

MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL

Artigo de Revisão

A TRISTEZA DOS CITROS E SUAS IMPLICAÇÕES NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PORTA-ENXERTOS⁽¹⁾

RITA BORDIGNON⁽²⁾; HERCULANO PENNA MEDINA FILHO^(2,5);
GERD WALTER MULLER⁽³⁾; WALTER JOSÉ SIQUEIRA⁽⁴⁾

RESUMO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros e, historicamente, a tristeza, a doença de maior importância econômica da cultura. Causada por um closterovírus (CTV) de RNA fita simples positiva, encontra-se disseminada por quase todas as regiões citrícolas do globo. Transmitida por enxertia e algumas espécies de pulgão, principalmente *Toxoptera citricida*, apresenta diversas estirpes, causando sintomas variados em *Citrus* e afins. Proteção cruzada de copas sensíveis através de estirpes fracas do vírus é uma eficiente técnica de controle desenvolvida no Brasil e utilizada em várias partes do mundo. Métodos de detecção e caracterização do vírus baseiam-se nos sintomas de variedades e clones específicos, mas, métodos sorológicos e moleculares são empregados também no monitoramento da expansão da doença. As plantas, não raro, são infectadas com mais de uma estirpe, que se podem recombinar geneticamente e são passíveis de transmissibilidade diferencial pelos vetores ou por diferentes borbulhas da mesma planta. A composição do complexo de estirpes presente na planta pode alterar-se após poda drástica, ou em resposta a condições ambientais. Tipos menores de RNA defectivos e subgenômicos ocorrem frequentemente junto às partículas normais do CTV. Alguns defectivos estão associados aos sintomas de amarelecimento de plântulas. O controle da doença é feito pelo uso de variedades de copas e de porta-enxertos que interagem conforme a capacidade de multiplicar as partículas virais em suas células e de tolerar sua presença nos tecidos do floema. Essas características têm importantes implicações para o cultivo e melhoramento. A presente revisão discute também as reações de plantas enxertadas e de pé-franco, ressalta os problemas, conceitos básicos e as implicações relevantes para o melhoramento genético de porta-enxertos.

Palavras-chave: CTV, tolerância, resistência, sintomas, *Citrus*.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 4 de dezembro de 2002 e aceito em 2 de outubro de 2003.

⁽²⁾ Centro de Análise e Pesquisa do Agronegócio do Café 'Alcides Carvalho', Instituto Agronômico (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas (SP). E-mail: rita@iac.sp.gov.br

⁽³⁾ Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Av. Colombo, 5.790, 87020-900 Maringá (PR).

⁽⁴⁾ Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais, Instituto Agronômico (IAC), Campinas (SP).

⁽⁵⁾ Com bolsa de produtividade em pesquisa do CNPq.

ABSTRACT

THE CITRUS TRISTEZA DISEASE AND ITS IMPLICATIONS ON ROOTSTOCK IMPROVEMENT

Brazil is the world leading citrus producer and historically, tristeza is the most serious disease in economic importance. Tristeza is caused by a single strand RNA closterovirus, Citrus Tristeza Virus (CTV), is disseminated in almost all citrus regions of the world. It is transmitted by grafting and by several species of aphids mainly *Toxoptera citricida*. There are several virus strains, causing variable symptoms in the majority of species and related genera of *Citrus*. Cross-protection by mild virus strains is an efficient technique for protecting very sensitive scions in Brazil and elsewhere. Methods for detecting and characterizing virus strains are classically based on the reaction symptoms of specific varieties and clones. However, development of serological and molecular methods have allowed progress in the characterization and in monitoring the spread of the disease. Plants may be infected with more than one strain that can undergo genetic recombination, show differential transmissibility by the vector aphids, have composition of the strain complex altered by drastic pruning, temperature, and also segregate among budwoods, or by sub-culture in different clones. Smaller defective RNAs are often associated with normal CTV particles, some correlated with symptoms of seedling yellows. Efficient control is achieved by favorable combinations of scions and rootstocks. They react in predictable interactions dependent on both, the capability to multiply the viruses and to tolerate their presence in phloem tissues. These peculiarities have important implications on practical cultivation and on the genetic improvement of scions and rootstocks. This review discuss also the reaction of grafted and non-grafted plants, and highlights problems, basic concepts and relevant implications for citrus rootstock improvement.

Key words: CTV, tolerance, resistance, history, symptoms, *citrus*.

1. HISTÓRICO

O Brasil é o maior produtor de laranja e o maior exportador de suco concentrado congelado do mundo. Historicamente, a tristeza é a doença mais importante dessa cultura. Acredita-se que seja proveniente da China (BAR-JOSEPH et al., 1981), centro de origem da maioria das espécies de *Citrus* (TANAKA, 1954), e daí se disseminado para outras partes do mundo, através de mudas e borbulhas infectadas. As sementes não transmitem a doença, e mudas assim produzidas constituem-se em eficiente estratégia para livrar os clones infectados do CTV e de outros vírus.

Variedades e espécies de citros têm seu cultivo registrado na bacia do Mediterrâneo desde o ano 300 a.C. Em meados do século XIX, uma grave doença atacando as raízes dos citros, hoje conhecida por *Phytophthora*, destruiu os plantios de laranjas doces nas ilhas Açores. Começou, então, a ser utilizada a laranja Azeda (*Citrus aurantium*), um porta-enxerto resistente à *Phytophthora* (BAR-JOSEPH et al., 1989), o qual se tornou rapidamente o porta-enxerto predominante em várias partes do mundo. Nessa época, a citricultura se expandia no mundo. Com essa expansão, verificou-se que, em algumas regiões como Java, Austrália e África do Sul, as combinações de laranjas doces sobre a Azeda entravam em colapso, enquanto sobre *Poncirus trifoliata* ou limão Rugoso (*C. jambhiri*) eram bem sucedidas e vigorosas. Por vários anos, acreditou-se que essa decadência seria devida à incompatibilidade entre o porta-enxerto e a copa,

até que WEBBER (1925) e TOXOPEUS (1937) sugeriram a existência de algum agente infeccioso para explicar esse colapso. Mais tarde, a presença de um agente causal ficou definitivamente comprovada pelo trabalho de transmissão por pulgão realizado por MENEHINI (1946), no Instituto Biológico, em São Paulo.

De 1890 a 1935 houve grande expansão nos plantios comerciais de laranja. A primeira grande devastação causada por essa doença ocorreu em 1930, em Corrientes, Argentina, onde se verificou a perda de 10 milhões de árvores em 15 anos (CARREIRA, 1933). MOREIRA (1942) denominou-a “Tristeza” e salientou que ocorria no Brasil desde antes de 1937. Em 12 anos, dizimou 7 milhões de árvores, o que correspondia a 75% dos pomares brasileiros de laranjas doces que, nessa época, eram enxertadas em laranja Azeda (MOREIRA et al., 1949).

Historicamente, a expansão e os danos da tristeza em outras regiões do mundo seguiram os padrões observados no Brasil e na Argentina. Segundo BAR-JOSEPH et al. (1989), as estimativas, no mundo, são de que 50 milhões de árvores morreram ou se tornaram improdutivas, causando prejuízos diretos de centenas de milhões de dólares em diversos países e a seus produtores. Atualmente, a tristeza encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras do mundo: América do Sul, América Central, Estados Unidos, Israel, Espanha, Austrália, África do Sul, entre outras (DICKSON e FLOCK, 1959; ROISTACHER et al., 1991; LEE et al., 1992, 1994; GOTTWALD et al., 1994, 1998).

A expansão da tristeza na citricultura mundial tem resultado em modificações técnicas e agrônomicas, bem como em ações governamentais fundamentadas nos conhecimentos gerados pelas pesquisas na área de Virologia, Entomologia, Fitotecnia e Genética. Tais conhecimentos permitiram que o Brasil se tornasse hoje o maior produtor e exportador mundial de suco concentrado congelado de laranja.

A complexidade das inter-relações porta-enxerto/enxerto, a variabilidade genética do vírus (CTV), a severidade dos sintomas e os prejuízos econômicos relacionados à sua ocorrência demandam uma atenção científica intensa.

Nos congressos trianuais da Organização Internacional dos Virologistas de Citros, a tristeza é o maior destaque. Sua importância econômica é evidenciada, por exemplo, pela dispendiosa operação de monitoramento de pomares por amostragem realizada pela Agência Central de Erradicação da Tristeza nos Estados Unidos (GOTTWALD e HUGHES, 1998), a qual perfaz anualmente 700.000 testes ELISA no Central Valley na Califórnia (LEE et al., 1994).

2. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

Os estudos a respeito da caracterização do vírus da tristeza são bastante difíceis. Esse fato se deve a diversos fatores, principalmente à sua complexidade e à natureza da interação com o hospedeiro citros. Trata-se de um vírus limitado ao floema e que pode ocorrer em baixa concentração nas plantas cítricas, que são perenes e lenhosas. Além disso, a purificação do vírus é trabalhosa e as partículas virais são sujeitas a quebras durante esse processo. Complicações adicionais advêm do fato de que a tristeza ocorre naturalmente na forma de diversas estirpes, freqüentemente co-infectando um mesmo indivíduo, cujas reações podem variar em intensidade em um mesmo hospedeiro (LI et al., 1990).

Os sintomas, da mesma forma, também variam, apresentando-se com amarelecimento das mudas, declínio rápido, declínio moderado, caneluras e mesmo ausência de sintomas visíveis; nesse caso, manifestam-se, em certas condições, apenas como uma interrupção ou diminuição na taxa de crescimento. Tais sintomas podem variar conforme o ambiente, sobretudo devido à temperatura, havendo também influência da constituição genética da copa, do porta-enxerto e da interação de ambos (ADAMS, 1991; LEE et al., 1994; ROCHA-PEÑA et al., 1995; CARVALHO et al., 1997; KARASEV et al., 1998).

KITAJIMA et al. (1964), no Instituto Agrônomico (IAC), em Campinas, descobriram, em microscópio eletrônico, que partículas filamentosas estavam associadas com a doença tristeza. Dois anos após, a purificação parcial do vírus foi conseguida por KITAJIMA et al. (1965) e SILVA et al. (1965), permitindo que PRICE (1966), BAR-JOSEPH et al. (1972) e outros pesquisadores continuassem os trabalhos de purificação do vírus (BAR-JOSEPH et al., 1974, 1976, 1985; GONSALVES et al., 1978; TSUCHIZAKI et al., 1978; LEE et al., 1987). Tipicamente, o CTV é um vírus longo, filamentososo, com simetria helicoidal, de 2.000 nm de comprimento por 10^{12} nm de largura (KITAJIMA et al., 1965; BAR-JOSEPH et al., 1979) e peso molecular 144×10^6 . Com essas dimensões, constitui-se no maior vírus de planta conhecido (KARASEV et al., 1995).

Devido a essas características, esse vírus é classificado como pertencente ao grupo dos closterovírus (BAR-JOSEPH et al., 1976; COFFIN e COUTTS, 1993). Além dos vírions de fita única positiva de RNA (KARASEV et al., 1995), encapsulados em uma capa de subunidades protéicas de 25 Kda, as plantas infectadas pelo CTV contêm uma população heterogênea de, pelo menos, nove partículas menores de RNA subgenômicos (PAPPU et al., 1993; HILF et al., 1995; MAWASSI et al., 1995; NAVAS-CASTILLO et al., 1997; KARASEV et al., 1998) e também de RNAs de 2,0 a 5,0 kb, defectivos, instáveis e variáveis (KARASEV et al., 1998). Supõe-se que algumas dessas partículas defectivas estejam associadas aos sintomas típicos de amarelecimento de plântulas (YANG et al., 1999).

Ao contrário, nenhum efeito biológico tem sido associado às partículas subgenômicas (SATYANARAYANA et al., 2001). Mais raramente, ocorrem partículas um pouco maiores (12,0 kb), com RNAs defectivos e que podem ser transmitidas mecanicamente através de ferimentos (CHE et al., 2002). A proteína do capsídeo do CTV tem sido caracterizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, *Western blotting*, mapeamento de polipeptídeo em gel SDS-PAGE e por técnicas serológicas diversas, com base na especificidade dos epitopos de vários isolados ocorrendo nas plantas cítricas (BAR-JOSEPH et al., 1972; LEE e CALVERT, 1987; LEE et al., 1988; NIKOLAEVA et al., 1996, 1998).

O gene da proteína do capsídeo foi bastante estudado na última década, tendo sido isolado e clonado em *Echerichia coli*, evitando purificações e facilitando a produção de anticorpos monoclonais (MANJUNATH et al., 1994; NIKOLAEVA et al., 1995; TARGON et al., 1997). A diferenciação de estirpes através de suas proteínas da capa é alvo de intensivas investigações que, em alguns casos, com anticorpos monoclonais, permitem a separação de algumas estirpes (LEE et al., 1988).

Em nível molecular, a comparação de seqüências parciais de muitos isolados e da seqüência completa de três isolados mostrou considerável diversidade genética, até de 40% entre certas regiões do genoma (PAPPU et al., 1997; KARASEV et al., 1998; KONG et al., 2000). Até o presente, não existe um método universal para detectar e diferenciar estirpes do CTV, apesar de serem usados variedades e clones diferenciais, imunodiagnose, hibridização, RT-PCR e SSCP (polimorfismo de conformação) de fita simples (MACHADO et al., 1997; NIBLETT et al., 2000; SAMBADE et al., 2002). É fato indiscutível, portanto, a extrema diversidade biológica das estirpes de CTV, as quais são mantidas com mais de 200 isolados em coleção em Beltsville, EUA. Não raro, esses isolados, considerados até então como “puros”, mostraram, no entanto, serem compostos de mais de uma estirpe, conforme testes com “primers” específicos por RT-PCR (KARASEV et al., 1998). No campo, é comum a co-existência de várias estirpes em um mesmo indivíduo (BROADBENT et al., 1996; BOUHIDA et al., 1998; RUBIO et al., 2001).

Outro aspecto que acrescenta complexidade ao sistema, e de forma dinâmica, é que nos complexos de CTV, ocorrendo em um único indivíduo hospedeiro de citros, podem existir variações na capacidade de transmissibilidade das estirpes componentes pelo vetor afídeo *Toxoptera citricida* Kirk. (MICHAUD, 1998). Também podem ocorrer mudanças na predominância das estirpes e dos sintomas, devido a podas drásticas, ou mesmo a separação de estirpes nas borbulhas de um mesmo indivíduo (RACCAH et al., 1980; BROADBENT et al., 1996; KOLLER e SOPRANO, 1998). À essa enorme complexidade soma-se o fato de que diferentes estirpes em um mesmo indivíduo podem se recombinar geneticamente (RUBIO et al., 2001).

Talvez a forma mais simples, antiga e eficiente de caracterização de estirpes de CTV seja a caracterização biológica, que se baseia no conjunto de sintomas manifestados em diferentes plantas indicadoras, experimentalmente submetidas à inoculação conforme pioneiramente indicado por COSTA et al. (1949). São de utilização generalizada como indicadoras de CTV as variedades de laranja Azeda (*C. aurantium*), lima ácida ‘Galego’ ou lima ‘Mexicana’ (*C. aurantifolia*), pomelos ‘Marsh seedless’ e ‘Duncan’ (*C. paradisi*), limão ‘Eureka’ (*C. limon*) e laranja doce ‘Madame Vinous’ (*C. sinensis*), entre outras (DESJARDINS et al., 1957; PERMAR e GARNSEY, 1991; LEE et al., 1994; MÜLLER et al., 1994; CARVALHO et al., 1997).

3. REAÇÃO E SINTOMAS NAS PLANTAS

A reação das diversas espécies e variedades de citros ao vírus da tristeza deve ser considerada sob

três aspectos fundamentais para seu adequado entendimento, como discutido com precisão e abrangência principalmente por COSTA et al. (1949), BENNETT e COSTA (1949) e por MÜLLER (1976). São os seguintes: a capacidade da planta de multiplicar o vírus após ser infectada, a tolerância dos tecidos do floema à presença do vírus e, de suma importância, a interação desses dois aspectos quando se considera uma planta cítrica comercial, composta de copa e porta-enxerto.

De modo geral, os tecidos do floema dos diversos cítricos podem ser tolerantes, intolerantes ou de reação intermediária à presença de partículas virais em suas células. Por outro lado, as plantas podem também variar quanto à resistência, ou seja, a capacidade de multiplicar o CTV em seus tecidos. Alguns tipos, mesmo após severas e repetidas inoculações, são incapazes de multiplicar as partículas virais, portanto, resistentes. Outros os multiplicam abundantemente, atingindo alta titulação viral nos tecidos do floema. Existem também tipos com comportamento intermediário.

A conceituação desses dois aspectos (resistência e tolerância) é necessária para compreender a reação de uma planta enxertada, pois, ocorre o colapso dos tecidos de um tipo intolerante na presença efetiva do vírus. Segundo COSTA et al. (1949), esse fato se deve à degeneração dos tubos crivados na região de união da enxertia nas primeiras fases da doença, estendendo-se posteriormente até 45 cm acima ou abaixo do enxerto, resultando na necrose do floema (SCHENEIDER et al., 1947). Esse mesmo tecido intolerante se mostrará sadio na ausência do vírus. Uma espécie intolerante e que promove a multiplicação dos vírus em seus tecidos vai apresentar sintomas da doença após a inoculação, seja em plantas de pé-franco, seja em plantas enxertadas em qualquer porta-enxerto ou quando utilizada como porta-enxerto de copas que permitam a multiplicação do vírus. São desse tipo algumas limas como ‘Kirk’ e ‘Beledy’, pomelos como ‘Duncan’, ‘Leonardy’ e ‘Mexican’ e alguns limões verdeiros.

Por outro lado, as plantas que não multiplicam os vírus e que, além disso, possuem floema tolerante, não desenvolvem a doença em qualquer situação. É o caso de diversos clones de *Poncirus trifoliata* e alguns híbridos dessa espécie.

Tipos interessantes são aqueles que, apesar de não multiplicarem ou ser muito reduzida essa multiplicação, não toleram, porém, sua presença. Tipicamente, esse é o caso da laranja Azeda e de *Severinia buxifolia* (MÜLLER, 1976; GARNSEY et al., 1987; YOSHIDA, 1996; MESTRE et al., 1997b) as quais, se enxertadas sobre cavalos resistentes (que não multiplicam o vírus), não desenvolvem a doença,

o mesmo ocorrendo com suas plantas de pé-franco. Essas plantas, porém, entram em colapso quando são utilizadas como porta-enxerto de variedades copa que multiplicam extensivamente o vírus, como é o caso de todas as laranjas doces conhecidas. Essa situação se reveste de grande importância histórica e econômica para o país, pois determinou uma mudança radical na citricultura brasileira após a década de 40, época em que praticamente todos os pomares de laranja doce utilizavam a laranja Azeda como porta-enxerto. Como o vetor pulgão preto é de ocorrência generalizada, os pomares foram rapidamente infectados após a introdução do vírus. Centenas de porta-enxertos testados (COSTA et al., 1949; MOREIRA e ROESSING, 1965) permitiram a substituição da laranja Azeda por porta-enxertos tolerantes, como o limão Cravo. Apesar dos esforços para diversificação de porta-enxertos, após mais de 50 anos, o limão Cravo (que multiplica o CTV) continua a ser ainda o porta-enxerto mais utilizado no Brasil.

A maioria das laranjas doces, apesar de multiplicarem amplamente o vírus da tristeza, tem, no entanto, os tecidos do floema tolerantes a sua presença. Por essa razão, devem ser cultivadas sobre porta-enxertos que tenham também tecidos tolerantes. Evidentemente, plantas de pé-franco de laranjas doces apresentam-se sem sintomas, embora no campo abriguem o vírus.

Caso um pouco diferente ocorre com a lima ácida 'Galego'. Essa, além de multiplicar o vírus, tem seus tecidos intolerantes, razão pela qual seu cultivo tornou-se extremamente difícil, mesmo quando enxertado sobre porta-enxertos que além de tolerantes são resistentes. Plantas dessa variedade, pré-imunizadas com estirpes fracas da tristeza, têm uma vida útil maior no campo (COSTA e MÜLLER, 1980; MÜLLER e COSTA, 1987).

Há também plantas com reações intermediárias de diversos graus, tanto quanto à capacidade de multiplicação do vírus quanto à de tolerância a sua presença. Tipicamente, é o caso das toranjas (*C. grandis*) e de algumas limas.

4. GENÉTICA E MELHORAMENTO

A natureza genética da tolerância à tristeza recebeu atenção no início da manifestação desta doença no Brasil, particularmente por COSTA et al. (1949) que, importando sementes de híbridos F_1 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) verificaram que o comportamento dos híbridos era semelhante a um ou a outro parental, indicando provável dominância da tolerância.

Com base nesse fato, aventaram a possibilidade de se produzir híbridos de *P. trifoliata*, *C. reticulata* e de *C. aurantifolia* com a laranja Azeda visando a tolerância à tristeza.

Considerando a importância econômica das laranjas doces, limões, tangerinas e pomelos e também o fato de a tristeza ser uma doença importante e comum a todas elas, seriam esperados grandes investimentos na área de melhoramento genético, uma vez que, à semelhança de outras doenças virais, não existe possibilidade de controle químico. Entretanto, isso não se verificou na extensão que seria desejável. Comparando-se as áreas de fitotecnia, testes varietais e biotecnologia, poucas são as referências a programas clássicos de melhoramento genético ou de genética orientados especificamente para o desenvolvimento de novos germoplasmas ou à natureza genética da tolerância à tristeza.

As razões para esse fato residem na complexidade do problema. Conforme mencionado, o vírus da tristeza ocorre sob a forma de complexos de diferentes estirpes, causando variados sintomas, de diversas intensidades nas folhas, frutos e na planta toda, dependentes não somente da copa, mas também do porta-enxerto e da interação de ambos. Tais fatores dificultam e tornam demorada a avaliação do comportamento de novos materiais com relação à tristeza.

A complexidade do assunto é aumentada nos trabalhos de melhoramento genético que visam à produção de novas variedades, pois os citros são espécies perenes, de longo ciclo vegetativo e que, além disso, possuem poliembrionia nucelar (CAMERON e FROST, 1968; BORDIGNON et al., 1990). Essa última particularidade dificulta bastante o melhoramento genético de porta-enxertos, pois, para obterem interesse comercial, têm que ter sementes poliembrionicas de modo que assegure aos viveiristas alta porcentagem de plantas nucleares na sementeira. Essas plantas nucleares são clones, ou seja, reproduções vegetativas fiéis do genótipo das plantas-mãe e conseqüentemente garantem a uniformidade genética das mudas e a homogeneidade das lavouras.

Na semente poliembrionica podem existir dois, três ou vários outros embriões. Entre esses embriões, somente um ou nenhum tem origem zigótica, resultado da união dos gametas masculinos e femininos. Todos os demais, com raras exceções (MEDINA FILHO et al., 1993), são nucleares.

A dificuldade para o melhoramento genético está no fato de que, após os cruzamentos controlados, os híbridos oriundos dos embriões zigóticos precisam ser identificados e separados dos clones oriundos dos embriões nucleares, pois esses últimos representam clones maternos (MEDINA FILHO et al., 1991).

Em alguns cruzamentos a taxa de embriões zigóticos é alta. Em outros, porém, os zigóticos são raros (BORDIGNON, 1995). A identificação das plantas de origem zigótica é feita, em alguns casos, mediante o uso de marcadores morfológicos e, em outros, são necessários marcadores isoenzimáticos ou mesmo a utilização de ambos (BALLVÉ et al., 1997). Marcadores moleculares podem também ser empregados (CRISTOFANI et al., 1999).

A poliembrionia nucelar, a taxa de ocorrência de embriões zigóticos e a identificação eficiente de grande número de indivíduos após os cruzamentos controlados representam, portanto, dificuldades adicionais às investigações que dependem de grande número de indivíduos com origem genética inequívoca. Essas dificuldades têm prejudicado, por certo, as investigações a respeito da genética e do melhoramento para tolerância à tristeza, oneram os programas e delongam os resultados e, conseqüentemente, desestimulam os investimentos nessa área.

Por outro lado, intensos esforços têm sido despendidos no estudo da resistência ou imunidade ao CTV que se manifesta nas plantas como a incapacidade de multiplicar o vírus. Essa característica ocorre em *Poncirus trifoliata*, *Severinia buxifolia*, *Swinglea glutinosa*, *Glycosmis*, *Atalantia*, *Fortunella*, *Murraya*, *Merrillia*, *Triphasia*, *Pleiospermium*, *Aegle*, *Feronia*, *Feroniella* (YOSHIDA et al., 1983; GARNSEY et al., 1987; YOSHIDA, 1996; MESTRE et al., 1997b). Foram identificados três genes independentes conferindo essa imunidade: *Ctv1* (YOSHIDA, 1985; GMITTER et al., 1996; CRISTOFANI et al., 1999) presente em *P. trifoliata*; *Ctv2* (FANG e ROOSE, 1999) encontrado em *C. máxima*; ambos são dominantes e não permitem a multiplicação do vírus, e *Ctm* (MESTRE et al., 1997a) que restringe a movimentação do vírus na planta. Esses três genes são importantes apenas para o melhoramento genético de copas via clonagem e transformação visando à produção de laranjas doces transgênicas.

O sucesso dessa estratégia estaria, entretanto, dependente da incorporação simultânea de *Ctv1* ou *Ctv2* e *Ctm* (MESTRE et al., 1997a). Conforme salientado por esses autores, a translocação do vírus da tristeza dentro da planta ocorre a curtas distâncias e se acumula nas plantas *Ctm-mm*. Com isso, toda a planta acabaria infectada após um curto período, uma vez que se trata de cultura perene. Conforme salientado por COSTA et al. (1949), esses genes são irrelevantes para o melhoramento genético de porta-enxertos se forem utilizados em países onde ocorrem de maneira generalizada, vetores eficientes e se cultivam copas que multiplicam intensamente os vírus, como as laranjas doces e tangerinas. Esse é exatamente o caso da cultura de citros no Brasil e em vários outros países.

Em que pese a enorme importância econômica e social da indústria citrícola brasileira, tipicamente exportadora de um produto destinado a centros diferenciados, e a atual rejeição do consumidor estrangeiro para alimentos geneticamente modificados, essa linha de investigação é discutível.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme mencionado, o vírus da tristeza é molecularmente bem caracterizado, seu genoma de RNA foi seqüenciado (KARASEV et al., 1995), inclusive a ORF (*open reading frame*) que codifica para a capa protéica (PAPPU et al., 1993). Ocorre na forma de diversas estirpes com genética e sintomas diferentes, não raro misturadas e se recombinando em um mesmo indivíduo no campo (KARASEV et al., 1998). Podem, no mesmo local de cultivo, variar devido à transmissibilidade diferencial do afídeo vetor e também, com o passar dos anos, após sucessivas subclonagens em diferentes porta-enxertos ou mesmo em reação a podas severas nas plantas (KOLLER e SOPRANO, 1998).

Tais aspectos devem ser considerados ao se desenvolverem programas de melhoramento genético visando à tolerância à tristeza. Investigações para a caracterização serológica resultam em diversos tipos de anticorpos monoclonais, reagindo diferencialmente com grupos de isolados (NIKOLAEVA et al., 1996). Entretanto, a caracterização mais importante em relação ao tipo e à severidade de estirpes de CTV baseia-se na reação das variedades ou clones diferenciais cuja reação conjunta permite a distinção de 11 categorias de estirpes (ROCHA-PEÑA et al., 1995).

De forma prática, considerando as reações apenas nas laranjas doces, as estirpes se classificam genericamente em fracas e severas. Essas últimas causam injúria nos porta-enxertos e ou nas copas, sendo a ocorrência nas copas independente de seus porta-enxertos. As estirpes severas, ao incidir em plantas de qualquer idade, causam a paralisação do crescimento e depauperamento de plantas enxertadas em laranja Azeda e outros porta-enxertos intolerantes; em condições de viveiro, ocorrem os conhecidos sintomas de amarelecimento ou "*seedling yellows*", quando enxertadas em laranjas Azeda. Outros tipos severos também causam depauperamento e um acentuado "enfazamento" (*stunting*) de plantas novas, podendo ainda manifestar ou não "*seedling yellows*".

É importante salientar que a tolerância do porta-enxerto limão Cravo, quando enxertado com copas de laranjas doces, se verifica em relação às estirpes

fracas e severas de CTV denominadas normais, exceção àquela extremamente severa que ocorre na região do município de Capão Bonito, SP, e apenas tolerada pelas tangerinas, *P. trifoliata* e alguns outros tipos de citros (MÜLLER et al., 1990). Note-se, entretanto, que a reação da copa às estirpes que causam caneluras (*stem pitting*) não é influenciada pela tolerância dos porta-enxertos.

Os sintomas de “*stem-pitting*” são causados por anormalidades no floema e no xilema, associados ao “enfazamento”, perda de vigor e de produtividade, mas que independem do porta-enxerto.

A seleção de clones tolerantes e o melhoramento genético de porta-enxertos visando à tolerância à tristeza dos citros tem-se mostrado, ao longo do tempo, como uma estratégia eficiente e duradoura na viabilização da citricultura em áreas onde essa doença e seus vetores se encontram disseminados, como no Brasil. Devido à crescente demanda para a produção, com o cultivo em novas condições edafo-climáticas e o surgimento de estirpes capazes de infectar porta-enxertos até então tolerantes, é de especial valia a continuidade das pesquisas nessa mesma linha de melhoramento.

A julgar pelos resultados históricos, essa perspectiva é favorável e vem sendo viabilizada pelo melhoramento clássico, com base em hibridações entre porta-enxertos conhecidos e amplamente testados nas condições locais. Tais investigações podem ser realizadas, atualmente, graças às técnicas de hibridação, identificação de híbridos e seleção, às informações detalhadas sobre a composição e os tipos de embriões das sementes com diferentes graus de poliembrião, ao estudo da genética da tolerância à tristeza e às diversas espécies e gêneros afins de citros, disponíveis no Banco de Germoplasma do Instituto Agrônomo, em Campinas (BORDIGNON et al., 2003 a,b, 2004; MEDINA FILHO et al.⁽⁶⁾).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Pesquisadores Jorgino Pompeu Júnior e Joaquim Teófilo Sobrinho, pelas sugestões ao trabalho, e a Silvia Luisa S. Lima, pelo auxílio na digitação.

⁽⁶⁾ MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T. Tolerância de híbridos e de clones de porta-enxertos de citros à infecção de raízes por *Phytophthora parasitica*. (Submetido para publicação)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.T. Reviewing the latest on Citrus tristeza virus. *Citrus industry*, Barthow, v.7, p.68-73, 1991.
- BALLVÉ, R.M.L.; MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R. Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of leaf petiole wing. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.20, n.4, p.697-702, 1997.
- BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Further purification and characterization of particles associated with citrus tristeza disease. *Virology*, San Diego, v.50, p.821-828, 1972.
- BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; COHEN, J. Comparison of particles characteristics and cytopathology of citrus tristeza virus with other morphologically similar viruses. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 7th, 1976, Riverside. *Proceedings...* Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1976. p.39-46.
- BAR-JOSEPH, M.; LOEBENSTEIN, G.; OREN, Y. Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6th, 1974, Richmond. *Proceedings...* Richmond: International Organization of Citrus Virologists, 1976. p.83-85.
- 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.
- BAR-JOSEPH, M.; ROISTACHER, C.N.; GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J. A review on tristeza, an ongoing threat to citriculture. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, 5th, 1981, Tokyo. *Proceedings...* Okitsu: International Society of Citriculture, 1982, v.1, p.419-423.
- 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*, Saint Paul, v.69, n.2, p.190-194, 1979.
- BAR-JOSEPH, M.; GUMPF, D.J.; DODDS, J.A.; ROSNER, A.; GINZBERG, I. A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology*, Saint Paul, v.75, p.195-198, 1985.
- BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. *Journal of Agricultural Research*, Washington, v.78, n.8, p.207-237, 1949.
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; BALLVÉ, R.M.L. Melhoramento genético de citros no Instituto Agrônomo. *Laranja*, Cordeirópolis, v.11, p.167-176, 1990.
- BORDIGNON, R. *Hibridações interespecíficas, intergenéricas, intergrupais, intersubtribais e intersubfamiliares de Citrus e gêneros relacionados*. 1995. 104f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas.

- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P. SIQUEIRA, W.J. Genetics of tolerance to the tristeza disease in citrus rootstocks. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.27, n.1, 2004. (no prelo)
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P.; SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Efeito da tristeza dos citros em caracteres vegetativos, produtivos e industriais da laranja 'Valência' enxertada em porta-enxertos híbridos segregando para tolerância. *Bragantia*, Campinas, v.62, n.2, p.207-215, 2003a.
- BORDIGNON, R.; MEDINA FILHO, H.P. SIQUEIRA, W.J.; PIO, R.M. Características da laranjeira 'Valência' sobre clones e híbridos de porta-enxertos tolerantes à tristeza. *Bragantia*, v.62, n.3, p. 381-395, 2003b.
- BOUHIDA, M.; ZEMZAMI, M.; CEVIK, B.; FEBRES, V.J.; LEE, R.F.; NOLASCO, G.; NIBLETT, C.L. Biological and molecular characterization of isolates of citrus tristeza virus from Morocco. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14th, 1998, Campinas. *Proceedings...* Campinas: International Organization of Citrus Virologists, 1998. p.33.
- 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*, Saint Paul, v.80, p.329-333, 1996.
- CAMERON, J.W.; FROST, H.B. Genetics, breeding and nucellar embryony. In: Reuther, W; Batchelor, L.D.; Webber, H.J., (Ed.). *The Citrus Industry*. Berkeley: University of California Press, 1968. v.2, p.325-370.
- CARREIRA, C. Informe preliminar sobre una enfermedad nueva comprobada en los citrus de Bella Vista (Corrientes). Buenos Aires: Ministério de Agricultura, 1933. p.275-280. (Boletín Mensual, 34)
- CARVALHO, S.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W.; SILVERIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.79-84, 1997.
- CHE, X.B.; MAWASSI, M.; BAR-JOSEPH, M. A novel class of large infectious defective RNAs of citrus tristeza virus. *Virology*, San Diego, v.298, n.1, p.133-145, 2002.
- COFFIN, R.S.; COUTTS, R.H.A. The clostero-viruses, capilloviruses and other similar viruses: a short review. *Journal of General Virology*, Reading, v.74, p.1475-1483, 1993.
- COSTA, A.S.; MÜLLER, G.W. Tristeza controlled by cross protection, a US-Brazil cooperative success. *Plant Disease*, Saint Paul, v.64, p.538-541, 1980.
- 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.
- 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.
- DESJARDINS, P.R.; WALLACE, J.M.; LANGUE, C.T.; DRAKE, R.J. The suppression of tristeza virus symptoms in Mexican lime seedlings by heat treatment. *Plant Disease Reporter*, Saint Paul, v.41, p.230, 1957.
- DICKSON, R.C.; FLOCK, R.A. Insect vectors of tristeza virus. In: WALLACE, J. M.(Ed). *Citrus Virus Disease*. Berkeley: University of California Press, 1959. 243p.
- 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.
- GARNSEY, S.M.; BARRET, H.C.; HUTCHISON, O.J. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica*, Pretoria, v.19, p.187-191, 1987.
- GMITTER JR., F.G.; XIAO, S.Y.; HUANG, S.; HU, X.L.; GARNSEY, S.M.; DENG, 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.
- GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E.; GARNSEY, S.M. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, Saint Paul, v.68, p.553-559, 1978.
- GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G. A new survey method for citrus tristeza virus disease assesment. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14th, 1998, Campinas. *Proceedings...* Campinas: International Organization of Citrus Virologists, 1998. p.50.
- GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; BORBÓN, J. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology*, Saint Paul, v.88, n.7, p.621-636, 1998.
- GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K. Present distribution of citrus tristeza virus and its vector, the brown citrus aphid, and the potential for further spread. *Citrus Industry*, Bartow, v.3, p 52-63, 1994.
- 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.
- 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.; 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.
- 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. 1964.
- KITAJIMA, E.W.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Electron microscopical investigations of tristeza. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3th, 1965, Gainesville. *Proceedings...* Gainesville: International Organization of Citrus Virologists, 1965. p.1-9.

- 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.
- KONG, P.; RUBIO, L.; POLEK, M.; FALK, B.W. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes*, Dordrecht, v.21, n.3, p.139-145. 2000.
- 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.; BAKER, P.S.; ROCHA-PEÑA, M.A. *The Citrus Tristeza Virus* (CTV). Ascot: International Institute of Biological Control, 1994. 145p.
- 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.; GARNSEY, S.M.; BRLANSKY, R.H.; GOHEEN, A.C. A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem-limited viruses. *Phytopathology*, Saint Paul, v.77, p.543-549. 1987.
- LEE, R.F.; ROISTACHER, C.N.; NIBLETT, C.L.; LASTRA, R.; ROCHA-PEÑA, M.; GARNSEY, S.M.; YOKOMI, R.K.; GUMPF, D.G.; DODDS, J.A. Presence of *Toxoptera citricidus* in Central America: a threat to citrus in Florida and the United States. *Citrus Industry*, Bartow, v.6, p.13-63. 1992.
- LI, K.B.; YONG, S.; WU, R.J.; XU, J.; K.E, C. The purification of citrus tristeza virus. *Virologia Sinica*, Beijing, v.5, n.3, p.312-316, 1990.
- 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, n.2, p.191-194, 1997.
- MANJUNATH, K.L.; PAPPU, H.R.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L.; CIVEROLO, E. Studies on the protein genes of four Indian isolates of citrus tristeza closterovirus: cloning, sequencing and expression. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12th, 1994, Riverside. *Proceedings...* Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1994. p. 20-27.
- MAWASSI, M.; KARASEV, A.V.; MIETKIEWSKA, E.; GAFNY, R.; LEE, R.F.; DAWSON, W.O.; BAR-JOSEPH, M. Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. *Virology*, San Diego, v.208, n.1, p.383-387, 1995.
- MEDINA FILHO, H.P.; BALLVÉ, R.M.L.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JÚNIOR, J. Isoenzimas na identificação precoce de híbridos e clones nucleares no melhoramento de citros. *Bragantia*, Campinas, v.50, n.1, p.57-76, 1991.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; BALLVÉ, R.M.L.; SIQUEIRA, W.J. Genetic proof on the occurrence of mono and dizygotic hybrids twins citrus rootstocks. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v.16, p.703-711, 1993.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; FEICHTENBERGER, E.; CARVALHO, M.R.T.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, p.534-540, 2003a.
- MEDINA FILHO, H.P.; BORDIGNON, R.; SIQUEIRA, W.J.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Segregações gaméticas de locos isoenzímicos em porta-enxertos de citros e suas contribuições alélicas na formação de híbridos. *Bragantia*, Campinas, v.62, n.3, p.357-367, 2003b.
- MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença tristeza dos citros. *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, 1997a.
- MESTRE, P.F.; ASINS, M.I.; PINA, J.A.; NAVARRO, L. Efficient search for new resistant genotypes to the citrus tristeza closterovirus in the orange subfamily *Aurantioideae*. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.95, p.1282-1288, 1997b.
- 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.
- MOREIRA, S. Observação sobre a tristeza dos citros ou podridão das radículas. *O Biológico*, São Paulo, v.8, p.269-272. 1942.
- MOREIRA, S.; ROESSING, C. Behavior of 77 tristeza tolerant rootstocks with old and nucellar clones of Barão orange scions. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3th, 1965, Gainesville. *Proceedings...* Gainesville: International Organization of Citrus Virologists, 1965. p.299-313.
- MOREIRA, S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. Conhecimentos atuais sobre a tristeza dos citros. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v.24, n.11-12, p.335-345, 1949.
- MÜLLER, G.W. A tristeza dos citros. *Summa Phytopathologica*, Piracicaba, v.2, p.245-263, 1976.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica*, Pretoria, v.19, n.2, p.197-198, 1987.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; POMPEU JÚNIOR, J. Importância do porta-enxerto em relação à tristeza e outras moléstias dos citros no Brasil. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS, 1., 1990, Bebedouro. *Anais...* Jaboticabal: Funep, 1990. p.223-231.
- 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.

- NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTI, M.R.; GOWDA, S.; HILF, M.E.; GARNSEY, S.M.; DAWSON, W.O. Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology*, San Diego, v.228, p.92-97, 1997.
- 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*, Amsterdam, v.71, n.1-2, p.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.
- NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; GUMPF, D.J.; LEE, R.F.; GARNSEY, S.M. Production of polyclonal antisera to the coat protein to citrus tristeza virus expressed in *E. coli*: application for immunodiagnosis. *Phytopathology*, Saint Paul, v.85, p.691-694, 1995.
- NIKOLAEVA, O.V.; KARASEV, A.V.; POWELL, C.A.; GUMPF, D.J.; GARNSEY, S.M.; LEE, R.F. Mapping of epitopes for citrus tristeza virus – specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, Saint Paul, v.86, p.974-979, 1996.
- 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.
- PAPPU, S.S.; FEBRES, V.J.; PAPPU, H.R.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Research*, Amsterdam, v.47, p.51-57, 1997.
- PERMAR, T.A.; GARNSEY, S.M. Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of citrus tristeza virus. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 11th, 1991, Riverside. *Proceedings...* Riverside: International Organization of Citrus Virologists, 1991. p.56-59.
- PRICE, W.C. Flexuous rods in phloem cell of lime plants infected with citrus tristeza virus. *Virology*, San Diego, v.29, p.285-294, 1966.
- 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.
- 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.; GUMPF, D.G.; DODDS, J.A.; LEE, R.F. The threat of “the citrus-killer”. *Citrograph*, Fresno, v. 6, n.10, p.4-22, 1991.
- 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.
- SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of Citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathology Oxford*, v.51, n.3, p.257-265, 2002.
- 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*, San Diego, v.280, p.87-96, 2001.
- SCHNEIDER, H.; BITANCOURT, A.A.; ROSSETTI, V. Similarities in the pathological anatomy of quick-decline and tristeza disease orange trees. *Phytopathology*, Saint Paul, v.37, p.845-846, 1947.
- SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; KITAJIMA, E.W. Partial purification of Tristeza. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3th, 1965, Gainesville. *Proceedings...* Gainesville: International Organization of Citrus Virologists, 1965. p.10-13.
- TANAKA, T. Species problem in citrus. A critical study of wild and cultivated units of citrus, based upon field studies in their native homes. (Revisio aurantiacearum IX). Ueno, Tokyo: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 152p.
- TARGON, M. L. P. N.; NIKOLAEVA, O.; MANJUNATH, K. L.; LEE, R. F.; MÜLLER, G. W.; MACHADO, M. A. Coat protein gene of a brazilian isolate of the citrus tristeza virus: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.22, n.1, p.99-102, 1997.
- TOXOPEUS, H.J. Stock-action incompatibility in citrus and its cause. *Journal of Pomology and Horticultural Science*, Ashford, v.14, p.360-364, 1937
- 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.
- WEBBER, H.J. A comparative study of the citrus industry of South Africa. Pretoria: South Africa Department of Agriculture, 1925. 160p. (Bulletin, 6)
- YANG, G.A.; CHE, X.B.; GOFMAN, R.; BEN-SHALOM, Y.; PIESTUN, D.; GAFNY, R.; MAWASSI, M.; BAR-JOSEPH, M. D-RNA molecules associated with sub isolates of the VT strain of citrus tristeza virus which induce different seedling-yellowings reactions. *Virus Genes*, Dordrecht, v.19, n.1, p.5-13, 1999.
- YOSHIDA, T. Inheritance of susceptibility to citrus tristeza virus in trifoliata orange (*Poncirus trifoliata*). *Bulletin of the Fruit Tree Research Station (Serie B)*, Okitsu, v.12, p.17-23, 1985.

YOSHIDA, T. Inheritance of immunity to citrus tristeza virus of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station (Serie B)*, Okitsu, v.25, p.33-43, 1993.

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.

YOSHIDA, T.; SHICHIGO, T.; UENO, I.; KIHARA, T.; YAMADA, Y.; HIRAI, M.; YAMADA, S.; IEKI, H.; KURAMOTO, T. Survey for resistance of citrus cultivars and hybrid seedlings to citrus tristeza virus (CTV). *Bulletin of the Fruit Tree Research Station (Serie B)*, Okitsu, v.10, p.51-68, 1983.