobre modificações por transgenia, muitos estudos ainda são necessários para que plantas transgênicas de citros, utilizando fragmentos de seqüências derivadas de CTV, possam ser realmente uma alternativa eficiente à proteção cruzada no controle de danos ou na resistência à tristeza. Desta maneira, uma melhor compreensão da relação patógeno/hospedeira/ambiente ainda é de grande importância para o futuro das técnicas mencionadas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e isolados de CTV

Os isolados de CTV que fizeram parte deste estudo foram obtidos de plantas originadas de quatro diferentes clones de laranja da variedade 'Pêra': 'IAC', 'IAC 2000', 'Olímpia' e 'Ipiguá' (QUADRO 1), estabelecidas sobre porta enxerto de limão 'Cravo' e instaladas em pomares experimentais, localizados nos municípios de Cajobi, Cordeirópolis, Capão Bonito e Itapetininga, pertencentes às regiões Noroeste, Central e Sudoeste do Estado de São Paulo, respectivamente. Esses pomares foram implantados com finalidade específica de pesquisa, e os municípios foram escolhidos pela representatividade das regiões e possibilidade de parceria. Os experimentos foram conduzidos em blocos inteiramente casualizados, sendo, nesse estudo, avaliado o material propagativo original e o microenxertado pré-imunizado com o isolado PIAC de cada clone em três repetições.

O município de Cajobi está na Latitude Sul a 20°31', e Longitude Oeste 48°28'. Encontra-se na altitude de 563 metros, com predomínio dos solos argissolo vermelho-amarelo eutrófico + argissolo vermelho eutrófico + latossolo vermelho distrófico (IBGE). O experimento localiza-se na Fazenda Santo Antônio, tendo sido realizado o plantio em fevereiro de 2000.

Cordeirópolis encontra-se na Latitude Sul 22°17' e Longitude Oeste 47°16' e está na altitude de 660 metros, com solos do tipo latossolo vermelho distrófico + latossolo vermelho distroférico (IBGE). O experimento analisado foi o RG 52 do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, com o plantio realizado em abril de 1997.

Capão Bonito está localizado em 24°00' de Latitude Sul e 48°12' de Longitude Oeste. A altitude é de 700 metros, com solo do tipo latossolo vermelho distrófico e argissolo vermelho-amarelo distrófico (IBGE). O local do experimento nessa região foi o Pólo Regional Sudoeste Paulista, com o plantio realizado em novembro de 1997. Como nesse experimento não está sendo avaliada a 'Pêra Ipiguá', para este clone foram coletados amostras de plantas de outro



experimento, instalado no município vizinho Itapetininga, compondo as plantas dos dois municípios o tratamento dessa região.

O município de Itapetininga está na Latitude Sul 23°21' e Longitude Oeste 48°01'. A altitude do terreno é de 660 metros, com solos do tipo latossolo vermelho distrófico + argissolo vermelho-amarelo distrófico (IBGE). O pomar pertence à Fazenda Campo de Aviação da Empresa Citrovita Agropecuária Ltda. O plantio foi feito em agosto de 1998.

Para verificar a estabilidade desses clones em relação à tristeza, propagações clonais dessas borbulheiras foram comparadas com respectivos clones microenxertados e novamente pré-imunizados com o isolado protetivo PIAC no Centro Apta Citros Sylvio Moreira, sendo levados a pomares experimentais para análise de desempenho.

Como controles nas análises de SSCP foram utilizados o isolado fraco 'Pêra IAC' e os isolados fortes 'Capão Bonito' e 'Barão B', obtidos de plantas matrizes de laranja 'Pêra', mantidas em casa de vegetação no CCSM.

O controle forte 'Capão Bonito' foi utilizado devido ao fato de que no município de Capão Bonito identificou-se a presença de um complexo de haplótipos de CTV que induz severos sintomas de tristeza em laranja doce, cultivar 'Pêra', enxertada sobre porta-enxerto de limão 'Cravo' (MÜLLER et al., 1999). Os sintomas provocados por esses variantes do vírus são caracterizados pela baixa taxa de crescimento, folhas reduzidas e com clorose, galhos quebradiços, frutos miúdos e pela presença, no tronco e nos ramos da planta, de caneluras pequenas, não muito profundas, porém, em grande número (MÜLLER e COSTA, 1993). A indução de sintomas de caneluras foi observada mesmo em plantas pré-imunizadas, sugerindo a possibilidade de contaminação em viveiros ou a quebra da proteção devido à pressão de variantes severos que infectam os pomares da região (MÜLLER e COSTA, 1988).

O controle forte Barão B foi coletado em plantas sem sintomas, mas portadoras do vírus. Esse isolado, quando enxertado em plantas de laranja doce nem sempre induz sintomas, mas em plantas de laranja Azeda e pomelo, apresenta reação severa de tristeza (TARGON, 1997).

**Quadro 1: Locais de coleta, blocos casualizados, cultivar e planta dos isolados de CTV de quatro diferentes clones de laranja da variedade 'Pêra'.**

<i>Amostra</i>	<i>Município</i>	<i>Bloco</i>	<i>Cultivar</i>	<i>Planta</i>
1	Cordeirópolis	II	IAC	-
2	Cordeirópolis	IV	IAC	-
3	Cordeirópolis	VI	IAC	-
4	Cordeirópolis	I	IAC MP	-
5	Cordeirópolis	IV	IAC MP	-
6	Cordeirópolis	VI	IAC MP	-
7	Cordeirópolis	I	IAC 2000	-
8	Cordeirópolis	II	IAC 2000	-
9	Cordeirópolis	VI	IAC 2000	-
10	Cordeirópolis	II	IAC 2000 MP	-
11	Cordeirópolis	III	IAC 2000 MP	-
12	Cordeirópolis	V	IAC 2000 MP	-
13	Cordeirópolis	III	Olímpia	-
14	Cordeirópolis	IV	Olímpia	-
15	Cordeirópolis	V	Olímpia	-
16	Cordeirópolis	III	Olímpia MP	-
17	Cordeirópolis	IV	Olímpia MP	-
18	Cordeirópolis	V	Olímpia MP	-
19	Cordeirópolis	II	Ipiguá	-
20	Cordeirópolis	IV	Ipiguá	-
21	Cordeirópolis	VI	Ipiguá	-
22	Cordeirópolis	V	Ipiguá MP	-
23	Cordeirópolis	VI	Ipiguá MP	-
24	Cordeirópolis	I	Ipiguá MP	-
25	Itapetininga	II	Ipiguá	-
26	Itapetininga	IV	Ipiguá	-
27	Itapetininga	VI	Ipiguá	-
28	Itapetininga	II	Ipiguá MP	-
29	Itapetininga	IV	Ipiguá MP	-
30	Itapetininga	VI	Ipiguá MP	-
31	Capão Bonito	IV	IAC	-
32	Capão Bonito	VII	IAC	-

33	Capão Bonito	VIII	IAC	-
34	Capão Bonito	IV	IAC MP	-
35	Capão Bonito	VI	IAC MP	-
36	Capão Bonito	VIII	IAC MP	-
37	Capão Bonito	IV	IAC 2000	-
38	Capão Bonito	VII	IAC 2000	-
39	Capão Bonito	VIII	IAC 2000	-
40	Capão Bonito	IV	IAC 2000 MP	-
41	Capão Bonito	VI	IAC 2000 MP	-
42	Capão Bonito	VIII	IAC 2000 MP	-
43	Capão Bonito	IV	Olímpia	-
44	Capão Bonito	VI	Olímpia	-
45	Capão Bonito	VIII	Olímpia	-
46	Capão Bonito	IV	Olímpia MP	-
47	Capão Bonito	VI	Olímpia MP	-
48	Capão Bonito	VIII	Olímpia MP	-
49	Cajobi	II	IAC	2
50	Cajobi	III	IAC	1
51	Cajobi	V	IAC	2
52	Cajobi	II	IAC MP	2
53	Cajobi	IV	IAC MP	2
54	Cajobi	V	IAC MP	1
55	Cajobi	II	IAC 2000	1
56	Cajobi	III	IAC 2000	2
57	Cajobi	V	IAC 2000	1
58	Cajobi	II	IAC 2000 MP	2
59	Cajobi	IV	IAC 2000 MP	2
60	Cajobi	V	IAC 2000 MP	1
61	Cajobi	III	Olímpia	1
62	Cajobi	II	Olímpia	2
63	Cajobi	V	Olímpia	1
64	Cajobi	II	Olímpia MP	2
65	Cajobi	IV	Olímpia MP	2
66	Cajobi	V	Olímpia MP	1
67	Cajobi	II	Ipiguá	2

68	Cajobi	III	Ipiguá	1
69	Cajobi	V	Ipiguá	1
70	Cajobi	II	Ipiguá MP	2
71	Cajobi	IV	Ipiguá MP	2
72	Cajobi	V	Ipiguá MP	1

Alguns clones de uma mesma cultivar do pomar instalado no município de Cajobi apresentavam repetições no mesmo bloco, sendo analisada, nesse estudo, apenas uma das plantas, representada por planta 1 ou 2.

### **3.2. Avaliação da sintomatologia da tristeza, intensidade de caneluras, produção e teste biológico**

A sintomatologia da tristeza apresentada pelas plantas foi avaliada por meio da observação das plantas, intensidade de caneluras nos ramos, produção e qualidade dos frutos.

O aspecto geral das plantas foi avaliado atribuindo-se notas de zero a cinco aos sintomas aparentes de tristeza, destacando-se a redução do porte e vigor das plantas, folhas com clorose, de tamanho reduzido e com aspecto coriáceo e quebradiço, frutos miúdos e presença de caneluras nos troncos. Nessa avaliação foram estabelecidos os seguintes critérios: zero - nenhum dos sintomas característicos da doença; 1 e 2 – sintomas fracos a moderados; 3, 4 e 5 – sintomas fortes a muito fortes de tristeza.

A avaliação da intensidade de caneluras foi realizada em segmentos de ramos jovens, de aproximadamente 1 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, coletados ao redor das copas, acondicionados em sacos de papel e armazenados em local seco. Após a remoção das cascas, foram atribuídas notas de 0 a 4 à intensidade de caneluras, com algumas modificações dos métodos descritos por Müller et al. (1996) e Meissiner et al. (2002). A nota 0 corresponde à ausência de caneluras; nota 1, à presença de caneluras esparsas; nota 2, a um número intermediário de caneluras; nota 3, a várias caneluras superficiais ou poucas

caneluras profundas; e nota 4, a toda a superfície do ramo coberta por caneluras superficiais ou profundas.

Dados sobre a produção (kg/planta) no período de 2004 a 2007, assim como os dados referentes à qualidade e características dos frutos, foram obtidos nas colheitas anuais realizadas no mês de agosto de cada ano. A qualidade dos frutos foi avaliada no laboratório de Análise de Qualidade do Centro de Citricultura Apta Citros Sylvio Moreira - IAC por meio de análises físico-químicas de 10 frutos por planta de 2 repetições, adotando-se como parâmetros a largura e altura dos frutos, brix, sólidos solúveis, acidez, ratio, peso, rendimento de suco e número de frutos por caixa.

Os dados da produção e qualidade dos frutos foram submetidos à análise estatística para determinar a ocorrência de diferenças entre clones e regiões avaliadas. Determinou-se a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene e a distribuição dos dados e dos erros pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Estes procedimentos foram realizados com o auxílio do módulo STAT do programa SAS, versão 9.1 para Windows. Não foram adotadas transformações de dados. Posteriormente, aplicou-se à análise de variância (ANOVA) em esquema fatorial 2x3x4 e, havendo significância a 5% de probabilidade pelo teste F, comparou-se as médias dos tratamentos por meio do teste de agrupamento de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Essas análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000).

A indexação biológica foi feita pelo método de dupla enxertia, inoculando-se 2 borbulhas das plantas amostradas e uma da indicadora lima ácida 'Galego' sobre limão 'Cravo' em condições de casa de vegetação. Foram utilizadas 5 plantas para cada teste, acompanhados de controles positivos e negativos, de acordo com o procedimento descrito por Carvalho et al. (1997). Os testes biológicos foram implantados de março a julho de 2008, e a avaliação dos sintomas, como palidez ou clorose nas nervuras, foi realizada 2 meses após a enxertia, adotando-se os seguintes critérios: sintomas fracos (+) = leve palidez nas nervuras; sintomas fortes (++) = palidez nas nervuras proporcionalmente maior;

sintomas muito fortes (+++) = suberização e curvamento do limbo (CARVALHO et al. 1997).

### **3.3. Coleta de material para análise molecular**

Para cada amostragem, folhas e brotações jovens foram coletadas de diferentes quadrantes da planta e compostas como uma única amostra, da qual foram retirados 100 mg para extração dos ácidos nucléicos totais. Cada amostra foi identificada, armazenada em saco plástico e, posteriormente, acomodada em caixa de isopor em câmara fria.

### **3.4. Análise Molecular do Gene do Capsídeo (GCP) do CTV por meio da técnica de SSCP**

Para a realização da técnica de SSCP, foi feita a extração do RNA viral, seguida pela síntese do DNA complementar e amplificação do gene da capa protéica do vírus por PCR.

### **3.5. Extração do RNA viral**

O material vegetal utilizado para a extração do RNA viral foi obtido a partir das cascas de brotações novas, de nervuras principais das folhas obtidas das plantas dos diferentes tratamentos avaliados e de plantas controles mantidas em casa de vegetação. O RNA do vírus foi extraído dos tecidos por meio de ciclos de extração por reagente Trizol. Esse reagente realiza a extração de RNA total. O procedimento de extração foi feito de acordo com as instruções da Invitrogen para o TRIZOL Reagent, com algumas modificações. Pesou-se de 50 a 100 mg de tecido, que foram triturados em almofariz com auxílio de N<sub>2</sub> líquido. Em seguida,

foi adicionado TRIZOL Reagent. As amostras foram agitadas, incubadas durante 5 min a 15 - 30 °C, e centrifugadas a 12000 x *g* (= rcf) por 10 min a 2 - 10 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo Eppendorff e clorofórmio puro adicionado. Novamente realizou-se a incubação por 3 minutos e nova centrifugação. A fase aquosa nessa fase foi transferida para novo tubo Eppendorff e o RNA foi precipitado adicionando-se Isopropanol. Depois de novamente agitado, incubado e centrifugado, o sobrenadante foi dispensado e o RNA lavado com etanol 75%. Centrifugou-se e o sobrenadante foi descartado. O RNA foi deixado para secar, sendo em seguida dissolvido em 50 µL de H<sub>2</sub>O. O material obtido foi estocado a -20 +/- 10 °C até ser utilizado.

### **3.6. Síntese de DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa**

O RNA viral extraído serviu de molde para a síntese da primeira fita de cDNA do gene da capa protéica do capsídeo (GCP) de acordo com o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989). As reações foram feitas para um volume de 20µl contendo: água mili-Q autoclavada, tampão 5X Buffer da MuMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase), DTT, dNTP, Random primer (Gibco-BRL), RNAout (Gibco-BRL), MuMLV-RT (Reverse Transcriptase) e dsRNA. A síntese foi realizada em aparelho termociclador, a uma temperatura de 37°C, por um período de duas horas.

### **3.7. Amplificação do gene da proteína do capsídeo (GCP) por meio da PCR**

A amplificação do gene da capa protéica por meio da PCR seguiu o procedimento descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. O GCP foi isolado e amplificado por meio da reação da polimerase em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction) com o uso de 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 reações foram feitas para um volume de 25µl contendo: água mili-Q autoclavada, tampão T10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM HCl, MgCL<sub>2</sub>), dNTP, CN119, CN120, Taq DNA Polymerase e cDNA. A amplificação foi realizada em aparelho termociclador programado apropriadamente para 39 ciclos. Alternativamente, podem ser utilizados outros pares de primers para detecção do CTV. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 0,8% e fotografado em fotodocumentador sob luz ultravioleta (UV).

### **3.8. Análise de SSCP**

As análises SSCP foram realizadas de acordo com a metodologia usada por Corazza-Nunes et al. (2001, 2006). 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 25 °C por um período de 16 horas. O gel foi corado com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita por Beidler et al. (1982) e fotografado sob luz UV.

As análises moleculares do gene da capa protéica (GCP) do *Citrus Tristeza Virus* foram conduzidas no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá.

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 da mesma cultivar, entre cultivares, com o isolado controle fraco 'Pêra IAC', e entre controles fortes 'Capão Bonito' e 'Barão B', nas diferentes regiões.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação da sintomatologia induzida pelo CTV

A avaliação dos pomares experimentais instalados nos municípios de Cordeirópolis e Cajobi revelou que, de um modo geral, as plantas de todos os clones, independente do tratamento, apresentaram um desempenho satisfatório em relação à tristeza, como indicam as notas de zero a um, atribuídas à sintomatologia da doença nas plantas (QUADROS 2 e 3).

Os resultados da análise da intensidade de caneluras e indexação biológica sugerem que as plantas dos diferentes clones estão infectadas por isolados fracos a moderados de CTV, em ambos os tratamentos nessas regiões. Como pode ser observado no Quadro 2, as notas mais altas de intensidade de caneluras foram 2,0, 2,3 e 2,7, atribuídas a uma ou duas das repetições de cada clone nos respectivos tratamentos no pomar do município de Cordeirópolis, com exceção do clone IAC original, para o qual foram atribuídas notas de caneluras de 0 a 1,3 nas 3 repetições. No entanto, muitas dessas plantas apresentaram sintomas muito leves de palidez de nervuras pelo método de indexação biológica. O inverso também foi observado, isto é, plantas com baixas notas de caneluras, porém com maior intensidade de clorose das nervuras (++) pelo teste de indexação biológica.

No experimento de Cajobi as notas de intensidade de canelura variaram de zero a um, sendo que somente os isolados das amostras 50, 61, 62, 69 e 72, clones de 'IAC', 'IAC MP' e 'IAC 2000 MP', induziram alguns sintomas mais pronunciados de palidez nas nervuras das folhas da planta indicadora no teste biológico (QUADRO 3).

**Quadro 2: Notas de sintomas de tristeza no porte da planta, intensidade de caneluras e teste biológico no experimento do município de Cordeirópolis**

<i>Amostra</i>	<i>Clone Pêra</i>	<i>Bloco</i>	<i>Sintomas Gerais de tristeza*</i>	<i>Caneluras</i>	<i>Indexação biológica</i>
1	IAC	BL II	0	1	+
2	IAC	BL IV	0	0	+
3	IAC	BL VI	0	1,3	++
4	IAC MP	BL I	0	2	+
5	IAC MP	BL IV	0	0,3	++
6	IAC MP	BL VI	0	1	+
7	IAC 2000	BL I	0	2,3	+
8	IAC 2000	BL II	0	1	+
9	IAC 2000	BL VI	0	0	++
10	IAC 2000 MP	BL II	0	2	+
11	IAC 2000 MP	BL III	0	1,3	+
12	IAC 2000 MP	BL V	0	0,7	+
13	Olímpia	BL III	0	2	++
14	Olímpia	BL IV	0	0	+
15	Olímpia	BL V	1	2,7	+
16	Olímpia MP	BL III	0	0,7	+
17	Olímpia MP	BL IV	0	1	+
18	Olímpia MP	BL V	0	2	+
19	Ipiguá	BL II	0	1	++
20	Ipiguá	BL IV	0	1	+
21	Ipiguá	BL VI	0	2	+
22	Ipiguá MP	BL I	0	0,3	++
23	Ipiguá MP	BL VI	0	1	+
24	Ipiguá MP	BL V	0	2	+

Sintomas fracos (+) = leve palidez nas nervuras; sintomas fortes (++) = palidez nas nervuras proporcionalmente maior; sintomas muito fortes (+++) = suberização e curvamento do limbo.

**Quadro 3: Notas de sintomas de tristeza no porte da planta, intensidade de caneluras e teste biológico no experimento do município de Cajobi**

<i>Amostra</i>	<i>Clone Pêra</i>	<i>Bloco/Planta</i>	<i>Sintomas gerais de tristeza</i>	<i>Caneluras Nos ramos</i>	<i>Indexação biológica</i>
49	IAC	BL II - PL 2	0	1	+
50	IAC	BL III - PL 1	0	1	+
51	IAC	BL V - PL 2	0	1	++
52	IAC MP	BL II - PL 2	0	0,7	+
53	IAC MP	BL IV - PL 2	0	0	++
54	IAC MP	BL V - PL 1	0	0,3	+
55	IAC 2000	BL II - PL 1	0	0	++
56	IAC 2000	BL III - PL 2	0	0	+
57	IAC 2000	BL V - PL 1	0	0	+
58	IAC 2000 MP	BL II - PL 2	0	1	+
59	IAC 2000 MP	BL IV - PL 2	0	0	++
60	IAC 2000 MP	BL V - PL 1	0	0,7	++
61	Olímpia	BL III - PL 1	0	0	+
62	Olímpia	BL II - PL 2	0	0	+
63	Olímpia	BL V - PL 1	0	1	+
64	Olímpia MP	BL II - PL 2	0	0,3	+
65	Olímpia MP	BL IV - PL 2	0	0	+
66	Olímpia MP	BL V - PL 1	0	1	+
67	Ipiguá	BL II - PL 2	0	0,3	+
68	Ipiguá	BL III - PL 1	0	1	+
69	Ipiguá	BL V - PL 1	0	0,3	+
70	Ipiguá MP	BL II - PL 2	0	0,3	+
71	Ipiguá MP	BL IV - PL 2	0	0	+
72	Ipiguá MP	BL V - PL 1	0	0,7	+

Sintomas fracos (+) = leve palidez nas nervuras; sintomas fortes (++) = palidez nas nervuras proporcionalmente maior; sintomas muito fortes (+++) = suberização e curvamento do limbo.

Na avaliação visual das plantas do pomar instalado em Capão Bonito as notas para tristeza variaram de 1 a 4, apontando para a ocorrência de isolados severos de CTV infectando plantas de todos os clone e tratamentos (QUADRO 4). As menores notas foram atribuídas a algumas das repetições do clone de IAC e IAC 2000 original e microenxertado pré-imunizado, sendo que todas essas plantas também apresentaram baixa intensidade de caneluras e leve palidez das nervuras no teste biológico, com exceção, para esse último requisito, das amostras 37 e 39, cujos isolados induziram forte reação na planta indicadora.

Todavia, algumas plantas, como as de número 32, 34, 35, 37 e 48, que receberam altas notas na avaliação visual da tristeza no pomar, apresentaram baixa intensidade de caneluras nos ramos amostrados e fraca reação de seus isolados em lima ácida 'Galego'. Esses resultados podem sugerir que alguns isolados severos presentes nessas plantas não induzem sintomas de caneluras ou clorose nas nervuras na indicadora 'Galego'. Por outro lado, como considerado por Powell et al. (1999) e Ferguson e Garnsey (1993), árvores com acentuados sintomas de ananicamento e clorose nas folhas podem ter o crescimento e desenvolvimento vegetativo afetados por outros fatores, além do CTV. Além disso, as baixas notas de caneluras atribuídas a essas plantas não significam que isolados severos que induzem esse sintoma não estejam presentes nessa região, pois, como descrito por Powell et al. (1999), muitas plantas infectadas por isolados severos não expressam sintomas de caneluras por vários anos.

A ocorrência de notas maiores para o aspecto geral das plantas dos diferentes clones da variedade de laranja Pêra no município de Capão Bonito está de acordo com os estudos realizados por Teófilo Sobrinho et al. (2001), que também atribuíram altas notas de tristeza às cultivares de 'Pêra' nos tratamentos presentes nas regiões Sul e Sudoeste do Estado de São Paulo, abrangendo os municípios de Capão Bonito e Itapetininga.

No entanto, a maioria das plantas da cultivar Ipiguá, amostradas no município de Itapetininga, exibiu sintomas moderados de tristeza na observação visual do pomar, baixa intensidade de caneluras nos ramos, e fraca reação em Galego, independente do tratamento (QUADRO 5).

Assim como as notas atribuídas aos sintomas de tristeza das plantas nos pomares, as comparações estatísticas da produção e qualidade dos frutos demonstram que as plantas das diferentes cultivares, instaladas em Capão Bonito, apresentaram desempenho inferior, diferindo significativamente daquelas instaladas nos pomares das regiões Noroeste e Central, com exceção dos clones da cultivar 'IAC 2000', que exibiram médias de produção e qualidade dos frutos mais próximas às plantas da mesma cultivar nas outras regiões (QUADRO 6).

Estudo conduzido por Roistacher et al. (1987) sugere que as diferenças entre regiões em relação à sintomatologia da tristeza desenvolvida pelas plantas podem ser devidas a fatores edafoclimáticos. Altas temperaturas, por exemplo, podem inibir sintomas severos da doença pela inativação do vírus, enquanto temperaturas mais baixas tendem a acentuar os sintomas.

O mapa climático da Figura 4 aponta para uma pequena diferença nas médias de temperatura das regiões estudadas, calculadas a partir dos registros dos anos de 2004 a 2007. Como pode ser observado, a média mais baixa de temperatura foi obtida dos registros da região Sul, onde se localizam os municípios de Capão Bonito e Itapetininga. Embora a diferença entre as médias seja pequena, os dados obtidos condizem com a hipótese de que temperaturas menores induzem sintomas mais acentuados de tristeza (MÜLLER et al., 1993). Provavelmente, a pequena diferença entre as médias foi suficiente para influenciar no patossistema planta/vírus, principalmente nos pomares experimentais instalados no município de Capão Bonito.

Outra possível causa do menor desempenho das plantas do experimento instalado nesse município, em relação ao CTV, reside no prevaletimento de isolados severos, que constituem o complexo 'Capão Bonito', exercendo pressão sobre isolados fracos do vírus (MULLER et al 1999).

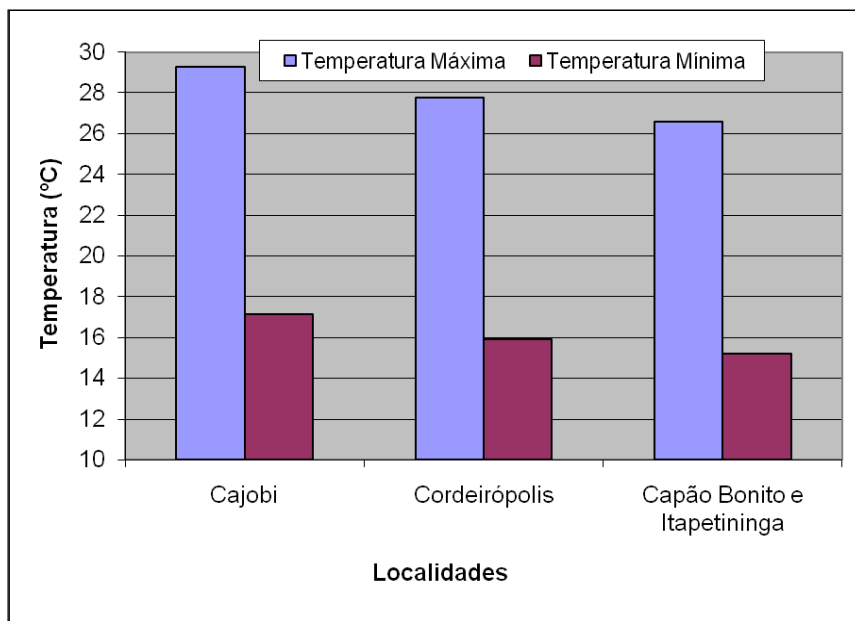
**Quadro 4: Notas de sintomas de tristeza no porte da planta, intensidade de caneluras e teste biológico no experimento do município de Capão Bonito**

<i>Amostra</i>	<i>Clone Pêra</i>	<i>Bloco</i>	<i>Sintomas gerais de tristeza</i>	<i>Caneluras nos ramos</i>	<i>Indexação biológica</i>
31	IAC	BL IV	2	0,3	+
32	IAC	BL VII	3	0,7	+
33	IAC	BL VIII	2	2	++
34	IAC MP	BL IV	3	0,3	+
35	IAC MP	BL VI	2	0,7	+
36	IAC MP	BL VIII	3	0,3	+
37	IAC 2000	BL IV	2	1,7	+++
38	IAC 2000	BL VII	2	0,3	+
39	IAC 2000	BL VIII	2	1,7	+++
40	IAC 2000 MP	BL IV	3	0	+
41	IAC 2000 MP	BL VI	1	0	+
42	IAC 2000 MP	BL VIII	3	2,3	+
43	Olímpia	BL IV	4	0,7	+
44	Olímpia	BL VI	3	0	+
45	Olímpia	BL VIII	3	2,7	++
46	Olímpia MP	BL IV	4	1	+++
47	Olímpia MP	BL VI	3	1	++
48	Olímpia MP	BL VIII	4	0	+

**Quadro 5: Notas de sintomas de tristeza no porte da planta, intensidade de caneluras e teste biológico no experimento do município de Itapetininga**

<i>Amostra</i>	<i>Clone Pêra</i>	<i>Bloco</i>	<i>Sintomas gerais de tristeza</i>	<i>Caneluras nos ramos</i>	<i>Indexação biológica</i>
25	Ipiguá	BL II	3	0,3	+
26	Ipiguá	BL IV	2	1,7	+
27	Ipiguá	BL VI	2	1	+
28	Ipiguá MP	BL II	2	0	+
29	Ipiguá MP	BL IV	2	0,3	+
30	Ipiguá MP	BL VI	2	0,3	+

Sintomas fracos (+) = leve palidez nas nervuras; sintomas fortes (++) = palidez nas nervuras proporcionalmente maior; sintomas muito fortes (+++) = suberização e curvamento do limbo.



**Figura 4:** Média geral dos 4 anos analisados em cada município (fonte: Ciagro).

O Quadro 6 indica comparações entre clones originais e respectivos microenxertados pré-imunizados de uma mesma cultivar, e entre cultivares, dentro da região.

**Quadro 6: Valores médios para produção e qualidade dos frutos dos clones Olímpia, Ipiquã, IAC e IAC 2000**

Clone	Reg	Produção kg/pl	Peso fruto	Altura	Largura	R. suco	Acidez	Brix	S. sol	Ratio	Frutos/ox
Olímpia	1	43,02 sA	148,37 sA	6,75 sA	6,41 sA	53,47 sA	0,71 sA	10,20 sA	2,23 sA	14,93 sA	276,87 sA
	2	36,61 sA	120,93 sB	6,25 sA	5,97 sB	46,81 sB	0,94 sA	11,15 sA	2,12 sA	11,80 sA	342,75 sA
	3	15,40 sB	103,37 sB	5,71 sB	5,58 sB	43,25 sB	0,84 sA	10,28 sA	1,81 sB	12,51 sA	419,75 sB
Olímpia MP	1	48,89 sA	155,75 sA	6,62 sA	6,63 sA	54,11 sA	0,73 sA	9,76 sA	2,16 sA	14,03 sA	263,87 sA
	2	45,94 sA	125,62 sB	6,25 sA	6,15 sA	50,36 sA	0,80 sA	10,72 sA	2,18 sA	13,26 sA	327,60 sA
	3	12,36 sB	85,06 sC	5,52 sB	5,28 sB	42,17 sB	0,93 sA	10,76 sA	1,81 sB	12,62 sA	508,37 sB
Cv %	14,65	14,12	6,90	5,40	9,17	21,10	13,79	10,08	30,62	19,06	

Clone	Reg	Produção kg/pl	Peso fruto	Altura	Largura	R. suco	Acidez	Brix	S. sol	Ratio	Frutos/ox
IAC	1	55,41 sA	169,27 sA	7,07 sA	6,73 sA	55,48 sA	0,70 sA	10,16 sA	2,30 sA	15,07 sA	242,37 sA
	2	53,27 sA	148,93 sA	6,83 sA	6,45 sA	54,13 sA	0,79 sA	9,95 sA	2,20 sA	12,72 sA	277,75 sA
	3	27,84 sA	115,25 sB	6,35 sA	5,80 sB	48,90 sA	0,88 sA	10,07 sA	2,01 sA	11,77 sA	361,75 sB
IAC MP	1	54,69 sA	173,93 sA	7,17 sA	6,78 sA	51,98 sA	0,73 sA	10,1 sA	2,15 sA	14,05 sA	240,37 sA
	2	53,53 sA	149,06 sA	6,86 sA	6,46 sA	53,53 sA	0,82 sA	9,93 sA	2,17 sA	12,16 sA	276,37 sA
	3	23,69 sB	111,18 sB	6,18 sB	5,76 sB	46,82 sA	0,88 sA	10,36 sA	1,95 sA	11,93 sA	380,87 sB
Cv %	14,00	13,06	6,89	4,91	8,56	19,87	11,78	12,04	16,65	15,71	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam região e letras maiúsculas comparam os clones. Reg 1 = Cajabi; Reg 2 = Cordeirópolis; Reg 3 = Capão Bonito e Itapetininga.



**Continuação Quadro 6: Valores médios para produção e qualidade dos frutos dos clones Olímpia, Ipiquá, IAC e IAC 2000**

Clone	Reg	Produção kg/pl	Peso fruto	Altura	Largura	R. suco	Acidez	Brix	S. sol.	Ratio	Frutos/cx
IAC2000	1	52,64 s A	175,10 s A	7,16 s A	6,76 s A	53,05 s A	0,72 s A	10,32 s A	2,23 s A	15,31 s A	237,62 s A
	2	44,75 s A	156,68 s A	7,08 s A	6,63 s A	50,82 s A	0,74 s A	10,15 s A	2,10 s A	13,71 s A	266,37 s A
	3	38,57 s A	150,00 s A	6,98 s A	6,45 s A	50,80 s A	0,86 s A	10,02 s A	2,07 s A	11,97 s A	278,75 s A
IAC2000	1	56,87 s A	179,00 s A	7,21 s A	6,81 s A	52,37 s A	0,69 s A	9,62 s A	2,05 s A	14,03 s A	239,12 s A
	2	44,91 s A	181,75 s A	7,57 s A	6,91 s A	51,96 s A	0,74 s A	9,52 s A	2,03 s A	13,00 s A	227,75 s A
	3	41,61 s A	155,31 s A	7,07 s A	6,51 s A	51,45 s A	0,84 s A	10,17 s A	2,15 s A	12,60 s A	272,25 s A
Cv %	14,60	15,66	7,96	5,66	4,08	23,96	16,19	16,32	18,31	16,62	

Clone	Reg	Produção kg/pl	Peso fruto	Altura	Largura	R. suco	Acidez	Brix	S. sol.	Ratio	Frutos/cx
IPIQUA	1	36,73 s A	156,18 s A	6,86 s A	6,58 s A	54,11 s A	0,67 s A	10,21 s A	2,24 s A	15,76 s B	263,37 s A
	2	54,21 s A	133,43 s A	6,56 s A	6,15 s A	50,77 s A	0,91 s B	11,15 s A	2,29 s A	12,30 s A	313,75 s A
	3	85,26 s B	136,93 s A	6,67 s A	6,18 s A	53,03 s A	0,94 s B	10,63 s A	2,30 s A	11,53 s A	303,25 s A
IPIQUA	1	54,69 s A	164,25 s B	7,08 s A	6,66 s B	52,72 s A	0,77 s A	9,72 s A	2,08 s A	12,83 s A	251,50 s A
	2	53,17 s A	131,56 s A	6,61 s A	6,18 s A	50,93 s A	0,83 s A	10,46 s A	2,16 s A	12,52 s A	316,75 s B
	3	96,57 s B	125,12 s A	6,50 s A	6,00 s A	51,43 s A	0,99 s B	10,81 s A	2,27 s A	11,06 s A	335,50 s B
Cv %	14,02	12,74	5,76	5,52	6,16	13,69	11,18	8,66	16,74	13,84	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam região e letras maiúsculas comparam os clones. Reg 1 = Cajobi; Reg 2 = Corderópolis; Reg 3 = Capão Bonito e Itapetinga.

As cultivares, Ipiгуá, Olímpia, IAC e IAC 2000 destacam-se por apresentarem alta produtividade e boa qualidade dos frutos. No entanto, para os clones amostrados no presente estudo dessas cultivares, houve grande diferença de desempenho de acordo com a região de implantação. Em relação aos dados de produção, as análises não indicaram diferenças entre os clones das diferentes cultivares e tratamentos nos municípios de Cajobi e Cordeirópolis. No município de Capão Bonito, porém, a cultivar IAC 2000, em ambos os tratamentos, destacou-se significativamente em relação às demais, apresentando um maior desempenho em relação à produção. De um modo geral, as cultivares que se destacaram na produção em relação às demais foram, em ordem decrescente, 'Ipiгуá', 'IAC 2000', 'IAC' e 'Olímpia', para ambos os tratamentos (QUADRO 7).

Da mesma maneira que ocorreu nas análises de vigor das plantas, as comparações estatísticas quanto à qualidade dos frutos demonstraram grande semelhança entre as cultivares em Cajobi e Cordeirópolis, em ambos os tratamentos (QUADROS 6 e 7). Generalizando, os valores obtidos para o teor de sólidos solúveis estão abaixo da média esperada para a laranja 'Pêra', que é de 2,5 Kg/caixa (FIGUEIREDO, 1991). Da mesma forma, um índice de acidez maior está relacionado aos frutos menores, sendo comumente observada a produção de frutos menores como um sintoma de tristeza nas plantas afetadas por isolados mais severos (MULLER, 1993). A relação tamanho do fruto/acidez condiz com os dados do Quadro 6.

O Quadro 7 ilustra as principais características observadas em plantas afetadas por tristeza. As comparações nesse quadro indicam a produção, relação A/L, rendimento do suco e frutos por caixa entre as cultivares, de forma geral.

**Quadro 7: Valores médios para os dados de produção, relação altura/largura, rendimento de suco e frutos por caixa de clones de laranja 'Pêra' em 3 regiões do Estado de São Paulo.**

Clone	Produção	A/L	Rd. Suco	Frutos/caixa
Olímpia	31,67 a	1,04 a	47,84 a	346,45 c
Olimpia MP	35,76 a	1,02 a	48,88 a	366,58 c
IAC	45,51 b	1,06 b	52,84 b	293,95 b
IAC MP	45,97 b	1,06 b	50,78 b	299,20 b
IAC 2000	45,32 b	1,07 b	51,55 b	260,91 a
IAC 2000 MP	47,80 b	1,08 b	51,92 b	246,37 a
Ipiguá	58,73 b	1,06 b	52,64 b	293,45 b
Ipiguá MP	68,14 b	1,07 b	51,70 b	301,25 b
	CV: 14,65 %	CV: 2,80%	CV: 7,21 %	CV: 16,83%

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-

Knott a 5% de probabilidade

As análises estatísticas do Quadro 6 demonstram que a produção da cultivar Olímpia foi semelhante nos municípios de Cajobi e Cordeirópolis, tanto para o isolado original de CTV quanto para microenxertado pré-imunizado com o PIAC. As plantas dessa cultivar, localizadas em Capão Bonito, tiveram as maiores notas para sintomas de tristeza, em ambos os tratamentos, o que refletiu na qualidade dos frutos e na produção (15,4 kg/planta para original, e 12,3 kg/planta para microenxertada), diferindo estatisticamente das outras regiões quanto a esses parâmetros. O peso por fruto foi maior em Cajobi (148,3 g para clone original e 155,7 g para microenxertado), seguido por Cordeirópolis (120,9 g para original e 125,6 g para microenxertado). As plantas de Olímpia no pomar de Capão Bonito apresentaram o pior desempenho nesse quesito, tendo o clone microenxertado se diferenciado ainda mais com menor peso do que o original (85 g e 103 g, respectivamente). Para altura e largura do fruto, Cajobi e Cordeirópolis tiveram os clones originais e micro enxertados com valores semelhantes, acima de 6 cm de altura e largura, dimensões consideradas satisfatórias para o mercado de

frutas frescas. Capão Bonito, com menor índice, teve o tamanho do fruto abaixo de 6 cm de altura e largura, dimensão considerada insatisfatória (DOMINGUES et al. 1999).

Para rendimento de suco, os clones dessa cultivar apresentaram melhor produção em Cajobi (53,47% para o clone original e 54,11% para MP). No entanto, na média geral, Olímpia foi a cultivar que menos produziu (QUADRO 7). De acordo com Figueiredo (1991), a variedade Pêra produz frutos com alto teor de suco, com média de 52% de rendimento, acima de outras variedades que apresentam média de 40 a 45% (DOMINGUES et al. 1999). Para brix não houve diferença entre os clones de todas as regiões e tratamentos. Para acidez, os frutos das plantas amostradas possuem níveis de 0,6 a 0,9%, conseguindo maiores valores de sólidos solúveis. Para as variedades normalmente processadas, as taxas de ratio normalmente variam de 6 a 20 durante a maturação, sendo ideal a faixa de 11 a 14 para a industrialização (DOMINGUES et al. 1999). Em relação ao número de frutos por caixa, novamente, as plantas de Cajobi e Cordeirópolis não diferiram, apresentando um valor menor, devido ao maior tamanho dos frutos. Em Capão Bonito as plantas de Olímpia apresentam um maior número de frutos por caixa que os demais (419 frutos/ caixa para original, e 508, 37 para microenxertado pré-imunizado), sendo também, essa cultivar, a que apresentou maior número de frutos por caixa na média geral (QUADRO 7).

Para a cultivar 'Pêra IAC' as produções em Cajobi (55,41 kg/planta para original e 54,69 kg/planta para MP) e Cordeirópolis (53,27 kg/planta para original e 59,53 kg/planta para MP) não diferiram entre si, enquanto os clones instalados no município de Capão Bonito apresentaram menores rendimentos (27,84 kg/planta para original e 23,69 kg/planta para MP). Para peso, largura e frutos por caixa, as plantas cultivadas em Cajobi e Cordeirópolis novamente foram superiores às de Capão Bonito, nos dois tratamentos. Para rendimento de suco, brix e sólidos solúveis por caixa, não houve diferenças entre os clones, independente da região. Os frutos das plantas amostradas indicaram acidez com níveis de 0,6 a 0,9%, e ratio na faixa de 11 a 14. Para rendimento de suco, os clones dessa cultivar produziram uma média aproximada de 54% para original e 52% para

microenxertado em Cajobi e Cordeirópolis, e média de 48,9% para original e 46,8% para MP em Capão Bonito.

A cultivar IAC 2000 não apresentou diferença significativa em qualquer um dos itens avaliados, quando teve seu rendimento comparado entre regiões pela análise de qualidade dos frutos e produção (45,3 kg/planta para original e 47,8 kg/planta para MP). Os frutos das plantas amostradas indicaram acidez com níveis de 0,6 a 0,9%, e ratio na faixa de 11 a 14. Para rendimento de suco, os clones dessa cultivar foram melhor em Cajobi (53% para original e 52% para microenxertado). Nas regiões de Cordeirópolis e Capão Bonito, a média foi de 50,8% para original e 51,5% para MP. Comparado os dados de qualidade dos frutos com as demais cultivares, indica ser a que melhor se adapta às condições de Capão Bonito, condizendo com as análises sintomatológicas.

Os clones originais e microenxertados pré-imunizados da cultivar 'Ipiguá' no experimento de Itapetininga obtiveram rendimento superior às demais cultivares de todas as regiões, destacando se pela alta produção (85,26 kg/planta para original e 96,57 kg/planta para MP), mesmo com notas mais altas na avaliação visual da sintomatologia da tristeza em relação às plantas das regiões Noroeste e Central. Pela produção geral, não houve diferença significativa entre as cultivares 'IAC' e 'IAC 2000' (QUADRO 7). Provavelmente, o melhor desenvolvimento vegetativo e produção da Pêra Ipiguá em Itapetininga devem-se ao alto investimento no manejo da cultura pela empresa administradora desse pomar experimental. Nos itens altura do fruto, rendimento de suco, brix e sólidos solúveis por caixa, não houve diferenças entre os clones nas diferentes regiões. No item ratio, somente o clone original de Pêra Ipiguá em Itapetininga diferiu, tendo valor médio de 15,76. Para rendimento de suco, de maneira geral, os clones dessa cultivar produziram numa faixa de 52% para original e 51% para microenxertado pré-imunizado.

## **4.2. Caracterização Molecular dos isolados de CTV por meio da Análise SSCP**

Em todos os perfis eletroforéticos dos produtos da PCR, realizada após a síntese da 1ª fita de cDNA (DNA complementar), foi observado um segmento de aproximadamente 670 pb, correspondente ao tamanho do GCP (SEKIYA et al., 1991).

As variações observadas na intensidade das bandas revelam diferenças na concentração dos produtos amplificados. Provavelmente, esta variação é devida as diferentes concentrações de cDNA, utilizado como molde nas reações de amplificação (TARGON et al., 1997).

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 da mesma cultivar em dois tratamentos, original e microenxertado pré-imunizado, entre cultivares, com o isolado controle fraco 'Pêra IAC', e entre controles fortes 'Capão Bonito' e 'Barão B'.

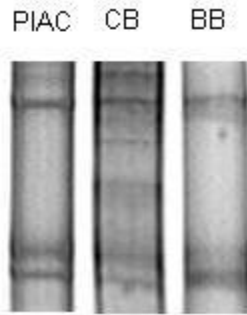
Devido à presença, concentração e posição de fragmentos em cada perfil eletroforético, demonstrou-se que cada isolado de CTV presente nas plantas, encontra-se constituído por uma mistura de haplótipos do vírus, assim como tem sido observado, por outros autores, nos perfis de SSCP de isolados brasileiros de CTV (CORAZZA NUNES et al., 2001, 2006; CARRARO, 2003; SOUZA e MÜLLER, 2006).

A análise SSCP dos produtos da RT-PCR dos isolados de CTV, obtidos das cultivares de 'Pêra' nos quatro pomares amostrados, mostrou, de modo geral, a ocorrência de distintos padrões eletroforéticos (FIGURAS 6, 7, 8 e 9). Como pode ser observado, variações nos padrões SSCP entre os isolados de CTV infectando a variedade Pêra ocorreram em todos os pomares entre tratamentos de um mesmo clone e, em muitos casos, dentro de um mesmo tratamento. Para os mesmos tratamentos, padrões semelhantes entre os isolados das repetições seriam esperados, uma vez que as plantas foram formadas a partir de

propagações de uma mesma matriz infectada por CTV. Portanto, os padrões diferentes podem ser devidos a inoculações e alterações naturais ao longo da condução dos experimentos.

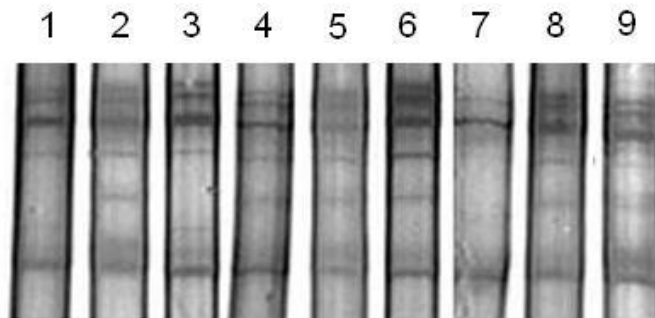
Como pode ser observado na Figura 9, todos os perfis eletroforéticos dos isolados de CTV que infectam as plantas do experimento instalado em Cordeirópolis apresentaram padrões de bandas distintos aos do controle PIAC, embora conservem a maioria de seus componentes. Os padrões SSCP dos tratamentos 'Pêra IAC' original (1, 2, 3) e MP (4, 5, 6) apresentaram-se bastante similares, mesmo entre tratamentos, porém com um maior número de bandas quando comparados ao perfil do controle PIAC. Perfis com grande complexidade de bandas também foram observados nos isolados da cultivar IAC 2000 original (7, 8, 9) e MP (10, 11, 12), sendo as três repetições deste último tratamento semelhantes entre si. Similaridade de padrão de bandas também foi observada entre as três repetições de Olímpia original (13, 14, 15), ao contrário do tratamento MP (16, 17, 18), no qual os perfis dos isolados diferiram no número e posição de algumas bandas intermediárias. Na cultivar Ipiguá, semelhanças entre padrões foram identificadas entre as amostras 19 e 21 do tratamento original (19, 20, 21) e entre a amostra 22 do tratamento MP (22, 23, 24).

De um modo geral, padrões semelhantes foram observados nas amostras 7, 10, 11, 12, 16, 22, que apresentaram os principais componentes do perfil eletroforético do controle Pêra IAC. O segundo grupo, constituído pelas amostras 2, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 21 e 23, diferiu dos perfis eletroforéticos do primeiro grupo e do controle Pêra IAC pela presença de uma ou mais bandas fracas intermediárias. A maioria das plantas de todas essas cultivares apresentaram, pela análise da sintomatologia, um bom desempenho em relação à tristeza.



**Figura 5:** Padrões eletroforéticos dos isolados controles ‘Pêra IAC’, ‘Capão Bonito’ e ‘Barão B’, respectivamente, obtidos pela técnica de SSCP.

<b>Sintomas gerais de tristeza</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Caneluras nos ramos</b>	1	0	1,3	2	0,3	1	2,3	1	0
<b>Indexação biológica</b>	+	+	++	+	++	+	+	+	++

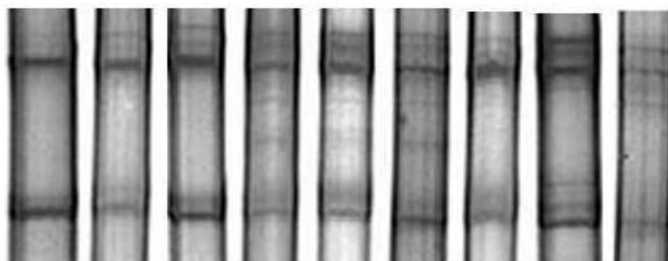


**Figura 6.1:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cordeirópolis, com respectiva sintomatologia.



<b>Sintomas gerais de tristeza</b>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<b>Caneluras nos ramos</b>	2	1,3	0,7	2	0	2,7	0,7	1	2
<b>Indexação biológica</b>	+	+	+	++	+	+	+	+	+

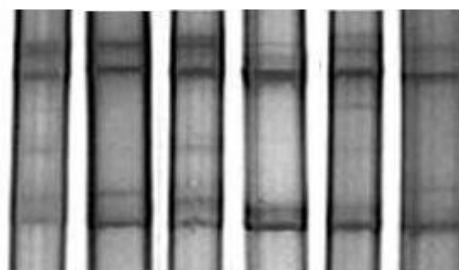
10 11 12 13 14 15 16 17 18



**Figura 6.2:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cordeirópolis, com respectiva sintomatologia.

<b>Sintomas gerais de tristeza</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Caneluras nos ramos</b>	1	1	2	0,3	1	2
<b>Indexação biológica</b>	++	+	+	++	+	+

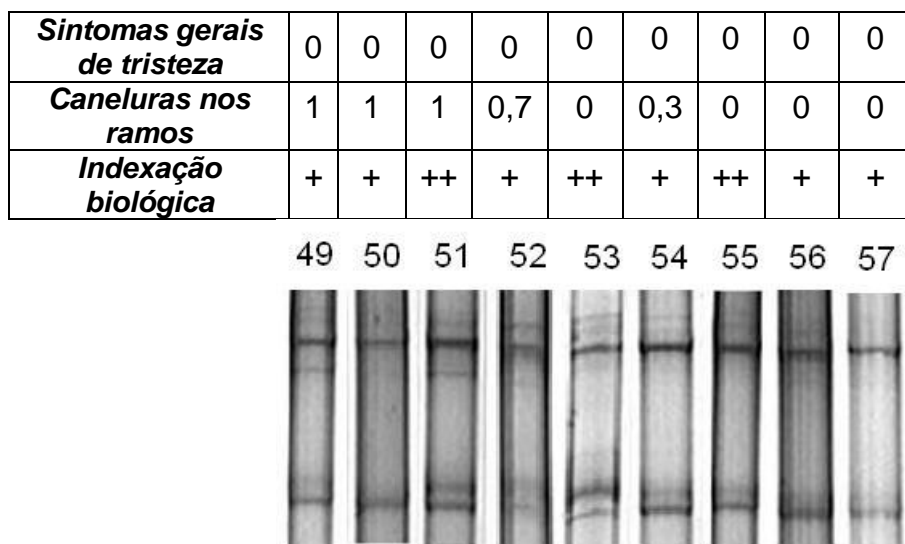
19 20 21 22 23 24



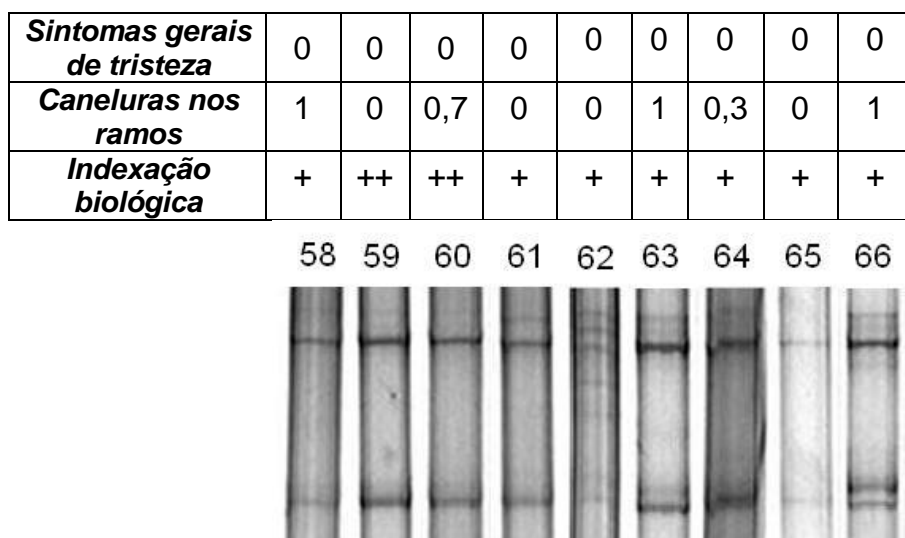
**Figura 6.3:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cordeirópolis, com respectiva sintomatologia.

A maioria dos perfis eletroforéticos de SSCP dos isolados das plantas originais e microenxertadas pré-imunizadas de Cajobi (Figura 7), independente do clone, exibiu o padrão de bandas predominantes do controle fraco PIAC (Figura 5), apresentando-se, também, bastante semelhantes aos dos grupos um e dois de Cordeirópolis. Padrões mais distintos foram observados nas amostras 49, 51, 62, 68, 70, 71, 72 (IAC, IAC, Olímpia, Ipiguá, Ipiguá MP, Ipiguá MP, Ipiguá MP), porém essas plantas apresentaram sintomas fracos e moderados de tristeza.

O bom desempenho de todas as plantas dos pomares de Cordeirópolis e Cajobi em relação à tristeza sugere que, ao lado da manutenção de componentes do complexo protetivo, na maioria delas, isolados que induzem sintomas fracos a moderados de tristeza estão sendo disseminados por afídeos vetores nessa região, com maior frequência do que os fortes. Essa hipótese pode explicar, também, o fato de clones originais de Olímpia e Ipiguá apresentarem padrões semelhantes ao controle IAC. Deste modo, a distribuição de material microenxertado e pré-imunizado, independente da cultivar, e também da variedade, constitui um benefício pela possibilidade de diminuir gradativamente fontes de inóculos severos, impedindo sua dispersão por enxertia ou pulgões (CARVALHO et al., 1997, 2003; MULLER, 1999).

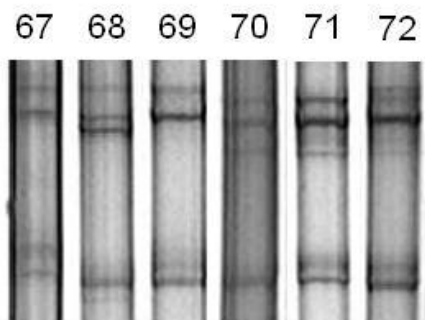


**Figura 7.1:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cajobi, com respectiva sintomatologia.



**Figura 7.2:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cajobi, com respectiva sintomatologia.

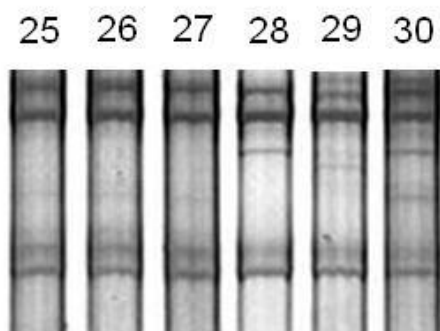
<b>Sintomas gerais de tristeza</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Caneluras nos ramos</b>	0,3	1	0,3	0,3	0	0,7
<b>Indexação biológica</b>	+	+	+	+	+	+



**Figura 7.3:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Cajobi, com respectiva sintomatologia.

Pela análise de SSCP, os isolados das plantas dos tratamentos de Itapetininga diferiram do PIAC pela presença de algumas bandas intermediárias (FIGURA 8). Os clones da cultivar Ipiguá micro enxertados pré-imunizados, 28, 29 e 30, diferiram dos clones originais, 25, 26, 27, pela presença de bandas mais fracas na região central do perfil eletroforético. Os clones originais foram os que apresentaram perfis de bandas mais próximos ao do controle PIAC. A correlação com os resultados observados para as plantas indica que houve a estabilização de um complexo com novo padrão molecular, devido a uma possível competição entre os diferentes haplótipos do vírus. A manutenção da capacidade protetiva do isolado utilizado na pré-imunização pode ser comprovada com a alta produção (QUADRO 6). Embora o complexo tenha se estabelecido em novas conformações, o conjunto de haplótipos presente na planta não permitiu que variantes severos, predominantes nessa região, sobrepujassem a proteção.

<b>Sintomas gerais de tristeza</b>	3	2	2	2	2	2
<b>Caneluras nos ramos</b>	0,3	1,7	1	0	0,3	0,3
<b>Indexação biológica</b>	+	+	+	+	+	+



**Figura 8:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas de 'Pêra Ipiquá' do município de Itapetininga, com respectiva sintomatologia.

Como podemos observar nos perfis eletroforéticos do GCP dos isolados do experimento de Capão Bonito (FIGURA 9), nenhum dos padrões de bandas apresentaram-se idênticos ao do controle PIAC. Apesar de conservarem os componentes principais do isolado protetivo, todas as repetições do clone 'Pêra IAC' original (31, 32 e 33) e do clone 'Pêra IAC' MP (34, 35, 36) exibiram acréscimo de bandas superiores e intermediárias, ou ausência de uma das bandas inferiores, apresentando padrões similares entre si. Os padrões eletroforéticos das repetições do clone 'Pêra IAC 2000' original (37, 38, 39) apresentaram-se bastante similares e diferiram do controle pela ausência de uma das bandas inferiores, mantendo, porém os demais componentes. No tratamento MP desse clone, o perfil da amostra 41 apresentou-se mais próximo ao do controle, ocorrendo um acréscimo de bandas além dos componentes principais do PIAC, nas amostras 40 e 42. Padrões distintos ao PIAC foram também observados na maioria das repetições de Olímpia original e MP, sendo o perfil da amostra 48 mais similar ao controle. A alteração dos padrões eletroforéticos em todos os clones e tratamentos desse experimento, principalmente pelo acréscimo

de bandas, sugerem a adição de novos haplótipos de CTV, constituindo outras combinações.

Alguns dos isolados dos clones de plantas presentes nesse pomar, tanto originais quanto microenxertadas pré-imunizadas, independente da cultivar, apresentaram, em seus perfis eletroforéticos, os componentes principais do perfil do controle forte 'Capão Bonito' (31, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 44 e 47), com acréscimo ou ausência de uma ou outra banda superior ou intermediária (FIGURA 9).

De acordo com a avaliação da sintomatologia, essas plantas apresentaram sintomas moderados a fortes de tristeza na observação do pomar, porém, baixa intensidade de caneluras e fraca reação em 'Galego' (QUADRO 4). Por outro lado, de um modo geral, a produção dos clones de todas as cultivares foi menor nessa região (QUADRO 6). Os dados do aspecto geral das plantas no pomar, produção e SSCP, sugerem que haplótipos do complexo severo ainda estão sendo disseminados por afídeos vetores nessa região, constituindo novas combinações.

Um dos principais sintomas induzidos pelos componentes do complexo Capão Bonito é a presença de grande número de caneluras superficiais. Assim, as baixas notas atribuídas a esse caráter podem sugerir que as novas combinações de haplótipos de CTV presentes nessas plantas não estão induzindo sintomas de canelura, apesar de afetar a produção, o crescimento e desenvolvimento vegetativo de algumas delas.

Dessa forma, por meio da técnica de SSCP e sintomatologia, pode-se afirmar que o isolado PIAC não apresenta a mesma estabilidade na região, e que isolados fortes de CTV estão infectando algumas dessas plantas. Por outro lado, padrões SSCP semelhantes entre plantas com caneluras fortes, e entre plantas com sintomas fracos ou moderados de caneluras, foram constatados por Corazza-Nunes et al. (2006) em plantas de pomelos. Nesse contexto, ressalta-se a necessidade de maiores estudos nas avaliações da correlação de padrões moleculares com sintomatologia.

<b>Sintomas no porte</b>	2	3	2	3	2	3	2	2	2
<b>Caneluras nos ramos</b>	0,3	0,7	2	0,3	0,7	0,3	1,7	0,3	1,7
<b>Indexação biológica</b>	+	+	++	+	+	+	+++	+	+++

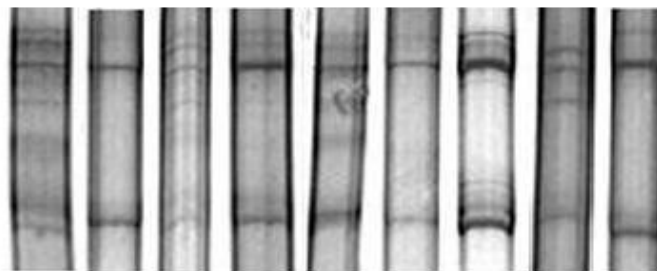
31 32 33 34 35 36 37 38 39



**Figura 9.1:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Capão Bonito, com respectiva sintomatologia.

<b>Sintomas no porte</b>	3	1	3	4	3	3	4	3	4
<b>Caneluras nos ramos</b>	0	0	2,3	0,7	0	2,7	1	1	0
<b>Indexação biológica</b>	+	+	+	+	+	++	+++	++	+

40 41 42 43 44 45 46 47 48



**Figura 9.2:** Padrões eletroforéticos obtidos pela técnica de SSCP dos isolados presentes nas plantas do município de Capão Bonito, com respectiva sintomatologia.

Os dados de diversidade dos padrões de bandas nos perfis eletroforéticos podem sugerir, também, que a distribuição de variantes do vírus na hospedeira pode ser alterada durante a sua transmissão por enxertia e pelo afídeo, ou mesmo durante a infecção sistêmica. Segundo Ayllón et al. (2006), novas conformações podem ser obtidas entre seqüências recombinantes de RNAs homólogos, influenciando na diversidade genética e biológica do vírus. Outros fatores como as condições ambientais, populações de afídeos, mudanças climáticas globais, microclimas, tipos de solo, vegetação nas cercanias da propriedade, e mesmo práticas culturais das diferentes áreas, podem ter contribuído para estruturar as populações de CTV.

Apesar das variações observadas nos padrões SSCP e poucos sintomas de caneluras em ramos de plantas do grupo 'Pêra' (MÜLLER et al., 2005), o complexo PIAC continua sendo indicado em programas de pré-imunização de variedades de laranja doce. Devido à ampla distribuição e alta eficiência do *T. citricida* Kirk, a tristeza é endêmica no Brasil e as plantas são expostas ao contato com o CTV em menor ou maior espaço de tempo (MÜLLER e COSTA, 1991). A estratégia de pré-imunização também garante a difusão e eventual dispersão por afídeos, nos futuros pomares, de complexos ou variantes mais brandos e com pouco desenvolvimento de sintomas de tristeza, contribuindo assim para a redução da pressão por complexos severos de CTV. (CARVALHO et al, 2001).

A principal limitação da análise por SSCP é que diferenças não podem ser quantificadas em termos de distância genética entre fragmentos de DNA correspondentes (RUBIO et al., 2001). Ela ainda mostra somente uma característica qualitativa da variação. Pequenas mutações na região de priming no RT-PCR (com primers derivados da seqüência consenso do T36) podem excluir variantes, permitindo uma subestimação das variações, assim como acontece com seqüências variantes indistinguíveis num perfil. No entanto, estudos conduzidos por Rubio et al. (2001), nos quais foram usados seqüenciamentos de clones em cima desses perfis indistinguíveis, mostram que a técnica de SSCP ainda é um método muito eficiente, pois as variações obtidas são mínimas.



Analisando-se a complexidade e tamanho do genoma do CTV, há inúmeras possibilidades de alterações genéticas. Como demonstrado por Ayllón et al. (2006), após propagações com troca de hospedeiro, o mesmo isolado pode se diferenciar nas novas plantas. Esses dados podem explicar as diferentes combinações de haplótipos nas cultivares, após a microenxertia e pré-imunização. Isto significa que pode ocorrer especificidade entre variantes no complexo CTV e a cultivar hospedeira (SOUZA et al., 2000).

Dessa forma, estudos da estabilidade de isolados do CTV em plantas matrizes em diferentes condições ambientais tornam-se relevantes para monitoramento da estabilidade da proteção cruzada e, potencialmente, para a seleção de complexos mais estáveis que ofereçam melhor proteção contra complexos severos do CTV.

## 5. CONCLUSÕES

Os dados referentes a sintomatologia, produção e teste biológico revelaram que as plantas instaladas nos pomares dos municípios de Cajobi e Cordeirópolis, região Noroeste e Central do Estado de São Paulo, com médias mais altas de temperatura, apresentaram melhor desempenho em relação à tristeza.

Plantas com sintomas mais severos de tristeza foram identificadas no pomar do município de Capão Bonito, localizado na região Sul do estado. Essa região apresentou temperatura média mais baixa do que as outras regiões estudadas, sugerindo uma correlação entre sintomas severos de tristeza e decréscimo de temperatura.

Sugeriu-se que o fato de plantas instaladas no município de Itapetininga, também sob influência de temperaturas mais baixas apresentarem um desempenho satisfatório em relação à tristeza, seja devido ao alto investimento da empresa administradora desse pomar experimental.

Dentre as cultivares da região Sul, afetadas pela tristeza, a cultivar 'Pêra IAC 2000' apresentou melhores resultados em relação à produção e qualidade dos frutos.

Os clones originais e respectivos clones microenxertados pré-imunizados de cada cultivar apresentaram comportamentos semelhantes em relação à sintomatologia da tristeza dentro de uma mesma região.

A análise de SSCP revelou que, apesar da mudança do perfil original, a capacidade protetiva do vírus fraco utilizado na pré-imunização foi mantida nos pomares dos municípios de Cajobi e Cordeirópolis, regiões noroeste e central do estado, com a maioria das plantas apresentando um perfil semelhante ao PIAC.

Padrões de SSCP semelhantes entre plantas com fortes sintomas de caneluras e plantas com sintomas fracos ou moderados ressaltam a necessidade de maiores estudos da correlação de padrões moleculares com sintomatologia, talvez sendo necessária a utilização de um maior número de amostragens.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIACH - MARTÍ, M. R., GUERRI, J.; MENDOZA, A. H; LAIGRET, F.; BALLESTER – OLMOS, J. F.; MORENO, P. **Aphid Transmission Alters the Genomic and Defective RNA Populations of *Citrus tristeza virus* Isolates** *Phytopathology*, v.90, p.134-138, 2000.

AYLLÓN, M. A.; LÓPEZ, C.; NAVAS - CASTILLO, J.; MAWASSI, M.; DAWSON, W. O. **New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation.** *J. Gen. Virol.* 80, p. 817–821, 1999.

AYLLÓN, M. A., GOWDA, S., SATYANAYANANA, T., KARASEV, A. V., E DAWSON, W. O. **Cis-acting elements at opposite ends of citrus tristeza virus genome differ in initiation and termination of sub genomics RNAs.** *Virology*, 322, p. 41-50, 2004.

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*, 32, 119–128, 2006.

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

BALLESTER-OLMOS, J. F.; PINA, J. A.; CARBONELL, E. A.; MORENO, P.; HERMOSO DE MENDONZA, A.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L. **Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain.** *Plant Pathol.* 42: 219-229, 1993.

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

BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G. **Comparison of particles characteristics and cytopathology of *Citrus tristeza virus* by the melon aphid.** *Phytopathology*, 63, 716-720, 1973.

BAR-JOSEPH, M. e LEE, R. F. ***Citrus tristeza virus*.** *AAB Descriptions of Plant Viruses*. 1989.

BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R. F. **The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control.** *Annual Rev. 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*, 126: 374 – 380, 1982.

BOTEON, M.; NEVES, E. M. **Citricultura brasileira: aspectos econômicos.** *In:* MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros.** Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p. 19-36, 2005.

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.

CARVALHO, S. A. **Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros.** *Fitopatologia Brasileira*. V. 22, p. 79-84, 1997.

CARVALHO, S. A. MACHADO, M. A.; MÜLLER, G. W.; COLETTA FILHO H. D. **Produção de borbulha básica para formação de mudas de citros sadias em São Paulo.** *Laranja, Cordeirópolis*, v.22, n.1, p. 185-201, 2001.

CARVALHO, S. A. **Regulamentação atual da Agência de defesa Agropecuária para a produção, estocagem, comércio, transporte e plantio de mudas cítricas no Estado de São Paulo.** *Laranja*, v. 24, p. 199-239, 2003.

CARVALHO, S. A.; GRAF, C. C. D.; VIOLANTE, A. R. **Produção de material básico e propagação.** *In:* MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros.** Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, p. 279-316, 2005.

CHE, X.; MAWASSI, M.; BAR-JOSEPH, M. **A novel class of large and infectious defective RNAs of Citrus tristeza virus.** *Virology*, 298, 133–145, 2002.

CHE, X.; DAWSON, W. O.; BAR-JOSEPH, M. **Defective RNAs of Citrus tristeza virus analogous to Crinivirus genomic RNAs.** *Virology*, 310, 298–309, 2003.

Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – Cipagri – Unicamp. (<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>), acessado em janeiro de 2009.

Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas - Ciagro - do Instituto Agrônomo de Campinas <http://www.ciiagro.sp.gov.br>, acessados em 14 de janeiro de 2009.

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. **Characterization of Citrus tristeza virus (CTV) isolates en grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) varieties from a Citrus Active**

**Germplasm Bank.** *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 322-327, 2006.

DOLJA, V. V.; KREUZE, J. F.; VALKONEN, J. P. T. **Comparative and functional genomics of closteroviruses.** *Virus Research*, 117, 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* p. 161–184. New York: Raven Press, 1994.

DOMINGUES, E. T.; SOBRINHO, J. T.; NETO, A. T.; JUNIOR, D. M. **Seleção de clones de laranja ‘Pêra’ e variedades assemelhadas quanto à qualidade do fruto e período de maturação.** *Laranja*, v. 20, nº2, p. 433 – 455, Cordeirópolis, 1999.

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

D’URSO, F., AYLLÓN, M.A., RUBIO, L., SAMBADE, A., HERMOSO DE MENDOZA, A., GUERRI, J.; MORENO, P. **Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission.** *Plant Pathol.* 49, 288–294, 2000.

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.** *Mol. Ecol.* 12, 517–526, 2003.

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MORENO, P.; NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. **Viral-like symptoms induced by the ectopic expresión of the p23 of Citrus tristeza virus are citrus specific and do not correlate with the patogenicity of the virus strain.** *Mol. Plant–Microbe Interact.* 18, p. 435– 445, 2005.

FERGUSON, J. J.; GARNSEY, S. M. **Citrus viruses and virus-like diseases.** Universidade da Flórida – Circular, n. 1131, dezembro, 1993.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados.** Lavras: UFLA, (SISVAR 4.1 pacote computacional) 2000.

FIGUEIREDO, J. O. **Variedade copa de valor comercial.** In: RODRIGUEZ, O; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR, J. AMARO, A. A. (eds.). **Citricultura Brasileira.** 2ª Ed. Campinas, SP: Fundação Cargill, v. 1, p.228-264, 1991.

GANDÍA, M.; CONESA, A.; ANCILLO, G.; GADEA, J.; FORMENT, J.; PALLÁS, V.; FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; MORENO, P.; GUERRI, J. **Transcriptional response of *Citrus aurantifolia* to infection by *Citrus tristeza virus*.** *Virology*, 367, 298–306, 2007.

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 spatial patterns of spread of citrus tristeza.** *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, p. 120–129. Riverside, CA, 1996.

GOWDA, S.; SATYANAYANANA, T.; DAVIS, C. L.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH- MARTÍ, M. R.; MAWASSI, M.; VALKOV, N.; BAR-JOSEPH, M.; MORENO, P.; DAWSON, W. O. **The p20 gene product of Citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies.** *Virology*, 274, p. 246–254, 2000.



GOWDA, S.; SATYANAYANANA, T., AYLLÓN; M. A., ALBIACH-MARTÍ; M. R.; MAWASSI, M.; RABINDRAN, S.; DAWSON, W.O. **Characterization of the cis-acting elements controlling sub genomic mRNAs of Citrus tristeza virus: production of positive-and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5' terminal RNAs.** *Virology*, 286, p. 134–151, 2001.

GREVE, A.; PRATES, H. S.; MÜLLER, G. W. **Produção de borbulhas certificadas de Citros no Estado de São Paulo.** *In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F. Citricultura Brasileira.* Campinas: Fundação Cargill, 2ª Ed., V 1, p. 302-317, 1991.

HILF, M.E., KARASEV, A.V., PAPPU, H.R., GUMPF, D.J., NIBLETT, C.L.; GARNSEY, S.M. **Characterization of citrus tristeza virus sub genomic RNAs in infected tissue.** *Virology*, 208, p. 576–582, 1995.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE - ([http://www.ibge.gov.br/mapas\\_ibge/default.php](http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/default.php)), acessados em 15 de janeiro de 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.

KARASEV, A. V.; HILF, M. E.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, W. O. **Transcriptional strategy of closteroviruses: mapping the 5'-termini of the Citrus tristeza virus subgenomic RNAs.** *J. Virol.* v.71, p 233-236, 1997.

KARASEV, A. V. **Genetic diversity and evolution of closterovirus.** *Annu. Rev. 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.** *Proc. 3rd conf. Int. Orga. Citrus Virol.*, pag 1-9, Univ. Fla, Gainesville, 1965.

LEE, R. F.; BAKER, P. S.; ROCHA-PENÃ, M. A. **The *Citrus tristeza virus* (CTV), and introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation.** *Central America and the Caribbean.* International Institute of Biological Control Berks, UK, 197, 1994.

LU, R.; FOLIMONOV, A.; SHINTAKU, M.; LI, W. X.; FALK, B. W.; DAWSON, W. O.; DING, S. W. **Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome.** *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2004

MACHADO, M. A., CRISTOFANI, M., AMARAL, A. M., OLIVEIRA, A. C. **Genética, melhoramento e biotecnologia de citros.** *In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. Citros.* Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p. 221-277, 2005.

MEISSNER FILHO, P. E.; SOARES FILHO, W. S.; VELAME, K. V. C.; DIAMANTINO, E. P.; DIAMANTINO M. S. A. S. **Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*.** *Fitopatol. bras.*, 2002.

MORENO, P.; GUERRI, J.; MUNHOZ, N. **Identification of Spanish strains of *Citrus tristeza virus* (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA).** *Phytopathology*, 80, p. 477-482, 1990.

MORENO, P., GUERRI, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., ALBIACH, R. AND MARTÍNEZ, M.E. **Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis.** *Plant Pathol.* 42, p. 35–41, 1993.

MORENO, P. E GUERRI, J. **Variability of citrus tristeza closterovirus (CTV): methods for differentiating isolates.** *In: Filamentous Viruses of Woody Plants* (MONETTE, P., ED.), pp. 97–107. Trivandrum, India: Research Signpost, 1997.

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACHI – MARTÍ, M. R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. **Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry.** *Molecular plant pathology*, p. 251-268, 2008.

MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; GUIRADO, N. **Results from premmunization tests to control the Capão Bonito strain of Tristeza.** *Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, 10<sup>th</sup>, p. 82-85, 1988.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. **Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros.** *Citricultura Brasileira*, v.2, 2<sup>a</sup> ed., Fundação Cargill, Campinas, 1991.

MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. **Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros.** Doenças dos citros causadas por algas, bactérias, fungos e vírus. 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. P. N.; MACHADO, M. A. **Trinta anos de uso do clone pré-imunizado ‘Pêra IAC’ na citricultura paulista.** *Laranja*, Cordeirópolis, v.20, p.399, 1999.

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.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. Citros.* Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p. 567-604, 2005.

NEVES, M. F.; JANK, M. S.; LOPES, F. F.; TROMBIM, V. G. **Ações para aumentar a competitividade da cadeia da laranja no Brasil.** Laranja, Cordeirópolis, v. 27, n 2, p. 213-229, 2006.

PASSOS, O. S. **Premunização contra tristeza (CTV) como técnica obrigatória no melhoramento de citros – uma experiência vivida nos trópicos.** *Fitopatologia Brasileira*, n.22, 1997.

PIO, R. M.; FIGUEIREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. B. **Variedades copas.** In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros.** Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, p. 37- 60, 2005.

POMPEU JUNIOR, J. **Rootstock and Scions in the Citriculture of the São Paulo State.** In: Int. Cong. Citrus nurserymen, 6, Ribeirão Preto, p. 331, 2001.

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*. 83: p. 989 – 991, 1999.

RACCAH, B., LOEBENSTEIN, G. AND SINGER, S. **Aphid-transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees.** *Phytopathology*, 70, 89–93, 1980.

RAI, M. **Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region.** *Plant Mol. Biol.* 61, 399–414, 2006.

REZENDE, J. A. M.; MÜLLER, G. W. **Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por pré-imunização.** *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, n.3, p.185-226, 1995.

ROCHA-PENÃ, M. A.; LEE, R. F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C. L.; OCHOA-CORONA, F.; GARNSEY, S. M.; YOKOMI, R. K. **Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricidus* - Threats to citrus production in the Caribbean and central and North America.** *Plant Disease*, n.79, p. 437-445, 1995.

ROISTACHER, C. N.; BAR - JOSEPH. **Transmission on *Citrus tristeza virus* (CTV) by *Aphis gossipii* and by graft inoculation to and from Passiflora species.** *Phytophylactica*, p.179-182, 1987.

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

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; GUERRI, J.; MORENO, P. **Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination.** *Journal of Virology*, p.8054-8062, 2001.

RUIZ-RUIZ S.; MORENO, P.; GUERRI, J.; AMBROS, S. **A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of *Citrus tristeza virus* in different plant tissues,** *Science Direct*, Valencia – Spain, 2007.

SALIBE, A. A. **Aspectos da citricultura mundial.** *1º Encontro paranaense de citricultores. Anais*, Londrina, pag. 11-29, Março, 1986.

SALIBE, A. A. **Clones nucleares de citros no estado de são Paulo.** *Laranja*. Cordeirópolis, v. 2, p. 443-466, 1987.

SALIBE, A. A.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; MÜLLER, G. W. **Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'**. *Laranja*, Cordeirópolis, v.23, n.1, p.231-245, 2002.

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*, p.257-265, 2002.

SAMBADE, A., LÓPEZ, C., RUBIO, L., FLORES, R., GUERRI, J.; MORENO, P. **Polymorphism of a specific region in the gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows differentiation between mild and severe isolates**. *Arch. Virol.* 148, 2281–2291, 2003.

SAMBADE, A., AMBRÓS, S., LÓPEZ, C., RUIZ-RUIZ, S., HERMOSO DE MENDOZA, A., FLORES, R., GUERRI, J.; MORENO, P. **Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants coinoculated with mild and severe variants**. *Arch. Virol.* 152, 1115–1126, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual, cold spring harbor laboratory**. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SAS Institute **User's Guide: Statistics, Version 9.1**. Cary: SAS Institute, 2002.

SATYANAYANANA, T.; GOWDA, S.; BOYKO, V. P.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; MAWASSI, M.; NAVAS-CASTILLO; J., KARASEV, A. V.; DOLJA, V.; HILF, M. E.; LEWANDOWSKY, D. J.; MORENO, P.; BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, W. O. **An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 7433–7438, 1999.

SATYANAYANANA, T.; GOWDA, S.; MAWASSI, M.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; AYLLÓN, M. A.; ROBERTSON, C.; GARNSEY, S. M.; DAWSON, W. O. **Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly.** *Virology*, 278, p. 253–265, 2000.

SATYANARAYANA, T.; GOWDA, S.; AYLLÓN, M. A.; ALBIACH-MARTÍ, M. R.; RABINDRAM, R.; DAWSON, W. O. **The p23 protein of Citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation.** *J. Virol.* 76, p. 473–483, 2002.

SATYANAYANANA, T.; GOWDA, S.; AYLLÓN, M. A.; DAWSON, W. O. **Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 799–804, 2004.

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

SENTELHAS, P. C. **Agrometeorologia dos citros.** *In:* MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. **Citros.** Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, p. 317-344, 2005.

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.** *Proc. 14<sup>th</sup> Conf IOCV*, p.136-140. IOCV, Riverside, CA, 2000.

SOUZA, A. A.; MULLER, G. W. **A premunização no controle da tristeza dos citros.** *Laranja*, v. 27, p. 57-70, 2006.

TARGON, M. L. P. **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.; NIKOLAEVA, O.; MANJUNATH, K. L.; LEE, R. F.; MULLER, G. W.; MACHADO, M. A. **Coat protein gene of a Brazilian isolate of the *Citrus tristeza virus*: cloning, expression in E. Coli and production of polyclonal antiserum.** *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.99-102, 1997.

TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; GUIRADO, N.; BARBIN, D. **Resultados de experimento de clones de laranja 'Pêra' enxertados sobre limão 'Cravo'.** *Laranja*, Cordeirópolis, n. 9, p. 209 - 223, 1988.

TEÓFILO SOBRINHO, J. et al. **Melhoramento de clones de laranjeira Pêra no Estado de São Paulo.** *In: Cong. Bras. Fruticultura*, 4, Salvador. Anais... Salvador: sociedade brasileira de fruticultura, p. 111-116, 1997

TEÓFILO SOBRINHO, J. et al. **A laranja 'Pêra IAC 2000'.** *Laranja*, v. 22, p. 495-501, 2001.

YANG, G., MAWASSI, M., GOFMAN, R., GAFNY, R. AND BAR-JOSEPH, M. **Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective citrus tristeza virus molecules.** *J. Virol.* 71, 1997.

YANG, G., CHE, X., GOFMAN, R., BEN SHALOM, Y., PIESTUN, D., GAFNY, R., MAWASSI, M. AND BAR-JOSEPH, M. **D-RNA molecules associated with subisolates of the VT strain of *citrus tristeza virus* which induce different seedling-yellows reactions.** *Virus Genes*, 19, 5–13, 1999.

ZERBINI, F. M., ALFENAS P. F.; ANDRADE, E. C. **O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus.** *RAPP* – Volume 13, 2005.