

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMPORTAMENTO DE VARIEDADES DE CITROS EM RELAÇÃO AO
Citrus tristeza virus (CTV) EM DIFERENTES ECOSSISTEMAS**

ALMIR SANTOS RODRIGUES

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2012

**COMPORTAMENTO DE VARIEDADES DE CITROS EM RELAÇÃO AO
Citrus tristeza virus (CTV) EM DIFERENTES ECOSISTEMAS**

ALMIR SANTOS RODRIGUES

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Paulo Ernesto Meissner Filho

Co-orientadora: Cristiane de Jesus Barbosa

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

R696	<p>Rodrigues, Almir Santos. Comportamento de variedades de citros em relação ao Citrus tristeza virus (CTV) em diferentes ecossistemas / Almir Santos Rodrigues._ Cruz das Almas, BA, 2012. 78f.; il.</p> <p>Orientador: Paulo Ernesto Meissner Filho. Coorientadora: Cristiane de Jesus Barbosa.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Frutas cítricas. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.3</p>
------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Central - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ALMIR SANTOS RODRIGUES**

Dr. Paulo Ernesto Meissner Filho
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientador)

Prof.^a Dra. Ana Cristina Fermino Soares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. José Geraldo de Aquino Assis
Universidade Federal da Bahia

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

MAIO - 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde, perseverança e paciência para alcançar meus objetivos.

Aos meus familiares, que de modo significativo sempre exercem grande influência em minha vida, oferecendo amor, respeito e confiança.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e à Embrapa Mandioca e Fruticultura pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, aos professores pelos ensinamentos transmitidos durante o curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

À Dra. Cristiane Barbosa pela amizade, confiança, oportunidade e estímulo à pesquisa, nestes seis anos de parceria científica.

Ao Dr. Paulo Meissner pela disposição, paciência e conhecimento transmitido nestes dois anos que estive sob sua orientação.

Ao Dr. Emanuel Abreu pela atenção e apoio crucial nas análises moleculares.

Ao Dr. Eduardo Andrade pela disponibilidade e atenção.

Ao Dr. Hermes Peixoto pela colaboração nos trabalhos de campo.

Ao Dr. Orlando Passos pelo importante apoio na fase inicial dos trabalhos de campo.

Aos proprietários da Fazenda Bagisa/SA e à Dra. Débora Costa da Embrapa Semiárido, também pelo importante apoio na fase inicial dos trabalhos de campo.

À toda equipe do Laboratório de Virologia: Karinna, Keilla, Cleidiane, Adriana, Taylane, Alessandra, Gabriella e João Paulo, pela amizade, apoio e conhecimento transmitido.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia, em especial aos amigos, Líliam, Rita e Henrique pela disponibilidade e apoio na fase de conclusão dos trabalhos de campo e análises dos dados obtidos.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular, em especial aos colegas Raimundo, Vandeson, Fernanda e Epaminondas, pela atenção e disponibilidade.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da EBDA, em especial aos amigos, Marcela, Tâmires, Kelly, Cynthia e Paulo, pela disponibilidade e companheirismo. Ao Dr. Frederico Rodrigues da EBDA pela concessão da bolsa do CNPq, com a qual iniciei o mestrado.

Aos funcionários do setor de campo da Embrapa, em especial ao Sr. Teixeira, Sr. Santana e Sr. Getúlio.

À Fátima pela disponibilidade e dicas nas análises de SSCP.

Aos amigos da República Papa Jaca: Djalma, Neto, Bruno, Júnior, Saulo, Darlan, Fabrício e Samir, pela amizade e momentos de descontração.

Ao amigo Edvaldo pela grande força nas análises estatísticas dos resultados.

Aos amigos e colegas de curso pelo companheirismo.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

Obrigado!

ÍNDICE

RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO GERAL	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1. A cultura dos citros: origem e distribuição	13
2. A Tristeza dos citros	14
3. O <i>Citrus tristeza virus</i>	18
4. Detecção e variabilidade do CTV	19
5. Manejo da Tristeza dos citros	21
MATERIAL & MÉTODOS	
1. Material vegetal e caracterização dos ecossistemas	
1.1. Material vegetal	24
1.2. Caracterização dos Ecossistemas	24
2. Avaliação das plantas básicas de citros nos diferentes ecossistemas	
2.1. Avaliação de caneluras de Tristeza	26
2.2. Avaliação da presença e concentração do CTV	26
3. Ensaio de indexação biológica	27
4. Análise molecular dos isolados de CTV coletados em diferentes ecossistemas	
4.1. Material Vegetal	29
4.2. Extração de RNA total com Trizol	29
4.3. Análise de RT-PCR	30
4.4. Análise SSCP do gene da capa proteica	30
4.5. Análise de restrição	31
5. Análise estatística	32

RESULTADOS & DISCUSSÃO

1. Avaliação das plantas básicas de citros nos diferentes ecossistemas	33
2. Ensaio biológico	40
3. Análise molecular dos isolados de CTV coletados em diferentes ecossistemas	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	73

RESUMO

RODRIGUES, A.S. **Comportamento de variedades de citros em relação ao *Citrus tristeza virus* (CTV) em diferentes ecossistemas.** Cruz das Almas, 2012. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

O estabelecimento da citricultura em novos ecossistemas, associado ao uso de novas variedades, torna necessário avaliar o seu comportamento para o *Citrus tristeza virus* (CTV). Este trabalho analisou o comportamento de dez variedades de citros em relação à Tristeza, quando cultivadas nos Tabuleiros Costeiros (Recôncavo Sul), Cerrado (Chapada Diamantina) e Semiárido (Vale do São Francisco). As plantas foram avaliadas quanto à severidade de caneluras nos ramos e por ELISA indireto. Amostras de citros cultivados nos ecossistemas em estudo foram enxertadas em plantas indicadoras: a laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.), a limeira ácida 'Galego' (*C. aurantifolia* Christm. Swing) e o pomeleiro 'Duncan' (*C. paradisi* Macfad) em condições controladas. As plantas foram observadas mensalmente quanto à presença de sintomas foliares. Doze meses depois da inoculação foi realizado teste de ELISA indireto para o CTV. Nas avaliações do desenvolvimento vegetativo das indicadoras e seus respectivos controles, mensurou-se a altura, o peso seco e a severidade de caneluras na haste principal. O RNA total extraído das amostras das indicadoras foi analisado por RT-PCR, SSCP e por digestão com enzimas de restrição. As plantas estabelecidas no Cerrado apresentaram caneluras mais severas. No entanto, as maiores leituras de absorvância no ELISA foram observadas, em sua maioria, nas plantas dos Tabuleiros Costeiros. Os resultados obtidos nas plantas indicadoras e as avaliações moleculares dos isolados de CTV dos diferentes ecossistemas, sugerem que eles são estirpes semelhantes. As variações de sintomas apresentados nas plantas estabelecidas nos diferentes ecossistemas parecem ser devidas a fatores ambientais.

Palavras-chave: tolerância, clima, estirpes, virologia.

ABSTRACT

RODRIGUES, A.S. **Behavior of citrus varieties in relation to *Citrus tristeza virus* (CTV) in different ecosystems.**

Establishment of citrus industry in new ecosystems, associated with the use of new varieties, makes it necessary to evaluate their behavior for the *Citrus tristeza virus* (CTV). This study examined the performance of ten varieties of citrus in relation to CTV, when grown in the Coastal Plains (South Recôncavo), Savannah (Chapada Diamantina) and semiarid (Valley of the São Francisco). The plants were evaluated for severity of grooves in the branches and by ELISA. Samples of citrus plants grown in the ecosystems studied were grafted onto indicator plants: the 'Sour' orange (*C. aurantium* L.), the acid lime 'Galego' (*C. aurantifolia* Christm. Swing) and pomeleiro 'Duncan' (*C. paradisi* Macfad) under controlled conditions. The plants were observed monthly for the presence of foliar symptoms. Twelve months after inoculation, plants were tested by indirect ELISA for CTV. Evaluations of the vegetative development of indicator plants and their respective controls, measured the height, dry weight and severity of grooves on the main stem. Total RNA of indicator plants was analyzed by RT-PCR, SSCP and by digestion with restriction enzymes. The established plants in the Cerrado showed more severe corrugations. However, the highest absorbance readings by ELISA were observed mostly in plants of the Coastal Plains. The results obtained in the indicator plants and molecular assessments of CTV isolates of different ecosystems, suggest they are similar strains. The variations of symptoms in established plants in different ecosystems seem to be due to environmental factors.

Keywords: tolerance, climate, strains, virology.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e principal exportador de suco de laranja concentrado e congelado (FNP, 2010). Detém 50% da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% do que produz (NEVES, et al., 2010). A produção nacional de laranja é de 19.831.787 toneladas, tendo os estados de São Paulo e Bahia como os maiores produtores (IBGE, 2011).

A cultura dos citros está sujeita a um grande número de doenças que podem tornar-se fatores limitantes. A Tristeza dos citros, causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), é uma virose de grande importância econômica nesta cultura. Ele pode infectar praticamente todas as espécies, cultivares e híbridos de citros (KARASEV, 2000). O CTV pertence ao gênero *Closterovirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000), sendo transmitido de forma semi-persistente pelo pulgão preto dos citros, *Toxoptera citricidus* Kirkaldy, e por material propagativo infectado (MURPHY et al., 1995).

O convívio com a doença, que é endêmica no país, foi possível por meio da utilização de porta-enxertos tolerantes e da proteção cruzada de copas mais suscetíveis (pré-imunização) (MULLER et al., 2005).

A Bahia tem uma produção de 1.033.917 toneladas de laranja, possuindo a segunda maior área cultivada do país, com 78 mil hectares. A citricultura é praticada na agricultura familiar, sendo que cerca de 80% dos pomares têm área inferior a 10 hectares (IBGE, 2011).

Os citros na Bahia são cultivados, basicamente, nos Tabuleiros Costeiros, principalmente na região do Litoral Norte e no Recôncavo Sul (CARVALHO, 2005). O clima na região é do tipo úmido, com pluviosidade média anual de 1.170 mm e temperatura média anual de 25°C (RIBEIRO, 1998), com mínima de 20°C na estação seca e máxima de 28°C na estação chuvosa (D'ANGIOLELLA et al., 1998).

A Chapada Diamantina, uma área de Cerrado, com altitude superior a 1.000 m, surge como uma das regiões com maior potencial para a produção de citros para mesa no país. O clima é o fator determinante de distinção para o

cultivo de variedades para produção de frutas de mesa, devido às baixas temperaturas que ali ocorrem, a qualidade das frutas cítricas, destinadas ao consumo *in natura*, é bastante superior às produzidas em outras regiões do Estado (PASSOS et al., 2005). A pluviosidade média anual é de 1.100 mm e a temperatura média anual é de cerca de 20°C, com mínima de 13°C na estação seca e máxima de 30°C na estação chuvosa (FAUSTINO & MACHADO, 2006; CPTEC, 2011).

O Submédio São Francisco, uma região do Semiárido, onde se insere o Pólo Petrolina/Juazeiro, abrange nos Estados da Bahia e de Pernambuco 115.986 km² ou 18,2% do Vale do São Francisco. O regime pluviométrico é inferior a 600 mm, a temperatura média anual é de 27°C, com mínima de 21°C e máxima de 32°C (MOURA & ANGELOTTI, 2008), constituindo vantagem comparativa no que tange à produção de biomassa e produtos hortícolas, principalmente frutas, mediante a suplementação de água via irrigação. A região apresenta condições privilegiadas, e únicas no País, no que diz respeito à produção de citros, principalmente limeiras ácidas e pomeleiros (PASSOS et al., 2010).

Como ameaças à citricultura destas novas fronteiras estão a baixa diversidade genética das plantas cultivadas e o uso de material propagativo não indexado, que aumentam a sua vulnerabilidade à novas epidemias, com importantes consequências para a sustentabilidade deste agronegócio, a exemplo da Tristeza em décadas passadas (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2010).

O estabelecimento da citricultura em novas fronteiras citrícolas na Bahia, como a Chapada Diamantina, Semiárido e Oeste baiano, a necessidade de utilização de novas variedades de citros que atendam ao segmento de consumo da fruta *in natura* (PASSOS et al., 2005; PASSOS et al., 2010), torna necessário a realização de estudos quanto ao seu comportamento em relação à Tristeza.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de dez variedades de citros em relação à Tristeza, quando cultivadas nos ecossistemas dos Tabuleiros Costeiros, Cerrado e Semiárido.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura dos citros: origem e distribuição

Há registro do cultivo de citros na bacia do Mediterrâneo desde o ano 300 a.C., (BAR-JOSEPH et al., 1989). O gênero *Citrus* pertence à tribo *Citreae*, subfamília *Aurantioideae*, família *Rutaceae*, e é nativo das regiões tropicais e subtropicais do continente asiático, com ramos filogenéticos que se estendem do centro da China ao Japão e do leste da Índia a Nova Guiné, Austrália e África Tropical (SWINGLE & REECE, 1967; SOOST & CAMERON, 1975). O Norte da região Indo-Burma também é apontado como centro de origem da maioria das espécies cítricas (ZIEGLER & WOLFE, 1961). A região de Yunnan, no centro sul da China, também pode ter sido importante para a origem e dispersão inicial de um grande número de espécies primitivas, tendo um papel determinante na origem e distribuição das espécies modernas de *Citrus* (GMITTER JUNIOR & HU, 1990; DAVIES & ALBRIGO, 1994).

A cidreira (*Citrus medica* L.) foi a primeira espécie conhecida pelas civilizações européias, seguida pela laranjeira 'Azeda' (*C. aurantium* L.), limoeiro (*C. limon* Burmann) e laranjeira doce (*C. sinensis* L. Osbeck) (WEBBER et al., 1967; CHAPOT, 1975). Nas Américas, Sul da África e Austrália, a introdução dos citros se deu pela expansão colonial européia. Na América do Norte, os citros foram introduzidos pelas Ilhas Canárias por Cristóvão Colombo, por volta de 1493 (CHAPOT, 1975). Todas as espécies de *Citrus* e gêneros afins economicamente importantes são originárias do continente asiático. Uma exceção é o pomeleiro (*C. paradisi* Macfadyen), que provavelmente surgiu ao redor de 1790, como um mutante, ou talvez, um híbrido natural em Barbados, no Caribe, após a introdução da toranjeira e da laranjeira doce pelos colonizadores europeus (SCORA et al., 1982; BOWMAN & GMITTER JUNIOR, 1990).

No Brasil, as plantas cítricas foram introduzidas pelos portugueses no início das expedições colonizadoras, no século XVI, provavelmente na Bahia, se expandindo logo em seguida para os estados de São Paulo e Rio de Janeiro (MOREIRA & MOREIRA, 1991). Presume-se que as primeiras plantas de citros foram cultivadas a partir de 1501, nas feitorias construídas pelo governo de Portugal, sendo que em 1540 já existiam laranjais espalhados pelo litoral, de Norte a Sul (NEVES & LOPES, 2005). A partir dessa data, o cultivo das plantas cítricas se expandiu por todo o país devido às condições ideais para vegetar e produzir, adaptando-se muito bem em certas áreas, como em Mato Grosso (MOREIRA & MOREIRA, 1991).

Hoje a citricultura está amplamente distribuída e é economicamente importante nas diferentes regiões do Brasil, destacando o país como maior produtor mundial de citros (FAO, 2011).

A Tristeza dos citros

A Tristeza dos citros é considerada uma doença altamente destrutiva para os citros (MORENO et al., 2008). Acredita-se que seja proveniente da China (BAR-JOSEPH et al., 1981), centro de origem da maioria das espécies de *Citrus* (TANAKA, 1954), e tenha se disseminado para outras partes do mundo por mudas e borbulhas infectadas.

Segundo CARREIRA (1933), a primeira grande devastação causada por essa virose ocorreu em 1930, em Corrientes, Argentina, onde se verificou a perda de 10 milhões de árvores em 15 anos. Estima-se que mais de 50 milhões de árvores morreram ou se tornaram improdutivas no mundo, causando prejuízos diretos de centenas de milhões de dólares em diversos países e a seus produtores (BAR-JOSEPH et al., 1989).

MOREIRA (1942) denominou-a de Tristeza e salientou que ocorria no Brasil desde antes de 1937. Em 12 anos, dizimou sete milhões de árvores, o que correspondia a 75% dos pomares brasileiros de laranjeiras doces que, nessa época, eram enxertadas em laranjeira 'Azeda', porta-enxerto

considerado como intolerante ao seu agente causal (MOREIRA et al., 1949; ROBERTS et al., 2001).

O agente etiológico da Tristeza é um vírus, denominado de vírus da Tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*, CTV). As partículas do CTV foram observadas pela primeira vez no Brasil por KITAJIMA et al. (1963), em microscópio eletrônico. Eles visualizaram partículas longas e flexuosas em preparações de plantas infectadas. Essas partículas não foram encontradas em amostras de plantas saudáveis, bem como em espécies e variedades de citros conhecidas por sua imunidade ou resistência ao vírus, como *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia* ou Citrange 'Troyer' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) (KITAJIMA et al., 1963).

A natureza infecciosa da Tristeza foi confirmada por MENECHINI et al. (1946) que demonstrou sua transmissão pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). Posteriormente ela também foi transmitida por enxertia de borbulhas (BAR-JOSEPH et al., 1989). Anteriormente, inúmeras outras causas haviam sido propostas para a Tristeza, dentre elas: incompatibilidade fisiológica entre a copa e o porta-enxerto, acidez e alto teor de umidade do solo e prolongados períodos de seca (BORDIGNON et al., 2003).

A manifestação dos sintomas da Tristeza depende das condições do ambiente e de fatores inerentes à própria planta, como a idade, a capacidade de permitir a multiplicação do vírus e a tolerância dos tecidos, principalmente do floema (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Para a Organização Internacional de Virologistas de Citros (IOCV) (PARLEVLIET, 1997; MUNIZ et al., 2010; YOKOMI et al., 2010), e a maioria dos virologistas de citros no Brasil (FEICHTENBERGER et al., 2005), as plantas cítricas têm sido classificadas como resistentes ou imunes ao CTV quando apresentam a habilidade de suprimir a replicação do vírus em seus tecidos. Algumas destas plantas, mesmo após severas e repetidas inoculações, não permitem a replicação do vírus, como é o caso do *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia*, *Swinglea glutinosa*, *Glycomis citrifolia*, *Atalantia ceylanica*, *Fortunella* spp., *Murraya paniculata*, *Merrillia* spp., *Triphasia trifolia*, *Pleiospermium alatum*, *Aegle* spp., *Feronia* spp., *Ferontella* spp. (YOSHIDA,

1996). Por outro lado, são consideradas como suscetíveis àquelas plantas que permitem a replicação do CTV. São consideradas tolerantes quando exibem pouco ou nenhum sintoma e como intolerantes quando exibem os sintomas da doença (AGRIOS, 2005; CARVALHO & MÜLLER, 2010; MORENO et al., 2010).

Utilizando a classificação anteriormente descrita, são consideradas tolerantes ao CTV, a maioria das laranjeiras doces [*C. sinensis* (L.) Osbeck] e as tangerineiras (*C. reticulata* Blanco), e intolerantes, a laranjeira doce cv. 'Pêra', algumas limeiras como o 'Galego' [*C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle] e os pomeleiros (*C. paradisi* Macf.). A limeira ácida 'Tahiti' também apresenta alguma intolerância a estirpes mais virulentas do CTV (MULLER et al., 2005).

Assim os sintomas da Tristeza variam com as variedades de citros em avaliação, assim como com a virulência dos isolados (GARNSEY, 2002). Os sintomas podem ser agrupados em três tipos principais (SATYANARAYANA et al., 2001; DJELOUAH & D'ONGHIA, 2001; FEICHTENBERGER et al., 2005, MORENO et al., 2008):

- Tristeza Clássica: observados em combinações de laranjeira doce, pomeleiros e tangerineiras tendo como porta-enxerto a laranjeira 'Azeda'. Com a substituição deste porta-enxerto no Brasil, estes sintomas não se observam em nossas condições. As plantas estabelecidas em laranjeira 'Azeda' apresentam na região da enxertia, a formação de células cromáticas, colapso e necrose dos tubos crivados, super produção e degradação de células do floema. Como consequência do bloqueio do transporte de fotoassimilados para as raízes, ocorre podridão e morte das radículas e, por fim, o declínio da planta caracterizado por sintomas não específicos: folhas ligeiramente bronzeadas de aspecto coriáceo e quebradiças; em alguns casos ocorre o amarelecimento da nervura principal, amarelecimento total das folhas velhas e seca gradativa dos galhos a partir das extremidades (*dieback*). Muitas vezes pode ocorrer o declínio rápido das plantas (*quick decline*);

- Caneluras (*stem pitting*): são depressões longitudinais que se formam no lenho das plantas, também são observados o enfezamento da planta, formação

de ramos frágeis e quebradiços e folhas pequenas e cloróticas, semelhante aos sintomas de deficiência de zinco, manganês e outros nutrientes. Os frutos ficam miúdos, sendo denominados “coquinhos”, que apresentam conformação defeituosa, com albedo espesso, elevada acidez e baixo teor de suco. Esses sintomas são observados quando a copa é laranjeira ‘Pêra’, pomeleiros, limoeiros ‘Galego’ e limeira ácida ‘Tahiti’, mesmo quando propagados em porta-enxerto tolerante. Nas folhas das limeiras ácidas, como o limoeiro ‘Galego’, e em algumas outras Rutáceas, observa-se característica palidez das nervuras (*vein clearing*);

- Amarelecimento do pé franco (*seedling yellows*), caracterizado por uma clorose severa e nanismo da planta, é observado em mudinhas de pé franco de laranjeira ‘Azeda’, limoeiro verdadeiro, pomeleiro e limoeiro ‘Galego’, quando inoculadas com estirpes virulentas de CTV.

Dentre os fatores ambientais que podem interferir na expressão de sintomas da Tristeza, a temperatura parece ser o fator determinante (DODS et al., 1987; BAR-JOSEPH et al., 1989). Sintomas mais acentuados da doença estão relacionados a temperaturas mais baixas em diferentes países (BAR-JOSEPH et al., 1989; BROADBENT et al., 1991). No Brasil, os maiores problemas estão no cultivo de laranjeira ‘Pêra’ pré-imunizada nas regiões de clima mais frio, como em Capão Bonito e Itapetininga, no estado de São Paulo (CARVALHO et al., 2011). Segundo SALIBE et al. (2002) todas as plantas de laranjeira ‘Pêra’, mesmo aquelas pré-imunizadas, desenvolvem sintomas de caneluras ou *stem pitting* nos ramos, sendo esses mais intensos nas regiões de climas mais amenos, como no Sul e no Sudoeste do planalto paulista. Sintomas fortes da Tristeza têm sido descritos em laranjeiras Pêra IAC 2000, uma variedade pré-imunizada contra o CTV, no Sul do estado de São Paulo, onde as temperaturas são mais baixas. A mesma variedade se comporta como tolerante ao vírus quando cultivada no Norte de São Paulo, onde as temperaturas são mais elevadas (CARVALHO et al., 2011).

O *Citrus tristeza virus*

O CTV foi observado pela primeira vez no Brasil em plantas com sintomas de Tristeza analisadas em microscópio eletrônico por Kitajima et al. (1963). O vírus pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Closterovirus*, apresentando partículas filamentosas e flexuosas, medindo 1.250 a 2.000 nm de comprimento e com 10-12 nm de diâmetro (KARASEV et al., 1995; KITAJIMA et al., 1997; MARTELLI et al., 2005). Possui RNA de fita simples (ssRNA), senso positivo, não segmentado, com peso molecular aproximado de $6,5 \times 10^3$ kDa, que corresponde a 20 kb (BAR JOSEPH et al., 1979; HILF et al., 1995).

O genoma completo do CTV possui de 19.226 a 19.296 nucleotídeos (ALBIACH-MARTI et al., 2000; TARGON et al., 2000; RUBIO et al., 2001), dependendo do isolado, e possui 12 “open reading frames” (ORFs), regiões não traduzidas em cada extremidade do RNA, codificando pelo menos 19 proteínas, que possuem tamanho de 6 a 349 kDa (RUBIO et al., 2001).

A proteína do capsídeo do CTV tem sido caracterizada através de eletroforese em gel de poli-acrilamida, *Western blotting*, mapeamento de polipeptídeo em gel SDS-PAGE e por técnicas sorológicas diversas (NIKOLAEVA et al., 1998).

O vírus infecta as células parenquimáticas do floema, adjacentes aos elementos de tubo crivado (SEKIYA et al., 1991), afetando essencialmente as plantas do gênero *Citrus* e gêneros afins. A única exceção é a possibilidade de infecção de *Passiflora gracilis* pelo CTV (KNORR, 1956).

O CTV pode ser transmitido por enxertia, propagação vegetativa e pelos pulgões vetores (DJELOUAH & D'ONGHIA, 2001; ROBERTS et al., 2001; PERSAD & HOY, 2003). A eficiência da transmissão de CTV é bastante variável, sendo o pulgão preto *Toxoptera citricidus* Kirk., o vetor mais importante e eficiente, embora *Aphis craccivora*, *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *Myzus persicae*, *T. aurantii* e *Dactynotus jacea* também atuem como vetores. No Brasil, o vírus da Tristeza é endêmico devido à alta eficiência e a prevalência do *T. citricidus* em nossas condições (MÜLLER et al., 2005).

O pulgão preto apresenta um ciclo de vida não-holocíclico (sem gerações com reprodução assexuada) em regiões tropicais e subtropicais, podendo apresentar ciclo holocíclico em condições temperadas (KOMAZAKI, 1993; MICHAUD, 1998). Seu comportamento alimentar é único e tecido-específico, preferindo a seiva elaborada que flui pelos elementos de tubo crivado. Ele alimenta-se em tecidos novos, como folhas jovens e botões florais (TSAI et al., 1999). Seu dano principal não é causado pela sua alimentação nas plantas hospedeiras, mas pela transmissão do CTV (FEBRES et al., 1996; MEHTA et al., 1997).

Deteção e variabilidade do CTV

Diferentes estirpes do CTV têm sido relatadas nas áreas citrícolas do mundo causando sintomas variados, desde leve clareamento das nervuras a severas caneluras do lenho, acompanhadas de rápido declínio e necrose do floema (GARNSEY et al., 1991; ROCHA-PEÑA et al., 1995). As estirpes do vírus podem coinfetar uma mesma planta e apresentar virulência distinta (PERONI, 2008), sendo, mais recentemente, denominadas de subisolados (CARRARO et al., 2003; ANANTHAKRISHNAN et al., 2010) ou haplótipos (SOUZA et al., 2002a; KIM et al., 2006).

As propriedades biológicas do vírus, como severidade dos sintomas induzidos em plantas no campo ou em plantas indicadoras, sua transmissibilidade por afídeos, ou a habilidade de proteção cruzada, foram inicialmente utilizadas para caracterizar as diferentes estirpes. Assim, baseado nos sintomas causados pelo CTV em um único hospedeiro, as estirpes foram, inicialmente, classificadas em fracas, médias e fortes, de acordo com a severidade dos sintomas que causavam nas plantas indicadoras em ensaios biológicos (MÜLLER & COSTA, 1976; BAR-JOSEPH et al., 1989).

A forma mais simples, antiga e eficiente de caracterização de estirpes de CTV é o método biológico. Ele se baseia no conjunto de sintomas manifestados em diferentes plantas indicadoras, que respondem mais rapidamente à inoculação experimental com o vírus (MUKHOPADHYAY, 2004; MORENO et

al., 2008). São geralmente utilizadas como indicadores para a Tristeza, as variedades de laranja 'Azeda', limeira ácida 'Galego' ou limoeiro 'Galego', pomeleiros 'Marsh seedless' e 'Duncan', limoeiro 'Eureka' [*C. limon* (L.) Burm. f.] e laranja doce 'Madame Vinous', entre outras (LEE et al., 1994; MÜLLER et al., 1994; CARVALHO et al., 1997).

As técnicas sorológicas só puderam ser estabelecidas após a introdução de protocolos eficientes para purificação do CTV, o que possibilitou o desenvolvimento de antissoros policlonais e monoclonais específicos para as diferentes estirpes de CTV (ROCHA-PEÑA & LEE, 1991). A disponibilidade dos anticorpos monoclonais e policlonais contra as proteínas do capsídeo do CTV permitiu, a partir de 1978, a utilização de diversas técnicas imunológicas capazes de detectar este vírus e sua variabilidade, dentre elas: imunodifusão dupla com SDS (GARNSEY et al., 1979); *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (BAR-JOSEPH et al., 1979); *radio immunosorbente assay* (RIA) (LEE et al., 1981), imunofluorescência (TSUCHIZAKI et al., 1978; BRLANSKY et al., 1984), imunomicroscopia eletrônica (GARNSEY et al., 1980), *Western blot* (LEE et al., 1987), *tissue immunoprint method* (GARNSEY et al., 1993).

Dentre os métodos imunoenzimáticos, o ELISA é o de maior importância para o diagnóstico de CTV, em função da rapidez, seu baixo custo, sua alta sensibilidade, ser um método quantitativo e possibilitar a diferenciação de estirpes (CAMBRA et al., 1990).

Os primeiros trabalhos com biologia molecular com o CTV abordaram: o mapeamento da proteína do capsídeo viral (LEE e CALVERT, 1987; LEE et al., 1988), a análise de RNA de fita dupla (dsRNA) de plantas infectadas (DODDS et al., 1987; BAR-JOSEPH et al., 1989; MORENO et al., 1990) e clonagem e seqüenciamento do genoma viral (PAPPU et al., 1993). A presença de diferentes variantes em isolados de CTV tem sido observada por meio de Análise do Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) e por Polimorfismo Conformacional de DNA de Fita Simples (Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP) (SOUZA et al., 2000; SANTOS et al., 2007). Usando SSCP e RFLP, VASCONCELOS (2000), SOUZA et al., (2002a) e TEMPORAL et al., (2011), demonstraram a

ocorrência de variabilidade em isolados de CTV obtidos de plantas de laranjeira 'Pêra' estabelecidas na Bahia, São Paulo e Paraná.

Outras metodologias utilizadas na identificação e detecção de variabilidade do CTV são a Imunocaptura-PCR (IC-PCR) e Imuno-PCR (I-PCR), a RT-PCR (Transcrição reversa-PCR) (HUNG et al., 2000; HUANG et al., 2004) e a RT-PCR-ELISA (CHANDELIER et al., 2001), juntamente com a PCR quantitativa (qPCR) em Tempo Real, que estão sendo empregados nas clínicas de certificações (RUIZ-RUIZ et al., 2007; SAPONARI, et al., 2008) e contribuem para a eficiente detecção e caracterização das estirpes brasileiras do CTV.

As técnicas de detecção descritas anteriormente permitiram demonstrar a grande diversidade biológica e molecular do CTV no mundo (NIBLETT et al., 2000; KIM et al., 2006; MARQUES et al., 2006) e no Brasil (SOUZA et al., 2002a,b; CARRARO et al., 2003; TEMPORAL et al., 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a alta variabilidade do CTV pode ser em consequência da capacidade das variantes do vírus presentes em uma planta recombinarem (RUBIO et al., 2001). Outro aspecto que favorece esta variabilidade é a capacidade de segregação destes variantes durante sua transmissão pelo vetor (MICHAUD, 1998; KARASEV et al., 1998), borbulhas e/ou pelas podas drásticas (RACCAH et al., 1980; BROADBENT et al., 1996; KOLLER & SOPRANO, 1998).

Manejo da Tristeza dos citros

Quando as combinações de citros enxertadas em laranjeira 'Azeda' foram perdidas no Brasil em função da Tristeza (MOREIRA et al., 1949), a recuperação da citricultura nacional foi possível, principalmente, por meio da utilização de porta-enxertos considerados tolerantes como o limoeiro 'Cravo', limoeiro 'Volkameriano' (*C. volkameriana* L.), *Poncirus trifoliata* e seu híbridos, dentre outros (MULLER & MATTOS JR, 2002).

Para as variedades copa, que ainda são afetadas pelos isolados severos

do CTV, mesmo quando estabelecidas em porta-enxertos tolerantes, o controle baseia-se na pré-imunização (MÜLLER et al., 2005). A laranjeira 'Pêra' e outras variedades de expressão econômica necessitam ser pré-imunizadas com o CTV para serem cultivadas no Brasil. O princípio da pré-imunização consiste em inocular plantas suscetíveis com isolados fracos do vírus, de forma a conferir um efeito protetor em relação às estirpes mais severas (FEICHTENBERGER et al., 2005). É uma técnica inovadora que pode ser considerada precursora da biotecnologia no controle de doenças em citros (ASTUA-MONGE et al., 2004). As bases moleculares da pré-imunização ainda não foram esclarecidas, embora diversas hipóteses tenham sido levantadas. Até a década de 1970, as ideias mais convincentes envolviam a formação de anticorpos, exaustão de metabólitos, limitação de sítios de replicação viral e adsorção das partículas do vírus por componentes celulares específicos (MÜLLER & REZENDE, 2004). Atualmente, as duas hipóteses mais aceitas são: sequestro de moléculas de RNA senso positivo por moléculas de RNA senso negativas do vírus mais fraco e interferência da capa protéica viral fraca em excesso no citoplasma (PENNAZIO et al., 2001).

A reutilização de plantas com características agrônômicas valiosas que se encontram infectadas por isolados fortes do CTV também é possível. Para tanto, se empregam as técnicas de termoterapia (MÜLLER et al., 1974) e microenxertia (NAVARRO et al., 1975), que permitem eliminar o vírus da planta infectada. Essas plantas devem, em seguida, ser pré-imunizadas com estirpes fracas do CTV.

Segundo BORDIGNON et al., 2003, intensos esforços têm sido despendidos no estudo da resistência ao CTV. Já foram identificados três genes independentes conferindo imunidade ao vírus: Ctv1 (GMITTER et al., 1996; CRISTOFANI et al., 1999) presente em *P. trifoliata*; Ctv2 (FANG & ROOSE, 1999) encontrado em *C. máxima* e Ctm (MESTRE et al., 1997) que restringe a movimentação do vírus na planta. Com base no estudo do comportamento de híbridos F1 de *P. trifoliata* x *C. sinensis* (citranges), citranges x *C. sinensis* (citrangores), *P. trifoliata* x *C. paradisi* e de *C. reticulata* x *C. paradisi* (tangelos) realizado por COSTA et al. (1949), busca-se produzir híbridos de *P. trifoliata*, *C. reticulata* e de *C. aurantifolia* com a laranjeira

'Azeda' resistentes à Tristeza.

A transformação genética de plantas é uma nova alternativa para a obtenção de variedades resistentes a patógenos, a exemplo do CTV (SCHINOR, 2006). Já foram obtidas plantas transgênicas de *C. aurantifolia* contendo o gene *p25* da capa protéica do CTV (DOMÍNGUEZ et al., 2002), *C. paradisi* contendo uma construção com o gene *Ctv* de resistência ao vírus (RAI, 2006) e também com diferentes construções contendo o gene da capa protéica de diversas estirpes do CTV (FEBRES et al., 2008). As plantas apresentaram resultados promissores (MUNIZ, 2008).

A Tristeza ainda representa uma ameaça para a citricultura nacional pelo seu caráter endêmico, pela presença do vetor e pela grande variabilidade do vírus o que pode levar a produção e a disseminação de estirpes fortes (ZANUTTO, 2009). Assim, estudos da estabilidade de isolados do CTV em diferentes condições ambientais, são relevantes para o monitoramento da proteção cruzada, bem como para a seleção de estirpes mais estáveis (SANTOS et al., 2007).

A presença da Tristeza em todas as áreas citrícolas brasileiras terá sempre que ser levada em conta na planificação de novos pomares e zonas de cultivos de citros no Brasil. Desse modo, para o estabelecimento de novos plantios, ou lançamento de novos porta-enxertos ou variedade copas, é necessário avaliar o seu comportamento para a Tristeza (ROSSETTI et al., 1993).

MATERIAL & MÉTODOS

5. Material vegetal e caracterização dos ecossistemas

1.1. Material vegetal

Foram avaliadas dez plantas básicas de citros da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**: as laranjeiras doce (*Citrus sinensis* L.) ‘Pêra C21’, ‘Pêra D6’, ‘Rubi’, ‘Valência Tuxpan’ e ‘Westin’, a limeira ácida ‘Tahiti 2001’ (*C. latifolia* Tan.), a limeira da ‘Pérsia’ (*C. limettioides* Tan.), o limoeiro ‘Fino’ [*C. limon* (L.) Burm. F.], o pomeleiro ‘Henderson’ (*C. paradisi* Macfadyen) e o tangeleiro ‘Page’ (*C. paradisi* Macf. X *C. tangerina* Hort. Ex Tan.), enxertadas em limoeiro ‘Cravo’ (*C. limonia* Osbeck) ou ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana* Ten. et Pasq.), e estabelecidas nos ecossistemas dos Tabuleiros Costeiros, Cerrado e Semiárido.

As variedades estudadas foram selecionadas em função de sua importância agrônômica e por constituírem variedades promissoras para recomendação de plantio nas novas fronteiras citrícolas do Cerrado baiano, na Chapada Diamantina, como também no Semiárido do Vale do São Francisco (PASSOS et al., 2005; PASSOS et al., 2010). Para este estudo serão consideradas como padrão de comparação, as variedades cultivadas nos Tabuleiros Costeiros, região de cultivo tradicional de citros (SOARES FILHO & PASSOS, 1978; PASSOS, 1991; SANTOS et al., 2009).

1.2. Caracterização dos Ecossistemas

Tabuleiros Costeiros – representado pelo Recôncavo Sul. A região está a 220 metros acima do nível do mar, possuindo médias anuais de temperatura de 25°C (min. 20°C e máx. 28°C) e precipitação pluviométrica de 1.000 mm

(RIBEIRO, 1998). A região apresenta relevo plano e solo do tipo Latossolo Amarelo Coeso (JACOMINE, 1996). As plantas básicas, com dez anos de idade, encontravam-se estabelecidas em área experimental da **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, em Cruz das Almas, Bahia (Figura 1).

Cerrado – representado pela Chapada Diamantina. Esta região está a 1.106 metros acima do nível do mar e apresenta médias anuais de temperatura de 20°C (min. 13°C e máx. 30°C) e precipitação pluviométrica de 1.100 mm. O Cerrado apresenta relevo bastante acidentado e solos do tipo Podzólicos e Latossolos (FAUSTINO & MACHADO, 2006). As plantas básicas, com dez anos de idade, encontravam-se estabelecidas na Fazenda BAGISA/SA, localizada no município de Ibicoara, Bahia (Figura 1).

Semiárido – representado pelo Vale do São Francisco. Esta região encontra-se a 386 metros acima do nível do mar e apresenta médias anuais de temperatura de 27°C (min. 21°C e máx. 32°C) e precipitação pluviométrica de 600 mm (MOURA & ANGELOTTI, 2008). O Semiárido apresenta relevo plano e solo do tipo Argissolo Vermelho-amarelo (EMBRAPA, 1999). As plantas básicas, com oito anos de idade, encontravam-se estabelecidas em área experimental da **Embrapa Semiárido**, localizada no município de Petrolina, Pernambuco (Figura 1).



Figura 1. Vista parcial das variedades de citros, selecionadas para este estudo, e estabelecidas em blocos de multiplicação na: A. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Ecossistema dos Tabuleiros Costeiros); B. Fazenda BAGISA/SA (Ecossistema do Cerrado); C. Embrapa Semiárido (Ecossistema do Semiárido).

2. Avaliação das plantas básicas de citros nos diferentes ecossistemas

2.1. Avaliação de caneluras de Tristeza

A avaliação para a presença e severidade de caneluras foi realizada por meio da coleta de dez ramos com cerca de vinte centímetros, nos diferentes quadrantes de cada planta básica de citros selecionada, nos três ecossistemas estudados. Os ramos foram autoclavados a 120°C durante dez minutos para facilitar a retirada da casca e avaliados por três examinadores, usando a escala de notas descrita na Figura 2.

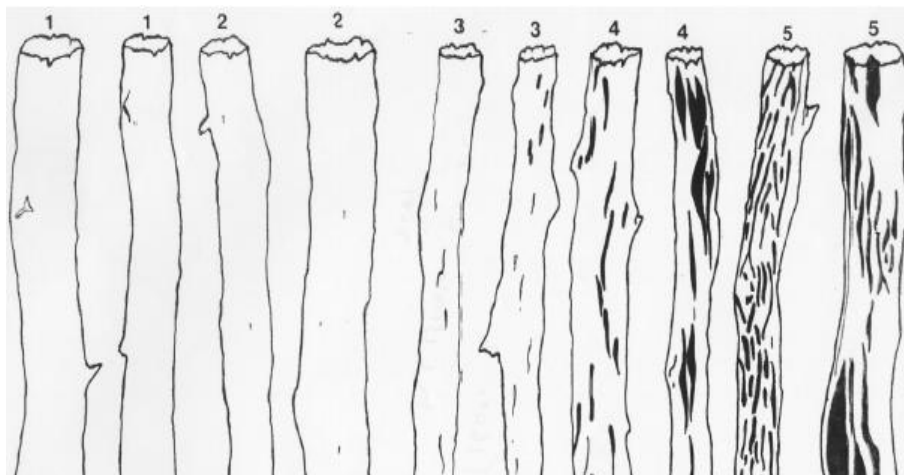


Figura 2. - Escala de notas para avaliação de resistência à Tristeza dos citros (*Citrus* spp.). 1. Ausência de caneluras; 2. Presença de caneluras esparsas; 3. Número intermediário de caneluras; 4. Várias caneluras superficiais ou poucas caneluras profundas; 5. Toda a superfície do ramo coberta por caneluras superficiais ou profundas (MEISSNER FILHO et al., 2002).

2.2. Avaliação da presença e concentração do CTV

Para avaliar a presença e estimar a concentração do CTV nas variedades selecionadas foi utilizado o teste sorológico de ELISA indireto (*Indirect Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*), de acordo com (KOENIG,

1981). Para tanto, foram coletadas amostras de cascas de ramos novos das plantas estabelecidas nos diferentes ecossistemas. Estas foram maceradas em tampão carbonato (Na_2CO_3 0,015 M; NaHCO_3 0,035 M, pH 9,8) e diluídas a 1:100 (p/v) em duas repetições. Para detecção foi utilizado antissoro policlonal contra o CTV, proveniente do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), que foi diluído a 1:10.000, em tampão para diluição do antissoro [PBS-Tween 0,05% (NaCl 0,14 M; KH_2PO_4 0,0014 M; Na_2HPO_4 0,008 M; KCl 0,0027 M) + 2% de PVP + 0,2% de albumina de ovo] e o antissoro conjugado com fosfatase alcalina goat-*anti-rabbit* IgG foi diluído a 1:1.000 em tampão para diluição do antissoro. Como controle negativo utilizaram-se amostras de cascas de ramos do *P. trifoliata* e como positivo, amostras de cascas de ramos da limeira ácida 'Galego', infectados pelo CTV. Em cada placa, adotaram-se dez repetições do controle negativo e seis do positivo. As leituras de absorbância foram realizadas na leitora de placas de ELISA (ELx 800 *Universal Microplate Reader*), a 405 nm, após dez minutos de reação com o tampão substrato (0,87 mg/L de p-nitrofenil fosfato, pH 9,8). Para determinar o valor de absorbância limite que permitiu separar as amostras infectadas e sadias, utilizou-se a média do controle negativo, acrescido de três vezes o desvio padrão ($x + 3s$) (CLARK & BAR-JOSEPH, 1984). Assim, foram consideradas positivas somente as amostras que apresentaram, pelo menos, uma repetição com leitura de absorbância superior a leitura da média do controle negativo acrescida do desvio padrão em cada teste.

3. Ensaio de indexação biológica

Para a indexação biológica foram utilizadas borbulhas provenientes de apenas seis das dez plantas básicas estabelecidas nos diferentes ecossistemas e avaliadas no trabalho, que foram selecionadas em função da importância agronômica e/ou como representante de cada espécie estudada: as laranjeiras doces 'Pêra C21', 'Pêra D6' e 'Valência Tuxpan', a limeira ácida 'Tahiti 2001', a limeira da 'Pérsia', e o tangeleiro 'Page'.

A indexação foi realizada por meio de enxertia de duas borbulhas das variedades a serem testadas na parte inferior do caule das plantas indicadoras: laranjeira 'Azeda', limeira ácida 'Galego' e pomeleiro 'Duncan'. A indexação foi realizada em casa de vegetação antifídica, com ventilação. O delineamento experimental para a indexação em cada indicadora foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 6 x 3 (variedades x ecossistemas) com 5 repetições, das quais duas foram os controles negativos. As indicadoras foram obtidas via semente e produzidas inicialmente em tubetes de 50 mL com substrato comercial à base de vermiculita e casca de *Pinus*. Posteriormente, essas plântulas foram transplantadas para sacos plásticos de 1,5 L com o mesmo substrato e, a partir de seis a oito meses de idade, foram utilizadas para as enxertias.

As plantas foram mantidas a uma temperatura média de 28°C, sendo submetidas a pulverizações semanais com Vertimec (10-30 mL/100 L) e Supracid (100-125 mL/100 L), alternadamente.

As plantas foram avaliadas mensalmente quanto ao aparecimento de sintomas foliares e morte. Após doze meses da inoculação, foram coletadas amostras foliares para a realização do teste sorológico de ELISA indireto contra o CTV (KOENIG, 1981), conforme já descrito anteriormente. Das plantas também foram coletadas, parte aérea e raiz, para a avaliação do desenvolvimento e da severidade de caneluras na haste principal das plantas indexadas e seus respectivos controles, de acordo com MEISSNER FILHO et al. (2002).

Para avaliar o desenvolvimento vegetativo foi feita a medição de altura da base até a extremidade da haste principal. O peso da matéria seca da parte aérea e raiz foi determinado após tratamento dos tecidos por 72 horas, em estufa a 37°C (TEDESCO et al., 1995).

4. Análise molecular das estirpes de CTV coletadas em diferentes ecossistemas

Este estudo foi realizado com a finalidade de verificar se houve alteração das estirpes do CTV predominantes nas variedades estudadas, quando estas foram estabelecidas nas novas fronteiras citrícolas do Cerrado e Semiárido. Considerou-se como padrão as estirpes presentes nestas mesmas plantas estabelecidas nos Tabuleiros Costeiros, ecossistema no qual são tradicionalmente cultivadas no Estado.

4.1. Material Vegetal

Foram utilizadas amostras de limeira ácida 'Galego' provenientes dos testes de indexação biológica das plantas de laranjeiras doce 'Pêra C21', 'Pêra D6' e 'Valência Tuxpan', limeira ácida 'Tahiti 2001', limeira da 'Pérsia' e o tangeleiro 'Page'.

4.2. Extração de RNA total com Trizol

Para esta metodologia foram utilizados 100 mg de tecido fresco (cascas de ramos novos) pulverizados em cadinhos com nitrogênio líquido. Antes de descongelar, o macerado recebeu 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen) e foi incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi transferido para microtubo de 2,0 mL, adicionado 0,2 mL de clorofórmio, agitado e centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi então transferida para um microtubo (1,5 mL) e o RNA total precipitado com 0,75 mL de isopropanol. Após a adição do isopropanol foi realizada nova centrifugação a 8.000xg por 8 min a 4°C e o pellet ressuspensão em 30 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os estoques de RNA foram mantidos a -80°C. A primeira avaliação do RNA foi realizado em gel agarose 1% em TBE livre de RNase (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1988).

4.3. Análise de RT-PCR - Síntese da primeira fita de cDNA e amplificação do gene da capa protéica (CP) do CTV

O RNA obtido como descrito acima foi usado como molde em RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) (SAMBROOK et al., 1989). A síntese da primeira fita de cDNA foi feita utilizando-se a M-MLV-RT (Sigma) e *primer* randômico de 6 bases (New England Biolabs Inc.) A composição das reações foi: 2,0 µL de RNA (100 a 200 ng), 1,0 µL de *primer* randômico (100 µmol), 1,0 µL de dNTPs (10 mM) e 6,0 µL de água tratada com DEPC.

Inicialmente, foi feita a desnaturação do RNA a 70°C durante 10 min. Em seguida, os tubos foram colocados imediatamente no gelo, e foram adicionados os outros componentes da reação: 2,0 µl de tampão 10x da M-MLV-RT, 1,0 µL de RNAsin (40 U/µL), 1,0 µL de M-MLV-RT (200 U/µL) e 6,0 µL de água DEPC. A reação foi incubada a 37°C durante 1 hora e, em seguida, foi feita a amplificação do gene da capa protéica do vírus com os *primers* específicos: CN 119 (5' AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG3') e CN120 (5' GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC 3') (SANTOS et al., 2007). As reações de PCR foram preparadas com: 2,5 µl de tampão 10x, 0,75 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTP (10 mM), 0,5 µl dos primers CN 119 e CN 120 (100 ng/µl), 5,0 µl de cDNA e 0,2 µl de Taq DNA polimerase Invitrogen (5U/µl), completando com água para um volume final de 25 µl.

A amplificação foi feita no PTC-100™ *Programmable Thermal Control* – MJ Research, Inc., em 35 ciclos de: 94°C/1 min, 52°C/ 1 min, 72°C/ 1 min e extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos das reações de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel 1,0% de agarose contendo brometo de etídio.

4.4. Análise SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) do gene da capa protéica

Para a análise SSCP (BAILEY, 1995), alíquotas do produto da amplificação da CP do vírus em laranjeira doce 'Valência Tuxpan', estabelecida

nos três ecossistemas, 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 e, em seguida, colocadas imediatamente no gelo (RUBIO et al., 1996; CORAZZA-NUNES et al., 2001). Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida a 10%. A corrida foi feita a 200 V por 16 horas a 25°C.

Após a corrida, o gel foi colocado numa solução fixadora (etanol a 10% e ácido acético a 1%), por no mínimo 10 minutos. Retirou-se essa solução e o gel foi colocado em ácido nítrico a 1% por 3 minutos. Em seguida, foi lavado com água destilada e corado numa solução de nitrato de prata a 0,2%, permanecendo sob agitação durante 20 minutos. O gel foi lavado com água destilada e colocado na solução reveladora contendo 1 mL de formaldeído em 1000 mL de carbonato de sódio a 3% até a total revelação das bandas. A revelação foi interrompida com a solução de etanol a 10% e ácido acético a 1% (SCHUMACHER et al., 1985), e o gel foi fotografado.

4.5. Análise de restrição (GRIFONI et al., 1995)

De um total de 25 µL do produto amplificado (em torno de 670 pb) da CP do vírus em laranjeira doce 'Valência Tuxpan', estabelecida nos três ecossistemas, 6 µL foram digeridos utilizando-se 1,0 µL das enzimas de restrição *Hind* III, *Pvu* II e *Kpn* I (Fermentas, 10u/µL) diluídas em 1,5 µL de tampão 10x e 6,5 µL de água destilada e incubadas a 37°C por 4 horas. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 1,0% contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídeo, imerso em tampão TBE (Tris 0,18 M, Ácido Bórico 0,1 M e EDTA 0,004 M, pH 8,0) a 80 V. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 1 Kb (Ludwig Biotec). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas com o sistema de fotodocumentação Gel Logic 200 (Imaging System).

5. Análise estatística

As variáveis referentes às leituras de caneluras e absorbância, e desenvolvimento vegetativo (altura e peso da matéria seca da parte aérea e raiz) foram analisadas por meio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (BANZATTO & KRONKA, 1995), utilizando-se o programa SISVAR (Versão 5.3).

RESULTADOS & DISCUSSÃO

Avaliação das plantas básicas de citros nos diferentes ecossistemas

As plantas básicas de citros estabelecidas no Cerrado, exceto a limeira ácida 'Tahiti' e o pomeleiro 'Henderson', apresentaram as maiores médias para as leituras de severidade de caneluras, principalmente as laranjeiras doces 'Pêra D6', 'Pêra C21', 'Westin' e 'Rubi', com valores acima de 2,5 (Tabela 1). A laranjeira 'Pêra' é, certamente, a variedade copa mais importante da citricultura Nacional. Detentora de vantagens e qualidades múltiplas ganhou a preferência dos produtores e consumidores, tornando-se a variedade de citros mais cultivada no País, inclusive na Bahia (AMARO, 1999). Entretanto, são consideradas muito suscetíveis ao CTV e o seu plantio no Brasil, somente é possível via pré-imunização com isolados menos virulentos do CTV (SALIBE et al., 2002). A 'Pêra D6' é a principal variedade de laranjeira cultivada na Bahia, principalmente nas regiões do Recôncavo Sul e Litoral Norte do Estado, que pertencem ao ecossistema dos Tabuleiros Costeiros. Nestas condições, esta variedade não têm apresentado problemas com a Tristeza. Esta laranjeira 'Pêra' está protegida pelo isolado CTV-D6, selecionado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura (VASCONCELOS et al., 2004).

O desenvolvimento de sintomas em plantas pré-imunizadas, como o observado na 'Pera D6' e 'Pêra C21' nas condições do Cerrado, deve ser considerado uma quebra de proteção. Este comportamento foi descrito por SOUZA et al. (2002a) que avaliaram plantas originadas de clones pré-imunizados com o isolado 'Pêra IAC' nas quais, após alguns anos, algumas plantas apresentaram sintomas e outras não, de caneluras. Do mesmo modo que os mecanismos de interação de estirpes não estão elucidados, a quebra de proteção também continua uma hipótese em discussão. As possíveis explicações para quebra de proteção estão associadas ao surgimento de mutações no vírus, em função da instabilidade de seu material genético e à ausência de fidelidade da polimerase; troca de material genético através de

recombinação entre estirpes; à infecção do porta-enxerto no viveiro; ou às constantes inoculações pelo vetor, que pode selecionar naturalmente isolados mais severos. Outro fator frequentemente mencionado como favorável à quebra de proteção é aquele relacionado com o ambiente, especialmente a temperatura (SOUZA et al., 2002a,b).

As laranjeiras 'Westin' e 'Rubi' são consideradas tolerantes à Tristeza, não tendo se encontrado nenhum relato da ocorrência de caneluras nestas variedades. Entretanto, neste trabalho, nas condições do Cerrado, estas variedades mostraram-se intolerantes (Tabela 1). Este resultado dá o suporte científico para que não se indique o cultivo destas variedades naquelas condições. Também mostra a necessidade da seleção de isolados com capacidade protetiva nestas condições. Trabalho semelhante tem sido feito em Capão Bonito, no estado de São Paulo, onde são selecionados isolados protetivos para as variedades de citros mais suscetíveis que são cultivadas na região (STACH-MACHADO et al, 2002).

O resultado pode ser melhor visualizado ao analisar as médias das leituras de severidade de caneluras de todas as variedades estudadas agrupadas por ecossistema (Figura 3).

Dentre os fatores ambientais que podem interferir na expressão de sintomas da Tristeza, a temperatura parece ser o fator determinante (DODS et al.,1987; BAR-JOSEPH et al., 1989). De uma maneira geral, ela afeta drasticamente as interações planta-vírus. Os surtos de viroses de plantas são frequentemente associados às baixas temperaturas, enquanto que as temperaturas elevadas, muitas vezes, amenizam os sintomas virais (SZITTYA et al., 2003).

Sintomas mais acentuados da Tristeza estão relacionados a temperaturas mais baixas em diferentes países (BAR-JOSEPH et al., 1989; BROADBENT et al., 1991). A temperatura média anual do ecossistema do Cerrado, região da Chapada Diamantina, é menor que a dos outros ecossistemas estudados. A média anual gira em torno de 20 °C, com mínima de 13°C na estação seca (FAUSTINO & MACHADO, 2006), o que pode ter influenciado a maior severidade de sintomas de caneluras observados naquelas condições.

Tabela 1. Detecção do CTV por ELISA indireto e severidade de caneluras em citros cultivados em diferentes ecossistemas.

Variedades	Ecossistemas	Severidade de caneluras ¹	Médias de Absorbância		
			Planta avaliada ²	Controle Negativo ³	Controle Positivo ³
'Pêra D6'	Tabuleiros Costeiros	1.77 a ⁴	0.510 c		
'Pêra D6'	Cerrado	3.90 b	0.247 b	0.071 a	0.779 d
'Pêra D6'	Semiárido	*	*		
'Pêra C21'	Tabuleiros Costeiros	2.23 b	0.451 d		
'Pêra C21'	Cerrado	4.80 c	0.398 c	0.047 a	1.014 e
'Pêra C21'	Semiárido	1.10 a	0.265 b		
'Rubi'	Tabuleiros Costeiros	1.93 a	0.152 b		
'Rubi'	Cerrado	4.00 b	0.371 c	0.013 a	0.649 d
'Rubi'	Semiárido	1.00 a	0.389 c		
'Westin'	Tabuleiros Costeiros	1.90 a	0.844 c		
'Westin'	Cerrado	3.70 b	0.686 b	0.047 a	1.014 d
'Westin'	Semiárido	2.20 a	0.097 a		
'V. Tuxpan'	Tabuleiros Costeiros	1.63 a	0.852 d		
'V. Tuxpan'	Cerrado	1.90 a	0.155 b	0.013 a	0.649 c
'V. Tuxpan'	Semiárido	1.00 a	0.023 a		
'Tahiti 2001'	Tabuleiros Costeiros	3.20 b	0.291 b		
'Tahiti 2001'	Cerrado	2.50 b	0.481 c	0.077 a	0.779 d
'Tahiti 2001'	Semiárido	1.00 a	0.406 c		
'Pérsia'	Tabuleiros Costeiros	1.30 ab	0.091 a		
'Pérsia'	Cerrado	2.00 b	0.109 b	0.077 a	0.779 c
'Pérsia'	Semiárido	1.00 a	0.080 a		
'Fino'	Tabuleiros Costeiros	1.00 a	0.110 c		
'Fino'	Cerrado	2.80 b	0.097 c	0.013 a	0.649 d
'Fino'	Semiárido	1.00 a	0.045 b		
'Henderson'	Tabuleiros Costeiros	4.23 b	1.194 e		
'Henderson'	Cerrado	4.23 b	0.352 b	0.071 a	0.779 d
'Henderson'	Semiárido	2.60 a	0.725 c		
'Page'	Tabuleiros Costeiros	1.26 a	0.165 b		
'Page'	Cerrado	2.50 b	0.570 c	0.013 a	0.649 d
'Page'	Semiárido	1.00 a	0.523 c		

* Dados não obtidos; 1. Severidade de caneluras de CTV baseada em escala de notas (MEISSNER et al., 2002); 2. Média obtida de três repetições; 3. Média obtida de dez repetições; 4. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

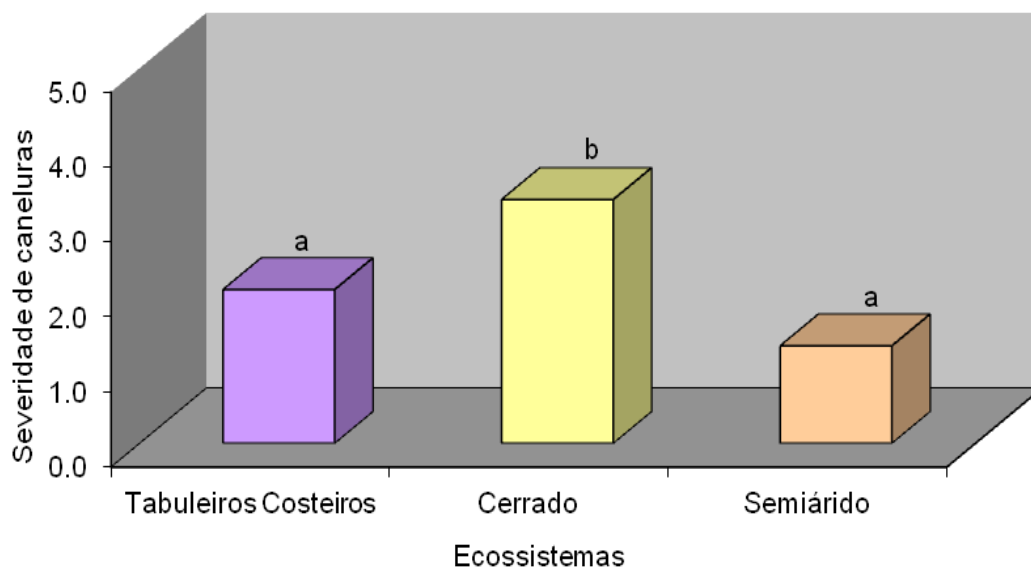


Figura 3. Médias das leituras de severidade de caneluras das variedades de citros estudadas, agrupadas por ecossistema. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

A ocorrência de sintomas fortes da Tristeza em laranjeiras 'Pêra IAC 2000', uma variedade considerada tolerante ao CTV, foi relatada por CARVALHO et al., (2011) no Sul do estado de São Paulo. Esta mesma variedade se comportou como tolerante quando cultivada no Norte de São Paulo, onde as temperaturas são mais elevadas (CARVALHO et al., 2011). Neste trabalho foram obtidos resultados semelhantes, já que a maioria das variedades estudadas, principalmente as laranjeiras doces, tiveram um maior incremento de sintomas de caneluras quando cultivadas no Cerrado (Tabela 1; Figura 3). Segundo SALIBE et al. (2002), todas as plantas de laranjeira 'Pêra', mesmo aquelas pré-imunizadas, desenvolvem sintomas de caneluras no Brasil, sendo esses mais intensos nas regiões de climas mais amenos, como no Sul e no Sudoeste do planalto paulista. Estas informações dão suporte à hipótese de que a temperatura pode ter sido o fator determinante para a maior severidade de sintomas de caneluras observadas nas condições do Cerrado.

A presença de estirpes mais virulentas do CTV no Brasil tem sido reportada no cultivo de laranjeira 'Pêra' pré-imunizada estabelecida em regiões mais frias, como em Capão Bonito e Itapetininga, no estado de São Paulo (MOLINARI & CARVALHO, 2008). Alguns autores têm correlacionado a maior virulência de estirpes com a produção de caneluras nos ramos e troncos das plantas infectadas (MEISSNER et al., 2002). Em São Paulo, por exemplo, CARVALHO et al. (1997), analisando o germoplasma de citros do IAC e sua reação ao CTV, observaram que os isolados mais virulentos ocorreram em laranjeiras doces, enquanto que em outras variedades predominaram os menos virulentos. Entretanto, esta correlação com o hospedeiro não está tão clara, visto que, a virulência destes isolados também pode variar com as condições ambientais, como visto neste trabalho e em outros realizados anteriormente (SALIBE et al., 2002; CARVALHO et al., 2011).

O pomeleiro 'Henderson' foi a variedade mais severamente afetada por caneluras nos ecossistemas dos Tabuleiros Costeiro e Cerrado, apresentando menos caneluras quando cultivado no Semiárido (Tabela 1). O pomeleiro é uma das espécies mais sensíveis ao CTV e, inclusive, é considerado como uma planta indicadora para a indexação biológica do patógeno (MÜLLER et al., 2005). Trabalhos realizados por CORAZZA-NUNES et al. (2006), mostraram que aproximadamente 46% dos acessos de pomeleiros do Banco Ativo de Germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) apresentavam sintomas severos de caneluras. O mesmo comportamento também foi observado em diferentes acessos de pomeleiros estabelecidos no Banco de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, que está estabelecido nos Tabuleiros Costeiros (SANTOS et al., 2009)

A limeira ácida 'Tahiti' nos Tabuleiros Costeiros e no Cerrado apresentou mais caneluras em seus ramos (Tabela 1), quando comparadas as do Semiárido, assim como observado com o pomeleiro 'Henderson', provavelmente em função das temperaturas serem mais amenas naqueles ecossistemas, como discutido anteriormente. MÜLLER et al. (1973) também observaram sintomas intensos da Tristeza em 7% das plantas de 'Tahiti' cultivadas em várias regiões de São Paulo. Na Bahia (SANTOS et al., 2009),

também observaram sintomas severos de caneluras em acessos de limeira ácida 'Tahiti' da Embrapa.

Todas as plantas básicas apresentaram pouca ou nenhuma canelura em seus ramos no Semiárido (Tabela 1; Figuras 3). Para ROISTACHER et al. (1974), altas temperaturas, como as observadas naquelas condições (MOURA & ANGELOTTI, 2008), podem reduzir a severidade dos sintomas da Tristeza. Desta forma, este ecossistema desponta como um dos mais favoráveis ao desenvolvimento da citricultura na Bahia, considerando o patossistema Tristeza.

O CTV foi detectado em todas as plantas por ELISA indireto, mesmo naquelas sem sintomas de caneluras. Este resultado já era esperado, em virtude da ocorrência endêmica deste vírus no Brasil (MÜLLER et al., 2005).

Não se observou um padrão nas leituras de absorvância para as plantas avaliadas nos diferentes ecossistemas. Algumas variedades, a exemplo das laranjeiras doces 'Valência Tuxpan' e 'Westin', apresentaram acentuadas diferenças nas leituras de absorvância nos diferentes ecossistemas, em contrapartida, na limeira da 'Pérsia' e no limoeiro 'Fino', essa diferença foi pequena (Tabela 1).

Quando as médias das leituras de absorvância de todas as variedades são avaliadas por ecossistema, observa-se que as cultivadas nos Tabuleiros Costeiros, apresentaram maior concentração do vírus (Tabela 1, Figura 4), no entanto, a severidade de caneluras foi mais frequente no Cerrado (Tabela 1, Figura 3). Em trabalhos realizados por CORAZZA-NUNES et al., (2006) com 35 acessos de pomeleiros também não se observou correlação entre a severidade de caneluras causadas pelo CTV e a detecção sorológica. Observações anteriores também mostram que essas características não são necessariamente correlacionadas (POWELL et al., 1992; MACHADO et al., 1997).

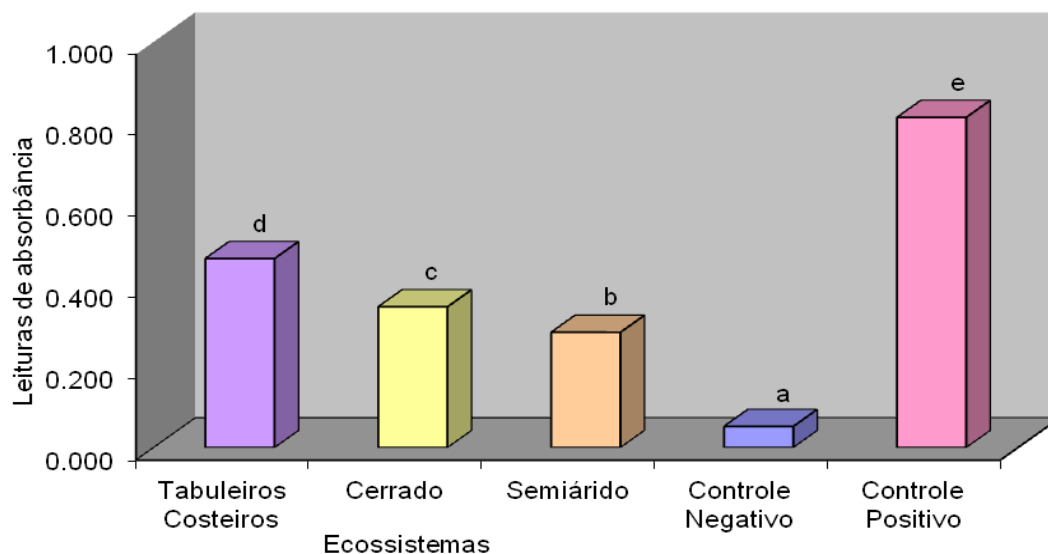


Figura 4. ELISA indireto das variedades de citros agrupadas por ecossistema. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

Ensaio biológico

Na avaliação das plantas indicadoras inoculadas com amostras de diferentes ecossistemas, observou-se que a laranjeira 'Azeda' não apresentou diferenças significativas para a severidade de caneluras (Tabela 2). Este resultado era esperado já que ela não manifesta caneluras em resposta à infecção pelo CTV (FEICHTENBERGER et al., 2005) (Tabela 2). Por outro lado, esta foi a indicadora que apresentou o maior número de plantas com sintomas de amarelecimento de pé franco (*seedlings yellows*), clareamento das nervuras e morte (Tabela 2; Figura 5A-C). Os sintomas de amarelecimento de plantas de pé franco foram mais frequentes como resposta a indexação das plantas estabelecidas nos Tabuleiros Costeiros (Tabela 2). Este sintoma tem sido associado à infecção por isolados muito severos de CTV (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Tabela 2. Sintomas produzidos nas plantas indicadoras inoculadas com isolados de Tristeza provenientes de diferentes ecossistemas.

Variedades	Ecossistema	Laranjeira 'Azeda'			Limeira Ácida 'Galego'			Pomeleiro 'Duncan'		
		Caneluras ¹	Seedlings yellows ²	Clareamento das nervuras	Caneluras	Seedlings yellows	Clareamento das nervuras	Caneluras	Seedlings yellows	Clareamento das nervuras
'Pêra D6'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a ³	+ ⁴	+	5.0 a	-	-	PM	PM	PM
	Cerrado	1.0 a	-	+	5.0 a	-	-	2.7 a	-	-
	Semiárido	*	*	*	*	*	*	*	*	*
'Pêra C21'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a	-	+	4.0 b	-	+	3.3 b	+	-
	Cerrado	PM ⁵	PM	PM	5.0 c	-	-	2.4 ab	+	+
	Semiárido	1.0 a	+	+	2.4 a	-	+	2.0 a	-	+
'Valência Tuxpan'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a	+	+	4.6 a	-	-	1.5 ab	-	+
	Cerrado	1.0 a	+	+	5.0 a	-	-	1.0 a	+	-
	Semiárido	1.0 a	-	+	5.0 a	-	+	2.0 b	-	-
'Tahiti 2001'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a	-	-	2.7 a	-	-	1.2 a	-	+
	Cerrado	1.0 a	+	+	4.8 b	-	+	3.6 b	-	-
	Semiárido	1.0 a	-	-	5.0 b	-	-	1.3 a	-	-
'Pérsia'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a	+	+	4.8 a	-	-	3.2 b	-	+
	Cerrado	1.0 a	-	+	5.0 a	-	+	2.2 a	-	-
	Semiárido	*	*	*	*	*	*	*	*	*
'Page'	Tabuleiros Costeiros	1.0 a	+	+	5.0 a	-	-	1.0 a	-	+
	Cerrado	1.0 a	-	+	4.7 a	-	+	3.0 c	-	-
	Semiárido	1.0 a	-	-	5.0 a	-	-	1.9 b	-	-

* Dados não obtidos; 1 - Severidade de caneluras de CTV baseada em escala de notas (MEISSNER et al., 2002); 2 - Sintoma caracterizado pelo amarelecimento e nanismo em plantas intolerantes ao CTV; 3 - Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade); 4 - Presença de sintomas foliares em pelo menos uma das repetições; 5 - PM (Plantas mortas).

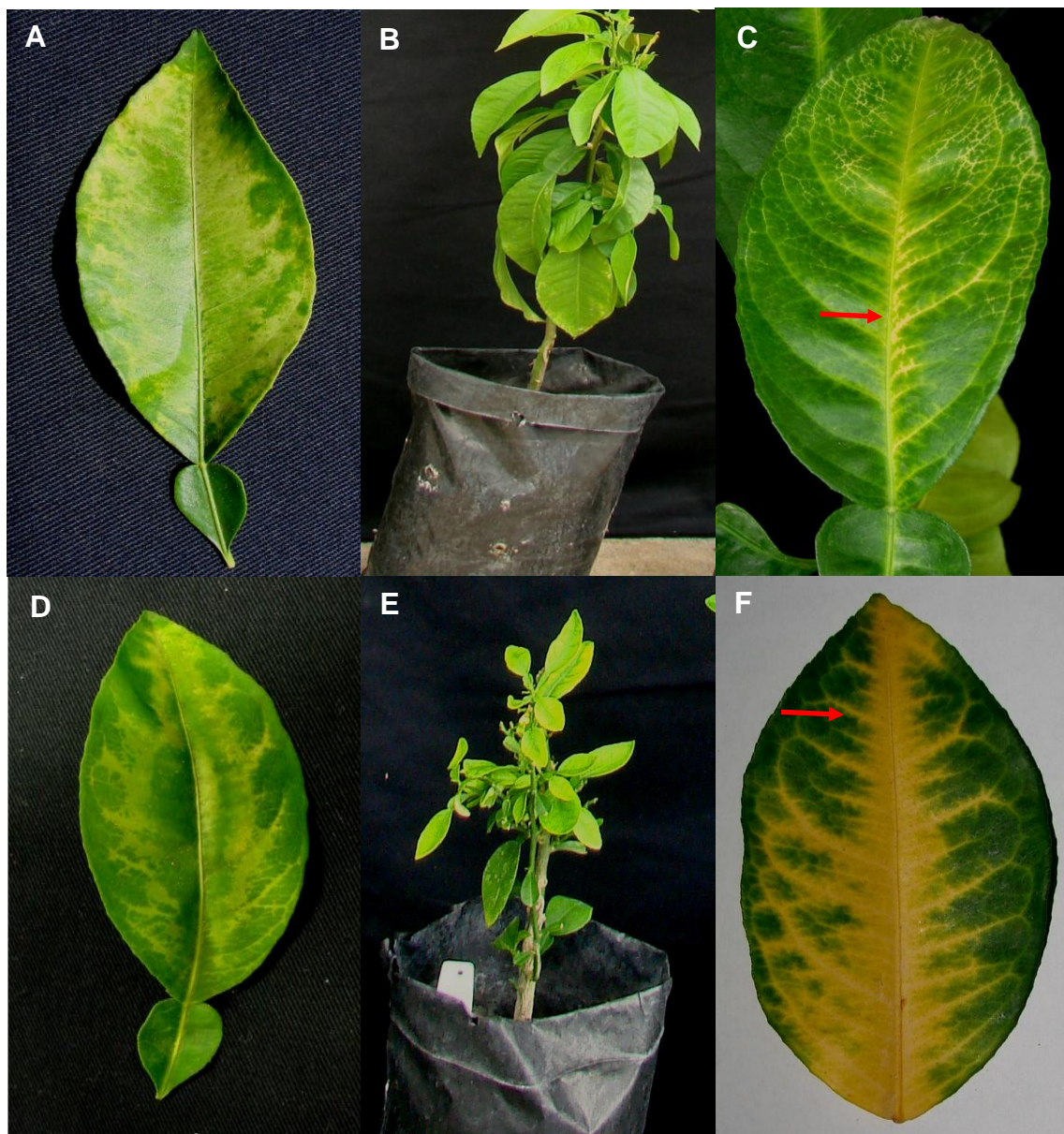


Figura 5. Sintomas foliares de CTV nas plantas indicadoras. A e B – *Seedlings yellows* em laranja 'Azeda'; C – Clareamento das nervuras em laranja 'Azeda'; D e E – *Seedlings yellows* em pomeleiro 'Duncan'; F – Clareamento das nervuras em limeira ácida 'Galego'.

A limeira ácida 'Galego' foi a indicadora que apresentou os sintomas de caneluras de Tristeza mais severos nos testes biológicos (Tabela 2). A maioria das variedades não apresentou diferenças significativas para severidade de caneluras. Foram exceções, a laranja 'Pera C21' e a limeira ácida 'Tahiti 2001'. No caso da laranja 'Pêra C21', as menores médias para severidade

de sintomas de caneluras foram observadas no Semiárido. Em contrapartida, para a limeira ácida 'Tahiti 2001', as menores médias para caneluras foram observadas nos Tabuleiros Costeiros. Apesar de sintomas de amarelecimento de plantas de pé franco serem relatados para a planta indicadora de limeira ácida 'Galego' como resposta à infecção por isolados muito severos de CTV (FEICHTENBERGER et al., 2005), nenhuma planta mostrou este sintoma nos ensaios realizados (Tabela 2). Algumas plantas mostraram sintomas de clareamento das nervuras (Figura 5F).

As plantas básicas, estabelecidas nos diferentes ecossistemas e indexadas em pomeleiro, mostraram sintomas de caneluras menos severos dos que os observados na limeira ácida 'Galego' (Tabela 2). Nesta indicadora também foram observados sintomas de amarelecimento do pé franco e clareamento das nervuras (Tabela 2; Figura 5D e E).

A avaliação da severidade média de caneluras de todas as variedades nos três ecossistemas, mostrou que somente a limeira ácida 'Galego' apresentou alguma diferença para a severidade de caneluras nos ecossistemas estudados (Figura 6), com prevalência de sintomas mais severos no Cerrado, confirmando os dados observados em campo (Figura 3).

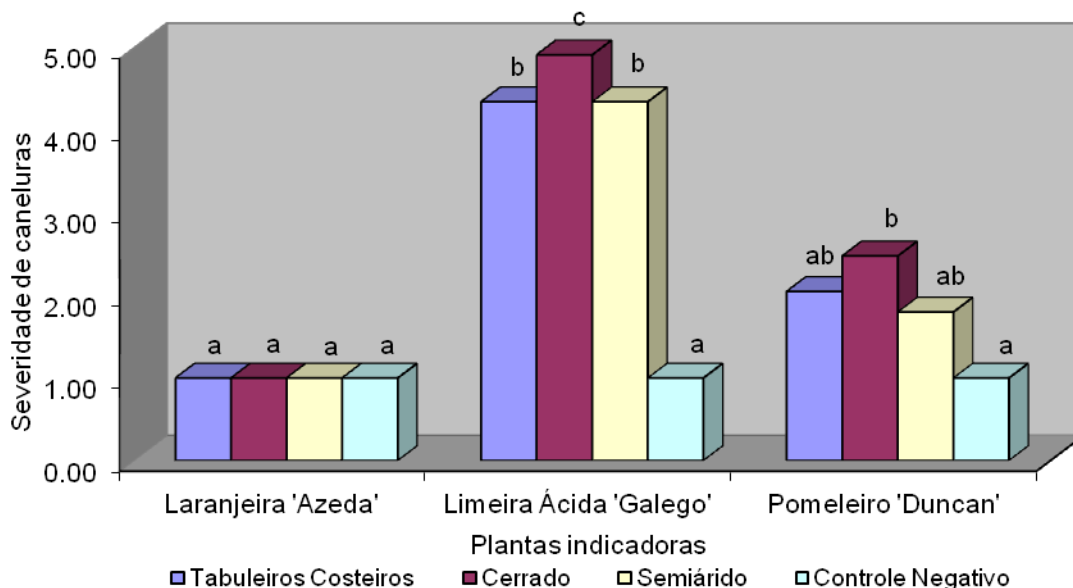


Figura 6. Valores médios de severidade de caneluras de todas as espécies e variedades de citros indexadas, agrupadas por planta indicadora. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

A limeira ácida 'Galego' foi a planta indicadora que apresentou as maiores leituras de absorvância em resposta à reação sorológica para o CTV, nos três ecossistemas estudados, em todas as variedades (Tabela 3). Esta também foi a indicadora que apresentou maiores notas para severidade de caneluras (Tabela 2). Em contrapartida, foi a laranjeira 'Azeda' que apresentou as menores leituras de absorvância (Tabela 3). A laranjeira 'Azeda' é considerada como resistente ao CTV justamente por sua baixa capacidade de replicação do vírus (FEICHTENBERGER et al., 2005).

Os valores de absorvância obtidos nos testes de ELISA indireto foram significativamente diferentes, para a maioria das variedades estudadas nos ecossistemas (Tabela 3). Entretanto, não foi observado um padrão de comportamento para cada ecossistema. Por exemplo, a laranjeira 'Pera C21', estabelecida no Cerrado, apresentou as maiores leituras de absorvância para o CTV, quando indexada em limeira 'Galego', ao contrário do que se observou na 'Valência Tuxpan' e na limeira ácida 'Tahiti 2001' que apresentaram as maiores leituras nos Tabuleiros Costeiros e no Semiárido, respectivamente (Tabela 3).

A avaliação da média dos valores de absorvância de todas as variedades nos três ecossistemas, mostrou que houve diferenças significativas para as leituras médias nas indicadoras limeira ácida 'Galego' e pomeleiro 'Duncan', sendo as maiores médias de leituras observadas para os Tabuleiros Costeiros (Figura 7). Este resultado também foi observado para as plantas básicas, que apresentaram maior concentração do vírus nos Tabuleiros Costeiros, no entanto, a severidade de caneluras foi mais frequente no Cerrado (Figuras 3 e 4). Em trabalhos realizados por CORAZZA-NUNES et al., (2006) na caracterização de isolados do vírus da Tristeza dos citros (CTV) de 35 acessos de pomeleiros que fazem parte do Banco Ativo de Germoplasma de Citros, pertencente ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), foram observados grupos de plantas com severos sintomas de caneluras e outro com fraco a moderado sintoma de canelura. No entanto, a maioria dos isolados de CTV das plantas de ambos os grupos induziu fraca reação em limeira ácida 'Galego' e nenhuma relação entre títulos do vírus nos tecidos e sintomatologia foi observada na avaliação sorológica conduzida por DAS-ELISA.

Tabela 3. Avaliação sorológica para CTV nas plantas indicadoras.

Variedade	Ecossistema	Laranjeira 'Azeda' ¹	Limeira Ácida 'Galego' ¹	Pomeleiro 'Duncan' ¹	Controle Negativo ²	Controle Positivo ²
'Pera D06'	Tabuleiros Costeiros	0.097 a ³	2.389 b	*		
'Pera D06'	Cerrado	0.101 a	2.065 a	0.519 a	0.064	1.482
'Pera D06'	Semiárido	*	*	*		
'Pera C21'	Tabuleiros Costeiros	0.156 b	1.998 a	0.392 c		
'Pera C21'	Cerrado	*	2.159 b	0.191 a	0.064	1.482
'Pera C21'	Semiárido	0.097 a	1.998 a	0.211 b		
'Valência Tuxpan'	Tabuleiros Costeiros	0.133 b	2.128 b	1.024 c		
'Valência Tuxpan'	Cerrado	0.168 c	2.055 a	0.152 a	0.064	1.482
'Valência Tuxpan'	Semiárido	0.101 a	2.209 c	0.582 b		
'Tahiti 2001'	Tabuleiros Costeiros	0.100 b	1.339 a	0.501 a		
'Tahiti 2001'	Cerrado	0.068 a	1.428 b	0.759 c	0.064	1.482
'Tahiti 2001'	Semiárido	0.215 c	2.024 c	0.530 b		
'Pérsia'	Tabuleiros Costeiros	0.109 a	1.824 b	1.047 b		
'Pérsia'	Cerrado	0.098 a	1.486 a	0.438 a	0.064	1.482
'Pérsia'	Semiárido	*	*	*		
'Page'	Tabuleiros Costeiros	0.080 a	2.634 c	0.838 c		
'Page'	Cerrado	0.122 b	2.312 b	0.165 a	0.064	1.482
'Page'	Semiárido	0.130 b	1.953 a	0.207 b		

* Dados não obtidos; 1. Média obtida das leituras de absorvância de três repetições; 2. Média obtida das leituras de absorvância de dez repetições; 3. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

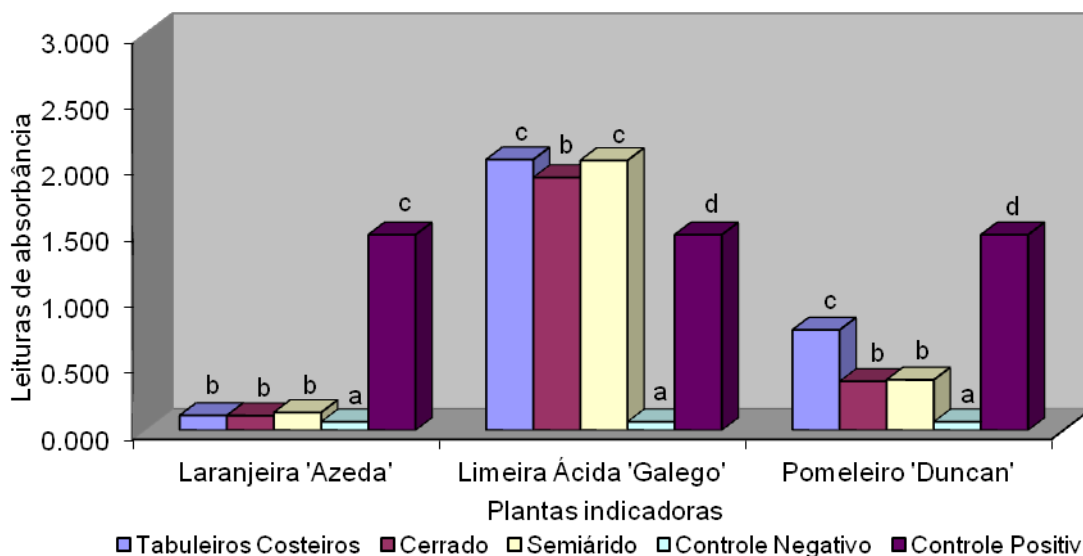


Figura 7. ELISA indireto de todas as variedades de citros indexadas, agrupadas por planta indicadora. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

A avaliação da média geral da altura de todas as variedades dos diferentes ecossistemas estudados, agrupadas por indicadora não apresentou diferenças significativas (Figura 8). Como as análises estatísticas da altura apresentaram coeficientes de variação mais elevados, CV superior a 20%, os dados obtidos não foram considerados relevantes para este estudo.

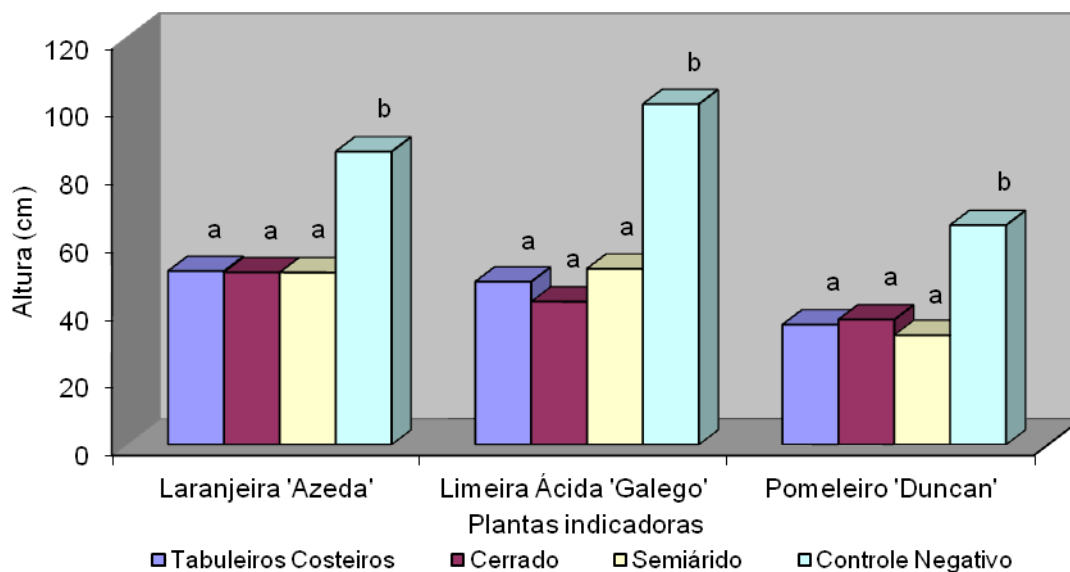


Figura 8. Valores médios da altura (cm) de todas as variedades indexadas dos três ecossistemas, agrupadas por indicadora. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

As médias do peso da matéria seca de todas as variedades indexadas dos três ecossistemas, agrupadas por indicadora, não mostraram diferenças significativas (Figura 9).

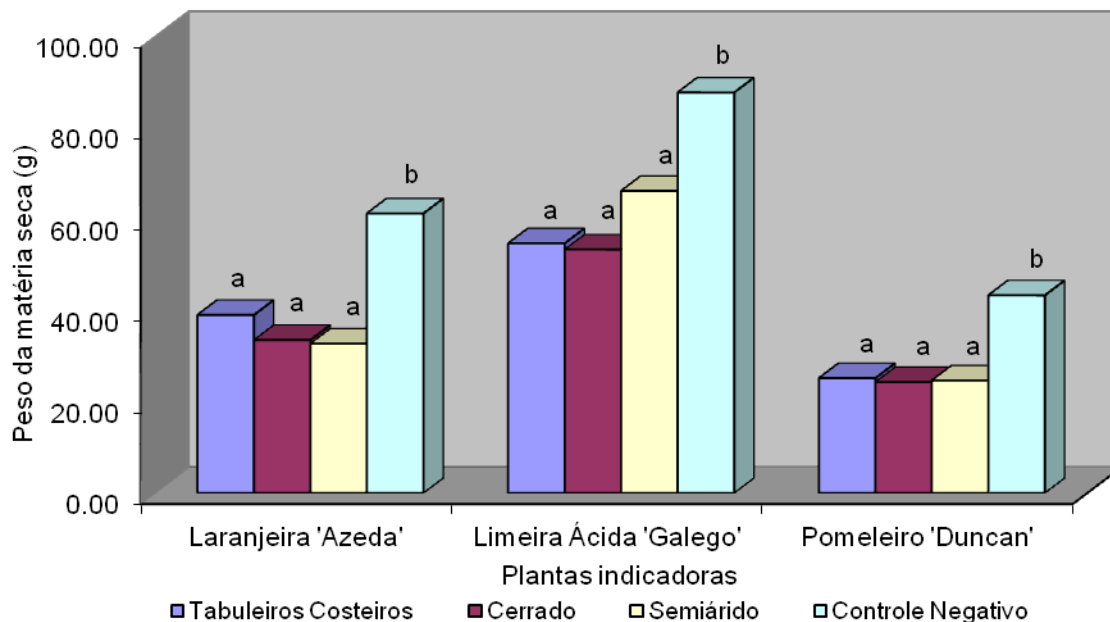


Figura 9. Valores médios da matéria seca (gramas) de todas as variedades indexadas dos três ecossistemas, agrupadas por indicadora. Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de

Análise molecular dos isolados de CTV coletados em diferentes ecossistemas

O protocolo utilizado permitiu a extração eficaz dos ácidos nucléicos totais de diferentes variedades de citros (Figura 10).

No RT-PCR das amostras da laranjeira doce 'Valência Tuxpan' amplificou-se um fragmento de 670 pares de bases (pb), que possui tamanho correspondente ao gene da capa proteica (CP) do vírus da Tristeza (Figura 11) (SEKIYA et al., 1991).

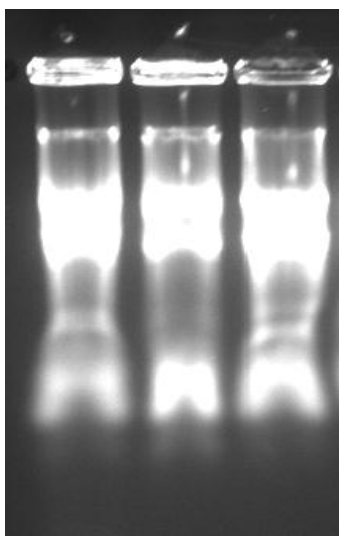


Figura 10. Gel de agarose a 1% com RNA total da laranjeira doce 'Valência Tuxpan'.

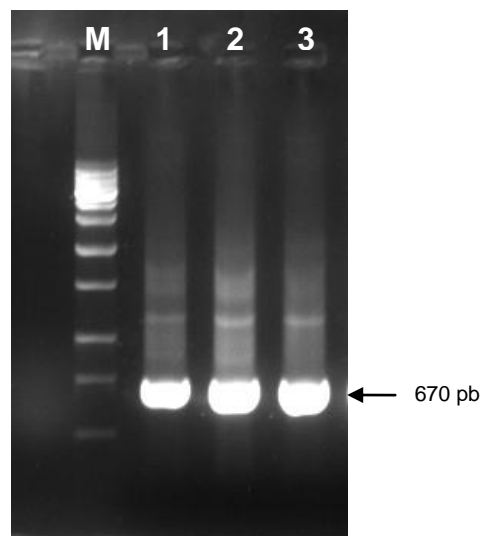


Figura 11. Gel de agarose a 1% com os produtos do RT-PCR de amostras de laranjeira doce 'Valência Tuxpan' proveniente de diferentes ecossistemas. M - marcador de peso molecular 1 kb; 1 - Tabuleiros Costeiros; 2 - Cerrado 3 - Semiárido.

O padrão de SSCP da CP do complexo viral da laranjeira doce 'Valência Tuxpan' está representado na figura 12. Observaram-se bandas com diferentes migração nas amostras, o que indica a presença de mistura de isolados do CTV, como observado por outros autores em laranjeira e pomeleiro (SOUZA et al., 2002b; CARRARO et al., 2003, CORAZZA NUNES et al., 2006, SANTOS et al., 2007). O padrão de SSCP obtido (Figura 12) foi semelhante para as amostras de 'Valência Tuxpan' coletadas nos três ecossistemas em estudo, indicando que os isolados coletados são similares. Neste trabalho, os produtos gerados pela amplificação da CP do vírus da Tristeza e digeridos pelas enzimas de restrição *Hind* III, *Pvu* II e *Kpn* I, também não permitiram diferenciar os isolados obtidos da laranjeira 'Valência Tuxpan', infectadas com os isolados de CTV coletados nos diferentes ecossistemas (Figura 13). Este resultado confirma os resultados obtidos na SSCP.

Embora represente apenas 3,5% do genoma do CTV, o gene da capa protéica apresenta suficiente polimorfismo em sua seqüência de nucleotídeos, permitindo a detecção de variantes. Os padrões gerados nas análises de SSCP e restrição da CP são capazes de diferenciar isolados do vírus (SOUZA et al., 2002a,b). Nas avaliações dos isolados de CTV presentes na 'Valência Tuxpan', cultivadas nos três ecossistemas, não se detectou diferenças no gene da CP. Nos ensaios biológicos também não houve diferenças no padrão de sintomas e nem diferenças significativas no desenvolvimento vegetativo das indicadoras em função do ecossistema (Figuras 6, 8 e 9). Como o comportamento nos ensaios biológicos, das outras espécies coletadas nos diferentes ecossistemas foi similar ao observado para a 'Valencia Tuxpan', também não se espera diferenças moleculares no gene da CP. Porém, mais estudos moleculares serão realizados para confirmar esta hipótese.

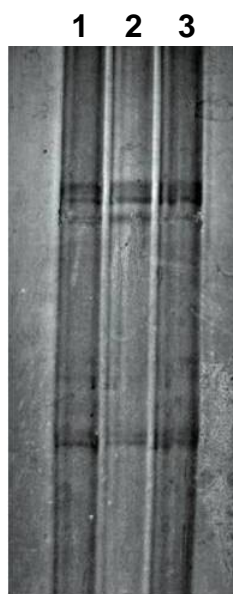


Figura 12. Gel de poliacrilamida a 10% com padrão de SSCP do gene da capa protéica do CTV de plantas de laranja doce 'Valência Tuxpan', provenientes de diferentes ecossistemas: Tabuleiros Costeiros (1), Cerrado (2) e Semiárido (3).

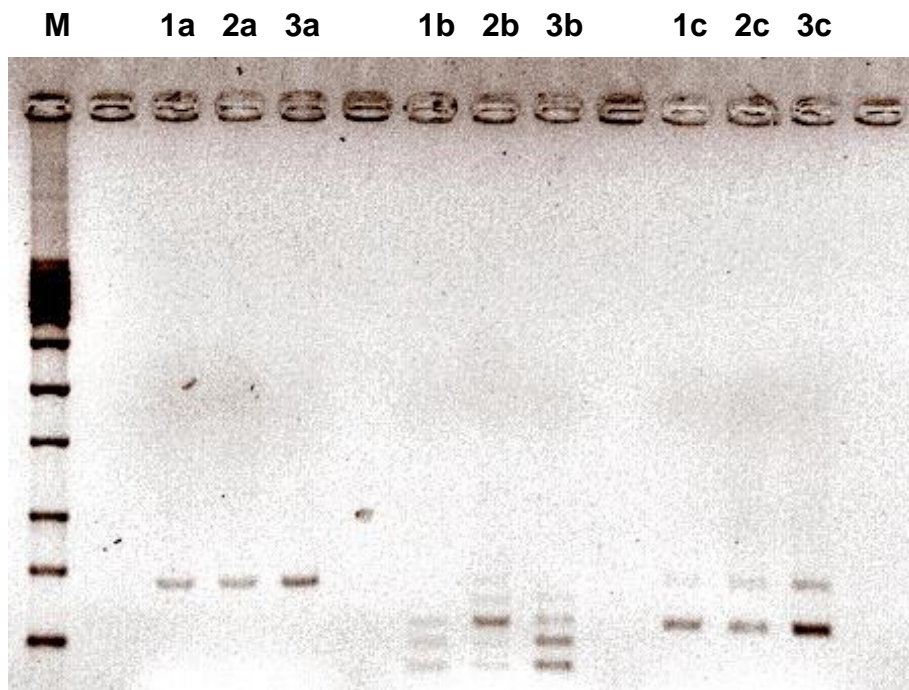


Figura 13. Gel de agarose a 1% com produtos da amplificação do gene da capa proteica do CTV em laranja doce 'Valência Tuxpan', estabelecida em diferentes ecossistemas: Tabuleiros Costeiros (1), Cerrado (2) e Semiárido (3), digeridos com as enzimas de restrição *Hind* III (1a – 3a), *Pvu* II (1b – 3b) e *Kpn* I (1c – 3c). M - marcador 1kb.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferenças observadas no comportamento das variedades de citros: laranjeiras 'Pêra C21', 'Pêra D6', 'Rubi', 'Valência Tuxpan' e 'Westin', limeiras 'Tahiti 2001' e 'Pérsia', limoeiro 'Fino', pomeleiro 'Henderson' e tangeleiro 'Page', em relação ao CTV, nos ecossistemas estudados, sugerem algum efeito das condições ambientais, onde o fator temperatura deve ser o mais considerado (MOLINARI & CARVALHO, 2008).

Os resultados das avaliações biológica e molecular, sugerem que não ocorreu variação nas estirpes de CTV presentes nas plantas estudadas, nos diferentes ecossistemas.

Com relação ao comportamento de variedades de citros nos ecossistemas estudados, pode-se concluir que:

- Os sintomas de Tristeza foram mais intensos no Cerrado e mais suaves no Semiárido .
- As laranjeiras doce 'Pêra D6', 'Pêra C21', 'Westin' e 'Rubi', além do pomeleiro 'Henderson' não devem ser recomendados para o plantio nas condições do Cerrado, na região da Chapada Diamantina da Bahia.
- As laranjeiras doces, mesmo aquelas consideradas como tolerantes para a Tristeza, não devem ser indicadas para o cultivo nas condições do Cerrado da Chapada Diamantina da Bahia, sem uma prévia avaliação de seu comportamento em relação à Tristeza. A mesma consideração se aplica aos pomeleiros. São necessários estudos para a seleção de isolados de CTV que tenham capacidade de manter a proteção destas variedades nestas condições.
- São necessários mais estudos moleculares dos isolados de CTV presentes nas plantas básicas estabelecidas nesses ecossistemas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, Agrios G.N. (Ed.). Elsevier Academic Press Ltd., London, 922p. 2005.

ALBIACH-MARTÍ, M.R.; MENDOZA, A.H.; LAIGRET, F.; BALLESTER-OLMOS J.F.; MORENO, P. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of Citrus tristeza virus isolates. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n.2, p.1999-1209, 2000.

AMARO, A. A. Citricultura. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.29, n. 12, 1999.

ANANTHAKRISHNAN, G.; VENKATAPRASANNA, T.; AVIJIT ROY, BRLANSKY, R.H. Characterization of the mixture of genotypes of a Citrus tristeza virus isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR. **Journal of Virological Methods** 164, p.75–82, 2010.

ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; MACHADO, M.A. Biotecnologia gera produtividade e citros sadios. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 2, p. 48-53, 2004.

BAILEY, A.L. Single-stranded conformational polymorphisms. In MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, eds, **PCR Strategies**. Academic Press, San Diego, pp 121–129, 1995.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, 247p. 1995.

BAR-JOSEPH, M.; GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; MOSCOVITZ, M.; PURCIFULL, D.E., CLARK, M.F.; LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathology** 69, 190–194, 1979.

BAR-JOSEPH, M.; ROISTACHER, C.N.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J. A review on the epidemiology of the tristeza disease, an ongoing threat. 4th International Citrus Congress, Tokyo (Japan). In: **Proc. Int. Soc. Citriculture**, 1: 419-423, 1981.

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

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

BOWMAN, K.D.; GMITTER JUNIOR, F.G. Forbidden Fruit (Citrus sp., Rutaceae) Rediscovered in Saint Lucia. **Economic Botany** Vol. 44, No. 2, pp. 165-173, 1990.

BRLANSKY, R.H.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F.; PURCIFULL, D.E. Application of citrus tristeza virus antisera in labeled antibody, immunoelectron microscopical, and sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion tests. **Proc. Int. Org. Citrus Virol.**, 9th, p. 337-342, 1984.

BROADBENT, P.; BEVINGTON, K.B.; COOTE, B. G. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection, In: **Proc. 11th Conf. IOCV**, Riverside, p. 64-70, 1991.

BROADBENT, P.; BRLANSKY, R.H.; INDSTO, J. Biological characterization of australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. **Plant Disease**, St.Paul, v. 80, p.329-333, 1996.

CAMBRA, M., GARNSEY, S.M., PERMAR, T.A., HENDERSON, C.T., GUMPF, D.,VELA, C. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. **Phytopathology** 80, 103, 1990.

CANTUARIAS-AVILÉS, T.; STUCHI, E.S.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; SILVA, S.R.; ESPINOZA, E.; BREMER NETO, H. **Avaliação horticultural de doze porta-enxertos para laranjeira ‘Folha Murcha’, limeira ácida ‘Tahiti’ e tangerineira Satsuma ‘Okitsu’**. (Relatório de pesquisa), 2010.

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 Estado do Paraná por meio de testes imunológicos e SSCP do gene da capa protéica. **Acta Sci. Agron.**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 269-273, 2003.

CARREIRA, C. **Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los citrus de Bella Vista (Corrientes)**. Buenos Aires: Ministério de Agricultura, p.275-280. (Boletim, 34),1933.

CARVALHO, J.E.B. **Produção Integrada de Citros – Bahia**; Relatório Técnico Final. Cruz das Almas: CNPq, 27p., 2005.

CARVALHO, S.A., MACHADO, M.A., BAPTISTA, C.R., MÜLLER, G.W. & SILVÉRIO, J.C. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza em diferentes espécies e variedades cítricas. **Fitopatologia Brasileira** 22:79-84. 1997.

CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Biological characterization and reaction to CTV isolates of Pera sweet orange clones in three regions of São Paulo state,

Brazil. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, SP, v.31 (suplemento), 129ps. 2010.

CARVALHO, S.A.; DE NEGRI, J.D.; MULLER, G. W.; POMPEU JR., J. Inter-enxertia e ocorrência de Tristeza Capão Bonito em laranja 'Pera IAC 2000'. In: 44º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Bento Gonçalves. **Plant Tropical Pathology**. Lavras: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, v.36, 2011.

CHANDELIER, A.; DUBOIS, N.; BAELEN, F.; DE LEENER, F.; WARNON, S.; REMACLE, J.; LEPOIVRE, P. RT-PCR-ELOSA tests on pooled sample units for the detection of virus Y in potato tubers **J. Virol. Methods**, 91: 99-108, 2001.

CHAPOT, H. The citrus plant. In: HÄFLIGER, E. (ed.). **Citrus**: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p.14-20. 1975.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acidic guanidium thiocyanatephenol-chlorophorm extraction. **Anal Biochem**, v. 162, p. 156-9, 1988.

CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. In: K. Maramorosch, H. Koprowski (eds.). **Methods in Virology 8**: 51-85. Academic Press, New York, USA, 1984.

COGGINS, C. A basic view of the complexities of lemon production. **Citrograf**, v.69, p.93-97, 1984.

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**, n.27, p.11-16, 2001.

CORAZZA-NUNES, M.J.; MACHADO M.A.; STACH-MACHADO, D.R.; NUNES, W.M.C.; CARVALHO, S.A.; MÜLLER, G.W. Characterization of *Citrus tristeza*

virus isolates from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of Citrus Active Germplasm Bank. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.322-327, 2006.

COSTA, A.S.; GRANT, T.J.; MOREIRA, S. Investigações sobre a tristeza II. Conceitos e dados sobre a reação das plantas cítricas à tristeza. **Bragantia**, Campinas, v.9, p.59-80, 1949.

CPTEC. **Observação e instrumentação**. Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br/dados_observados>. Acesso em: dez. de 2011.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. and mapping of citrus tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, Dordrecht, v.109, p.25-32, 1999.

D'ANGIOLELLA, G.L.B.; CASTRO NETO, M.T.; COELHO, E.F. Tendências Climáticas para os Tabuleiros Costeiros da região de Cruz das Almas. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA**, 27, 1998, Poços de Caldas: Universidade Federal de Lavras, v. 1, p. 43-45, 1998.

DAVIES, F.S.; ALBRIGO, L.O. **Citrus**. CAB INTERNATIONAL, UK, 254p., 1994.

DJELOUAH, K., D'ONGHIA, A.M. Occurrence and spread of Citrus Tristeza in the Mediterranean area. **CIHEAM - Options Mediterraneennes**, p. 51-60, 2001.

DODDS, J.A.; JORDAN, R.L.; ROISTACHER, C.N.; JARUPA'r, T. Diversity of citrus tristeza virus isolates indicated by dsRNA analysis, **Intervirology** 27, 177-188, 1987.

DOMÍNGUEZ, A.; MENDOZA, A.H.; GUERRI, J.; CAMBRA, M.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; PEÑA, L. Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus*

(CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its *p25* coat protein gene. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 10, p. 1-10, 2002.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa. 412p, 1999.

FANG, D.Q.; ROOSE, M.L. A novel gene conferring citrus tristeza virus resistance in *Citrus maxima* (Burm.) Merrill. **HortScience**, Alexandria, v.34, n.2, p.334-335, 1999.

FAO. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 22 de outubro de 2011.

FAUSTINO, T.C. & MACHADO, C.G. Frugivoria por aves em uma área de campo rupestre na Chapada Diamantina, BA. **Revista Brasileira de Ornitologia** 14:137-143, 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 end of citrus tristeza virus particles. **Phytopathology** 86, 1331-1335, 1996.

FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; MOORE, G.A. Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 93-104, 2008.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE JR. J. Doenças dos Citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 239-269, 2005.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium** (Lavras), v. 6, p. 36-41, 2008.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO **Agriannual 2010**: anuário estatístico da agricultura brasileira. São Paulo, 520 p. 2010.

GARNSEY, S.M.; GONÇALVES, D.; PURCILL, D.E. Rapid diagnosis of citrus tristeza vírus infection by SDS immunidiffusion procedures. **Phytopathology** 69: 88-95, 1979.

GARNSEY, S.M., CHRISTIE, R.G., DERRICK, K.S., BAR-JOSEPH, M. Detection of citrus tristeza virus. light and electron microscopy of inclusions and viral particles. **Proc. Conf. Int. Org. Citrus. Virol.**, 8th, 9-16, 1980.

GARNSEY, S.M.; CIVEROLO, E.L.; GUMPF, D.J.; YOKOMI, R.K.; LEE, R.F. Development of world-wide collection of citrus tristeza virus isolates. In: **Proc. 11th Intl. Org. Citrus Virology**. (Eds.): R.H. Bransky, R.F. Lee and L.W. Timmer. University of California, Riverside, California, USA, pp. 113-120, 1991.

GARNSEY, S.M., PERMAR, T.A., CAMBRA, M., HENDERSON, C.T. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In: Moreno, P., da Graça, J.V., Timmer, L.W. (Eds.), **Proceedings** of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA, pp. 39–50, 1993.

GARNSEY, S.M. Virological aspects to an integrated management of vector-borne virus diseases of citrus. **Food & Fertilizer Technology Center** (<http://www.agnet.org/library/eb/416>), p. 1-8, 2002.

GMITTER JUNIOR, F.G.; HU, X. The possible role of Yunnan, China in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae). **Economic Botany**, vol. 44: 267–277, 1990.

GMITTER JUNIOR, F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M.; ENG, Z. A localized linkage map of the citrus tristeza virus resistance gene region. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.92, p.688-695. 1996.

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of Azospirillum strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, v. 127, p. 85-91, 1995.

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**, San Diego, v.208, p.576-582, 1995.

HUANG, Z., RUNDELL, A.P., GUAN, X., POWELL, A.C. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Dis.** 88, 625–629, 2004.

HUNG, T.H., WU, M.L., SU, H.J. A rapid method based on the onestep reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. **J. Phytopathol.** 148, 469–475, 2000.

IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 out. 2011.

JACOMINE, P.K.T. Distribuição geográfica, características e classificação dos solos coesos dos Tabuleiros Costeiros. In: REUNIÃO TÉCNICA SOBRE SOLOS COESOS DOS TABULEIROS, Cruz das Almas, 1996. **Pesquisa e desenvolvimento para os Tabuleiros Costeiros**; anais. Aracaju: EMBRAPA, CPATC; EMBRAPA, CNPMF; EAUFBA; IGUFBA, p.13-24, 1996.

KARASEV, A.V.; BOYKO, V.P.; GOWDA, S.; NIKOLAEVA, O.V.; HILF, M.E.; KOONIN, E.V.; NIBLETT, C.L.; CLINE, K.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M.; LEWANDOWSKI, D.J.; DAWSON, W.O. Complete sequence

of the citrus tristeza virus RNA genome. **Virology**, San Diego, v.208, p.511-520. 1995.

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

KARASEV, A.V. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review of Phytopathology** 38:293-324, 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, 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**, Basingstoke, v.201, p.1011-1012. 1963.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA, JR. C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia brasileira**, v.22, p.555-559, 1997.

KNORR, L.C. Suscepts, indicators, and filters of tristeza virus, and some differences between tristeza in Argentina and in Florida. **Phytopathology** 46 : 557-560, 1956.

KOENIG, R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v. 55, p. 53-62, 1981.

KOLLER, O.L.; SOPRANO, E. Aumento da severidade do vírus da tristeza dos citros em dois clones de laranja Valência. **Citricultura e Agrotecnologia**, Lavras, v.22, n.2, p.219-225, 1998.

KOMAZAKI, S. Biology and virus transmission of citrus aphids. Food and Fertilizer Technology Center **Tech. Bull.** No. 136. 9 pp., 1993.

LEE, R.F.; CALVERT, L.A. Polypeptide mapping of citrus tristeza virus strains. **Phytophylactica**, Pretoria, v.19, n.2, p.205-210, 1987.

LEE, R.F.; CALVERT, L.A.; NAGEL, J.; HUBBARD, J.D. Citrus tristeza virus: characterization of coat proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.1221-1226, 1988.

LEE, R.F.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA, M.A. **The Citrus tristeza virus (CTV)**. Ascot: International Institute of Biological Control, 145p, 1994.

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**, Brasília, v.22, p.191-194, 1997.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI, M.; AMARAL, A.M.; OLIVEIRA, A.C. Genética, melhoramento e biotecnologia de citros. Cap. 9, p. 221-277. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; POMPEU JUNIOR, J. (Eds.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 927 p., 2005.

MARQUES, N.T.; BAILEY, A.M.; NIBLETT, C.L.; NOLASCO, G. Differentiation of Citrus tristeza virus (CTV) isolates by cleavase fragment length polymorphism (CFLP) analysis of the major coat protein gene. **Phytopathologia Mediterranea** 45, 99-109, 2006.

MARTELLI, G.P., AGRANOVSKY, A.A., BAR-JOSEPH, M., BOSCIA, D., CANDRESSE, T., COUTTS, R.H.A., DOLJA, V.V., FALK, B.W., GONSALVES, D., HU, J., JELKMANN, KARASEV, A.V., MINAFRA, A., NAMBA, S., VETTEN, H.J., WISLER, C.G., YOSHIKAWA, N. Virus taxonomy. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego, CA, 2005.

MEISSNER FILHO, P.E.; SOARES FILHO, W.S.; VELAME, K.V.C.; DIAMANTINO, E.P. Reação de porta-enxertos híbridos ao Citrus tristeza virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 312-315, 2002.

MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença tristeza dos citrus. **O Biológico**, São Paulo, v.12, p.285-287, 1946.

MESTRE, P.F.; ASINS, M.I.; CARBONELL, E.A.; NAVARRO, L. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to citrus tristeza virus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.95, p.691-695, 1997.

METHA, P., BRLANSKY, R.H., GOWDA, S., YOKOMI, R.K. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of *Citrus tristeza virus* in aphids. **Plant Disease** 81, 1066–1069, 1997.

MICHAUD, J.P. A review of the literature on Toxoptera citricida (Kirkaldy) (Homoptera: aphididae). Florida **Entomologist**, Lutz, v.81, n.1, p.37-61. 1998.

MOLINARI, R.P.; CARVALHO, S.A. Efeito do clima e da pré-imunização para a Tristeza dos citros no crescimento, produção e qualidade de frutos de laranja 'Pêra Bianchi'. **Anais do II Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC**, Campinas-SP, 2008.

MOREIRA, S. Observações sobre a tristeza dos citros ou podridão das radículas. **O Biológico**. São Paulo, n.11, p.269-272, 1942.

MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Conhecimentos atuais sobre a tristeza dos citrus. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.24, n.11-12, p.335-345, 1949.

MOREIRA, S.M; MOREIRA, S. Historia da citricultura no Brasil. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU, JR, J.; AMARO, A.A. (eds). **Citricultura Brasileira**, Fundação Cargill, p.1-21, 1991.

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

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

MORENO, P.; PINA, J.A.; PIQUER, J.; GUERRI, J. Mild isolates of *Citrus tristeza virus* protect Valencia sweet Orange on sour Orange rootstock against tristeza decline. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, SP, v.31 (suplemento), 129ps. 2010.

MOURA, M. S. B.; ANGELOTTI, F. Clima. In: ALBUQUERQUE, A. C. S.; SILVA, A. G. da.. (Org.). **Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas**. 1 ed. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, v. v.2, p. 411-429, 2008.

MUKHOPADHYAY, S. **Citrus, Production, Postharvest, Disease and Pest Management**. Published by Science Publishers, Inc. Enfield, NH. USA, 1-3. 2004.

MÜLLER, G.R.; REZENDE, J.A.M. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. In: NAQVIS, S.A.M.H. (Ed.). **Disease of**

fruits and vegetables: diagnosis and management. Amsterdam: Kluwer Academic, v.1, p.361-369, 2004.

MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; CAMPOS, J.S. Tristeza severa no limão-Tahiti. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., 1973, Viçosa. **Anais...** Viçosa: SBF, p. 381-387, 1973.

MÜLLER G.W.; COSTA A.S.; KITAJIMA E.W.; CAMARGO I.J.B. Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora spp.* In: LG Weathers, M Cohen (eds.). **Proc. 6th Conf. Int. Org. Citrus Virol.**, Univ. Calif. Div. Agric. Sci., Richmond, California: 75-78, 1974.

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

MÜLLER, G.W.; CARVALHO, S.A.; GUIRADO, N. Indexação para viroses das matrizes de citros do Centro de Citricultura Sylvio Moreira – xiloporose. **Laranja**, Cordeirópolis, v.15, n. 2, p.213-220, 1994.

MÜLLER, G.W.; MATTOS JUNIOR, D. Clássicos da citricultura brasileira. **Laranja**, Cordeirópolis, v.23, n.2, p.499-525, 2002.

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. Cap. 19, p. 567-604. In: Mattos Júnior, D., De Negri, J.D., Pio, R.M., Pompeu Junior, J. **Citros**. Instituto Agrônômico, Fundag. 927p. 2005.

MUNIZ, F.R. **Caracterização molecular e avaliação da resistência ao vírus da tristeza dos citros (CTV) em plantas transgênicas de laranja ‘Valência’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck)**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2008.

MUNIZ, F.R.; HARAKAVA, R.; STACH-MACHADO, D.R.; REZENDE, J.A.M.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MENDES, B.M.J. Evaluation of *Citrus sinensis* transgenic lines for resistance to *Citrus tristeza virus*. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, SP, v.31 (suplemento), 129ps. 2010.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A. & SUMMERS, M.D. Virus taxonomy-classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology** 10:497. (Abstract), 1995.

NAVARRO, L.; ROISTACHER, C.N.; MURASHIGE, T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, 100: 471-479, 1975.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. (Org.). **Estratégias para a laranja o Brasil**. São Paulo: Atlas, 225p., 2005.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1. ed. Ribeirão Preto: v. 1. 137 p. 2010.

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** 71, 97–106, 2000.

NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, n.11, p.1276-1280. 1998.

PAPPU, H.; PAPPU, S.S.; NIBLETT, C.L.; LEE, R.F.; CIVEROLO, E. Comparative sequence analysis of the coat proteins of biologically distinct

citrus tristeza closterovirus isolates. **Virus Genes**, Dordrecht, v.7, n.3, p.255-264. 1993.

PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. In: **Resistência de plantas a doenças** (eds. L. Zambolin and F.X.R. do Vale). Universidade de Vicosa, MG, Brasil, 1997.

PASSOS, O.S. Clones de laranja Pêra. Embrapa: Citros em foco. Brasília: Embrapa, p.1-2, 1991. (**Boletim Embrapa**, n. 36.)

PASSOS, O.S.; ALMEIDA, C.O.; PEIXOUTO, L.S. Potencialidade da Chapada Diamantina para citricultura. **Bahia Agrícola**. v.7 n. 1, 2005.

PASSOS, O.S.; BASTOS, D.C.; SOUZA, J.S.; RAMOS, Y.C. **Potencialidade do submédio São Francisco para citricultura**. In: Seminário Desafios e Potencialidades da Fruticultura no semiárido. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010.

PENNAZIO, S.; ROGGERO, P.; CONTI, M. A history of plant virology. Cross protection. **New Microbiol** 24, 99–114, 2001.

PERONI, L.A. **Caracterização dos epítomos e da estrutura secundário da proteína do capsídeo do *Citrus tristeza virus* e um diagnóstico imunomolecular para *Xylella fastidiosa***. Universidade Estadual de Campinas, 150p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), 2008.

PERSAD, A. B., AND HOY, M. A. Intra- and interspecific interactions between *Lysiphlebus testaceipes* and *Lipolexis scutellaris* on *Toxoptera citricida*. **J. Econ. Entomol.** 96: 564-569, 2003.

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**, St. Paul, v.76, p.141-144, 1992.

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

RAI, M. Refinement of the Citrus tristeza vírus resistance gene (Ctv) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.61, p. 339-414, 2006.

RIBEIRO, L.P. Os Latossolos Amarelos do Recôncavo Baiano: **Gênese, evolução e degradação**. Salvador, Seplantec, 99p. 1998.

ROBERTS, P.D.; McGOVERN, R.J.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. Tristeza. Florida Cooperative Extension Service, **Inst. Food Agric. Sci.**, p.10, 2001.

ROCHA-PEÑA, M.A.; LEE, R.F.; LASTRA, R.; NIBLETT, C.L.; OCHOA-CORONA, F.M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, K. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.79, n.5, p.437-445, 1995.

ROISTACHER, C.N.; BLUE, R.L.; NAUER, E.M.; CALAVAN, E.C. Suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings grown at warm temperatures. **Plant Disease**. Rep. 58: 757-760, 1974.

ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. **Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus**, Fundação Cargill, 84 pp., 1993.

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

RUBIO, L.; AYLLON, 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**, Washington, v.75, n.17, p.8054-8062, 2001.

RUIZ-RUIZ, S., MORENO, P., GUERRI, J., AMBRÓS, S. A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. **Virology Methods**. 145: 96-105, 2007.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989.

SANTOS, E.E.S.; RODRIGUES, A.S.; SANTOS, A.F.; BARBOSA, C.J. Monitoramento de Doenças nas Plantas Básicas de Citros e do Comportamento de Clones de Lima Ácida Tahiti à infecção por Citrus tristeza virus, CTV. In: III Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009 (**Resumo**).

SANTOS, F.A.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A. Estabilidade do complexo PÊRA IAC do *Citrus tristeza virus* em quatro cultivares de laranja doce. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.28, n.1-2, p.17-28, 2007.

SAPONARI, M.; MANJUNATH, K.; YOKOMI, R.K. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). **J Virol Methods** 147, 43-53, 2008.

SATYANARAYANA, T., BAR-JOSEPH, M., MAWASSI, M., ALBIACH-MARTÍ, M.R., AYLLÓN, M.A., GOWDA, S., HILF, M.E., MORENO, P., GARNSEY, S.M.,

DAWSON, W.O. Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. **Virology**, 280: 87-96, 2001.

SCHINOR, E.H. **Organogênese *in vitro* e transformação genética em *Citrus* sp. com o gene da capa proteica e uma sequência conservada antisense do vírus da tristeza dos citros**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 88p. Tese (Doutorado em Agronomia), 2006.

SCHUMACHER, J.; MEYER, N.; RIESNER, D.; WEIDEMANN, H. L. Diagnostic Procedure for Detection of Viroids and Viruses with Circular RNAs by “Return”–Gel Electrophoresis. **J. Phytopatology**, v.115, p.332-343, 1985.

SCORA, R.W.; KUMAMOTO, J.; SOOST, R.K.; NAUER, E.M. Contribution to the origin of the grapefruit, *Citrus paradisi* (Rutaceae). **Systematic Botany**, Kent, v.7 n.2, p.170-177, 1982.

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** 72, 1013-1020, 1991.

SOARES FILHO, W.S. & PASSOS, O.S. Melhoramento do limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka): obtenção de clones nucelares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.1, p.43-50, 1978.

SOOST, R.K.; J.W. CAMERON. Citrus. In: (Eds.): **Advances in Fruit Breeding**. JANICK, J.; MOORE, J.N. Purdue University Press, West Lafayette, pp.507-540, 1975.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M. Evaluation of changes which occurred in a mild protective citrus tristeza virus isolate in Pera sweet orange trees using RFLP and SSCP analyses of the coat protein

gene. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologist, 14., 1998, Campinas. **Proceedings**...Lake Alfred: IOCV, p. 131-135, 2000.

SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Evaluation of CTV coat protein gene haplotypes in premmunized plants of 'Pera' sweet orange. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p. 154-159, 2002(a).

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 ,Paphus, 2001. **Proceedings**.... IOCV, Riverside, p.117-130, 2002(b).

STACH-MACHADO, D.R.; PERONI, L.C.F.; CAPORRINO, M.C.; MULLER, G. W.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Characterization of monoclonal antibodies for identification of the severe strains of 'Capão Bonito' citrus tristeza virus. In: XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 2002, Paphos. **Proceedings** of the XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists, p. 165-171, 2002.

SWINGLE, W.T.; REECE P.C. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In REUTHER W., WEBBER H. and BATCHELOR L. [eds.] **The Citrus Industry**, Vol 1.p: 190 – 430. University of California, USA, 1967.

SZITTYA, G.; SILHAVY, D.; MOLNÁR, A.; HAVELDA, Z.; LOVAS, A.; LAKATOS, L.; BÁNFALVI, Z.; BURGÝÁN, J. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. **The EMBO Journal** 22, 633 – 640, 2003.

TANAKA, T. **Species problems in citrus**. Tokyo: Japanese Society for the Promotion of Science, 152p., 1954.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; CRISTOFANI, M. Genetic polymorphism of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties evaluated by random amplified polymorphic DNA. **Acta Horticulturae** 535:51-3, 2000.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 174p. (Boletim técnico, 5), 1995.

TEMPORAL, W.M.; CORAZZA, M.J.; ZANUTTO, C.A.; NUNES, W.M.C.; MÜLLER, G.W. SSCP analysis of *Citrus tristeza virus* protective isolates in Pêra sweet orange clones under northern Paraná state, Brazil conditions. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.32, n.1, p.9-16, 2011.

TSAI, J.H.; LEE, R.F.; LIU, Y.; NIBLETT, C.L. Biology and Control of Brown Citrus Aphid (*Toxoptera citricida* Kirkaldy) and Citrus Tristeza. Fort Lauderdale Research and Education Center, IFAS; University of Florida, 1999.

TSUCHIZAKI, T.; SASAKI, A.; SAITO, Y. Purification of citrus tristeza virus from disease fruit and the detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. **Phytopathology**, Saint Paul. v.68, p.139-142, 1978.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses** Academic Press, United States of America. 1162 p. 2000.

VASCONCELOS, A.P.A. **Caracterização de um complexo protetivo do vírus da Tristeza dos citros, em laranjeira 'Pêra' após sucessivas propagações por borbulhas**. Escola de Agronomia. Universidade Federal da Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), 2000.

WEBBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H.W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds). **The Citrus Industry**. Berkeley, University of California Press, v.1, p.1-39. 1967.

YOKOMI, R.K.; METHENEY, P. GRAFTON-CARDWELL, E.E.; STEWART-LESLIE. Current status of *Citrus tristeza virus* in Central California. **Citrus Research & Technology**. Cordeirópolis, SP, v.31 (suplemento), 129ps. 2010.

YOSHIDA, T. Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantioideae* and their susceptibility to citrus tristeza virus. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, n.4, p.414-417, 1996.

ZANUTTO, C.A. **Capacidade protetiva de novos isolados fracos de *Citrus tristeza virus* para utilização em programa de pré-imunização de laranjeira 'Pêra'**. Universidade Estadual de Maringá. Maringá – Paraná. Tese (Doutorado em Agronomia), 2009.

ZIEGLER, L.W.; H.S. WOLFE. **Citrus growing in Florida**. University of Florida Press, Gainesville. 248 pp., 1961.

ANEXOS

(Protocolo para ELISA indireto e análises de variância)

**ELISA INDIRETO COM PBS (segundo Ramon L. Jordan/USDA conforme
comunicação pessoal de Theresa Shelly, Livro SBFitopatol.) revisado
04/08/2006**

Preparado por Paulo Ernesto Meissner Filho

Procedimento

1- Macerar as amostras, na proporção 1/5 (p/v) em tampão carbonato +1% de PVP. Aplicar 100µl em cada orifício da placa de ELISA.

2- Incubar as placas em câmara úmida por uma noite em geladeira.

3- Esvaziar as placas, lavando-as com tampão PBS-Tween (0,05%). A primeira lavagem consiste em apenas encher os orifícios e esvaziar a placa logo em seguida. A seguir efetuar 3 lavagens esperando 5 minutos entre cada uma delas.

4- Fazer o bloqueio das placas adicionando a cada orifício 100µl de PBS + 3% albumina de soro bovino (BSA), incubando sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente.

5- Lavar a placa 1 vez com PBS – Tween durante 5 minutos.

6- Adicionar 100µl do anti-soro (anticorpo) diluído a 1/1000 (ou conforme recomendação do fabricante) em tampão para diluição do anti-soro (PBS – Tween + 2% de PVP + 0,2% de albumina de ovo). Homogeneizar bem a solução antes de iniciar sua transferência para a placa de ELISA.

7- Incubar em câmara úmida por uma noite em geladeira.

8- Repetir a lavagem das placas conforme descrito no item 3.

9- Adicionar 100µl de anti-soro “goat anti-rabbit” conjugado com fosfatase alcalina, diluído a 1/1000 (ou conforme recomendação do fabricante) em tampão para diluição do anti-soro (anticorpo/conjugado) (PBS – Tween + 2% de PVP + 0,2% de albumina de ovo). Homogeneizar bem a solução antes de iniciar sua transferência para a placa de ELISA.

10- Incubar, em câmara úmida, em estufa a 37°C/4 horas.

11- Esvaziar a placa e efetuar 5 lavagens com PBS – Tween, conforme descrito no item 3.

12- Adicionar 100µl por orifício, do tampão substrato para a enzima contendo 0,8 mg/l de p-nitrophenyl phosphate. Tampão contendo o substrato deve ser mantido no escuro. Dissolver bem o p-nitrophenyl phosphate.

13- A placa é mantida a temperatura ambiente no escuro, sendo as reações obtidas monitoradas constantemente e lidas em leitora de placas de ELISA, utilizando-se um filtro de 405 nm. Geralmente após 60 minutos de reação o teste pode ser concluído. Utilizar a leitura no Assay 13.

Soluções e tampões

Placas para microtitulação, placas para ELISA com fundo chato, 96 orifícios em poliestireno.

Tampão Carbonato pH 9,6

Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃).....	0,015M
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃).....	0,035M
Água destilada q.s.p.....	1000 ml

Poyvinil pyrrolidona 40 (PM = 40.000), PVP 40

Tampão para extração das amostras

Tampão Carbonato + 1% de PVP.

PBS pH 7,4 para 1L

Cloreto de sódio (NaCl)	8,0 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Fosfato de sódio dissódico anidro (Na ₂ HPO ₄)	1,15 g
Cloreto de potássio (KCl)	0.2 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

ALTURA MEDIA GERAL (AZEDA)

Variável analisada: ALT

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	6434.450625	2144.816875	82.139	0.0000
Erro	8	208.896667	26.112083		
Total corrigido	11	6643.347292			
CV (%) =	8.41				
Média geral:	60.7291667	Número de observações:		12	

ALTURA MEDIA GERAL (GALEGO)

Variável analisada: ALT

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	2866.164825	955.388275	19.638	0.0005
Erro	8	389.207800	48.650975		
Total corrigido	11	3255.372625			
CV (%) =	11.70				
Média geral:	59.6275000	Número de observações:		12	

ALTURA MEDIA GERAL (POMELO)

Variável analisada: ALT

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1535.164492	511.721497	24.085	0.0002
Erro	8	169.971800	21.246475		
Total corrigido	11	1705.136292			
CV (%) =	11.20				
Média geral:	41.1608333	Número de observações:		12	

PESO SECO MEDIA GERAL (AZEDA)

Variável analisada: Peso Fresco

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1623.509467	541.169822	19.751	0.0005
Erro	8	219.195000	27.399375		
Total corrigido	11	1842.704467			
CV (%) =	12.58				
Média geral:	41.6066667	Número de observações:		12	

PESO SECO MEDIA GERAL (GALEGO)

Variável analisada: Peso Fresco

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	2239.582067	746.527356	27.243	0.0001
Erro	8	219.219133	27.402392		
Total corrigido	11	2458.801200			
CV (%) =	8.00				
Média geral:	65.4500000	Número de observações:		12	

PESO SECO MEDIA GERAL (POMELO)

Variável analisada: Peso Fresco

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	777.841092	259.280364	25.730	0.0002
Erro	8	80.615000	10.076875		
Total corrigido	11	858.456092			
CV (%) =	10.83				
Média geral:	29.3141667	Número de observações:		12	

PLANTAS INDEXADA MEDIA GERAL (GALEGO)

Variável analisada: CANELURA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	28.845900	9.615300	260.754	0.0000
Erro	8	0.295000	0.036875		
Total corrigido	11	29.140900			
CV (%) =	5.25				
Média geral:	3.6550000	Número de observações:		12	

PLANTAS INDEXADA MEDIA GERAL (POMELO)

Variável analisada: CANELURA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	3.281225	1.093742	5.437	0.0247
Erro	8	1.609267	0.201158		
Total corrigido	11	4.890492			
CV (%) =	24.65				
Média geral:	1.8191667	Número de observações:		12	

SOROLOGIA PLANTAS DE CAMPO MEDIA GERAL

Variável analisada: SOROLOGIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	4	0.938542	0.234635	7286.814	0.0000
Erro	10	0.000322	0.000032		
Total corrigido	14	0.938864			
CV (%) =	1.45				
Média geral:	0.3926000	Número de observações:		15	

SOROLOGIA PLANTAS INDEXADAS MÉDIA GERAL (AZEDA)

Variável analisada: SOROLOGIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	4	4.555400	1.138850	3884.209	0.0000
Erro	10	0.002932	0.000293		
Total corrigido	14	4.558332			
CV (%) =	4.50				
Média geral:	0.3808000	Número de observações:		15	

SOROLOGIA PLANTAS INDEXADAS MÉDIA GERAL (GALEGO)

Variável analisada: SOROLOGIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	4	8.515154	2.128789	47097.093	0.0000
Erro	10	0.000452	0.000045		
Total corrigido	14	8.515606			
CV (%) =	0.44				
Média geral:	1.5122000	Número de observações:		15	

SOROLOGIA PLANTAS INDEXADAS MÉDIA GERAL (POMELO)

Variável analisada: SOROLOGIA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	4	3.571714	0.892928	16597.182	0.0000
Erro	10	0.000538	0.000054		
Total corrigido	14	3.572252			
CV (%) =	1.20				
Média geral:	0.6116000	Número de observações:		15	