

ESTABILIDADE DO COMPLEXO PÊRA IAC DO *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EM QUATRO CULTIVARES DE LARANJA DOCE

FRANCISCA ALVES DOS SANTOS^{1,2}, SÉRGIO ALVES CARVALHO^{1,3},
ALESSANDRA ALVES DE SOUZA^{1,3} e MARCOS ANTÔNIO MACHADO^{1,3}

RESUMO

O *Citrus tristeza virus* (CTV) é um dos mais importantes vírus que atacam a cultura dos citros, ocorrendo nas plantas como um complexo de haplótipos geneticamente relacionados, podendo ou não desenvolver sintomas de tristeza dos citros, em função da suscetibilidade da variedade ou cultivar e condições ambientais. Avaliou-se, neste trabalho, a estabilidade do complexo fraco e protetivo do CTV presente na laranja Pêra IAC (PIAC) em função da cultivar, do ambiente e da época do ano, utilizando-se a técnica de SSCP (polimorfismo da conformação de fita simples do DNA) do gene da capa protéica do vírus. Plantas de quatro cultivares de laranjas doces [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] Pêra IAC, Pêra IAC 2000, Pêra Olímpia e Hamlin, infectadas com o complexo PIAC, foram mantidas em condições de campo e de telado sob proteção de afídeos. A estabilidade do complexo foi avaliada na primavera, no verão, no outono e no inverno, utilizando-se como controle o padrão SSCP original do PIAC. Mesmo sob diferentes condições climáticas e exposição às inoculações de novos variantes por afídeos vetores nas diferentes épocas do ano, não houve alteração no padrão SSCP do complexo PIAC na laranja Pêra IAC, comprovando a estabilidade do isolado e sua aplicabilidade em programas de pré-imunização para essa cultivar. Nas demais, ocorreram variações em relação ao padrão original, confirmando a capacidade de alteração de composição do complexo CTV em algumas variedades ou mesmo clones.

Termos de indexação: Citros, CTV, proteção cruzada, haplótipos, RT-PCR, SSCP.

¹ Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”- Instituto Agronômico de Campinas, Caixa Postal 4, 13490-970 Cordeirópolis (SP).

² Bolsista AT do CNPq. E-mail: fssantos@centrodecitricultura.br

³ Bolsista Produtividade do CNPq.

SUMMARY

STABILITY OF THE PERA IAC *CITRUS TRISTEZA VIRUS* COMPLEX IN FOUR SWEET ORANGE CULTIVARS

Citrus tristeza virus (CTV) is a major citrus pathogen occurring as a population of genetically related variants in the plant, showing or not symptoms of tristeza disease, according to the varieties or cultivars as well as the environmental conditions. The objective of this investigation was to evaluate the stability of the PIAC (Pera IAC) CTV isolate, through SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) of CTV coat protein gene, during the four seasons throughout the year, in plants maintained in field and under screen conditions. Plants of Pera IAC, Pera GS 2000, Pera Olimpia and Hamlin, sweet oranges [*Citrus sinensis* (L.) Osb.], infected with the protective PIAC isolate and kept under screen and field conditions, were sampled during each season and used in SSCP of CTV coat protein gene. Plants of Pera IAC with the original protective isolate maintained in greenhouse were used as control. Regardless of the climatic conditions and constant exposition to inoculations of new variants by aphid vectors throughout the year, only a few variations were observed in the SSCP profile of the protective PIAC isolate for Pera IAC, demonstrating its stability and applicability for the cross protection of this cultivar. On another hand, for the remaining varieties, alterations were found in the SSCP profile of the original CTV protective isolate, suggesting the specificity of some variants for these hosts.

Index terms: CTV, Cross protection, haplotypes, RT-PCR, SSCP.

1. INTRODUÇÃO

Citrus tristeza virus (CTV) infecta, praticamente, todas as espécies e híbridos de citros com gêneros afins (MÜLLER & COSTA, 1993). O vírus normalmente ocorre na planta como uma população de variantes relacionados geneticamente ou haplótipos (AYLLÓN et al., 1999), podendo ou não desenvolver sintomas de tristeza em função da combinação copa/porta-enxerto e da severidade do complexo viral. Aparentemente, também existe um forte componente ambiental, particularmente da temperatura, afetando a

composição do complexo (DODS et al., 1987; BAR-JOSEPH et al., 1989). A interação entre estss fatores pode resultar nas diferentes formas de expressão da tristeza dos citros, como o declínio rápido de plantas enxertadas sobre laranja Azeda (*Citrus aurantium* L.), o amarelecimento de plântulas dessa laranja (“seedling yellows”), caneluras (“stem pitting”) em algumas variedades copa e em porta-enxertos tolerantes à tristeza comum, como o limão Cravo (*C. limonia* Osb.) quando infectado com o complexo severo de tristeza “Capão Bonito” (MÜLLER et al., 2005).

Assim como para outras viroses vegetais (GARCIA-ARENAL et al., 2001), estudos têm mostrado que tanto o hospedeiro quanto algumas condições ambientes podem influenciar a composição da população do complexo CTV dentro da planta (SOUZA et al., 2000). De acordo com AYLLÓN et al. (1999), a seleção afeta a distribuição de haplótipos, de modo que a adaptação a um novo hospedeiro pode ser tão ou mais importante do que a origem geográfica do complexo. Desse modo, a variação na composição da população de CTV, após mudança de hospedeiro ou transmissão por afídeos, pode explicar, em parte, a ampla variabilidade biológica observada entre os complexos do vírus.

Por ser o CTV transmitido de modo semipersistente por diferentes espécies de afídeos [*Toxoptera citricidus* Kirk, *Aphis gossypii* Glov. e *A. spiraecola* Patch], espera-se que, em condições de campo, ocorra grande variabilidade nas populações desse vírus nas plantas. No Brasil, o vetor mais eficiente é o *T. citricidus* Kirk (MÜLLER et al., 2005), embora as três espécies possam ser encontradas naturalmente nos pomares ao longo do ano.

O controle da tristeza no Brasil foi inicialmente obtido mediante o uso de porta-enxertos tolerantes, como o limão Cravo, o que permitiu a retomada da citricultura paulista. Entretanto, para variedades copa muito sensíveis, somente o uso de porta-enxertos tolerantes não possibilita um controle eficiente. Esse é caso dos pomelos (*Citrus paradisi* Macf.), lima ácida Galego (*C. latifolia* Tanaka) e algumas variedades de laranja doce que, mesmo enxertados sobre porta-enxertos tolerantes, não apresentam desenvolvimento satisfatório. Para algumas variedades dessas espécies, a estratégia de controle é a proteção cruzada ou pré-imunização com complexos fracos e protetivos.

De particular destaque foi a recuperação da laranja Pêra para o Programa de Matrizes no Estado de São Paulo, utilizando-se, para tanto, o isolado 1743, denominado Pêra IAC ou PIAC (MÜLLER et al., 1999). Esse complexo de CTV tem sido empregado como rotina para pré-imunização de plantas matrizes de laranjeiras, tangerineiras e híbridos no programa atualmente desenvolvido no Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' (CARVALHO et al., 2001). Trabalhos de caracterização e seleção de outros complexos continuam sendo realizados para dar continuidade ao programa de pré-imunização contra novas variantes severos do vírus (ZANETTI et al., 2002; MÜLLER et al., 2005; CORAZZA NUNES et al., 2006).

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

O procedimento mais comum para a caracterização de complexos ou isolados do CTV é a indexação biológica, utilizando-se plantas indicadoras. No entanto, esse processo, além de caro e demorado, nem sempre permite uma identificação correta do complexo (BALLESTER-OLMOS et al., 1993). O emprego de várias técnicas moleculares tem contribuído muito para a caracterização de componentes do complexo CTV (SOUZA et al., 2001), sendo SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) uma das mais utilizadas (KOENIG et al., 1995; SHI et al., 1996; PALACIO & DURAN-VILA, 1999). Estudos realizados por SAMBADE et al. (2002), com isolados de diferentes regiões e severidade, sugerem que a avaliação por SSCP pode ser usada para monitorar a estabilidade da proteção cruzada. A técnica baseia-se na comparação da estrutura secundária do DNA fita simples, em função de sua seqüência primária de nucleotídeos, após desnaturação do DNA dupla fita. Variação de apenas um nucleotídeo em qualquer parte da seqüência de DNA pode ser suficiente para mudar a conformação da fita simples e, conseqüentemente, sua migração durante a eletroforese (SOUZA et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição e a estabilidade do complexo protetor PIAC em plantas de quatro cultivares de laranja doce mantidas em condições de campo e sob telado e em diferentes épocas do ano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Avaliaram-se plantas de variedades de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] cultivares Pêra IAC, Pêra IAC 2000, Pêra Olímpia e Hamlin, mantidas em condições de campo e sob telado anti-afídeos, por 10 e 8 anos, respectivamente, no Centro APTA Citros Sylvio Moreira - IAC, em Cordeirópolis (SP). Esse material foi oriundo de plantas livres de CTV por micro-enxertia e pré-imunizadas com o complexo protetor PIAC mediante enxertia. A confirmação da infecção foi feita por DAS-ELISA (CAMBRA et al., 1990) com anticorpos poli e monoclonais universais 3DF1 e 3CA5 (VELA et al., 1986). Utilizando-se quatro repetições com parcela composta de uma planta, coletaram-se folhas e brotações jovens, na primavera, no verão, no outono e no inverno, nos diferentes quadrantes da planta e compostas como uma única amostra, da qual se utilizaram 100 mg para extração dos ácidos nucléicos totais, segundo MANJUNATH et al. (1993).

Empregaram-se como controle plantas contendo o isolado original PIAC, mantidas em vaso sob condições de casa de vegetação, foram utilizadas como controle.

O ácido nucléico total foi utilizado como molde para a síntese da 1ª fita de cDNA (DNA complementar) com “random primers” e M-MLV “Reverse Transcriptase”, de acordo com as instruções da Invitrogen (www.invitrogen.com.br).

Usou-se uma alíquota do cDNA para amplificação do gene da capa protéica (GCP) com “primers” específicos: CN 119 (5'-AGATCTACCA-TGGACGACGAAACAAAG-3') e CN 120 (5'-GAATTCGCGGCCGCT-CAACGTGTGTTAAATTTCC-3'), em termociclador programado para 35 ciclos de 1 min a 94°C; 30 seg a 50°C e 1 min a 72°C. O produto da PCR foi observado sob luz ultra-violeta após eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo.

O produto das reações de amplificação foi purificado com o Kit GFX (Amersham) e utilizado em SSCP. Uma alíquota de 1 a 5 µl da solução do fragmento purificado foi misturada com igual volume de solução desnaturante (95% de formamida, 2mM de EDTA e azul de bromofenol), incubada a 95°C por 10 min e imediatamente colocada no gelo. A separação dos fragmentos foi feita por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 200 volts, por 8

horas a 25°C (SOUZA et al., 2002 a, b). O gel foi corado com prata conforme descrito por BEIDLER et al. (1982). O poliformismo de fita simples foi avaliado em função do número e da posição dos fragmentos dissociados do GCP.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de SSCP do GCP do complexo protetivo PIAC das diferentes repetições das quatro cultivares de laranjas mantidas em campo e sob telado, em diferentes épocas do ano, está representado nas Figuras 1, 2, 3 e 4. Observaram-se várias bandas em uma mesma amostra, o que indica que cada isolado é constituído por uma mistura de haplótipos do CTV. CORAZZA NUNES et al. (2006), utilizando a técnica de SSCP, também verificaram a ocorrência de misturas de haplótipos do CTV em germoplasma de pomelo (*C. paradisi* Macf.).

No presente estudo, nas plantas da cultivar Pêra IAC, o padrão de SSCP foi similar ao do isolado original PIAC (controle) (Figura 1). Observaram-se algumas variações quanto à concentração de um ou outro componente do complexo na planta sem, entretanto, afetarem significativamente o padrão do isolado original, mantendo a maioria dos haplótipos predominantes (indicado por seta, Figura 1). Esses resultados demonstram que, mesmo após longo período de manutenção das plantas em campo, o complexo protetor PIAC manteve-se estável.

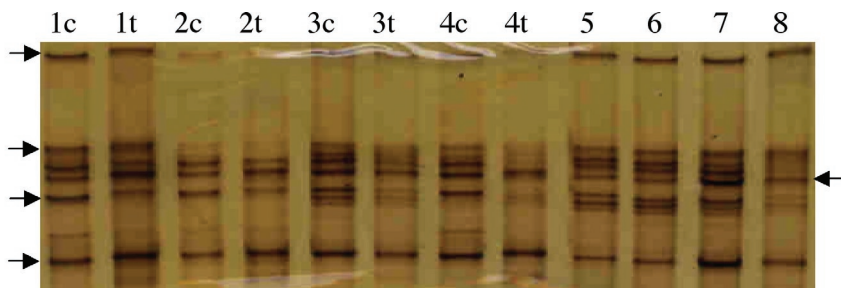


Figura 1. Padrão de SSCP do gene da capa protéica do isolado protetivo de CTV em variedade ‘Pêra IAC’, avaliados no outono (1), inverno (2), primavera (3) e verão (4) sob condições de telado (t) e campo (c). Canaletas de 5 a 8 correspondem ao padrão de SSCP do isolado protetivo original em condições de telado, nas mesmas épocas do ano.

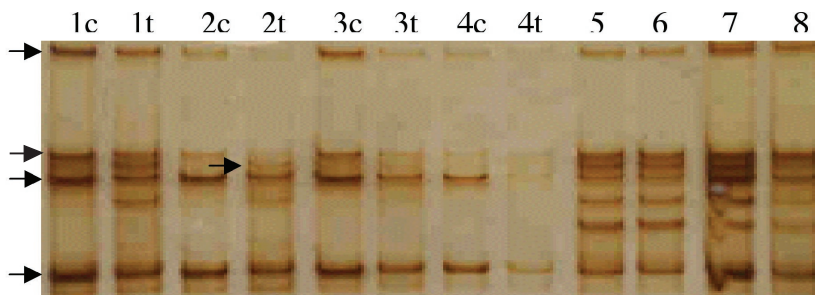


Figura 2. Padrão de SSCP do gene da capa proteica do complexo protetivo do CTV em laranja ‘Pêra IAC 2000’, avaliados no outono (1), inverno (2), primavera (3) e verão (4) sob condições de telado (t) e campo (c). Caneluras 5 a 8 correspondem ao padrão de SSCP do complexo projetivo original em condições de telado, nas mesmas estações do ano.

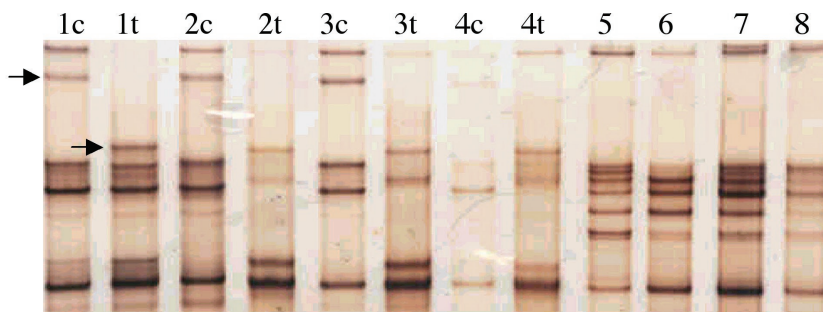


Figura 3. Padrão de SSCP do gene da capa protéica do complexo protetivo do CTV em ‘Pêra Olímpia’, avaliados no outono (1), inverno (2), primavera (3) e verão (4) sob condições de telado (t) e campo (c). Caneluras 5 a 8 correspondem ao padrão de SSCP do isolado protetivo original em condições de telado, nas mesmas estações do ano.

Para o complexo do CTV presente em laranja Pêra IAC 2000 observa-se uniformidade nos padrões de SSCP do GCP, tanto na planta mantida em telado (Figura 2: 1t, 2t, 3t e 4t) quanto no campo (Figura 2: 1c, 2c, 3c e 4c), em todas as épocas do ano avaliadas. Para essa cultivar, os padrões foram similares nos dois ambientes, mantendo, aparentemente, o mesmo número de haplótipos, apesar de existir variação e/ou distribuição de bandas (Figura 2, indicados por seta). Os padrões de SSCP para o GCP nessas plantas apresentaram-se distintos do isolado protetivo PIAC (controle)

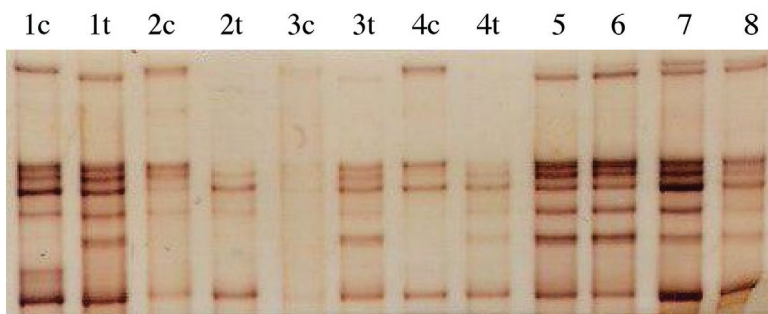


Figura 4. Padrão de SSCP do gene da capa proteica do complexo protetivo de CTV em laranja ‘Hamlin’ avaliados no outono (1), inverno (2), primavera (3) e verão (4) sob condições de telado (t) e campo (c). Canaletas 5 a 8 correspondem ao padrão de SSCP do isolado protetivo original nas em condições de telado nas mesmas estações do ano.

originalmente inoculado (Figura 2: 5, 6, 7 e 8), indicando que, durante a transmissão, possa ter ocorrido, provavelmente, uma seleção e posterior estabilização de determinados haplótipos do CTV na cultivar Pêra IAC 2000. Esses resultados confirmam a hipótese de especificidade entre variantes no complexo CTV e a variedade/espécie hospedeira (SOUZA et al., 2001). No presente estudo, mesmo com a alteração do padrão SSCP em relação ao originalmente inoculado, não se observaram sintomas de tristeza em plantas de laranja Pêra IAC 2000, considerado um clone tolerante ao vírus (TEÓFILO SOBRINHO et al., 2001).

Em todas as épocas avaliadas, o complexo CTV presente nas plantas da cultivar Pêra Olímpia apresentou padrão de SSCP diferente do complexo protetor original, tanto nas plantas provenientes de telado quanto nas de campo (Figura 3). Nas quatro estações do ano, apesar de similar entre plantas do mesmo ambiente, o padrão nas plantas mantidas em telado foi distinto do obtido nas avaliações das plantas em campo (Figura 3, indicado por seta). Assim como se observou no complexo presente na Pêra IAC 2000, as variações no complexo PIAC originalmente inoculados em Pêra Olímpia, e sua estabilidade em laranja Pêra IAC, sugerem que, para programas de pré-imunização, a seleção de complexos seja direcionada para hospedeiro

específico, devendo-se, portanto, considerar a variedade ou mesmo o clone ou cultivar. Assim como se observou em Pêra IAC 2000, a alteração no padrão SSCP, aparentemente não alterou a patogenicidade do vírus na Pêra Olímpia, cujo clone microenxertado pré-imunizado apresentou crescimento, caneluras e tamanho de frutos semelhantes ao clone original do BAG Citros - IAC Pêra Olímpia 1515, relatado por FIGUEIREDO et al. (1993) como de reação moderada ao CTV.

Na cultivar Hamlin, o complexo CTV avaliado nas plantas de telado e de campo, nas diferentes estações do ano, apresentou padrão de SSCP mais próximo ao do protetor original PIAC (Figura 4). Pequenas variações em relação ao isolado original são devidas, possivelmente, à prevalência de um ou de outro componente do complexo do CTV nas plantas de Hamlin (Figura 4), sem provocar também sintomas de tristeza, doença para a qual não há relatos de problemas com a cultivar.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que o complexo protetor PIAC foi estável nas diferentes estações do ano, tanto nas condições de campo quanto nas de telado para a laranja Pêra IAC, variedade na qual foi selecionado e cuja combinação apresentou sucesso em exploração comercial por mais de três décadas (MÜLLER et al., 1988). Detectaram-se pequenas alterações, porém a maioria dos haplótipos presentes nesse isolado não foi alterada, correlacionando com os resultados observados para a planta, como crescimento normal e ausência de caneluras fortes, indicando a manutenção de sua capacidade protetiva.

Observaram-se mudanças do padrão SSCP do gene da capa protéica do complexo protetivo original do CTV nas variedades Pêra IAC 2000, Pêra Olímpia e Hamlin, sugerindo haver especificidade de alguns variantes do vírus para tais hospedeiros. Entretanto, ao contrário do trabalho de SAMBADE et al. (2002), no qual a virulência do complexo coincidiu com as diferenças nos padrões de SSCP, nas condições do presente estudo as alterações no complexo originalmente inoculado não foram correlacionadas com ocorrências de sintomas nas plantas de Pêra Olímpia, clone considerado também sensível ao CTV (FIGUEIREDO et al., 1993). Padrões SSCP semelhantes entre plantas com caneluras fortes e entre plantas com sintomas fracos ou

moderados de caneluras foram observados em pomelo por CORAZZA NUNES et al. (2006), ressaltando a necessidade de maiores estudos nas avaliações da correlação de padrões moleculares com sintomas.

Apesar das variações nos padrões SSCP, considerando que sintomas de caneluras em ramos podem ser observados apenas em alguns clones do grupo das Pêra (MÜLLER et al., 2005), o complexo PIAC continua sendo o mais indicado em programas de pré-imunização de variedades de laranjas doces. Apesar de não haver ganhos diretos com seu emprego em variedades tolerantes ao vírus, essa estratégia, conforme os objetivos do programa desenvolvido no Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira' (CARVALHO et al., 2001), garante a difusão e eventual dispersão por afídeos nos futuros pomares de complexos ou variantes mais estáveis e com pouco desenvolvimento de sintomas de tristeza, contribuindo, assim, para a redução da pressão por complexos severos de CTV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J. & MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of *Citrus Tristeza Virus* is altered after host change or aphid transmission. **Virology**, Orlando, v.255, p.32-39, 1999.
- BALLESTER-OLMOS, J.F.; PINA, J.A.; CARBONELL, E.; MORENO, P.; MENDOZA, A.H.; CAMBRA, M. & NAVARRO, L. Biological diversity of *citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. **Plant Pathology**, Palo Alto, v. 42, 219-229, 1993.
- BAR-JOSEPH, M.; MARCUS, R. & LEE, R F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 27, p. 291-316. 1989.
- BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R. & RILL, R.L. Ultrasentitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, New York, v.126, p.374-380, 1982.
- CAMBRA, M.; GARNSEY, S. M.; PERMAR, T.A.; HENDERSON, C.T. & GUMPH, D.J.; Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. **Phytopathology**, v.80, 10-34, 1990.
- CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; MÜLLER, G.W. & COLETTA-FILHO, H. 2001. Produção de borbulha básica para formação de mudas de citros sadias em São Paulo. *Laranja, Cordeirópolis*, v.22, n.1, p.185-201, 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.
- DODDS, J.A.; JORDAN, R.L.; ROISTACHER, C.N. & JARUPATI, T. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on double-stranded RNA analysis of *Citrus tristeza virus*. **Phytopathology**, v.77, p.442-447, 1987.
- FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JÚNIOR, J.; PIO, R.M.; MÜLLER, G.W. & TEÓFILO SOBRINHO, J.T. Estudos recentes sobre a ocorrência de caneluras da tristeza em variedades de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.14, n.1, p.329-339, 1993.
- GARCIA-ARENAL, F.; FRAILE, A. & MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, v.39, p.157-186, 2001.
- KOENIG, R.; LÜDDECKE, P. & HAEBERLÉ, A.M. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphism of immunocapture RT-PCR products. **Journal of General Virology**, Reading, v.76, p.2051-2055, 1995.
- MANJUNATH, K.L.; PAPPU, H.R.; LEE, R.F.; NIBLETT, C.L. & CIVEROLO, E. Studies on the coat protein gene of four Indian isolates of citrus tristeza colsterovirus: cloning, sequencing and expression. In: **Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.**, p.20-27, 1993.
- MÜLLER, G.W. & COSTA A.S. Doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: ROSSETI V.; MÜLLER G.W. & COSTA A.S. (Eds.). **Citricultura Brasileira**. Campinas: Fundação Cargill. p.55-84, 1993.
- MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; CASTRO, J.L. & GUIRADO, N. Results from preimmunization tests to control the Capão Bonito strain of tristeza. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10, 1986. Valência. **Proceedings**..., Riverside: IOC, Univ. Florida Press, 1988. p.82-85
- MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A. & RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JR. D. et al. **Citros**. Campinas, Instituto Agrônomo/Fundag. cap. 19, p. 567-604, 2005.
- MÜLLER, G. W. ; TARGON, M. L. P. N. & MACHADO, M. A. Trinta anos de uso do clone pré-imunizado 'Pêra IAC' na citricultura paulista. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 20, n. 2, p. 399-408, 1999.
- PALACIO, A. & DURAN-VILA, N. Single-strand conformation polymorphism(SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. **Journal of Virology Methods**, Amsterdam, v. 77, p. 27-36, 1999.

- SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; MÜLLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J. & MORENO, P. Comparison of viral RNA population of pathogenically distinct isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, v.51, p.257-265, 2002.
- SHI, N.; CHEN, J.; WILSON, T.M.A.; MACFARLANE, S.A.; ANTONIW, J.F. & ADMS, M.J. Single-strand conformation polymorphism analysis of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. **Virus Research**, v. 44, p. 1-9, 1996.
- SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D. & MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene capsídeo do *Citrus tristeza virus* em plantas pré-imunizadas em laranja Pêra. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.154-159. 2002a.
- SOUZA, A. A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N. & MACHADO, M.A. Evaluation of changes which occurred in a mild protective *Citrus tristeza virus* isolat 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. Campinas. **Proceedings....** Lake Alfred IOCV, p. 131-135, 2000.
- SOUZA, A.; MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA M.A. & MACHADO, M.A. Stability of the mild protectiv 'PIAC' isolate of *Citrus tristeza virus* In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 15, Paphus, 2003. **Proceedings....** IOCV, Riverside, p.117-130, 2002b.
- SOUZA, A. A.; TARGON, M.L.P.N.; SANTOS, F.A.; MÜLLER, G.W. & MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n. 2, p.503-516, 2001.
- TEÓFILO SOBRINHO, J.; MÜLLER, G.W.; FIGUEIREDO, J.O.; LARANJEIRA, F.F. & SALIBE, A..A. Laranja 'Pêra IAC 2000'. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.469-494, 2001.
- VELA, C.; CAMBRA, M.; CORTÉS, E.; PÉREZ SAN ROMÁN, C.; SAINZ, A.; MORENO, P. & MIGUET, J. G. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. **Journal General Virology**, v. 67, p.91-96, 1986.
- ZANETTI, M.; CARVALHO, S.A. & MÜLLER, G.W. Avaliação Inicial da laranjeira 'Pêra' e da limeira ácida 'Galego' nos porta enxertos 'Cravo' e 'Gou Tou' inoculados com diferentes isolados do vírus da tristeza dos citros. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, Belém, 2002. **Anais....** SBF, Belém, 2002. (1 cd room–resumo expandido 180).