

ALESSANDRA TENÓRIO COSTA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CLONES DE LARANJA
PÊRA EM RELAÇÃO AO *Citrus tristeza virus* NAS CONDIÇÕES DE
CAMPO DO NORTE PARANAENSE**

MARINGÁ-PARANÁ-BRASIL

FEVEREIRO - 2009

ALESSANDRA TENÓRIO COSTA
BIÓLOGA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CLONES DE LARANJA
PÊRA EM RELAÇÃO AO *Citrus tristeza virus* NAS CONDIÇÕES DE
CAMPO DO NORTE PARANAENSE**

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 - 2009

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

C837e Costa, Alessandra Tenório
Estudo do comportamento de diferentes clones de laranja Pêra em relação ao *Citrus tristeza virus* nas condições de campo do norte paranaense / Alessandra Tenório Costa. -- Maringá : [s.n.], 2009.
64 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração: Proteção de Plantas, 2009.

1. *Citrus tristeza virus* (CTV). 2. Clones de laranja Pêra. 3. Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP). 4. Sintomatologia da tristeza dos citros. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. II. Título.

CDD 21.ed. 634.318

ALESSANDRA TENÓRIO COSTA

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CLONES DE LARANJA
PÊRA EM RELAÇÃO AO *Citrus tristeza virus* NAS CONDIÇÕES DE CAMPO
DO NORTE PARANAENSE

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

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. **Dauri José Tessmann**

Dr. **Gerd Walter Müller**

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

Dedico

Aos meus pais, Jurandir e Dalva.

Aos meus irmãos, Alex e Aline.

À minha cunhada, Simoni

Aos meus familiares

Ao meu amor Júnior,

Carinhosamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado me dando força, coragem e esperança para superar todas as dificuldades desta caminhada, servindo sempre como fonte de muita fé.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Mário de Carvalho Nunes, pela orientação, incentivo, oportunidade e amizade ao longo de todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Gerd Walter Müller pelos ensinamentos e atenção.

À Prof^a. Dra. Maria Júlia Corazza pela valiosa colaboração desde o início de minhas atividades científicas.

A Cooperativa Agroindustrial de Rolândia (COROL) pela instalação do experimento e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) por possibilitar a realização do experimento e pelo envio de material para o estudado.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo envio de materiais.

A grande amiga Rúbia de Oliveira Molina, pelo apoio, colaboração, atenção e ajuda especial na realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Carlos Alexandre Zanutto pela ajuda nas viagens a campo, coleta do material, auxílio no laboratório, por toda a amizade, paciência e apoio.

Ao técnico José Alcides Remolli pelo auxílio nas viagens a campo e coleta de material, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos de todos os dias, membros do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA-UEM): Inaiara dos Santos, Fernanda Meira, Walter Magri Temporal, Andréia Kazumi, Marilda Caixeta, Akemi Yamamoto, e a todos que passaram pelo Núcleo.

Ao colega Marcus Vinícius Kvitschal pela atenção.

Aos professores, funcionários e colegas da pós-graduação do Centro de Treinamento de Irrigação (CTI), pela harmoniosa convivência de todos os dias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade concedida para a efetivação deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo auxílio financeiro.

A minha família e ao Júnior, pelo incentivo, paciência, compreensão e colaboração em todos os momentos.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ALESSANDRA TENÓRIO COSTA, filha de Jurandir Tenório Costa e Dalva Aparecida Tenório Costa, nascida em Maringá, no Estado do Paraná, aos seis dias do mês de maio de 1981.

Graduou-se em Ciências Biológicas Licenciatura, em dezembro de 2006, pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Iniciou, em março de 2007, o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Maringá vindo a concluí-lo aos vinte e sete de fevereiro de 2009.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1.1 INTRODUÇÃO.....	01
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
1.2.1 Citricultura Paranaense.....	04
1.2.2 A Tristeza dos Citros.....	05
1.2.2.1 Descoberta, Sintomatologia e Danos causados.....	05
1.2.2.2 Disseminação e Modo de Transmissão.....	08
1.2.2.3 Morfologia e Caracterização Biológica do CTV.....	10
1.2.2.4 Controle.....	12
1.2.2.5 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) para caracterização de isolados do CTV.....	14
1.3 REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO-I: SELEÇÃO DE CLONES DE LARANJA PÊRA [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ TOLERANTES Á TRISTEZA DOS CITROS.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
2.1 INTRODUÇÃO.....	25
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
2.4 CONCLUSÕES.....	37
2.5 REFERÊNCIAS.....	38

CAPÍTULO-II: PADRÕES SSCP DE ISOLADOS DO <i>Citrus tristeza vírus</i> APÓS SUCESSIVAS PROPAGAÇÕES EM DIFERENTES CLONES DE LARANJA PÊRA [<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES DE CAMPO DO NORTE PARANAENSE.....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	42
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.1 Origem dos isolados de CTV.....	43
3.2.2 Extração do Genoma Viral.....	45
3.2.3 Síntese da primeira fita de cDNA e Amplificação do Gene do Capsídeo (GCP).....	45
3.2.4 Análise de SSCP.....	46
3.2.5 Coloração do gel não desnaturante de poliacrilamida.....	47
3.2.6 Análise dos perfis eletroforéticos.....	47
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.4 CONCLUSÕES.....	60
3.5 REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

BAG= Banco Ativo de Germoplasma de Citros

cDNA= DNA complementar

CTV= *Citrus tristeza virus*

COROL= Cooperativa Agroindustrial de Rolândia

DNA= Ácido desoxirribonucléico

DICER= Enzima RNA III

dsRNA= RNA fita dupla

dNTPs= Desoxirribonucleosídeos trifosfatados

DTT= Dithiothreitol

EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético

GCP= Gene da capa protéica

H= Altura da planta

IAPAR= Instituto Agronômico do Paraná

IBGE= Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IAC= Instituto Agronômico de Campinas

Índice de Produtividade= Kg/m³ de copa

Kb= Kilobase

mg= Miligrama

ml= Mililitro

mM= Milimolar

µl= Microlito

µg= Micrograma

nM= Nanômetro

ORFs= “Open reading frames” (Matriz de leitura aberta)

PCR= Reação da polimerase em cadeia

Primers= Iniciadores da PCR

PTGS= Silenciamento Gênico Pós-Transcricional

Random Primers= Oligonucleotídeos aleatórios

rcf= Força centrífuga relativa

RNA= Ácido ribonucléico

RNAse OUT= Inibidor de RNA

RFLP= “Restriction Fragment Length Polymorphism” (Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

RISC= Complexo de Silenciamento RNA-induzido

R= Raio da copa

Rácio= Cálculo da relação sólidos solúveis/ácidez total

RT= Transcriptase reversa

ssRNA= RNA de fita simples

SSCP= “Single Strand Conformational Polymorphism” (Polimorfismo conformacional de fita simples)

siRNA= Pequeno RNA de interferência

UPGMA = “Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages” (Método com medias não ponderadas de grupos pareados)

V= Volume da copa

RESUMO

COSTA, Alessandra Tenório. Universidade Estadual de Maringá, Fevereiro de 2009. **ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE DIFERENTES CLONES DE LARANJA PÊRA EM RELAÇÃO AO *Citrus tristeza virus* NAS CONDIÇÕES DE CAMPO DO NORTE PARANAENSE.** Professor Orientador: Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

O Estado do Paraná tem possibilitado nos últimos anos o desenvolvimento da citricultura, principalmente nas regiões Norte e Noroeste do Estado. Dentre os problemas fitopatológicos que atingem essa cultura, a tristeza dos citros, doença causada pelo closterovírus *Citrus tristeza virus* (CTV), destaca-se ainda hoje por ser considerada altamente destrutiva para cultivares cítricos sensíveis ao vírus. Observações realizadas em pomares comerciais paranaenses sugeriram que os clones de laranja Pêra, neles implantados, nem sempre se comportam de maneira satisfatória em relação à tristeza. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sintomatologia da tristeza em treze diferentes clones de laranja Pêra e verificar a estabilidade ao longo dos anos, dos isolados de CTV presentes em alguns desses clones, através dos padrões eletroforéticos SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) do gene da capa protéica (GCP) nas condições edafoclimáticas do Norte paranaense. O estudo foi realizado em um pomar experimental implantado no município de Arapongas. Os clones são provenientes de acessos do IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) e de clones naturalmente infectados selecionados em pomares do Estado de São Paulo e também do Paraná. Foram realizadas avaliações da intensidade de caneluras nos troncos e ramos, desenvolvimento vegetativo, índice de produtividade e qualidade dos frutos nos anos de 2005 e 2008. Desses clones, cinco foram selecionados para a análise molecular, onde os isolados sofreram várias comparações. Para isso, o genoma viral foi extraído e empregado na amplificação do GCP por meio das reações de RT-PCR. Os produtos da PCR foram desnaturados e submetidos à eletroforese, sendo em seguida,

analisados os perfis eletroforéticos dos isolados. A avaliação sintomatológica e molecular revelou que os isolados protetivos presentes na maioria dos clones avaliados estão contribuindo para o bom desempenho dessas plantas, com a estabilidade dos isolados sendo mantida ao longo dos anos, com exceção dos isolados presentes nos clones de Pêra Vimusa 66B e Pêra Seleção 37, porque quando comparado o resultado molecular à sintomatologia da doença, verificou-se a ocorrência de uma provável quebra de proteção.

Palavras chaves: clones, CTV, sintomatologia, SSCP e estabilidade.

ABSTRACT

COSTA, Alessandra Tenório, Maringá State University, February, 2009. **STUDY OF THE BEHAVIOR OF DIFFERENT CLONES OF PÊRA ORANGE, IN RELATION TO *Citrus tristeza virus*, UNDER FIELD CONDITIONS IN NORTHERN OF PARANÁ STATE.** Advisor: Dr. William Mário de Carvalho Nunes.

Parana State has allowed in recent years the development of citriculture, mainly in Northern and Northwestern State. Among the phytopathological problems affecting this culture, the citrus tristeza disease, caused by the *Citrus tristeza virus* (CTV) closterovirus, still today, stands out for being considered highly destructive for citric cultivars sensitive to the virus. Observations carried out in commercial orchards in Parana State suggested that the clones of Pêra orange, there implanted, do not always behave in a satisfactory manner in relation to the tristeza. The objective of this work was to evaluate the symptomatology of tristeza in thirteen different clones of Pêra orange, and check the stability over the years of the isolated of CTV present in one of these clones, through the SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) electrophoretic standards of the coat protein gene (CPG) under edaphic-climatic conditions of Northern Parana. The study was carried out in an experimental orchard implanted in Arapongas city. The clones are from IAPAR (Parana Agronomic Institute) and from naturally infected clones selected in orchards from the States of São Paulo and Parana. It was made evaluations of stria intensity in trunks and branches, of vegetative growth, of fruit quality and of productivity index in the years 2005 and 2008. Five of these clones were selected for molecular analysis, where the isolated one suffered several comparisons. To do so, the viral genome was extracted and employed in the amplification of CPG through the reactions of RT-PCR. The products of PCR were denatured and submitted to electrophoresis, then it was analyzed the isolated electrophoretic profiles. The symptomatologic and molecular evaluations revealed that the protective isolated present in most of the evaluated clones are contributing to the proper

performance of these plants, with the stability of the isolated ones being maintained over the years, however, with the exception of the isolated present in clones of 66B Vimusa Pêra and 37 Selection Pêra, because when compared the molecular result with the symptomatology of the disease, it was verified the occurrence of a probable breakdown of cross-protection.

Key words: clones, CTV, symptomatology, SSCP and stability.

1.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de plantas cítricas está distribuído por diversos Estados do Brasil, destacando-se pelo seu excelente desempenho e expressiva importância sócio-econômica. A produção brasileira de laranja, em 2008, foi de 18.580.697 milhões de toneladas com uma área cultivada de aproximadamente 821.124 hectares (IBGE, 2008).

A citricultura brasileira baseia-se no cultivo de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], variedades Pêra, Valência e Natal, com atual destaque para a Valência por seu progressivo aumento na produção de mudas (POMPEU JUNIOR et al., 2004). No entanto, a variedade mais importante ainda é a Pêra devido a sua qualidade e grande aceitação nos mercados interno e externo de frutas frescas e industrialização (SALIBE et al., 2002; PIO et al., 2005). As plantas dessa variedade possuem tecidos sensíveis a diversas doenças dentre elas a tristeza dos citros causada pelo closterovírus *Citrus tristeza virus* (CTV).

Nos anos de 1930 e 1940, o setor citrícola nacional foi seriamente afetado em função da suscetibilidade das laranjas doces ao CTV levando ao extermínio de milhões de árvores enxertadas em laranja Azeda [*Citrus aurantium* L.] (MÜLLER e COSTA, 1991). A recuperação dos pomares somente ocorreu mediante a adoção de medidas de controle. Inicialmente, com a substituição do porta-enxerto, de laranja Azeda pelo limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), seguidos pela limpeza clonal e, posteriormente, pela pré-imunização com o isolado fraco do vírus denominado 'Pêra IAC' (MÜLLER e COSTA, 1977; MÜLLER et al., 1999)

No Brasil, a tristeza é uma doença endêmica devido à presença cosmopolita do vetor, o pulgão preto *Toxoptera citricida* Kirk, e da plasticidade do CTV, que resulta na ocorrência de uma grande diversidade de haplótipos do vírus. Por isso, somente com a adoção das medidas de controle tornou-se possível conviver com a doença. Entretanto, ela ainda é preocupante, pois contribui para a redução da produtividade dos pomares no país (DIAS, 2002).

Os sintomas mais característicos da doença são: presença de caneluras (depressões no lenho) (MEISSNER-FILHO et al., 2002), atrofiamento da planta, folhas e frutos reduzidos (BORDIGNON et al., 2003a), e folhas com aspecto de clorose (semelhante à deficiência de nutrientes) (MÜLLER et al., 1999). Mas esses sintomas podem variar conforme a espécie hospedeira (copa e porta-enxerto) (ROCHA-PEÑA et al., 1995; BORDIGNON et al., 2003a).

Há aparente sensibilidade das populações de CTV à mudanças de plantas hospedeiras, à transmissão por afídeos e à mistura de populações causada pelas múltiplas inoculações de afídeos em árvores no campo ou por práticas culturais. Essas situações podem explicar, em parte, a ampla biologia, serologia e variabilidade molecular tradicionalmente observada entre os isolados de CTV (AYLLÓN et al., 1999).

O Estado do Paraná vem se destacando nos últimos anos pelo incremento da fruticultura em especial o cultivo de laranjas. A cultura de citros tem conseguido conviver bem com a tristeza, mesmo sendo os pomares paranaenses formados por mudas de diferentes origens, especialmente do Estado de São Paulo, introduzidas muitas vezes sem o devido controle fitossanitário (LEITE, 1992; LOLLI, 2007).

No Paraná, estudos de plantas infectadas pelo CTV ainda são poucos. Os trabalhos realizados basearam-se em observação de sintomas, seguidos de diagnóstico imunológico com análise de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) e análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Nesses estudos, a existência de isolados fortes foi verificada na região Norte do Estado (NAKATANI et al., 1997; CARRARO et al., 2003; ZANINELLI-RÉ, 2004).

Nos últimos anos, a citricultura paranaense encontra-se consolidada com os pomares exibindo alta qualidade, sanidade e vigor, sendo um modelo não apenas em citricultura de alto padrão, mas um respeitado centro irradiador de tecnologia nessa área (JARDIM-JÚNIOR, 2007).

Diante dessas constatações os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar a sintomatologia da tristeza em diferentes clones de laranja Pêra nas condições edafoclimáticas da região Norte do Estado do Paraná;

- Verificar a estabilidade de isolados do CTV ao longo dos anos, presentes em alguns desses clones, através dos padrões eletroforéticos SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) do gene da capa protéica.

A partir desses estudos elaboraram-se dois trabalhos:

-SELEÇÃO DE CLONES DE LARANJA PÊRA [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ TOLERANTES À TRISTEZA DOS CITROS.

-PADRÕES SSCP DE ISOLADOS DO *Citrus tristeza virus* APÓS SUCESSIVAS PROPAGAÇÕES EM DIFERENTES CLONES DE LARANJA PÊRA [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES DE CAMPO DO NORTE PARANAENSE.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 CITRICULTURA PARANAENSE

A história da citricultura paranaense iniciou-se com a produção de citros na região do Alto Ribeira, tradicional região produtora de tangerinas, principalmente nos municípios de Cerro Azul e Adrianópolis (MORIMOTO, 1990), espalhando-se para outras regiões a partir da implantação do projeto de produção de laranjas nas regiões Norte, Noroeste e Oeste do Estado (DORETTO e SHIKI, 1987).

No entanto, com a ocorrência nessas regiões do cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006), a produção comercial de citros ficou interdita por três décadas (DORETTO e SHIKI, 1987). Em 1986, foi apresentada uma proposta para a prevenção do cancro cítrico tornando possível assim, a retomada da citricultura do Estado do Paraná (LEITE, 2007).

Os pomares de laranja Pêra das regiões Norte e Noroeste foram formados por mudas ou borbulhas originárias de sucessivas propagações clonais de plantas pré-imunizadas do Estado de São Paulo e eventualmente da Bahia, bem como, de plantas não pré-imunizadas, ou seja, infectadas naturalmente por haplótipos fracos do *Citrus tristeza virus* (CTV) que foram selecionadas de pomares comerciais de várias localidades, ou ainda de plantas contendo tecidos tolerantes ao vírus. Além disso, muitas introduções foram realizadas sem o devido controle de patógenos (LEITE, 1992).

Segundo Leite (2007), em 1978 paralelamente às pesquisas sobre o cancro cítrico, o IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná) desenvolveu um sistema de produção de material sadio que permitiu, após certo período, a produção de material propagativo livre das principais doenças dos citros, com alta qualidade genética e fitossanitária. Dessa forma, criou-se lotes de plantas matrizes e estabeleceu-se borbulheiras, inicialmente, em nível de campo e que hoje se encontram teladas.

Por apresentarem as melhores condições edafoclimáticas para o cultivo dos citros, as regiões Norte e Noroeste se destacam. A produção paranaense é voltada para o consumo interno e exportação de suco concentrado, levando o Estado a integrar o quinto lugar no ranking de maior produtor de frutas cítricas do país (MÜLLER et al., 2005). De acordo com os dados do IBGE (2008), o Paraná apresentou uma produção de 504.400 toneladas de laranja, participando com 2,7% da safra nacional.

Apesar disso, ainda existem poucos estudos sobre a tristeza no Estado, principalmente nas regiões produtoras. O primeiro trabalho realizado baseou-se em observação de sintomas (NAKATANI et al., 1997), seguido de diagnóstico imunológico juntamente com análise de SSCP (CARRARO et al., 2003) e análise de RFLP associada à sintomatologia (ZANINELLI-RÉ, 2004). Essas pesquisas revelaram a existência de isolados severos de CTV em pomares de laranja Pêra da região Norte, demonstrando que nesta região nem todos os clones se comportam de maneira satisfatória em relação à doença.

1.2.2 A TRISTEZA DOS CITROS

1.2.2.1 Descoberta, Sintomatologia e Danos causados

A tristeza dos citros, causada pelo closterovírus *Citrus tristeza virus* (CTV), tem como centro de origem as regiões subtropicais da Ásia e arquipélago Malaio. Esses são os locais de origem da maioria das espécies de citros (MÜLLER, 1976). Essa doença foi registrada pela primeira vez, no início do século passado, na África do Sul e Austrália onde variedades de laranja doce (*C. sinensis*) demonstravam incompatibilidade quando enxertadas em laranja Azeda. Essa mesma incompatibilidade foi observada em outras regiões do mundo (BENNETT e COSTA, 1949; BAR-JOSEPH et al., 1989; ROISTACHER e MORENO, 1991; ROCHA-PEÑA et al., 1995; MÜLLER e REZENDE, 2004).

A denominação de tristeza foi empregada por Moreira (1942 citado por Muller, 1976) para designar uma moléstia de natureza então desconhecida que afetava combinações de laranjas doces enxertadas em laranja Azeda. A

tristeza foi observada na Argentina em 1930, e no Brasil em 1937, nos pomares de citros do vale do Paraíba, São Paulo, onde inicialmente foi denominada de doença dos citros no Vale do Paraíba (BITANCOURT, 1940 citado por MÜLLER, 1976).

Após a devastação provocada pela doença nos pomares da América do Sul, muitas teorias foram apresentadas para tentar explicar os seus efeitos. Dentre elas: a incompatibilidade fisiológica entre copa e porta enxerto, acidez do solo e deficiência de vários tipos de nutrientes, toxicidade do solo, períodos prolongados de seca, infecção por nematóides, organismos patogênicos e infecção viral (BENNETT e COSTA, 1949).

De acordo com Bennett e Costa (1949), após vários estudos em 1944, A.A. Bitancourt apresentou a teoria de que a tristeza era causada por um vírus. No entanto, a primeira evidência experimental confirmando esta teoria só foi relatada em 1946 por M. Meneghini. Nessa mesma época, Fawcett e Wallace conseguiram demonstrar que a transmissão também ocorria através da enxertia de mudas e borbulhas. No Brasil, Bennett e Costa (1949) confirmaram a transmissão da doença por meio do pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida* Kirk) e por enxertia de mudas contaminadas.

O CTV infecta muitas espécies de citros, variedades, híbridos e alguns parentes de citros. As únicas hospedeiras conhecidas fora das Rutáceas são certas espécies de *Passiflora* (MÜLLER, 1976; BAR-JOSEPH et al., 1989).

Os primeiros sintomas da doença estariam associados com a acumulação excessiva de carboidratos e de outros produtos na copa das árvores. Os demais sintomas poderiam ser influenciados por um maior grau de prejuízo do sistema radicular resultante da falta de nutrientes (BENNETT e COSTA, 1949).

Entretanto, os sintomas podem variar conforme a espécie hospedeira (copa e porta-enxerto), acoplados a severidade do isolado do vírus, tempo de infecção, habilidade de proteção cruzada e condições ambientais, principalmente, de temperatura (ROCHA-PEÑA et al., 1995; BORDIGNON et al., 2003a).

Conforme descrito por Bennett e Costa (1949), os tecidos do floema dos diversos citros afetados pelo CTV podem ser classificados da seguinte forma: tolerantes, parcialmente tolerantes, intolerantes ou resistentes. Nos

chamados tolerantes, as plantas possibilitam a multiplicação do vírus nas células do floema sem que estas entrem em colapso na região da enxertia, não afetando seu crescimento e produção. Já as resistentes não permitem a multiplicação do vírus em seus tecidos. Nas plantas com tecidos intolerantes como as limas ácidas (*Citrus latifolia*), pomelos (*Citrus paradisi*) e algumas laranjas doces, o sintoma mais característicos é a redução ou paralisação do crescimento. Também podem ser encontradas plantas com aspecto normal apresentando um ou mais galhos afetados, ou galhos que se destacam, pelo seu vigor, do resto da copa afetada. As limas ácidas apresentam geralmente palidez nas nervuras em folhas jovens. Em plantas inoculadas, experimentalmente, ocorre suberificação das nervuras e folhas com tamanho reduzido e acanoadas. Em pomelos e laranja Pêra, as folhas apresentam tamanho reduzido e com sintomas de clorose semelhante à deficiência de nutrientes (MÜLLER, 1976; MÜLLER et al., 1999).

As árvores afetadas apresentam déficit na produção, predominando frutos miúdos, de coloração pálida, conformações defeituosas denominados de “coquinhos”. Além disso, ao examinar o lenho dessas plantas após a retirada da casca, observam-se sintomas de depressões conhecidos como caneluras “stem pitting”, que são impregnadas por uma substância marrom, essas podem ser encontradas tanto no tronco como nos galhos das plantas (MÜLLER, 1976; MEISSNER-FILHO et al., 2002).

Dentre os isolados do CTV presentes no Brasil, o complexo denominado de ‘Capão Bonito’ é considerado o mais severo, em função dos danos acentuados causados nas variedades de laranjas doces enxertadas sobre limão Cravo (MÜLLER et al., 1968). O complexo foi identificado, no final de 1965, em pomares do município de Capão Bonito, região Sudoeste do Estado de São Paulo, provocando baixa taxa de crescimento da planta, folhas reduzidas e com sintomas de clorose, galhos quebradiços, frutos miúdos e caneluras. Essas caneluras, porém, parecem ser ligeiramente diferentes das encontradas nas plantas afetadas pela tristeza comum, apresentando-se menores, em maior número e menos profundas (MÜLLER et al., 1968; MÜLLER, 1976).

Teófilo Sobrinho et al., (1988) investigaram clones de laranja Pêra enxertados sobre limão Cravo, infectados pelo CTV. Foram relatados dados

sobre a produção, sintomas de caneluras, desenvolvimento vegetativo, qualidade dos frutos, índice de produtividade e 'declínio' dessas plantas. A contaminação pelo CTV, aliado a outros fatores, levou de modo geral a redução das produções dos clones afetados, causando prejuízos até mesmo nos mais produtivos que também apresentaram índice de caneluras de leve a moderado, enquanto os clones menos produtivos apresentaram índices severos.

Bordignon et al., (2003b) investigaram os efeitos da tristeza em algumas características vegetativas, produtivas e industriais da laranjeira Valência, enxertada em híbridos segregados para tolerância à tristeza. Nesse estudo, os resultados revelaram que os caracteres mais afetados foram os produtivos, seguidos dos vegetativos e industriais. Verificou-se que não somente a produção e o vigor vegetativo são bastante afetados pela doença, mas também a produtividade das plantas por área, estimada pela relação da produção de frutos por área da projeção da copa.

Na sintomatologia dessa virose, um fator de destaque é que a ausência de sintomas nas plantas cítricas não significa necessariamente ausência de vírus, uma vez que as variedades consideradas tolerantes são assim classificadas pela sua facilidade em conviver com o patógeno sem expressiva redução de produção ou desenvolvimento de sintomas (BAR-JOSEPH et al., 1989).

1.2.2.2 Disseminação e Modo de Transmissão

Disseminado mundialmente por meio de mudas e borbulhas infectadas (BORDIGNON et. al., 2003a), o CTV pode ainda ser transmitido pela cuscuta (*Cuscuta subenclusa* Dur & Hilg) e também por diferentes espécies de afídeos vetores tais como: *Toxoptera citricida*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis craccivora*, *Dactynotus jaca* e *Myzus persicae* (BENNETT e COSTA, 1949; ROCHA PEÑA et al., 1995).

No Brasil, o *Toxoptera citricida* Kirk (Homoptera: Aphididae) conhecido como pulgão preto, é o vetor mais eficiente do CTV (MÜLLER, 1996). Originário da China tornou-se amplamente distribuído na Ásia, Índia, Nova

Zelândia, Austrália, Ilhas do Pacífico e América do Sul através da movimentação de borbulhas ou mudas infectadas (YOKOMI, 1994).

O pulgão preto é um inseto que possui dimensões de 1,5 mm a 2,4 mm, apresenta coloração marrom escura na forma jovem; é preto brilhante, quando adulto. Os caracteres para a sua identificação estão nas antenas e asas da fêmea alada (MÜLLER, 1996). Nessa espécie, os alados são mais bem atraídos pela cor amarela e também o mais sensível aos efeitos de repelentes, principalmente, pela casca de arroz (MÜLLER, 1996). Seus picos de revoada acontecem paralelamente com o crescimento de novas brotações.

Este vetor se move predominantemente de uma árvore para outra, além disso, pulgões virulíferos individuais são capazes de transmitir o CTV em 30 minutos após um período de aquisição de 20 minutos à 1 hora, e perderem a infectividade em 24 horas após o período de aquisição (MÜLLER, 1976; MÜLLER, 1996). A transmissão do CTV ocorre de maneira semipersistente, isto é, o vírus não se multiplica no vetor e não há período latente (BAR- JOSEPH et al., 1989).

Toledo et al., (2006) estudando a distribuição espacial de *T. citricida* na cultura de citros verificaram que o pulgão coloniza os talhões de forma moderadamente agregada, sendo que com o aumento da população ocorre maior agregação.

As interações moleculares entre o vírus e seus vetores ainda não foram totalmente esclarecidas. Herron e outros (2006) sugerem que essas interações podem ocorrer através de muitas proteínas multifuncionais do CTV que agregadas em diferentes conformações podem promover a integridade do vírion. As interações específicas ocorrem no forro cuticular dos afídeos, no tubo digestivo, incluindo a válvula e a bomba do cibário. A dissociação ou desagregação de algumas das estruturas do CTV podem ser necessárias para que essas interações específicas possam ter lugar entre a cutícula do afídeo e os componentes do vírus afim de que a transmissão ocorra.

Segundo D'urso et al., (2000) no processo de transmissão do vírus pelo afídeo dois fatores podem contribuir para alterar a população do RNA genômico. O primeiro deles refere-se à distribuição desigual de variantes do RNA genômico em diferentes partes da planta que possa resultar na aquisição de uma diferente população viral pelo pulgão dependendo do seu local de

alimentação. O segundo fator indica que afídeos individuais podem separar alguns dos variantes, mesmo se esses não estejam predominando, transmitindo assim uma subpopulação diferente da variante original. Este processo pode atuar como um gargalo, separando alguns variantes do RNA genômico e dando origem a diferentes populações que podem também diferir na expressão dos sintomas.

1.2.2.3 Morfologia e Caracterização Biológica do CTV

O CTV é um membro do gênero *Closterovirus*, que se encontra limitado ao floema das plantas cítricas, podendo ocorrer em baixa concentração nas plantas. Considerado o maior vírus de plantas, apresenta-se na forma de filamentos flexuosos com simetria helicoidal apresentando cerca de 2000 nm de comprimento por 10 a 12 nm de diâmetro (KITAJIMA et al., 1964), é composto de uma molécula de RNA de fita simples senso positivo, estimado em 19 Kb com 12 ORFs que codificam pelo menos 19 proteínas (SOUZA et al., 2002; BORDIGNON et al., 2003a; SENTANDREU et al., 2006).

Dentre essas proteínas, algumas estão associadas à maquinaria de replicação, uma proteína homóloga a HSP70, proteínas de revestimentos duplicadas e outras com função ainda desconhecidas (HILF et al., 1995; KARASEV, 2000). Possui também uma região não traduzida em cada uma das extremidades (KARASEV et al., 1995).

Além dos virions de fita única positiva de RNA encapsulados em uma capa protéica, as plantas infectadas pelo CTV contêm uma população heterogênea de pelo menos nove partículas menores de RNA subgenômicos e de RNAs de 2,0 a 5,0 Kb defectivos (BORDIGNON et al., 2003a). RNAs de fita dupla (dsRNA) que correspondem a forma replicativa completa do vírus também são observados (BAR-JOSEPH et al., 1989).

O CTV não é um único vírus, mais sim um complexo de vírus, que se encontram relacionados imunologicamente (POWELL et al., 1992), podendo ou não desenvolver sintomas em função das variedades copa e porta-enxerto.

Os isolados de CTV são compostos por uma população de variantes de sequência (RUBIO et al., 2001). Como ocorre em outras viroses de RNA, isto é

resultado do erro de leitura da RNA polimerase RNA dependente e de repetidas inoculações por afídeos em árvores no campo carregando diferentes populações virais e da recombinação entre as variantes de sequência (RUBIO et al., 2002; AYLLÓN et al., 2006).

A presença de variantes divergentes dentre os mesmos isolados abre a possibilidade da população mudar para uma sequência predominante distinta. Isso pode explicar as mudanças observadas nas características biológicas e moleculares e no processo de transmissão de alguns isolados de CTV (RUBIO et al., 2002).

A comparação da sequência do gene da capa protéica (GCP) do CTV de diversos isolados apresentou uma homologia de 90% na sequência de ácidos nucleicos e aminoácidos, existindo uma relação entre as sequência e os sintomas causados pelos isolados (NIBLETT et al., 2000). Por outro lado, análises moleculares revelaram sequências heterogêneas, acima de 40% entre diferentes isolados, em certas regiões do genoma do CTV (KARASEV et al., 1989).

Febres et al., (1996) demonstraram que a partícula do CTV possui duas proteínas no capsídeo que estão associadas, uma de 27 KDa e outra de 25 KDa, que cobrem aproximadamente 5 e 95 % da partícula viral, respectivamente. A sequência do GCP de vários isolados mostrou ser altamente conservada (HILF et al., 1999).

Os isolados de CTV são caracterizados por diferentes procedimentos, tais como: indexação biológica, reação com anticorpo monoclonal, análise de mapas de peptídeos da capa protéica, hibridização com complementaridade do DNA com sondas do genoma do CTV, análise RFLP do gene da capa protéica e análise do dsRNA das plantas infectadas (BAR-JOSEPH et al., 1989; MORENO et al., 1996; NIBLETT et al., 2000).

Até o presente, não existe um método universal para detectar e diferenciar estirpes do CTV, apesar de serem usados variedades e clones diferenciais, imunodiagnose, hibridização, RT-PCR, SSCP e RFLP (MACHADO et al., 1997; BORDIGNON et al., 2003a).

Embora o CTV pareça ser geneticamente estável em algumas hospedeiras, interações realizadas pelo homem utilizando combinações de diferentes copa e porta-enxerto sob diferentes condições ambientais podem ter

gerado variabilidade genética, posteriormente modulada por outros fatores como: recombinação, seleção, deriva genética ou fluxo gênico entre regiões (MORENO et al., 2008).

1.2.2.4 Controle

O agente causal da tristeza dos citros é um vírus transmitido pelo *Toxoptera citricida* Kirk e por enxertia de material infectado, por isso, como medida de controle, no Brasil, foi adotado o uso de porta-enxertos tolerantes em substituição à laranja Azeda. Essa medida não se mostrou completamente viável para algumas variedades de laranja doce. Dessa forma, outras medidas de controle passaram a ser estudadas, destacando-se a pré-imunização ou proteção cruzada que veio oferecer um controle satisfatório da doença (MÜLLER et al., 1999).

Os programas de pré-imunização ou proteção cruzada têm como objetivo promover a infecção de clones nucelares sadios ou microenxertados da variedade de interesse, com isolados fracos do vírus da tristeza que venha oferecer proteção contra isolados fortes, ocasionando assim um controle das manifestações severas da doença (REZENDE e MÜLLER, 1995; MÜLLER et al., 1999).

O primeiro programa de pré-imunização foi desenvolvido no Estado de São Paulo, a partir de 1961, por pesquisadores do IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), visando controlar os danos causados por isolados severos do CTV na laranja Pêra (COSTA e MÜLLER, 1980). Nesse programa, vários isolados de CTV foram selecionados nos pomares paulistas e inoculados em plantas livres de vírus. Dos clones de laranja Pêra obtidos, aquele inoculado com o isolado nº 1743/82, denominado de 'Pêra IAC', apresentou os melhores resultados e foi escolhido para formar as primeiras borbulheiras a céu aberto de São Paulo (MÜLLER et al., 1999).

Ao longo dos anos esse material foi distribuído para os citricultores de São Paulo e de diversos Estados, posicionando-se entre os melhores selecionados para a variedade (MÜLLER et al., 1999). Posteriormente, pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, no Estado da Bahia,

selecionaram os clones denominados D-6 e D-9, para as regiões Norte e Nordeste do país (PASSOS, 1997).

Um programa dessa natureza também foi recentemente instalado no Paraná por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), visando à obtenção de plantas matrizes de laranja Pêra, pré-imunizadas com isolados fracos do vírus, selecionados nas condições do Estado (COSTA et al., 2005).

O perigo da ocorrência de isolados severos do vírus que poderiam quebrar a proteção conferida às plantas pelo isolado fraco, acarretando graves prejuízos não é descartado. Por isso, a seleção de diferentes isolados fracos do vírus para serem utilizados nos trabalhos de pré-imunização de variedades suscetíveis de laranjas é de extrema importância (TARGON, 1997; MÜLLER et al., 1999).

Observações realizadas por Souza et al., (2000) revelaram a existência de plantas pré-imunizadas que apresentavam sintomas de tristeza severos. Dentre os isolados de CTV, um dos mais severos é denominado de 'Capão Bonito', pois afeta praticamente todas as variedades de laranja doce e porta-enxertos tolerantes, como o limão Cravo. O isolado protetivo da laranja 'Pêra IAC' é ineficiente na proteção contra este isolado (SOUZA et al., 2002).

Segundo Rezende e Müller, (1995) é possível que a planta hospedeira também tenha algum efeito na interação que resulta na proteção entre os isolados de um vírus. A reação dos diferentes tipos de citros à infecção viral é decorrente de duas características, sendo uma delas referente à possibilidade que o vírus tem de se multiplicar na planta e a outra à tolerância dos tecidos da planta na presença do vírus (MÜLLER, 1976).

Embora algumas propostas já tenham sido levantadas às bases moleculares da pré-imunização ainda não foram esclarecidas. Uma das hipóteses está baseada no mecanismo de silenciamento de um gene envolvido na transcrição ou também conhecido como PTGS. Zhou et al., (2002) verificaram que para a planta iniciar a PTGS como uma defesa contra a infecção utilizando isolado protetivo, deve ocorrer uma subsequente degradação do vírus desafiante, com baixa pressão do inóculo e uma alta homologia de sequências entre os dois isolados.

Neste mecanismo os dsRNAs são clivados pela DICER, produzindo siRNAs com 21-24 nucleotídeos, após a incorporação na RISC, das sequências específicas alvo da degradação do genoma viral e RNAs subgenômicos (FAGOAGA et al., 2006). A presença de siRNAs vírus-específicos é considerada uma característica da resposta antiviral que tem sido documentada nas plantas infectadas pelo CTV. De acordo com o modelo aceito de PTGS, os siRNAs derivados de isolados fracos de CTV poderiam prevenir ou atenuar a invasão subsequente por isolados severos com sua incorporação na RISC (SAMBADE et al., 2007).

1.2.2.5. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) para caracterização de isolados do CTV

A técnica de SSCP baseia-se na conformação adquirida pela sequência de nucleotídeos no gel, após a desnaturação da dupla fita de DNA que migra como dois fragmentos de DNA fita simples. A ocorrência de qualquer alteração na sequência de nucleotídeos pode resultar em uma modificação na conformação das fitas e conseqüente alteração do padrão eletroforético (SOUZA et al., 2001).

A análise dos padrões SSCP do gene da capa protéica (GCP) a partir do produto de PCR usando primers específicos vem sendo aplicada para estudos de proteção cruzada (SOUZA et al., 2000; CORAZZA-NUNES et al., 2001; SOUZA et al., 2002; KIM et al., 2006),

Ayllón et al., (1999) utilizaram os perfis eletroforéticos SSCP de dois genes p18 e p20 para comparar a estrutura da população de isolados severos de CTV e ter quantitativamente estimado a variabilidade genética desses genes dentro e entre populações.

A variação genética nas populações naturais de CTV de duas regiões genômicas (gene p20 e segmento A, localizado na ORF1a) também foi detectada por SSCP (D'URSO et al., 2003).

Rubio et al., (2000) utilizaram-se dessa técnica para detectar o menor variante de sequência na população de RNA e as mudanças ocorridas nas populações genômicas após a mudança da planta hospedeira. Os resultados

mostraram que mudanças da planta hospedeira frequentemente induzem mudanças nas populações genômicas de CTV, o que pode explicar em parte, a ampla biologia e variabilidade molecular observada entre isolados deste vírus.

Davino et al., (2005) empregaram esta mesma análise para verificar a estrutura genética das populações de CTV em três áreas de cultura de citros na Itália. Os resultados revelaram que todos os isolados coletados na mesma área mostraram o mesmo padrão SSCP. Entretanto, cada área produziu um padrão distinto, isso indicou que, dentro de cada área, a população do vírus é homogênea, enquanto entre as três áreas existem diferenças.

Leonel (2004) caracterizou através de SSCP os complexos de CTV presentes em plantas de três variedades de laranja doce, submetidos a diferentes tratamentos. Os resultados indicaram que complexos de CTV mais fortes estão infectando plantas de clones velhos das três variedades e que a estabilidade do complexo protetivo dos isolados de CTV de alguns clones microenxertados e pré-imunizados estão sendo mantidas.

No Paraná, esta técnica foi utilizada por Carraro et al., 2003 que avaliou complexos de CTV de pomares de laranja Pêra da região Norte do Estado, estabelecendo comparações com isolados severos do Estado de São Paulo. Essa técnica também foi empregada, em conjunto com a análise RFLP por Costa et al., (2006) no estudo da seleção de isolados fracos do vírus para o programa paranaense de pré-imunização.

Mesmo aliada a outras análises, ainda hoje a técnica de SSCP é muito utilizada em vários trabalhos para a identificação e caracterização do CTV (VIVES et al., 2005; CORAZZA-NUNES et al., 2006; SAMBADE et al., 2007; IGLESIAS et al., 2008).

1.3. REFERÊNCIAS

- AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. **Virology**, v.255, nº1, p.32-39, 1999.
- AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; SENTANDREU, V.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. **Virus Genes**, v.32, nº2, p.19–128, 2006.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R.; LEE, R.F. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.291-316, 1989.
- BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, nº8, p.207-237, 1949.
- BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J.; A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. **Bragantia**, v.62, nº3, p.345-355, 2003a.
- BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Efeito da tristeza em caracteres vegetativos, produtivos e industriais da laranja 'Valência' enxertadas em híbridos segregado para tolerância. **Bragantia**, v.62, nº2, p.207-215, 2003b.
- CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**, v.25, nº2, p.269-273, 2003.
- 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 virus* (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.11-16, 2001.
- CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of citrus active germplasm bank. **Summa Phytopathologica**, v.32, nº4, p.322-327, 2006.
- COSTA, A.T.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MÜLLER, G.W.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A. Caracterização molecular de isolados do *Citrus tristeza virus* com potencial para pré-imunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.751, 2005, (Suplemento).

COSTA, A.T.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MÜLLER, G.M.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; MOLINA, R.O.; MACHADO, M.A. Estudos moleculares de complexo do *Citrus tristeza virus* para uso em um programa de pré-imunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.S275, 2006, (Suplemento).

COSTA, A.S.; MÜLLER, G.W. Tristeza control by cross protection: a U.S. – Brazil cooperative success. **Plant Disease**, v. 64, nº6, p. 538-541, 1980.

DAVINO, S.; RUBIO, L.; DAVINO, M. Molecular analysis suggests that recent *Citrus tristeza virus* outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions. **European Journal of Plant Pathology**, v.111, nº3, p.289-293, 2005.

DIAS, L.C.F. **Caracterização imunológica dos anticorpos monoclonais que reconhecem proteínas do capsídeo viral do vírus da tristeza dos citros do complexo Capão Bonito**. 2002. 94f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 2002.

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 Pathology**, v.49, nº2, p.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. **Molecular Ecology**, v.12, nº2, p.517-526, 2003.

DORETTO, M.; SHIKI, S. Considerações sócio-econômicas. In: IAPAR, Londrina. Regionalização da Citricultura para o Estado do Paraná. Londrina, IAPAR, 1987. p.16 (**IAPAR. Circular, 55**).

FAGOAGA, C.; LÓPEZ, C.; MENDOZA, A.H.; MORENO, P. NAVARRO, L.; FLORES, R.; PEÑA, L. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. **Plant Molecular Biology**, v.60, nº2, p.153-165, 2006.

FEBRES, V.J.; ASHOULIN, L.; MAWASSI, M.; FRANK, A.; BAR-JOSEPH, M.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. The p27 protein is present at one of *Citrus tristeza virus* particles. **Phytopathology**, v.86, nº12, p.1331-1335, 1996.

HERRON, C.M.; MIRKOV, T.E.; DA GRAÇA, J.V.; LEE, R.F. *Citrus tristeza virus* transmission by the *Toxoptera citricida* vector: In vitro acquisition and transmission and infectivity immunoneutralization experiments. **Journal of Virological Methods**, v.134, nº1-2, p.205-211, 2006.

HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; PAPPU, H.R.; GUMPF, D.J.; NIBLETT, C.L.; GARNSEY, S.M. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. **Virology**, v.208, nº2, p.576-582, 1995.

HILF, M.E.; KARASEV, A.V.; ALBIACH-MARTI, M.R.; DAWSON, W.O.; GARNSEY, S.M. Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. **Phytopathology**, v.89, nº4, p.336-342, 1999.

IGLESIAS, N.G.; GAGO-ZACHERT, S.P.; ROBLEDO, G.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; VERA, O.; GRAU, O.; SIMORILE, L.C. Polulation structure of *Citrus tristeza virus* from field Argentinean isolates. **Virus Genes**, v.36, nº1, p.199-207, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Levantamento sistemático da produção agrícola, 2008. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>> . Acesso em: 21 set. 2008.

JARDIM-JUNIOR, J.F. O Paraná demonstrou que a realidade poderia ser bem diferente. In: Tormem, V. (ed.) **O Sucesso da Citricultura Comercial no Norte e Noroeste do Paraná**. 1ªed. Londrina: Gráfica e Editora Midiograf, 2007. 16-18p.

KARASEV, A.V.; DAWSON, W.O.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M. Molecular biology of *Citrus tristeza virus*: implications for disease diagnosis and control. **Acta Horticulturae**, v.472, p.333-337, 1989.

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. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. **Virology**, v.208, nº2, p.511-520, 1995.

KARASEV, A.V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review Phytopathology**, v.38, p.293-324, 2000.

KIM, D.H.; SHIM, H.K.; HYEON, J.W.; KWON, H.M.; KIM, K.S.; CHOI, M.S.; LEE, J.K.; KIM, D.G.; YANG, J.S.; LEE, S.C. SSCP analysis of variations in haplotypes of *Citrus tristeza virus* isolated from Yuzu (*Citrus junos*) in geographically separate regions of Korea. **Journal of Plant Biology**, v.49, nº1, p.88-96, 2006.

KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. **Nature**, v.201, p.1011-1012, 1964.

LEITE-JUNIOR, R.P. A citricultura no Paraná. In: IAPAR, Londrina. Londrina, IAPAR, 1992. (**IAPAR. Circular, 72**).

LEITE-JUNIOR, R.P. Temos hoje uma citricultura altamente desenvolvida. In: Tormem, V. (ed.) **O Sucesso da Citricultura Comercial no Norte e Noroeste do Paraná**. 1ªed. Londrina: Gráfica e Editora Midiograf, 2007. 27-33p.

LEONEL, W.M.S. **Avaliação molecular do *Citrus tristeza virus* de clones de laranja doce submetidos á limpeza clonal e pré-imunização**. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2004.

LOLLI, M.E. As dificuldades foram muitas porque tivemos que partir do zero. In: Tormem, V. (ed.) **O Sucesso da Citricultura Comercial no Norte e Noroeste do Paraná**. 1ªed. Londrina: Gráfica e Editora Midiograf, 2007. 93-95p.

MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; TARGON, M.L.P.N.; BAPTISTA, C.R.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Diagnóstico do vírus da tristeza dos citros com diferentes anticorpos monoclonais. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, nº2, p.191-194, 1997.

MEISSNER-FILHO, P.E.; SOARES-FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C; DIAMANTINO, E.; DIAMANTINO, M.S.A. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia brasileira**, v.27, nº3, p.312-315, 2002.

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

MORENO, P.; AMBRÓS, S.; ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GUERRI, J.; PEÑA, L. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. **Molecular Plant Pathology**, v.8, nº6, p.251-268, 2008.

MORIMOTO, F. Situação atual da Citricultura. In: Garcia Jr., J.B.; Croce-Filho, J.; Andrade, J.M.B.; Stenzel, N.M.C.; Leite-Junior, R.P.; Carvalho, S.L.C. (eds.) 1990. **Anais** - Encontro Paranaense de Citricultura: Associação dos Engenheiros Agrônomos do Paraná, 1990, p.51-56.

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

MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.245-263, 1976.

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

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: Rodrigues, A.; Viégas, F.; Pompeu Júnior, J.; Amaro, A.A. (eds). **Citricultura Brasileira**. 2ªed. Campinas: Fundação Cargil, 1991, v.2, 734-762p.

MÜLLER, G.W. Pulgão e tristeza dos citros no Brasil. **Laranja**, v.17, nº1, p.292-293, 1996.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, v.20, nº2, p.399-408, 1999.

MÜLLER, G.W.; REZENDE, A.M. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: Diseases of Fruits and Vegetables. 2004. **Diagnosis and Management**, 2004, v.1, p.361-395.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (eds). Capítulo 19. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005, 567-604p.

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

NIBLETT, C.L.; GENC, H.; CEVIK, B.; HALBERT, S.; BROWN, L.; NOLASCO, G.; BONACALZA, B.; MANJUNATH, K.L.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.R.; LEE, R.F. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. **Virus Research**, v.71, nº1-2, p.97-106, 2000.

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

PIO, R.M.; DE FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (eds). Capítulo 3. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundag, 2005, 39-60p.

POMPEU JUNIOR, J.; SALVA, R.; BLUMER, S. Copas e porta-enxertos nos viveiros de mudas cítricas do Estado de São Paulo. **Laranja**, v.25, nº2, p.413-426, 2004.

POWELL, C.A.; PELOSI, R.R.; COHEN, M. Superinfection of orange trees containing mild isolates of *Citrus tristeza virus* with severe Florida isolates of *Citrus tristeza virus*. **Plant Disease**, v.76, nº2, p.141-144, 1992.

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

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**, v.79, nº5, p.437-445, 1995.

ROISTACHER, C.N.; MORENO, P. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* – a review. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 11., 1991, Riverside. **Proceedings: Riverside IOCV**, 1991. p.7-19.

RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of DNA complementary to their RNA population. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 14., 2000, Riverside. **Proceedings: Riverside IOCV**, 2000. p.12-17.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDEZ, A.; POLEK, M.; GUERRI, J.; MORENO, P.; FALK, B.W. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. **Journal of Virology**, v.75, nº17, p.8054-8062, 2001.

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

SALIBE, A.A.; TEÓFILO-SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'. **Laranja**, v.23, nº1, p.231-245, 2002.

SAMBADE, A.; AMBROS, S.; LOPEZ, 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 co-inoculated with mild and severe variants. **Archives of Virology**, v.152, nº6, p.1115–1126, 2007.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBER, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, nº8, p.690-695, 2006.

SENTANDREU, V.; CASTRO, J.A.; AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; GUERRI, J.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F.; MORENO, P.; MOYA, A. Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* (CTV) after host passage. **Archives of Virology**, v.151, nº5, p.875-894, 2006.

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

SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N.; DOS SANTOS, F.A.; MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, v.22, nº2, p. 503-516, 2001.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do vírus da tristeza dos citros em plantas pré-imunizadas com sintomas de tristeza. **Summa Phytopathologica**, v.28, nº2, p.154- 159, 2002.

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

TOLEDO, F.R.; BARBOSA, J.C.; YAMAMOTO, P.T. Distribuição espacial de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Hemiptera: Aphididae) na cultura de citros. **Brasileira de Fruticultura**, v.28, nº2, p.194-198, 2006.

TEÓFILO-SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J.O.; GUIRADO, N.; BARBIN, D. Resultados de experimentos de clones de laranja 'Pêra' enxertados sobre limão cravo. **Laranja**, v.1, nº9, p.209- 223, 1988.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; SAMBADE, A.; MIRKOV, T.E.; MORENO, P.; GUERRI, J. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. **Virology**, v.331, nº2, p.232-237, 2005.

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

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

ZHOU, C.Y.; HAILSTONES, D.; BROADBENT, P.; CONNOR, R.; BOWYER, J.A. Studies on mild strain cross protection against stem-pitting *Citrus tristeza virus*. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 15., 2002, Riverside. **Proceedings**: Riverside IOCV, 2002. p.151-157.

CAPÍTULO-I: SELEÇÃO DE CLONES DE LARANJA PÊRA [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DA REGIÃO NORTE DO PARANÁ TOLERANTES À TRISTEZA DOS CITROS

RESUMO

A seleção de diferentes clones de laranja Pêra com maior tolerância à tristeza dos citros, doença causada pelo closterovírus *Citrus tristeza virus* (CTV), e adaptados a determinadas regiões edafoclimáticas é de grande importância para a manutenção da produtividade, em virtude dos elevados danos que essa doença provoca à cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sintomatologia da tristeza em treze diferentes clones de laranja Pêra nas condições edafoclimáticas da região Norte do Paraná. O estudo foi realizado em um pomar experimental, instalado no município de Arapongas, região Norte do Estado. Os clones são provenientes de acessos da Estação Experimental do IAPAR e de material naturalmente infectado, selecionado em pomares do Estado de São Paulo e também do Paraná, totalizando 65 plantas. Avaliações da intensidade de caneluras nos troncos e ramos, desenvolvimento vegetativo (altura, diâmetro e volume), índice de produtividade e qualidade dos frutos foram realizadas nos anos de 2005 e 2008. Os resultados demonstraram que dentre os clones avaliados destacaram-se: os clones de Pêra Vimusa 66B e Pêra Seleção 37 em relação à incidência de caneluras no tronco e nos ramos, respectivamente, os clones Pêra Seleção 27 e 15 quanto ao parâmetro altura, os clones de Pêra Seleção 27, 12 e 15 quanto ao volume e os clones de Pêra Morretes 34B em relação ao índice de produtividade e qualidade dos frutos. Na avaliação do diâmetro, diferenças significativas não foram observadas entre os clones.

Palavras chaves: CTV, clones de laranja Pêra, seleção.

CHAPTER-I: SELECTION OF PÊRA ORANGE CLONES TOLERANT TO CITRUS TRISTEZA DISEASE [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] IN EDAPHOCLIMATIC CONDITIONS IN NORTHERN OF PARANA STATE

ABSTRACT

The selection of different Pêra orange clones, with increased tolerance to the citrus tristeza disease, caused by the *Citrus tristeza virus* (CTV) closterovirus, and adapted to certain edaphoclimatic regions, is of great importance to the productivity maintenance, due to high damage to the culture. The objective of this work was to evaluate the symptomatology of tristeza in thirteen different clones of Pêra orange in edaphoclimatic conditions in Northern of Parana State. The study was carried out in an experimental orchard, situated in Arapongas city, North region of the State. The clones were acquired in the Experimental Station of IAPAR and in the naturally infected material, selected in orchards from the States of São Paulo and Parana, totaling 65 plants. Evaluations of striae intensity in trunks and branches, vegetative development (height, diameter and bulk), productivity index and fruit quality were carried out in the years 2005 and 2008. The results showed that among the evaluated clones it was highlighted: the 66B Vimusa Pêra and 37 Selection Pêra clones, due to incidence of striae in the trunk and branches, respectively; the clones of 27 and 15 Selection Pêra, due to height parameter; the clones of 27, 12 and 15 Selection Pêra, due to the bulk; and the clones of 34B Morretes Pêra, in relation to productivity index and fruit quality. In the evaluation of diameter, significant differences were not observed among the clones.

Key words: CTV, Pêra orange clones, selection.

2.1. INTRODUÇÃO

A laranja Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é a variedade de citros mais importante no país, com plantio predominando em todos os Estados brasileiros, em virtude de suas características e qualidades múltiplas (PIO et al., 2005). O cultivo comercial da laranja Pêra ocorre somente no Brasil e em pequenos pomares no Uruguai (SALIBE et al., 2002).

Independente de porta-enxertos, as árvores de laranja Pêra são afetadas pelo closterovírus *Citrus tristeza virus* (CTV), agente causal da tristeza do citros (TEÓFILO-SOBRINHO et al., 1988; MÜLLER et al., 1999), transmitido pelo *Toxoptera citricida* Kirk (BENNETT e COSTA, 1949; MÜLLER, 1976). Os sintomas apresentados são: redução do crescimento e vigor da planta, redução do tamanho da fruta, folhas com sintomas de deficiência de zinco (clorose), folhas reduzidas, aparecimento nos ramos e no tronco das chamadas caneluras (ranhuras ou estrias que se formam no lenho das plantas) (MÜLLER et al., 1999; SALIBE et al., 2002; BORDIGNON et al., 2003a).

No Brasil, para que fosse possível o plantio desta variedade de maneira satisfatória, foi desenvolvido um programa de pré-imunização ou proteção cruzada, onde vários isolados de CTV foram selecionados nos pomares paulistas e inoculados em plantas livres de vírus (MÜLLER et al., 1999). O clone de laranja Pêra obtido que apresentou os melhores resultados foi denominado 'Pêra IAC' (MÜLLER et al., 1999). Outros clones, portadores naturais de isolados atenuados de CTV, também foram selecionados e distribuídos (TEÓFILO-SOBRINHO et al., 1988).

A expressão clone de laranja Pêra indica a soma de três fatores distintos: as características genéticas de uma seleção da variedade, o nível de severidade do complexo do vírus da tristeza presente nas plantas do clone e o efeito do clima na expressão da sua hereditariedade (SALIBE et al., 2002).

A partir de 1980, teve início experimentos de competição entre clones de laranja Pêra em pomares de várias regiões do Estado de São Paulo com o intuito de selecionar para cada região edafoclimática clones mais produtivos e

adaptados às mesmas (TEÓFILO-SOBRINHO et al., 2001a). No Estado do Paraná, o primeiro experimento utilizando clones de laranja Pêra foi realizado por Nakatani et al., (1997), visando avaliar o comportamento destes em relação à tristeza dos citros na região Norte do Estado. Nesse trabalho, os resultados indicaram uma variabilidade na intensidade da doença entre os clones avaliados.

As plantas de laranja Pêra, mesmo estando pré-imunizadas, desenvolvem sintomas de caneluras ou “stem pitting” nos ramos. Em pomares do sul e sudoeste do Estado de São Paulo, por apresentarem clima mais ameno, em relação às outras regiões do Estado, os sintomas da doença expressaram-se com muita intensidade (SALIBE et al., 2002). Isso confirma as afirmações de Roistacher et al., (1974) que relatou a ocorrência de CTV causando sintomas severos em condições de clima mais frio. O mesmo também foi verificado por Carvalho et al., (1997) em experimento de caracterização biológica de isolados de CTV utilizando limoeiro Galego como indicadora que apresentou reações variadas quanto à presença de CTV com tendência à acentuação dos sintomas nos períodos mais frios do ano.

Comparando as regiões sul e sudoeste do Estado de São Paulo com a região Norte do Estado Paraná, pode-se verificar a ocorrência de médias termais semelhantes que igualmente contribui para o aparecimento de árvores de laranja Pêra com sintomas severos de tristeza, tornando necessária assim a seleção de clones mais adaptados a esta região.

A utilização de um único clone de laranja Pêra é sempre problemático, em virtude de sua estreita base genética, que favorece o aparecimento de diversas doenças. Dessa maneira, a avaliação do comportamento e do desempenho de diferentes clones de laranja Pêra em relação à tristeza é de grande importância para a manutenção da produtividade. Os sintomas apresentados pelas plantas com o vírus e os efeitos da doença podem causar prejuízos imensos à cultura (BORDIGNON et al., 2003b).

Diante disso, o objetivo do trabalho é avaliar a sintomatologia da tristeza em treze diferentes clones de laranja Pêra nas condições edafoclimáticas da região Norte do Estado do Paraná.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de competição de clones foi instalado em abril de 2000, no município de Arapongas região Norte do Estado do Paraná no Sítio São José pela Cooperativa Agroindustrial de Rolândia (COROL). O clima dessa região é do tipo subtropical, com temperaturas médias anual variando de 20°C a 21°C e solo do tipo latossolos roxos e terra roxa estruturada (CAVIGLIONE et al., 2000).

Os clones são provenientes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG), instalado na Estação Experimental do IAPAR (Instituto Agronomico do Paraná), em Londrina e de material naturalmente infectado selecionado em pomares do Estado de São Paulo e também do Paraná.

O pomar experimental foi conduzido com espaçamento de 3,5 a 4,0 x 7,0 a 7,5 metros. Foram utilizados treze clones de laranja Pêra sendo: Bianchi 89C, D-6 111A, Vacinada 59B, Vacinada 58B, Morretes 34B, Gullo 87B, Vimusa 66B, Seleção 12, Seleção 27, Seleção 11, Seleção 14, Seleção 15, Seleção 37, enxertados sobre limão cravo (*Citrus limonia* Osb.). O experimento foi instalado em 13 parcelas aleatórias com 5 repetições de cada cultivar, totalizando 65 plantas. Essas plantas foram plantadas em sequência, ocupando quatro linhas do talhão, numa área de 0,16 hectares. As plantas do experimento foram expostas à livre infecção pelo vírus da tristeza, através da presença do pulgão preto (*Toxoptera citricida* Kirk) na área estudada.

Para a avaliação sintomatológica foram obtidos dados quanto à intensidade de caneluras, desenvolvimento vegetativo, índice de produtividade e qualidade dos frutos.

As avaliações da intensidade de caneluras foram realizadas em março de 2005 e março de 2008 nos troncos e ramos das plantas. Os troncos foram avaliados através de um corte na forma de retângulo com cerca de 3 x 5 cm, próximo ao ponto de enxertia. A estes foram atribuídos notas de 0 a 5 de acordo com a seguinte escala proposta por Meissner-Filho et al., (2002) onde

0 = nenhuma canelura; 1 = raras caneluras superficiais; 2 = um número moderado de caneluras; 3 = um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte; 4 = muitas caneluras superficiais e algumas profundas e 5 = superfície inteiramente coberta de caneluras superficiais ou profundas (Figura 1). No caso dos ramos jovens, estes foram coletados aleatoriamente ao redor da copa das árvores, acondicionados em sacos de papel e armazenados em local seco. No laboratório, após a remoção das cascas foram realizadas as avaliações em cada ramo, onde se atribui notas conforme a escala já mencionada acima.

A campo foram realizadas as avaliações do desenvolvimento vegetativo determinado em março de 2005 e março de 2008, sendo avaliadas medidas de altura das plantas, diâmetro e volume das copas. Para o cálculo do volume foi usada a equação $V = \frac{2}{3} \pi R^2 H$ (MENDEL, 1956), onde V representa o volume da copa, R o raio médio da copa e H a altura da planta.

Os dados sobre índice de produtividade e qualidade dos frutos referentes aos anos avaliados foram fornecidos pela Cooperativa COROL. A avaliação do índice de produtividade (por metro cúbico de copa) foi obtida dividindo-se a produção de frutos (kg) de cada planta pelo seu respectivo volume médio. A qualidade dos frutos dos diversos clones de Pêra foi obtida através da análise físico-química destes, coletando-se cinco frutos por parcela, sendo determinados: peso médio, acidez, brix e o ratio. O ratio é a relação entre o grau Brix do suco, que equivale à medida total de sólidos solúveis (açúcares) e o seu teor de acidez (quantidade de ácido cítrico presente na fruta). Quanto maior o valor do ratio, menor é o teor de acidez na fruta e, portanto, mais adocicado é o suco.

Os dados de índices de caneluras e desenvolvimento vegetativo foram submetidos a teste de médias considerando o delineamento inteiramente casualizado e transformados por $\sqrt{y+1}$, para a normalidade dos erros. Para a análise, utilizou-se o *software* SISVAR, Versão 4.3, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (FERREIRA, 2000), sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. No caso do índice de produtividade e qualidade dos frutos foram obtidas médias não transformadas dos dados fornecidos.



A

B

C



D

E

Figura 1. Sintomas de caneluras no tronco das plantas observados no pomar. Escala de notas atribuídas: A=0 (nenhuma canelura); B=1 (raras caneluras superficiais); C=2 (um número moderado de caneluras); D=3 (um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte); E=4 (muitas caneluras superficiais e algumas profundas). Fonte: Müller, G.W. (2005).

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos dados médios de caneluras nos ramos e tronco, altura das plantas e diâmetro das copas revelou diferença significativa pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

A média para a incidência de caneluras no tronco mostrou-se com maior valor para os clones de Pêra Vimusa 66B e menor valor para os clones de Pêra Vacinada 59B, Pêra Seleção 27, Pêra Seleção 15, Pêra Morretes 34B e Pêra Gullo 87B em comparação aos demais (Tabela 1).

Na avaliação de caneluras dos ramos o menor valor das médias foi encontrado nos clones de Pêra Morretes 34B, Pêra Seleção 27, Pêra Seleção 15, Pêra Gullo 87B, Pêra Bianchi 89C e Pêra Seleção 11 quando comparadas com as dos demais clones avaliados (Tabela 1).

Os clones de Pêra Vimusa 66B e Pêra Seleção 37 apresentaram em relação aos demais clones avaliados respectivamente sintomas fortes e moderados de caneluras no tronco e nos ramos, apontando assim para a ocorrência de prováveis danos no desenvolvimento vegetativo. Ao contrário disso, os clones de Pêra Seleção 27 e Pêra Seleção 15 que apresentaram sintomas fracos de caneluras nos troncos e nos ramos apresentaram um bom desenvolvimento vegetativo não sendo afetados pela doença.

Quanto aos clones de Pêra Morretes 34B e Pêra Gullo 87B, apesar de apresentarem sintomas fracos de caneluras nos troncos e nos ramos, estes não se apresentaram com um bom desenvolvimento vegetativo em relação aos demais (Tabela 1).

Resultado semelhante foi obtido por Corazza-Nunes et al., (2006) em estudos com acessos de pomelos onde foi verificada a ocorrência de plantas com sintomas fracos a moderados de caneluras, porém com baixíssimos valores para o desenvolvimento vegetativo. Neste caso, outros isolados de CTV ou outros fatores podem estar afetando o desenvolvimento dessas plantas.

Além disso, os resultados mostraram que as plantas avaliadas apresentaram variação na intensidade dessa sintomatologia (Tabela 1). O mesmo foi verificado nos trabalhos realizados por Zaninelli-Ré (2004), que revelaram sintomas moderados a fortes de caneluras nos troncos e ramos em plantas de laranja Pêra amostradas de pomares da região Norte do Estado, assim como os resultados obtidos por Nakatani et al., (1997) que verificaram a incidência de caneluras em ramos de árvores também de laranja Pêra, nessa região, indicando variabilidade na intensidade desse sintoma entre os clones dessa variedade.

Na avaliação do desenvolvimento vegetativo das plantas, quanto ao parâmetro altura, maiores médias foram verificadas nos clones de Pêra Seleção 27, seguidas pelos clones de Pêra Seleção 15 (Tabela 1). Para o parâmetro volume das copas destacaram-se os clones de Pêra Seleção 27, Pêra Seleção 12 e Pêra Seleção 15 (Tabela 1). Na avaliação do diâmetro realizada nas plantas nos anos de 2005 e 2008, diferenças significativas não foram observadas entre os clones (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios da avaliação de caneluras nos ramos, canelura no tronco, altura da planta, diâmetro e volume da copa de treze clones de laranja Pêra enxertados sobre limão Cravo, para os anos de 2005 e 2008, em pomar experimental, Sítio São José, Arapongas/PR.

Variedade ou clone	⁽¹⁾ Caneluras ramos		⁽¹⁾ Caneluras Tronco		Altura da planta (m)		Volume da copa (m ³)		Diâmetro da copa (m)	
Pêra Bianchi 89 C	1,0	a*	1,0	b*	2,47	b*	9,55	a*	2,65	a*
Pêra D-6 111 A	1,3	b	1,1	B	2,22	a	7,75	a	2,52	a
Pêra Vacinada 59 B	1,3	b	0,7	A	2,49	b	10,22	a	2,67	a
Pêra Vacinada 58 B	1,5	b	1,2	B	2,38	a	7,34	a	2,39	a
Pêra Morretes 34 B	0,7	a	0,9	A	2,28	a	8,46	a	2,57	a
Pêra Gullo 7 B	0,9	a	0,9	A	2,36	a	9,31	a	2,7	a
Pêra Vimusa 66 B	1,7	b	3,1	C	2,32	a	8,77	a	2,66	a
Pêra Seleção 12	1,2	b	1,4	B	2,54	b	10,27	b	2,76	a
Pêra Seleção 27	0,7	a	0,7	A	2,94	d	13,19	c	2,91	a
Pêra Seleção 11	1,1	a	1,1	B	2,55	b	8,72	a	2,53	a
Pêra Seleção 14	1,3	b	1,2	B	2,5	b	9,22	a	2,59	a
Pêra Seleção 15	0,9	a	0,7	A	2,67	c	11,24	b	2,78	a
Pêra Seleção 37	2,1	b	1,6	B	2,51	b	9,44	a	2,58	a

*Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si (sentido vertical) pelo teste de Scott Knott a 5%. Para análise estatística os dados foram transformados para $\sqrt{y+1}$.

⁽¹⁾ Notas, onde 0 = nenhuma canelura; 1 = raras caneluras superficiais; 2 = um número moderado de caneluras; 3 = um número intermediário de caneluras entre o sintoma fraco e muito forte; 4 = muitas caneluras superficiais e algumas profundas e 5 = superfície inteiramente coberta de caneluras superficiais ou profundas (dados não transformados).

Em relação ao índice de produtividade e qualidade dos frutos, os clones de Pêra Vimusa 66B na safra de 2005 apresentaram boa produtividade (Figura 2). Entretanto, o peso médio dos frutos foi de 80g e o valor do ratio estimado em 9,31 (Tabela 2). Estes valores encontram-se abaixo dos relatados por Teófilo-Sobrinho (2001b), onde os valores médios característicos referentes ao peso e ratio para o clone de Pêra Vimusa são de 140,7g e 12,9 respectivamente. Já na safra de 2008, foi verificada uma melhora na qualidade dos frutos, segundo os valores atribuídos por Teófilo-Sobrinho (2001b) (Tabela 2), porém com uma considerável redução na produtividade das plantas (Figura 2).

A diminuição no índice de produtividade pode ter ocorrido, em virtude do aumento ao longo dos anos dos sintomas de caneluras observados nesses clones, que em conjunto com outros fatores, provavelmente, interferiu na sua produção. Apesar da baixa na produtividade, a ocorrência de frutos de melhor qualidade, pode ser explicada, levando-se em consideração fatores tais como: a própria constituição genética da copa e aos tecidos constituintes das plantas que de alguma forma não permitiu que a qualidade destes fosse prejudicada.

No caso dos clones de Pêra Seleção 37, possivelmente, a constituição dos tecidos das plantas foi o que permitiu a manutenção da produtividade e a ocorrência de frutos de boa qualidade, de acordo com os valores médios para a laranja Pêra relatados por Pozzan e Triboni (2005), mesmo estes apresentando sintomas moderados de caneluras.

Segundo Bordignon et al., (2003b), a tristeza dos citros é uma doença que afeta o sistema vascular das plantas podendo influenciar no mecanismo de translocação de água e nutrientes, diminuindo assim o tamanho dos frutos. Apesar disso, devido a algum mecanismo compensatório, os frutos das plantas afetadas apresentam seu teor de sólidos solúveis aumentado. Plantas em cultivo não irrigado tendem a apresentar maior teor de sólidos solúveis, porém menor tamanho dos frutos.

Na safra de 2005 os clones de Pêra Morretes 34B e Pêra Gullo 87B apresentaram uma boa produtividade. Já na safra de 2008, a produtividade dos clones de Pêra Morretes aumentou consideravelmente, porém no caso dos clones de Pêra Gullo uma pequena redução foi observada (Figura 2).

A avaliação da qualidade dos frutos referente aos clones de Pêra Morretes 34B e Pêra Gullo 87B na safra de 2005 revelou que os valores médios encontrados foram de 105g e 10,76 de ratio e 83g e 10,5 respectivamente. Para ambos os clones, na safra de 2008, houve uma melhora considerável na qualidade dos frutos quando comparados com os valores médios relatados por Pozzan e Triboni (2005) para a laranja Pêra.

Em experimento paulista a cultivar Pêra Gullo tem se destacado como a mais produtiva em relação ao seu volume de copa, seguida pela cultivar Pêra Vimusa, que se destaca em posição intermediária (TEÓFILO-SOBRINHO et al., 1990). No entanto, nas condições de campo do Norte paranaense a cultivar Pêra Vimusa não vem se destacando, pois se encontra severamente afetada pela tristeza.

Conforme Teófilo-Sobrinho et al., (1988), de modo geral as menores produtividades são encontradas em clones portadores de intensidade de caneluras severas. No entanto, isso não foi verificado nos resultados de produção obtidos na safra de 2008, devido ao fato de que a maioria dos clones teve uma redução na produção, apesar de apresentarem sintomas fracos a moderados de caneluras, bem como, um bom desenvolvimento vegetativo. Neste caso, essa redução pode ser justificada não apenas pela sintomatologia da tristeza, mas sim pela condição do pomar, visto que, desde a safra de 2006, o produtor vem encontrando dificuldades na condução do mesmo, o que tem afetado consideravelmente a produção (dados informados pela Cooperativa COROL).

Nesse estudo, cabe ressaltar a importância dos resultados apresentados pelos clones de Perra Morretes 34B com sintomas fracos de tristeza, aumento na produtividade e pouco desenvolvimento vegetativo, o que sugere a realização de outros experimentos para verificação do potencial desses clones na formação de pomares de citros adensados com a finalidade de aumentar a produtividade por unidade de área e, conseqüentemente, a rentabilidade da cultura na região.

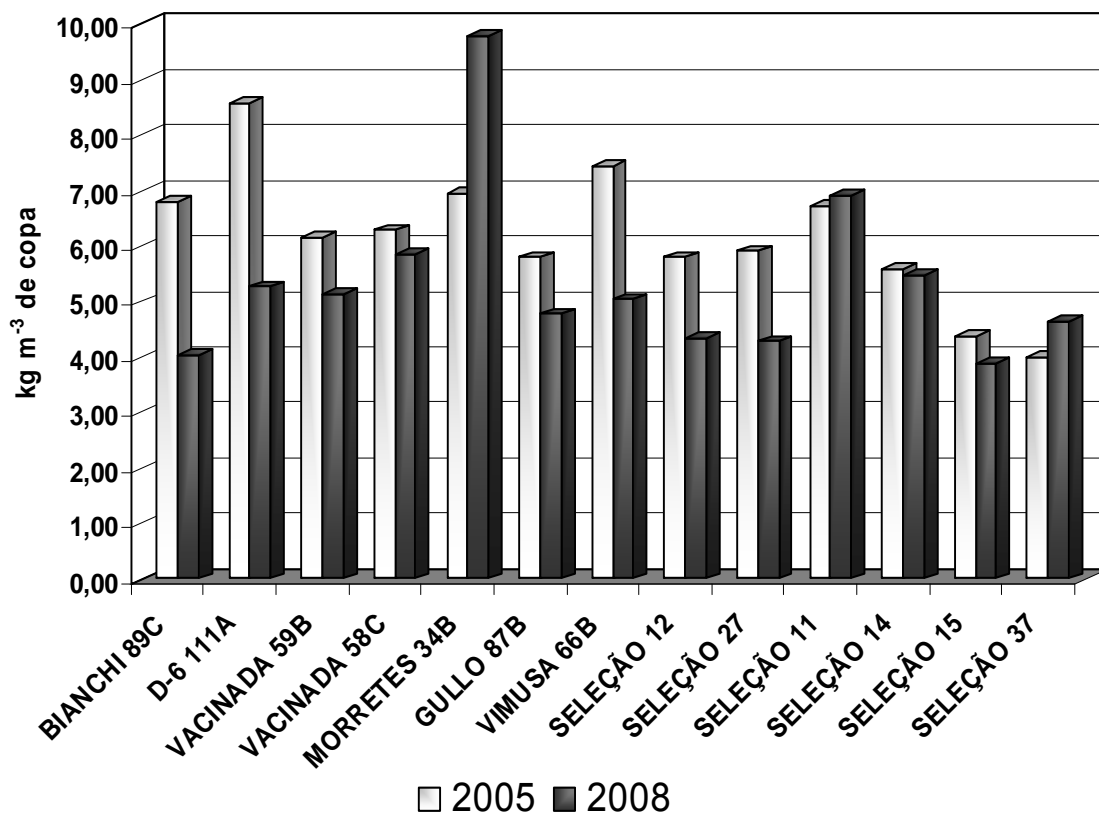


Figura 2. Índices médios de produtividade (kg m⁻³ de copa) de treze clones de laranja Pêra enxertados sobre limão Cravo, nos anos de 2005 e 2008, em pomar experimental, Sítio São José, Arapongas/PR.

Tabela 2. Parâmetros médios de qualidade dos frutos de treze clones de laranja Pêra enxertados sobre limão Cravo, nos anos de 2005 e 2008, em pomar experimental, Sítio São José, Arapongas/PR.

CLONES	SAFRA 2005				SAFRA 2008			
	Peso do Fruto (g)	Brix (%)	Acidez (%)	Ratio	Peso do Fruto (g)	Brix (%)	Acidez (%)	Ratio
BIANCHI 89C	117	11,98	0,912	13,16	157	10	0,84	11,98
D-6 111 A	108	13,47	1,36	9,9	144	10,9	1,14	9,46
VACINADA 59 B	N/C	12,82	1,09	11,7	140	10,1	0,98	11,28
VACINADA 58 C	115	12,92	1,08	11,96	154	10,6	0,84	12,58
MORRETES 34 B	105	13,35	1,24	10,76	144	11,3	1,00	12,46
GULLO 87 B	83	14,68	1,37	10,51	155	11,5	0,98	11,68
VIMUSA 66 B	80	13,18	1,41	9,31	153	11,1	1,00	11,1
SELEÇÃO 12	110	13,57	1,32	10,28	172	10,18	0,89	11,36
SELEÇÃO 27	92	11,8	0,98	12	*N/C	*N/C	*N/C	*N/C
SELEÇÃO 11	100	12,22	1,09	11,15	144	11,2	1,00	11,11
SELEÇÃO 14	100	12,55	1,25	10	150	12,5	1,04	12
SELEÇÃO 15	120	11,92	1,08	11	148	10,7	1,00	10,6
SELEÇÃO 37	114	13,19	0,92	14,3	143	11,7	0,94	12,38

*N/C- Dados não fornecidos pela Cooperativa

2.4 CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu concluir que:

- A incidência de caneluras “stem-pitting” variou de fraca a moderada na maioria dos clones avaliados, com exceção dos clones de Pêra Vimusa 66B que apresentaram sintomas severos.
- Os clones de Pêra Morretes 34B apresentaram elevado índice de produtividade com frutos de boa qualidade.
- A sintomatologia da tristeza foi expressa com maior intensidade nos clones de Pêra Vimusa 66B, provocando provavelmente em conjunto com outros fatores (condições de solo e tratos culturais) a redução do índice de produtividade, porém, sem afetar a qualidade dos frutos.

2.5 REFERÊNCIAS

BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. **Journal of Agricultural Research**, v.78, nº8, p.207-237, 1949.

BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J.; A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. **Bragantia**, v.62, nº3, p.345-355, 2003a.

BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Efeito da tristeza em caracteres vegetativos, produtivos e industriais da laranja 'Valência' enxertadas em híbridos segregado para tolerância. **Bragantia**, v.62, nº2, p.207-215, 2003b.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**, v.25, nº2, p.269-273, 2003.

CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W.; SILVÉRIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, nº1, p.79-84, 1997.

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

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of citrus active germplasm bank. **Summa Phytopathologica**, v.32, nº4, p.322-327, 2006.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: **45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**, 2000, p.255-258.

MENDEL, K. Rootstock-scion relationships in Shamouti trees on light soil. **Ktavim, Rehovot**, v.6, p.35-60, 1956.

MEISSNER-FILHO, P.E.; SOARES-FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C.; DIAMANTINO, E.; DIAMANTINO, M.S.A. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus tristeza virus*. **Fitopatologia brasileira**, v.27, nº3, p.312-315, 2002.

MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.245-263, 1976.

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, v.20, nº2, p.399-408, 1999.

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

ROISTACHER, C.N.; BLUE, R.L.; NAUER, E.M.; CAVALAN, E.C.; Suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedling grown at warm temperature. **Plant Disease**, v.58, 1974 (Reporter).

SALIBE, A.A.; TEÓFILO-SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W. Sinopse de conhecimentos e pesquisas sobre a laranja 'Pêra'. **Laranja**, v.23, nº1, p.231-245, 2002.

TEÓFILO-SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; GUIRADO, N.; BARBIN, D. Resultados de experimentos de clones de laranja 'Pêra' enxertados sobre limão cravo. **Laranja**, v.1, nº9, p.209- 223, 1988.

TEÓFILO-SOBRINHO, J.; POMPEU JUNIOR, J.; FIGUEIREDO, J. O.; TANNURI, F. Seleção de clones de laranjeira Pêra na região de Araraquara. **Laranja**, v.11, nº1, p.297-308, 1990.

TEÓFILO-SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W.; FIGUEIREDO, J.O.; LARANJEIRA, F.F.; SALIBE, A.A. Laranja 'Pêra IAC 2000'. **Laranja**, v.22, nº2, p.495-501, 2001a.

TEÓFILO-SOBRINHO, J. IAC-2000: um clone de laranja Pêra de boa qualidade. **O Agrônomo**, v.53, nº1, p.30, 2001b.

PIO, R.M.; DE FIGUEIREDO, J.O.; STUCHI, E.S.; CARDOSO, S.A.B. Variedades copas. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (eds). Capítulo 3. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005, 39-60p.

POZZAN, M.; TRIBONI, H.R. Colheita e qualidade do fruto. In: Mattos Júnior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Júnior, J. (eds). Capítulo 26. **Citros**. Campinas: Instituto Agrônomo e Fundag, 2005, 801-822p.

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

CAPÍTULO-II: PADRÕES SSCP DE ISOLADOS DO *Citrus tristeza virus* APÓS SUCESSIVAS PROPAGAÇÕES EM DIFERENTES CLONES DE LARANJA PÊRA [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] NAS CONDIÇÕES DE CAMPO DO NORTE PARANAENSE

RESUMO

O monitoramento da manutenção da estabilidade de isolados protetivos de CTV, presentes em diferentes clones de laranja Pêra, oriundos de material pré-imunizado e naturalmente selecionado, após sucessivas propagações, foram avaliados nas condições do Norte paranaense, através da análise SSCP do gene da capa protéica (GCP). Os perfis eletroforéticos dos isolados dos clones foram comparados: entre eles (repetições); com os isolados presentes no material original das coleções do IAPAR, dos Estados de São Paulo e da Bahia e também durante os anos de 2005 e 2008. Para isso, o genoma viral extraído através do reagente TRIZOL foi empregado na amplificação do GCP por meio das reações de transcriptase reversa (RT) e polimerase em cadeia (PCR). Os produtos da PCR foram desnaturados e submetidos à eletroforese. O perfil eletroforético dos isolados foi analisado através do Programa Genes, empregando-se o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA. Os resultados revelaram que a grande maioria dos clones apresentou alterações nos perfis eletroforéticos dos isolados de CTV, quando comparados entre eles e com os demais materiais, porém a estabilidade dos complexos protetivos continua sendo mantida, com exceção dos isolados presentes nos clones de Pêra Vimusa 66B e Seleção 37, em que o resultado molecular aliado à sintomatologia da doença observada nessas plantas revelou a ocorrência de uma provável quebra de proteção. Durante os anos avaliados pouca variabilidade genética foi observada nos isolados.

Palavras chaves: CTV, SSCP, estabilidade do complexo protetivo.

CHAPTER-II: ISOLATED SSCP PATTERNS FROM *Citrus tristeza virus* AFTER SUCCESSIVE PROPAGATIONS IN DIFFERENT CLONES OF PÊRA ORANGE [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] UNDER FIELD CONDITIONS IN NORTHERN OF PARANA STATE

ABSTRACT

The monitoring of the stability maintenance of the CTV protective isolated, present in different clones of Pêra orange, from pre-immunized and naturally selected material, after successive propagations, were evaluated under the conditions of Northern of Parana State, through the SSCP analysis of the coat protein gene (CPG). The electrophoretic profiles from the isolated clones were compared: among them (repetitions); and with the isolated present in the original material from IAPAR collections, from the States of São Paulo and Bahia and also during the years 2005 and 2008. To do so, the viral genome, extracted by means of the TRIZOL reagent, was employed in the CPG amplification through the reactions of reverse transcriptase (RT) and polymerase chain reaction (PCR). The PCR result were denatured and submitted to electrophoresis. The isolated electrophoretic profile was analyzed through the Gene Program, using the Jaccard coefficient and the UPGMA method. The results revealed that the vast majority of the clones showed modifications in the electrophoretic profiles from the isolated CTV, when compared among themselves and with the other materials, yet the protective complex stability keeps the same, except the isolated present in clones of 66B Vimusa Pêra and 37 Selection, where the molecular result, associated with the symptomatology of the disease observed in these plants, showed the occurrence of a probable breakdown of cross-protection. During the years in which these were evaluated, little genetic variability was observed in the isolated.

Key words: CTV, SSCP, protective complex stability.

3.1. INTRODUÇÃO

O *Citrus tristeza virus* (CTV) é um closterovírus, limitado ao floema das plantas cítricas, que é transmitido pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida* Kirk). Agente causal da tristeza dos citros, o CTV é considerado o maior vírus de plantas, com genoma composto de uma molécula de RNA de fita simples. Nas plantas infectadas pelo vírus, existe uma população heterogênia de RNAs subgenômicos, RNAs defectivos e RNAs de fita dupla (dsRNA) que corresponde a forma replicativa completa do vírus (BAR-JOSEPH et al., 1989; SOUZA et al., 2002a; BORDIGNON et al., 2003).

O grande tamanho do genoma do CTV pode explicar, em parte, a elevada diversidade genética desse vírus (NIBLET et al., 1993), além de não ser um único vírus, mas sim de uma população de variantes de sequências que podem se recombinar geneticamente (RUBIO et al., 2001).

A complexa população de RNA do CTV e sua patogenicidade característica podem ser alteradas, após a mudança de hospedeira ou através da transmissão pelo pulgão, sugerindo uma grande variação genética nas populações (ALBIACH-MARTÍ et al., 2000; D'URSO et al., 2000).

Esta variação genética pode ser aumentada pelo fato de que as árvores de citros normalmente permanecem longos períodos no campo favorecendo mudanças na população viral devido às repetidas inoculações por pulgões ou como resultado de práticas culturais (BORDIGNON et al., 2003; D'URSO et al., 2003; KIM et al., 2006). Contudo, os dados sobre a sua diversidade genética ainda são limitados e a variação dessa população sob condições de campo é em grande parte desconhecida (D'URSO et al., 2003; KIM et al., 2006).

A estrutura genômica das populações de CTV e as alterações ocorridas nas populações vêm sendo detectadas através da técnica de SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) (AYLLON et al., 1999; RUBIO et al., 2000; D'URSO et al., 2003; DAVINO et al., 2005). A análise dos padrões SSCP também é empregada em outros estudos tais como: proteção cruzada

(SOUZA et al., 2000b; CORAZZA-NUNES et al., 2001; SOUZA et al., 2002a; KIM et al., 2006; COSTA et al., 2006), identificação e caracterização do vírus (VIVES et al., 2005; CORAZZA-NUNES et al., 2006; SAMBADE et al., 2007; IGLESIAS et al., 2008).

Temporal (2006) utilizou a análise SSCP na avaliação de um experimento piloto a campo, instalado na região Norte do Paraná, visando verificar a estabilidade dos complexos protetivos de isolados do CTV, dos clones de Pêra Bianchi e Pêra Vacinada ao longo dos anos. Neste estudo, verificou-se que os complexos protetivos dos isolados fracos, presentes nessas plantas, estão se mantendo protetivos ao longo dos anos, mesmo estando expostos à alta pressão de inóculo do isolado forte. Essa proteção vem contribuindo para o bom desempenho desses clones em relação à sintomatologia da tristeza, permitindo assim, o desenvolvimento normal dessas plantas no pomar.

Dando continuidade a este estudo, o presente trabalho teve como objetivo monitorar a manutenção da estabilidade dos isolados de *Citrus tristeza virus*, presentes em clones de laranja Pêra pré-imunizados e naturalmente selecionados, após sucessivas propagações clonais, nas condições de campo do Norte paranaense, através de padrões eletroforéticos SSCP da região do gene da capa protéica.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Origem dos isolados de CTV

Os isolados de CTV analisados neste estudo foram selecionados de clones de laranja Pêra pré-imunizados e naturalmente infectados provenientes de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Citros (BAG), existente na Estação Experimental do IAPAR (Instituto Agronomico do Paraná), instalados em um pomar experimental, no município de Arapongas, região Norte do Paraná. Para a seleção do material naturalmente infectado foram verificados

aqueles que durante os anos de 2005 a 2008 apresentaram a campo aumento na intensidade de caneluras, sintoma típico da tristeza.

Os clones dos quais foram obtidos os isolados para a análise molecular foram: Bianchi 89C, D-6 111A, Vacinada 59B, Vimusa 66B e Seleção 37 enxertados sobre limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck.), com suas repetições. Também foram analisados os isolados presentes no material original da coleção do IAPAR [Bianchi (B-I), D-6-I, Vacinada (Vac-I) e Vimusa (V-I)], do material fornecido pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis/ SP [isolados: Bianchi (B-C), D-6-C e Vimusa (V-C)] e pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical da EMBRAPA, Cruz das Almas/ BA (isolado D-6-B). Como controles foram empregados: o isolado ‘Pêra IAC’ (controle fraco) e o isolado ‘Capão Bonito’ (controle forte), oriundos do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, e o isolado ‘Rolândia’ (controle forte) oriundo da região Norte paranaense (MÜLLER, G.W. comunicação pessoal).

Folhas e ramos jovens foram coletados dos quadrantes da copa dos clones selecionados, nos anos de 2005 e 2008. Em seguida, acondicionados dentro de sacos plásticos, em isopor com gelo e mantidos em refrigerador até o seu processamento. No Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, ocorreu a retirada da “casca” e nervura principal das folhas, que foram utilizadas para a extração do vírus e posterior análise molecular do gene da capa protéica (GCP) do CTV.

Nessa análise os perfis eletroforéticos dos isolados sofreram as seguintes comparações: primeiramente foram comparados entre eles (repetições); em seguida foram comparados com os perfis dos isolados presentes no material original da coleção do IAPAR, do material fornecido pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” e pelo Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical da EMBRAPA. Verificaram-se também possíveis alterações dos padrões desses isolados durante os anos de 2005 e 2008.

3.2.2. Extração do Genoma Viral

O genoma viral (RNA de fita simples) foi extraído através do reagente TRIZOL de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Para isso, foram utilizados 100 mg de tecido triturado em nitrogênio líquido, onde foi adicionado 1,5 ml do reagente TRIZOL. Os microtubos tipo eppendorff foram agitados por 15 segundos e depois incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugados a 12.000 rcf por 10 minutos a 6°C.

O sobrenadante foi transferido para microtubos novos sendo adicionado 0,3 ml de clorofórmio puro, agitados por 15 segundos, incubados por 3 minutos e, posteriormente, centrifugados por mais 15 minutos.

Logo após, o sobrenadante foi novamente transferido para microtubos de 1,5 ml e o RNA precipitado adicionando-se 0,75 ml de isopropanol, incubado por 15 minutos e centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o RNA lavado com 1,5 ml de etanol 75%, centrifugado a 7.500 rcf durante 5 minutos. A secagem foi realizada com 1mL de etanol 100%. O RNA foi suspenso em 50 µl de água milli-Q autoclavada e armazenado.

3.2.3. Síntese da primeira fita de cDNA e Amplificação do Gene do Capsídeo (GCP)

O genoma viral extraído serviu de molde para a síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar) de acordo com o procedimento descrito por Sambrook et al., (1989). Inicialmente foram preparadas reações com um volume de 10 µl, adicionando-se a alíquota do RNA extraído, Random primer (Invitrogen) (3 µg/µl) e água milli-Q autoclavada. Essas reações foram desnaturadas a 75°C por 10 minutos, sendo em seguida, colocadas imediatamente no gelo. Posteriormente, prepararam-se reações com 15 µl de volume, contendo: tampão 5x da M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Reverse Transcriptase), DTT (0,1M), dNTP, RNase OUT (Invitrogen)(40 U/µL), M-MLV-RT (200 U/µl) (Invitrogen) e água milli-Q autoclavada. As amostras foram incubadas a 37°C por 2 horas.

O cDNA foi usado na reação da polimerase em cadeia (PCR) para isolar e amplificar o gene da capa protéica (GCP). Foram utilizados os 'primers' 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 de PCR foram preparadas em um volume de 25 µl contendo: tampão 10x [200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl, MgCl₂ (50 mM)], dNTP (10 mM), CN119-CTV (forward) (50 ng/µL), CN120-CTV (reverse) (50 ng/µL), Taq DNA Polymerase (Invitrogen) (2,5 U), cDNA e água milli-Q autoclavada.

A amplificação foi realizada em aparelho termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf) programado para 40 ciclos sendo: desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 55°C e síntese de DNA por 2 minutos a 72°C, seguido por um período de extensão de 10 minutos a 72°C.

Os produtos das reações da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e fotografado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 System).

3.2.4. Análise de SSCP

As análises SSCP foram realizadas de acordo com a metodologia usada por Corazza-Nunes et al., (2001) com algumas modificações. Para isso alíquotas de 4 a 10 µl do produto de amplificação do GCP foram misturadas com igual volume de solução desnaturante (95% de formamida, 2 mM de EDTA e 0,05% azul de bromofenol). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 10 minutos, colocadas imediatamente no gelo e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% em tampão TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM de EDTA, pH 8,5), a 200 volts durante 15 horas a 25°C.

3.2.5. Coloração do gel não desnaturante de poliacrilamida

Para a visualização das bandas os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata, conforme protocolo descrito por Beidler et al.,(1982). Os géis foram colocados em recipiente de plástico branco contendo solução fixadora (etanol a 10%) por 10 minutos e depois lavados com água destilada. Em seguida, foram mergulhados em uma solução de ácido nítrico a 1% por 3 minutos. Após serem lavados duas vezes com água destilada, os géis foram submersos numa solução de nitrato de prata a 2% durante 20 minutos sob agitação constante. Novamente, procederam-se as duas lavagens com água destilada e, em seguida, os géis foram revelados em solução de carbonato de sódio contendo 108 µl de formaldeído, agitando-se por 5 a 10 minutos constantemente até o aparecimento das bandas. Logo após, adicionou-se a solução de parada constituída de ácido acético a 5%. Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz branca em equipamento de fotodocumentação (UVP GDS-8000 *System*).

3.2.6. Análise dos perfis eletroforéticos

Os perfis eletroforéticos foram analisados através de observações do número e posição das bandas presentes nos géis que foram convertidos em uma matriz binária de presença e ausência de bandas (sendo 0 para ausência e 1 para presença).

As análises foram realizadas através do Programa Genes (CRUZ, 1997), onde com base no coeficiente de Jaccard as distâncias genéticas entre os isolados foram estimadas. As matrizes de distâncias genéticas foram utilizadas para realizar as análises de agrupamento, empregando como critério o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages). Com base nessas análises diferentes grupos de similaridade foram definidos.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese dos produtos da PCR obtidos após a síntese da primeira fita de cDNA de isolados do CTV presentes nos tecidos infectados dos clones selecionados e suas repetições, realizada em gel de agarose 1%, revelou um segmento de aproximadamente 670 pb, que corresponde ao tamanho do GCP do vírus (SEKIYA et al., 1991) (Figura 1).

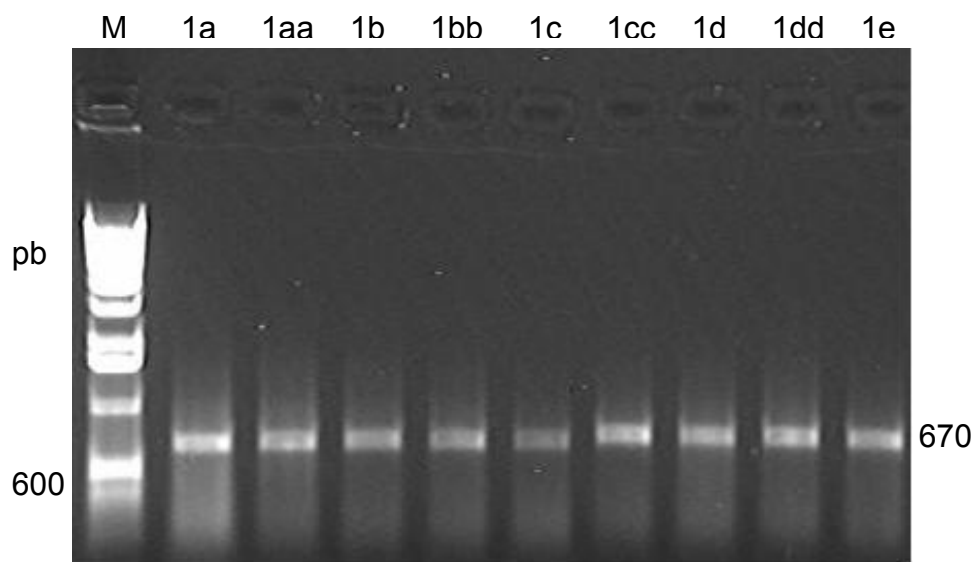


Figura 1. Produtos da amplificação da PCR do gene da proteína do capsídeo de isolados de CTV, revelados em gel de agarose a 1%. M=marcador de DNA de 1Kb; 1a, 1b, 1c, 1d e 1e=amostras do clone de Pêra Bianchi, coletados em 2005; 1aa, 1bb, 1cc e 1dd=amostras do clone de Pêra Bianchi, coletados em 2008.

No gel de agarose foram observadas variações na intensidade das bandas do produto da PCR amplificados, revelando diferenças na sua concentração. Segundo Targon (1997) essa diferença observada pode ocorrer devido a diferentes concentrações de cDNA utilizadas nessas reações (Figura 1).

Na análise de SSCP do gene da proteína do capsídeo verificou-se o número e a posição de bandas em cada perfil eletroforético, demonstrando a variabilidade genética entre os isolados dos clones analisados (Figuras 2 e 3).

Os perfis observados revelaram a ocorrência de quatro a dez bandas nos géis (Figuras 2 e 3), sugerindo a presença de dois a cinco haplótipos em cada isolado de CTV. Como descrito por Gillings et al., (1996), Corazza-Nunes et al., (2001) e Souza et al., (2002a), as plantas geralmente são infectadas por isolados constituídos por uma mistura de haplótipos. Além de que a maioria das plantas da mesma cultivar apresentou o mesmo perfil eletroforético.

A diversidade genética observada entre os complexos de CTV que infectam os clones e suas repetições e entre os clones ocorre provavelmente devido ao tipo de movimento do pulgão *Toxoptera citricida* dentro do pomar (LEONEL, 2004).

Como mostrado na Figura 2 (A) pode-se verificar que para os clones de Pêra Bianchi 89C, os padrões eletroforéticos dos isolados foram muito similares em todas as repetições nos anos avaliados. Os perfis encontrados nos isolados do material da coleção do IAPAR (B-I) e de São Paulo (B-C) foram idênticos entre si, e similares ao de todos os isolados dos clones desta cultivar. Estes resultados confirmaram a primeira análise realizada neste material por Temporal (2006), demonstrando a manutenção do complexo protetivo ao longo das sucessivas propagações.

Para os clones D-6 111A, os perfis eletroforéticos avaliados em 2005 dos isolados 2a e 2c apresentaram-se idênticos [Figura 2 (B)]. No caso do isolado 2b o padrão eletroforético foi idêntico com o encontrado no material original do IAPAR (D-6-I) [Figura 2 (B)]. Padrão idêntico foi observado entre os isolados obtidos do material de São Paulo (D-6-C) e da Bahia (D-6-B) [Figura 1 (B)]. Porém estes foram diferentes dos encontrados no isolado do IAPAR, e nos demais isolados dos clones dessa cultivar. Na avaliação de 2008 não foi observada alteração nos padrões [Figura 2 (B)].

No caso dos clones de Pêra Vacinada 59B verificou-se que os isolados 3a e 3b mostraram-se similares ao isolado da coleção do IAPAR (Vac-I) nas duas avaliações [Figura 2 (C)]. Contudo, também em ambas as avaliações, os demais isolados 3c, 3d e 3e apresentaram padrões bem similares ao encontrado no isolado 'Rolândia', utilizado como controle forte [Figura 2 (C)]. Diferenças nos padrões dos isolados de alguns clones de Pêra Vacinada 59B, também foi observado por Temporal (2006). No entanto, como as plantas dessa cultivar apresentaram um bom desempenho em relação à sintomatologia da tristeza, sugere-se que essas plantas provavelmente apresentam tecidos tolerantes ao CTV, pois apesar de permitirem a multiplicação do vírus, não são afetadas significativamente pela doença.

Num estudo semelhante realizado por Souza et al., (2002b), com plantas de laranja Pêra pré-imunizadas com o isolado 'Pêra IAC', foi verificado o padrão SSCP do gene do capsídeo dessas plantas, após um ano de exposição a campo, em região com alta incidência do complexo severo 'Capão Bonito'. Neste experimento, porém, os resultados demonstraram que perfil eletroforético das plantas apresentou-se idêntico ao do isolado protetivo original.

A alteração nos perfis dos isolados 3c, 3d e 3e dos clones dessa cultivar, tornando-os semelhantes ao encontrado no isolado 'Rolândia', pode ter ocorrido, provavelmente, em virtude da alta pressão de inóculo exercida pelo complexo 'Rolândia' ocorrida na região. Essa alteração no complexo viral, em conjunto com a condição do tecido das plantas, poderá ainda vir a resultar em uma quebra de proteção, com conseqüente desencadeamento de sintomas severos da doença. De acordo com Moreno et al., (1996), independentemente da mistura de isolados, nas plantas co-inoculadas, para que os sintomas sejam expressos é necessária uma multiplicação detectável do isolado severo.

Os isolados dos clones de Pêra Vimusa 66B foram os que revelaram maior presença de bandas sugerindo a ocorrência de isolado constituído por um número maior de haplótipos quando comparados com os demais [Figura 3 (D)]. Em 2005, perfis eletroforéticos idênticos foram encontrados entre os isolados 4b e 4c e entre os isolados 4a e 4e. O isolado 4d diferenciou-se dos demais. Nenhum dos isolados apresentou padrões similares aos dos isolados da coleção do IAPAR (V-I) e de São Paulo (V-C) [Figura 3 (D)]. Da mesma

forma quando comparado os perfis dos isolados desses materiais entre si, diferença significativa foi observada [Figura 3 (D)]. Em 2008, considerável alteração só foi verificada no perfil do isolado 4dd [Figura 3 (D)].

Nos clones de Pêra Seleção 37 observou-se que os perfis dos isolados 5b, 5c e 5d apresentaram-se idênticos em 2005, sendo mantidos na avaliação feita em 2008 (isolados 5bb, 5cc e 5dd) [Figura 3 (E)]. Para os isolados 5a e 5e diferentes padrões foram encontrados. Nenhum dos padrões eletroforéticos foram similares ao controle fraco e fortes comparados [Figura 3 (E)]. Em todos os clones avaliados nenhum dos isolados tiveram perfis similares ao do isolado forte 'Capão Bonito'.

Num experimento utilizando clones de laranja Pêra instalado no município de Capão Bonito, São Paulo, local de alta pressão de inóculo do complexo severo 'CB', o gene do capsídeo do CTV foi avaliado por SSCP. Os resultados indicaram que embora possa ser deduzida a ocorrência de um isolado comum em todas as plantas, existem variações entre eles possivelmente associada à inoculação cruzada por pulgões. Padrões de isolados considerados protetivos também já se apresentam misturados com outros componentes (MÜLLER et al., 2000).

Van der Vyver et al., (2002) trabalhando com certas seleções de pomelos pré-imunizados com dois isolados protetivos de CTV do sul da África verificaram pela análise de SSCP mudanças nos perfis eletroforéticos desses isolados, com a presença de haplótipos adicionais do vírus em algumas árvores pré-imunizadas a campo, em comparação com os isolados originais mantidos em estufa como controles.

A análise de SSCP de quatro genes foi utilizada por Sambade et al., (2002), para monitorar dois isolados fracos de CTV utilizados na pré-imunização, desafiados com isolado forte do vírus. Os resultados revelaram que nenhum dos isolados fracos avaliados protegeu as plantas de laranja doce quando desafiadas com isolado forte. O perfil SSCP indicou uma mistura de ambos os isolados, com a presença de bandas características do isolado fraco em menor concentração, indicando assim, um aumento da população do isolado severo em relação à população dos isolados fracos dentro das plantas.

Mudanças nos perfis eletroforéticos também foram observadas nos isolados dos materiais da coleção do IAPAR (D-6-I e V-I) [Figuras 2 (B) e 3

(D)]. Essas mudanças podem ter acontecido devido à segregação do isolado protetivo após as sucessivas propagações, ou a infecção de isolado severo em sucessivas inoculações por pulgão. Este último fato possivelmente seja o mais provável de ter ocorrido, pois inicialmente, as borbulheiras da coleção do IAPAR encontravam-se a céu aberto, favorecendo a ação de pulgões e, conseqüente, modificação do complexo viral.

Uma banda intermediária, característica do isolado 'Rolândia', utilizada como controle forte, esteve presente em grande parte dos isolados dos clones analisados em ambos os anos. Este fato sugere que, a mistura ocorrida entre estes isolados, provavelmente, se deu durante os cinco primeiros anos de exposição dos clones a campo, em uma área de alta pressão do complexo forte (Figuras 2 e 3).

Os perfis eletroforéticos observados nos isolados dos clones Pêra Vimusa 66B e Pêra Seleção 37 demonstram a ocorrência de uma provável quebra de proteção, pois a avaliação sintomatológica realizada revelou sintomas fortes e moderados da tristeza nestas plantas. Neste caso, a quebra de proteção provavelmente esteja relacionada à mistura ocorrida entre os isolados, aliada a sensibilidade dos tecidos das plantas ao vírus.

A ocorrência de caneluras em plantas de laranja Pêra pré-imunizadas, bem como, a alteração no padrão SSCP do gene da capa protéica do CTV obtida das plantas, quando comparados ao padrão encontrado no isolado fraco utilizado para a pré-imunização, sugere uma quebra de proteção (Souza et al., 2000a; 2002a). Segundo Souza et al., (2002a), a coexistência de diferentes haplótipos não implica necessariamente no desenvolvimento de sintomas da doença, porém, o desenvolvimento de sintomas em plantas pré-imunizadas deve ser considerado uma quebra de proteção.

O monitoramento da manutenção da estabilidade dos isolados protetivos de CTV, através da análise de SSCP da região do gene da capa protéica, constatou que uma maior complexidade de isolados foi verificada na avaliação feita em 2005, quando comparada à avaliação de 2008.

Resultado semelhante foi observado por Souza et al., (2000b), ao caracterizarem isolados de CTV estabelecidos inicialmente em variedades de laranja doce após três anos a campo. A análise de SSCP revelou que os padrões eletroforéticos dos isolados coletados de plantas cultivadas há três

anos foram menos complexos que quando comparados com aqueles observados nas plantas dois anos após o plantio. Essa menor complexidade sugere a existência de competição entre certos isolados.

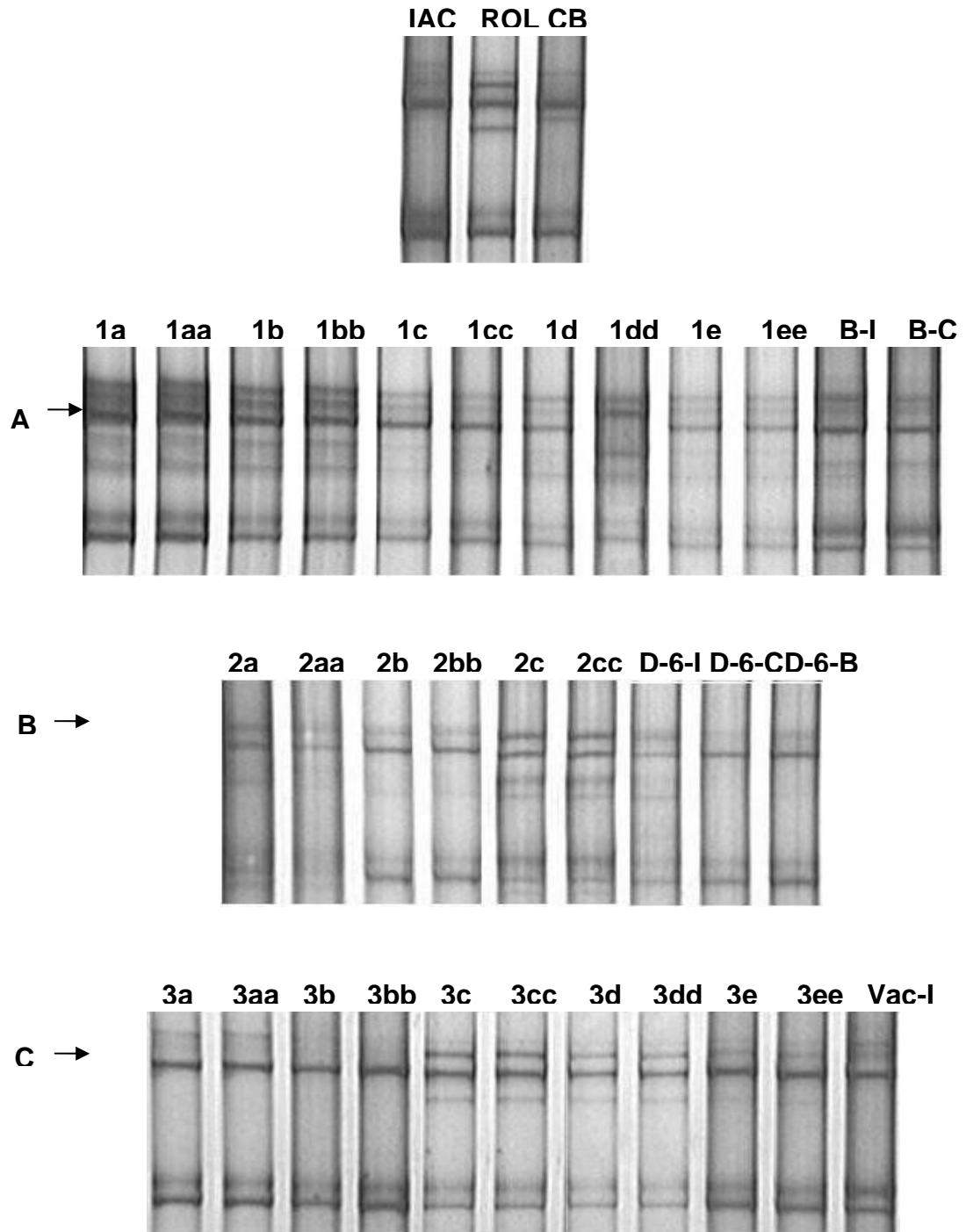


Figura 2. Padrões SSCP dos isolados de CTV, em gel de poliacrilamida a 8%, de laranja Pêra. A-isolados dos clones Pêra Bianchi 89C; B-isolados dos clones Pêra D-6 111A; C-isolados dos clones Pêra Vacinada 59B. Material IAPAR=B-I; D-6-I; Vac-I. Material São Paulo=B-C; D-6-C; Material Bahia=D-6-B. Controle fraco=Pêra IAC (IAC); controles fortes=Rolândia (ROL) e Capão Bonito (CB). Amostras com uma letra=coleta ano 2005; amostras com duas letras=coleta ano 2008.

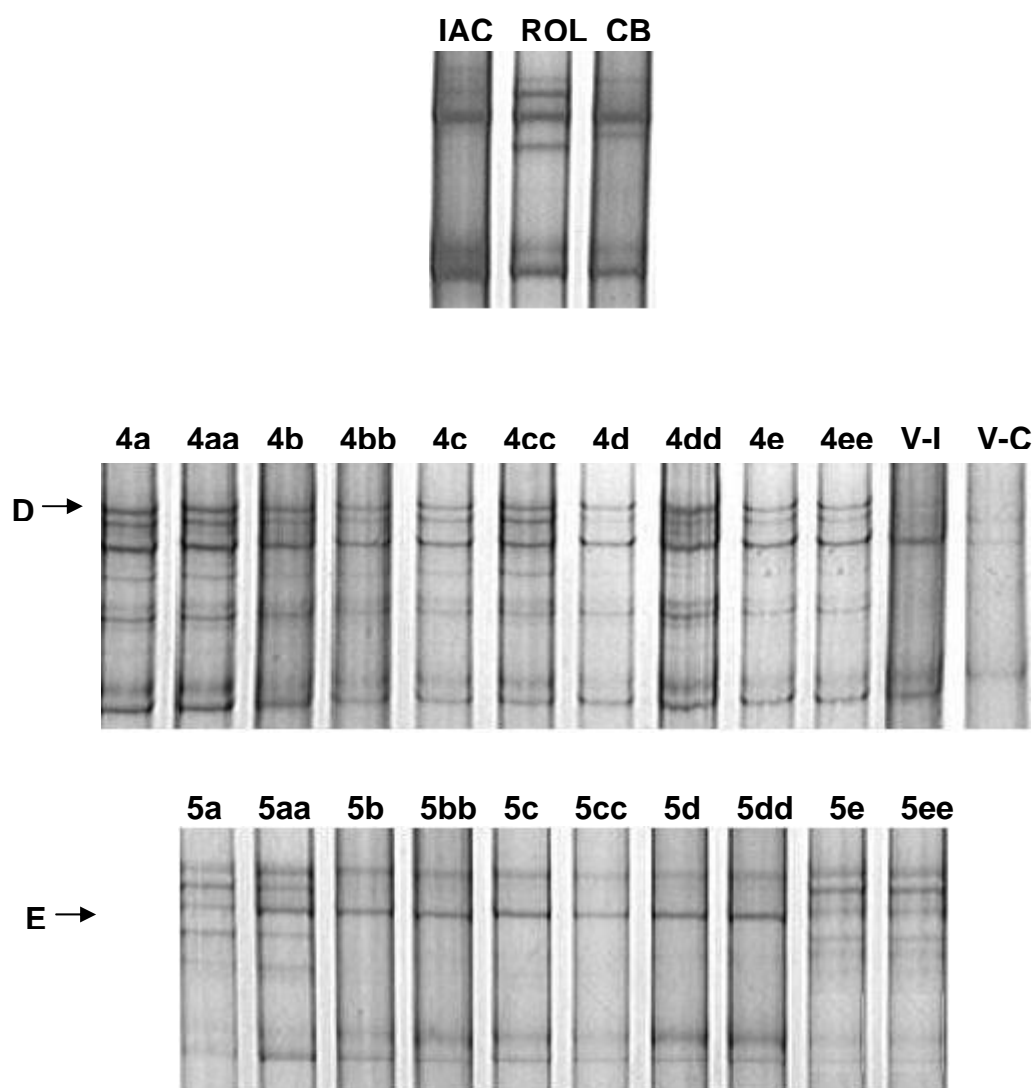


Figura 3. Padrões SSCP dos isolados de CTV, em gel de poliacrilamida a 8%, de laranja Pêra. D-isolados dos clones Pêra Vimusa 66B; E-isolados dos clones Pêra Seleção 37. Material IAPAR=V-I. Material São Paulo=V-C. Controle fraco=Pêra IAC (IAC); controles fortes=Rolândia (ROL) e Capão Bonito (CB). Amostras com uma letra=coleta ano 2005; amostras com duas letras=coleta ano 2008.

Durante os anos avaliados as distâncias genéticas entre os isolados de CTV analisados foram pequenas. Os valores observados estiveram entre 0,08 e 0,54 em 2005 e entre 0,09 e 0,46 em 2008, indicando assim a ocorrência de pouca variabilidade genética entre os isolados.

No dendrograma UPGMA gerado pela avaliação realizada em 2005 (Figura 4), pôde-se verificar a formação de três grupos bem definidos, onde dos três grupos o que mais se dividiu em subgrupos relacionados foi o grupo III. Neste foram agrupados os isolados dos clones Pêra Bianchi 89C, Pêra Vimusa 66B e apenas dois isolados dos clones de Pêra Seleção 37, bem como os isolados do material da coleção do IAPAR (B-I) e de São Paulo (B-C) (Figura 4). O grupo II foi constituído apenas pelos isolados dos clones de Pêra D-6 111A, sendo que o isolado 'Pêra D-6-I' apresentou maior similaridade com o isolado 2b (2005) (Figura 4).

O grupo I foi constituído pelos outros isolados dos clones Pêra Seleção 37, Pêra Vacinada 59B, pelos isolados do material da coleção do IAPAR (V-II e Vac-I), de São Paulo (D-6-C e V-C) e da Bahia (D-6-B) e também pelo isolado 'Pêra IAC' utilizado como controle fraco (Figuras 4 e 5). Verificou-se que o isolado 3d do clone Pêra Vacinada 59B apresentou maior similaridade com o isolado forte 'Rolândia' (Figura 4).

No dendrograma UPGMA gerado pela avaliação realizada em 2008 (Figuras 5), observou-se a manutenção dos três grupos já formados anteriormente, porém algumas alterações nos agrupamentos foram verificadas. Neste dendrograma os isolados B-I e B-C apresentaram-se agrupados ao grupo II junto com os isolados dos clones de Pêra D-6 111A (Figura 5). Verificou-se também que além do isolado 3d do clone Pêra Vacinada 59B mais dois isolados desse mesmo clone (3cc e 3ee) apresentaram similaridade com o isolado forte 'Rolândia' (Figura 5).

No caso do isolado do controle forte 'Capão Bonito', em ambos os anos estudados, este divergiu de todos os demais isolados analisados não se agrupando aos mesmos (Figuras 4 e 5).

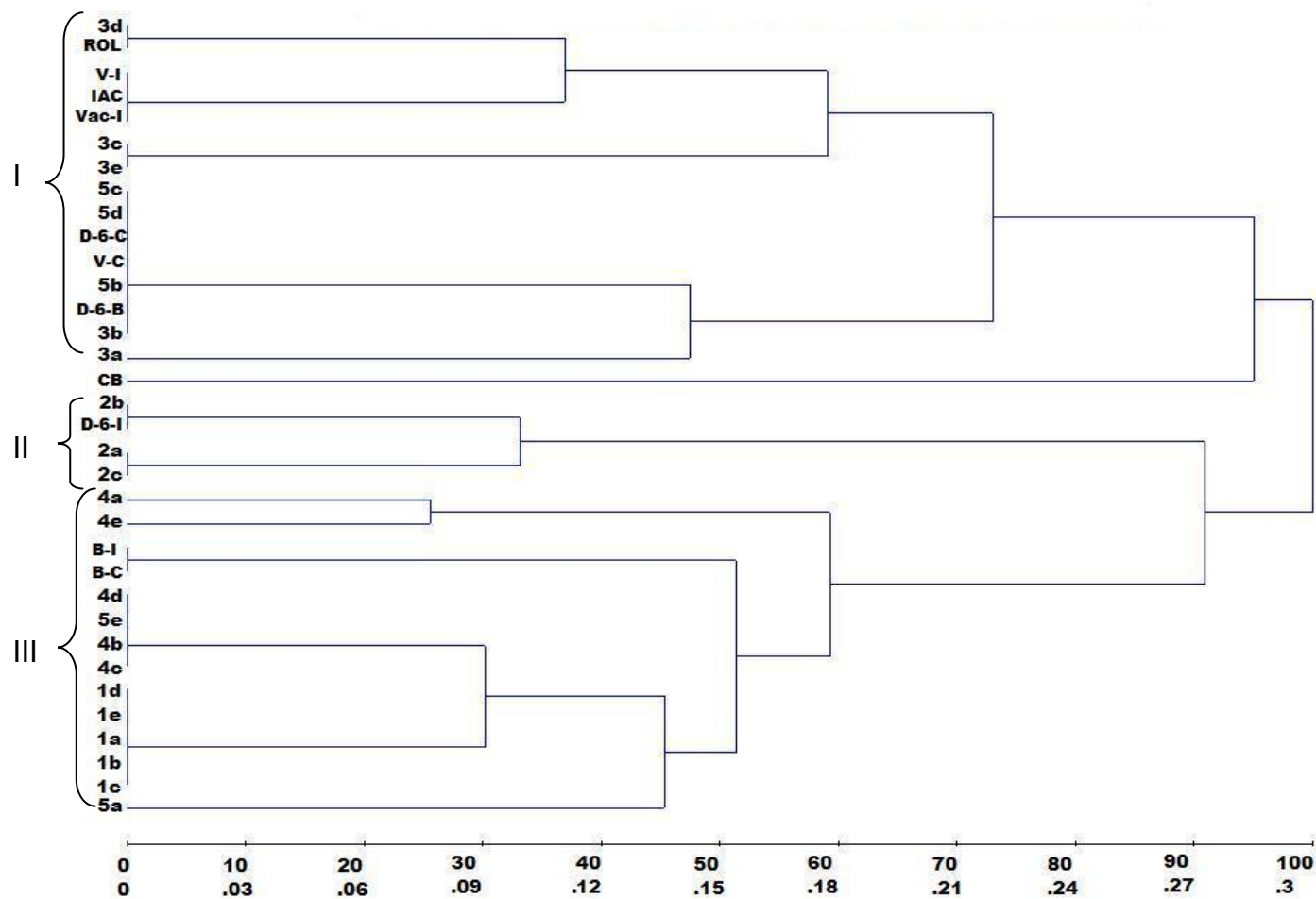


Figura 4. Dendrograma representativo de agrupamento dos isolados do vírus da tristeza (CTV) dos diferentes clones de laranja Pêra, determinado por SSCP do gene da proteína do capsídio (Coeficiente de Jaccard). Coleta realizada em 2005.

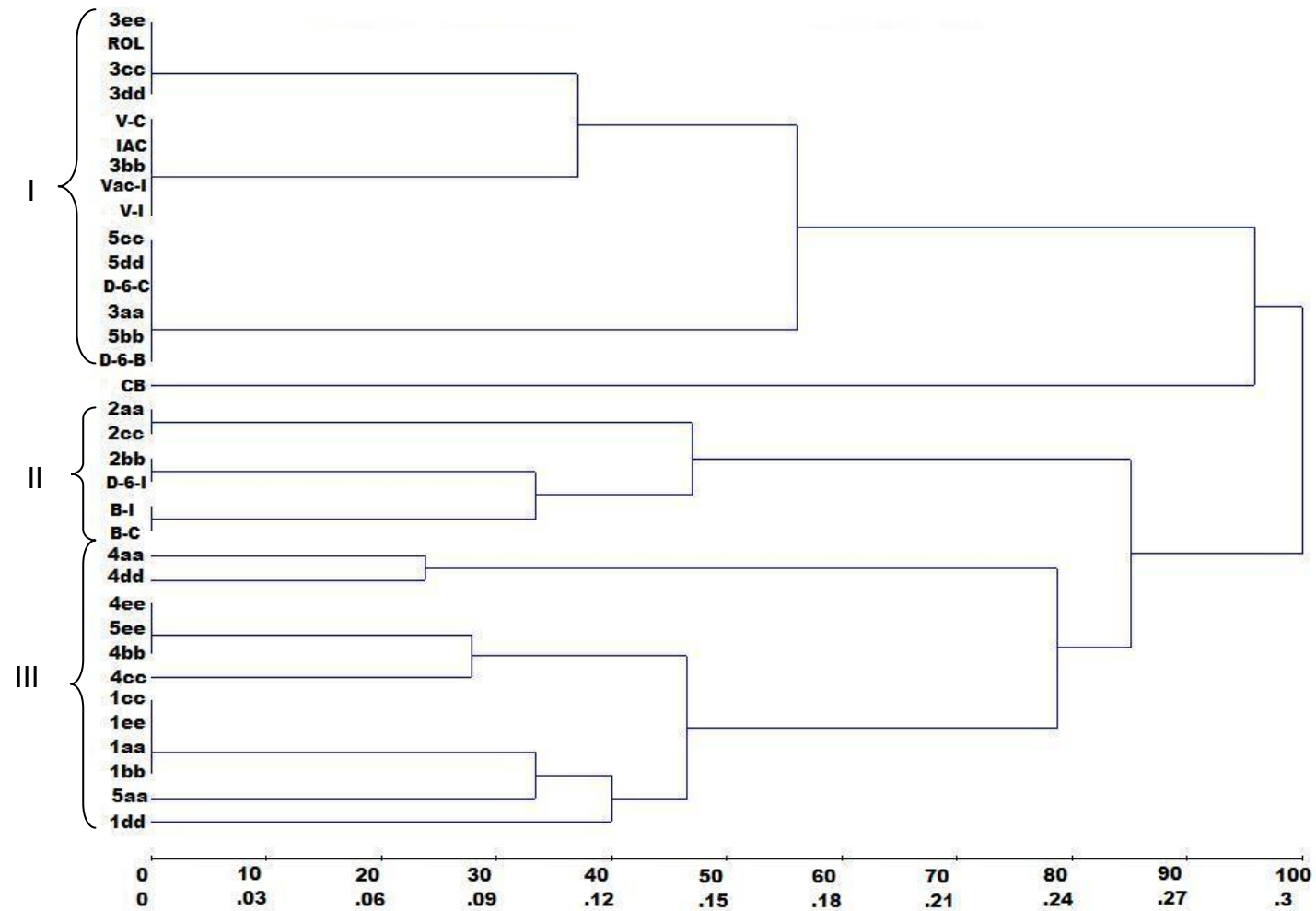


Figura 5. Dendrograma representativo de agrupamento dos isolados do vírus da tristeza (CTV) dos diferentes clones de laranja Pêra, determinado por SSCP do gene da proteína do capsídeo (Coeficiente de Jaccard). Coleta realizada em 2008.

Na Figura 6 é apresentado um gráfico de correlação das matrizes construído a partir das distâncias genéticas. O gráfico permite uma melhor visualização da proximidade genética entre os isolados de CTV presentes nos clones avaliados com o cálculo da correlação entre as matrizes indicando 81% de proximidade entre eles.

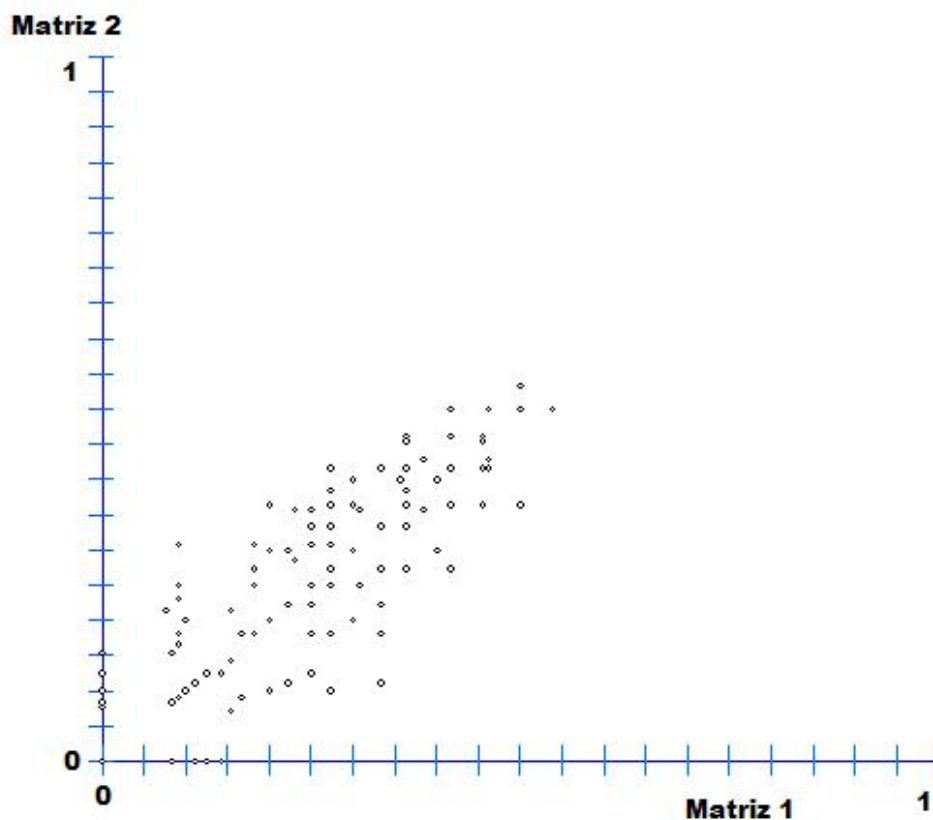


Figura 6. Gráfico representativo da correlação entre as matrizes de distâncias genéticas.

3.4 CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu concluir que:

- A grande maioria dos clones apresentou alterações nos perfis eletroforéticos dos isolados de CTV quando comparados entre si e com os materiais da coleção do IAPAR e dos Estados de São Paulo e da Bahia, no entanto, nenhum dos perfis foi similar ao do isolado forte 'Capão Bonito';
- Os isolados dos clones de Pêra Bianchi 89C estão mantendo a estabilidade do complexo protetivo nas condições de campo do Norte paranaense;
- Apesar dos isolados 3c, 3d e 3e dos clones de Pêra Vacinada 59B apresentarem perfis eletroforéticos semelhantes ao do isolado forte 'Rolândia', estes clones, possivelmente, apresentam tecidos tolerantes ao CTV;
- A partir dos perfis eletroforéticos observados nos isolados dos clones Pêra Vimusa 66B e Pêra Seleção 37 e da avaliação da sintomatologia da tristeza, sugere-se a ocorrência de uma provável quebra de proteção;
- Durante os anos avaliados pouca variabilidade genética foi observada nos isolados dos clones analisados.

3.5 REFERÊNCIAS

ALBIACH-MARTÍ, M.R.; GUERRI, J.; HERMOSO de MENDONZA, A.; 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, nº2, p.134-138, 2000.

AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. **Virology**, v.255, nº1, p.32-39, 1999.

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

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

BORDIGNON, R.; MEDINA-FILHO, H.P.; MÜLLER, G.W.; SIQUEIRA, W.J.; A tristeza dos citros e suas implicações no melhoramento genético de porta enxertos. **Bragantia**, v.62, nº3, p.345-355, 2003.

CARRARO, B.P.; NUNES, W.M.C.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R. Avaliação de complexos do *Citrus tristeza virus* da região Norte do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Scientiarum**, v.25, nº2, p.269-273, 2003.

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 virus* (CTV) complexes in preimmunized Marsh seedless grapefruit. **Summa Phytopathologica**, v.27, p.11-16, 2001.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO, M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of citrus active germplasm bank. **Summa Phytopathologica**, v.32, nº4, p.322-327, 2006.

COSTA, A.T.; CORAZZA-NUNES, M.J.; MÜLLER, G.M.; NUNES, W.M.C.; ZANUTTO, C.A.; MOLINA, R.O.; MACHADO, M.A. Estudos moleculares de complexo do *Citrus tristeza virus* para uso em um programa de pré-imunização. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.S275, 2006, (Suplemento).

CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. **Universidade Federal de Viçosa**, 1997, 442p.

DAVINO, S.; RUBIO, L.; DAVINO, M. Molecular analysis suggests that recent *Citrus tristeza virus* outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions. **European Journal of Plant Pathology**, v.111, nº3, p.289-293, 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 Pathology**, v.49, nº2, p.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. **Molecular Ecology**, v.12, nº2, p.517-526, 2003.

GILLINGS, M.; BROADBENT, P.; INDSTO, J. Restriction analysis of amplified CTV coat protein cDNA is a sensitive and rapid method for monitoring and controlling CTV infections. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 13., 1996, Riverside. **Proceedings: Riverside IOCV**, 1996. p.25-37.

IGLESIAS, N.G.; GAGO-ZACHERT, S.P.; ROBLEDO, G.; COSTA, N.; PLATA, M.I.; VERA, O.; GRAU, O.; SIMORILE, L.C. Population structure of *Citrus tristeza virus* from field Argentinean isolates. **Virus Genes**, v.36, nº1, p.199-207, 2008.

KIM, D.H.; SHIM, H.K.; HYEON, J.W.; KWON, H.M.; KIM, K.S.; CHOI, M.S.; LEE, J.K.; KIM, D.G.; YANG, J.S.; LEE, S.C. SSCP analysis of variations in haplotypes of *Citrus tristeza virus* isolated from Yuzu (*Citrus junos*) in geographically separate regions of Korea. **Journal of Plant Biology**, v.49, nº1, p.88-96, 2006.

LEONEL, W.M.S. **Avaliação molecular do *Citrus tristeza virus* de clones de laranja doce submetidos á limpeza clonal e pré-imunização**. 2004. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2004.

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

MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, v.20, nº2, p.399-408, 1999.

MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A.; SOUZA, A.A.; CORAT, M.A.F.; TEÓFILO-SOBRINHO, J. Padrões SSCP do CTV em clones de laranja 'Pêra' desafiados

com o complexo 'Capão Bonito' no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.445, 2000 (Suplemento).

NIBLETT, C.L.; PAPPU, H.R.; PAPPU, S.S.; FEBRES, V.J.; MANJUNATH, K.L.; LEE, R.F.; GROSSER, J.W.; SCHELL, J. Progress on the characterization and control of citrus tristeza virus. **Proc. Fla. State Soc.**, v.106, p.99-102, 1993.

RUBIO, L.; GUERRI, J.; MORENO, P. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of DNA complementary to their RNA population. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 14., 2000, Riverside. **Proceedings**: Riverside IOCV, 2000. p.12-17.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDEZ, A.; POLEK, M.; GUERRI, J.; MORENO, P.; FALK, B.W. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. **Journal of Virology**, v.75, nº17, p.8054-8062, 2001.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, v.51, nº3, p.257-265, 2002.

SAMBADE, A.; AMBROS, S.; LOPEZ, 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 co-inoculated with mild and severe variants. **Archives of Virology**, v.152, nº6, p.1115–1126, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSH, J.; MANATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,1886p.

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

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

SOUZA, A.A.; CARVALHO, S.A.; TARGON, M.L.P.N.; MÜLLER, G.W.; MACHADO, M.A. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by SSCP of the coat protein gene in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. In:Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 14., 2000b, Riverside. **Proceedings**: Riverside IOCV, 2000b. p.131-135.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do vírus da tristeza dos citros em plantas pré-imunizadas com sintomas de tristeza. **Summa Phytopathologica**, v.28, nº2, p.154- 159, 2002a.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; MACHADO, M.A. Stability of the mild protective 'PIAC' isolate of *Citrus tristeza virus*. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 15., 2002b, Riverside. **Proceedings**: Riverside IOCV, 2002b. p.131-135.

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

TEMPORAL, W.M. **Análise SSCP da estabilidade de isolados protetivos do *Citrus tristeza virus* em clones de laranja Pêra nas condições paranaenses**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, 2006.

VAN DER VYVER, J.B.; VAN VUUREN, S.P.; LUTTIG, M.; DA GRAÇA, J.V. Changes in the *Citrus tristeza virus* status of pre-immunized grapefruit field trees. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 15., 2002, Riverside. **Proceedings**: Riverside 2002. p.175-184.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; SAMBADE, A.; MIRKOV, T.E.; MORENO, P.; GUERRI, J. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. **Virology**, v.331, nº2, p.232-237, 2005.