

A PREMUNIZAÇÃO NO CONTROLE DA TRISTEZA DOS CITROS

ALESSANDRA ALVES DE SOUZA¹ e GERD WALTER MÜLLER²

RESUMO

A tristeza dos citros, doença causada pelo *Citrus tristeza virus* (CTV), dizimou a citricultura paulista na década de 40 do século passado. Atualmente, a citricultura paulista só é possível em vista da utilização de porta-enxerto tolerante ao CTV. Contudo, seus variantes severos são capazes de induzir sintomas de tristeza mesmo quando o porta-enxerto é tolerante. Nesse caso, outra medida de controle adotada é a premunização: consiste na seleção de variantes fracos do CTV que, quando inoculados nas plantas, são capazes de impedir a colonização dos variantes severos. Apesar de a premunização ser um termo bastante conhecido entre os membros da cadeia citrícola, muitos ignoram as etapas para seleção de isolados fracos do CTV com potencial protetivo. Por isso, este artigo técnico visa abordar as etapas do programa de premunização, assim como seu funcionamento diante dos casos onde houve ocorrência de variantes severos.

Termos de indexação: *Citrus tristeza virus*, CTV, isolado fraco, isolado severo.

¹ Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. Rod. Anhanguera km 158, Caixa Postal 04, 13490-000 Cordeirópolis (SP). E-mail: alessandra@centrodecitricultura.br

² Pesquisador visitante CNPq/Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada. Av. Colombo, 5.790, 87020-900 Maringá (PR).

SUMMARY

THE PREMUNIZATION TO CONTROL CITRUS TRISTEZA

The *Citrus tristeza virus* (CTV) destroyed the citrus industry in São Paulo State, Brazil, in the 40's of the last century. Renewal of the orchards was possible due to the use of tristeza tolerant rootstocks. However, severe CTV variants may induce tristeza symptoms on some scions even on CTV tolerant rootstocks. In this case, the control measure used is the premunization (cross protection), which consists in the selection of mild CTV variants that, once inoculated in a plant, avoid the display of symptoms caused by a second usual severe variant that is inoculated later. Although premunization is a well known term among the members of the citrus industry, many do not know the complete process. This work aims to describe the different steps of a premunization program, starting from the selection of the mild isolates through its use on population level.

Index terms: Citrus tristeza virus, CTV, mild isolate, severe isolate.

1. INTRODUÇÃO

A tristeza dos citros é causada por um vírus denominado *Citrus tristeza virus* (CTV). Este existe como uma mistura de variantes, sendo alguns mais ou menos severos, ou seja, capazes ou não de induzir sintomas de tristeza, dependendo da combinação copa/porta-enxerto. O conjunto de todos os variantes do vírus em uma planta é chamado de isolado. De acordo com REZENDE & MÜLLER (1995), o termo isolado refere-se aos vírus obtidos de uma planta infectada, não denotando pureza do vírus envolvido. Hoje, variantes do CTV estão presentes em todas as plantas de citros, sendo, desse modo, considerado endêmico na citricultura brasileira. A disseminação do CTV ocorreu, e ocorre devido à alta eficiência de transmissão pelo inseto vetor, o pulgão preto *Toxoptera citricida* K., cujo controle é impossível nas condições climáticas brasileiras e mesmo mundial.

A tristeza dos citros dizimou a citricultura paulista na década de 40 do século passado, quando as variedades-copas eram enxertadas sobre laranja

‘Azeda’ (*Citrus aurantium* Osb.) (MÜLLER & COSTA, 1991). A recuperação da citricultura nacional foi possível devido, principalmente, à utilização de porta-enxertos considerados tolerantes (infectados, mas não afetados pelo CTV), como o limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Essa medida funcionou satisfatoriamente para grande número de copas comerciais, como as laranjas doces Hamlin [*C. sinensis* (L.) Osbeck], Valência (*C. sinensis*), Natal (*C. sinensis*) e tangerinas de maneira geral, que têm tecidos tolerantes ao vírus. Entretanto, alguns tipos de citros como a laranja Pêra (*C. sinensis*), a lima ácida Galego [*C. aurantiifolia* (Christ.) Swingle], pomelos e alguns de menor valor comercial, apresentavam problemas devidos à tristeza, mesmo quando enxertados em porta-enxertos tolerantes (MÜLLER & COSTA, 1991). Esse fato ocorria sempre que a copa era do tipo que permitia multiplicação do vírus. Nesses casos, os sintomas se caracterizam, segundo MÜLLER et al., 2005, por:

- Reduzido crescimento da planta (ananicamento);
- Depressões no lenho de ramos, galhos e troncos de alguns dos citros acima mencionados sobre qualquer porta-enxerto, sendo os sintomas mais acentuados no limão Cravo;
- Folhas de tamanho reduzido aparentando deficiência de Zn, Mn e outros micronutrientes;
- Formação de frutos miúdos, de conformação defeituosa (coquinhos) com albedo espesso, elevada acidez e baixo teor de suco.

Tornou-se, então, necessário desenvolver um método de controle para essas variedades-copas de grande importância econômica.

A abordagem mais promissora para solucionar o problema de controle da tristeza em copas intolerantes foi a baseada na premunização, isto é, a inoculação de copas sadias com isolados fracos e que oferecessem proteção em campo à superinfecção natural por isolados severos. Os resultados foram altamente positivos, pois, nas regiões Centro e Norte do Estado de São Paulo, o controle dos danos induzidos pelo vírus da tristeza em laranja Pêra foi obtido mediante o uso do clone premunizado, denominado Pêra IAC, que assegurou, e vem assegurando, um bom efeito protetivo e estabilidade duradoura ao longo de mais de trinta e cinco anos (MÜLLER et al., 2005).

Apesar de a tristeza estar, na maioria dos casos, satisfatoriamente controlada em São Paulo e em outros Estados, alguns focos de isolados

fortes do vírus continuam a ser verificados em vários municípios paulistas, notadamente Casa Branca, Bofete, Araraquara (SOUZA et al., 2002a) e Conchal (MÜLLER, 2005, comunicação pessoal). E também nos Estados da Bahia (SANTOS FILHO & SILVA, 1991), Minas Gerais (TARGON et al., 2003) e Paraná (RÉ, 2004). Pelo exposto, infere-se a necessidade de continuar obtendo isolados fracos protetivos do CTV, para regiões geográficas bem definidas, o que, por via de regra, demanda anos de estudos continuados. Assim, este artigo técnico tem por objetivo abordar as etapas do programa de premunização, bem como tentar explicar o funcionamento desse processo frente aos variantes severos do CTV. Para uma abordagem mais científica consultar REZENDE & MÜLLER (1995).

2. PREMUNIZAÇÃO

A premunização consiste em promover a infecção de uma planta com um isolado fraco do vírus que venha a oferecer proteção contra formas severas, levando, dessa maneira, a um controle das manifestações da moléstia (REZENDE & MÜLLER, 1995).

Um programa que visa à premunização compreende diversas etapas interligadas, a saber:

- a) obtenção das estirpes fracas do vírus, mediante seleção de plantas-elite. Essa fase é crucial e oferece maior dificuldade;
- b) teste de valor protetivo em condição de casa de vegetação;
- c) avaliação da estabilidade das estirpes fracas;
- d) experimentos-piloto no campo, a fim de confirmar o valor protetivo e do seu efeito no desenvolvimento das plantas, observando a produção e qualidade do produto;
- e) integração da técnica de premunização no sistema de manejo da cultura no campo (REZENDE & MÜLLER, 1995).

a) Obtenção das estirpes fracas do vírus por meio da seleção de plantas-elite

São chamadas plantas-elite aquelas que, mesmo localizadas em pomares contendo sintomas severos de tristeza dos citros, não apresentam

sintomas e mantêm todas as características agronômicas de uma planta produtiva (Figura 1). Supõe-se que esas plantas não apresentem sintomas por conter um isolado fraco (conjunto de variantes do CTV que não provoca a doença) que impede que os variantes severos as colonizem. Dessa forma, material vegetativo de tais planta(s) é levado para um centro de pesquisa para que sejam efetuadas as avaliações do potencial protetivo desse isolado.



Figura 1. Esquema de seleção de uma planta-elite em pomar com tristeza dos citros.

Muito importante, também, é selecionar material de plantas visualmente contaminadas com isolados fortes, que servirão para as etapas de teste de proteção. É sempre adequado procurar os isolados fracos em plantas da mesma variedade que se deseja premunizar. Exemplificando, se o objetivo é procurar isolados protetivos para laranja Pêra, deve-se procurar tal planta e não de outra variedade. Outro ponto importante é a seleção de grande número de isolados, pois apenas uns poucos preencherão as condições exigidas para serem bons protetores. Embora alguns autores considerem esse processo empírico, a seleção de plantas-elite ainda é o processo preferido para a iniciação de um programa de premunização.

b) Testes para avaliação do potencial protetivo dos isolados

b.1. Indexação biológica em plantas indicadoras

A indexação biológica é uma prática onde se utiliza uma planta indicadora (aquela que reage com sintomas específicos quando infectada com determinado vírus), ou seja, no caso do CTV, é uma planta suscetível a qualquer variante do vírus. Assim, pelo uso da planta indicadora e em função dos sintomas desenvolvidos, pode-se inferir não só a presença do vírus, mas,

também, sua severidade. As indicadoras têm que ser comprovadamente livres do vírus da tristeza. Essas são obtidas por técnicas específicas de microenxertia (PAZ & PASQUAL, 1998). É necessário que as plantas estejam livres de vírus para se ter certeza que o isolado a ser inoculado seja o único isolado viral contido na planta. Dessa forma, após realização da microenxertia, as plantas são testadas pela técnica de ELISA (“Enzyme Linked Imunosorbent Assay”), utilizando anticorpos que reconhecem qualquer isolado do CTV (MÜLLER et al., 2005). Essa técnica permite verificar se a microenxertia foi realizada com sucesso, ou seja, certificar que a planta está realmente livre de vírus.

Todo o trabalho deve ser desenvolvido em casa de vegetação à prova de afídeos. As plantas assim obtidas serão as matrizes sadias, que fornecerão o material de propagação para os futuros estudos. É recomendável que as matrizes das indicadoras em apreço sejam formadas a part ir de material com boas características agrônômicas. Inicialmente, deverão ser produzidas as mudas de porta-enxertos que serão formadas mediante a de sementeira direta em tubetes de plástico de 50 ml contendo substrato à base de vermiculita e matéria orgânica. É importante que o substrato seja estéril, livre de patógenos que possam mascarar os sintomas de CTV. Ainda, o aspecto nutricional das plantas não pode, de modo algum, ser negligenciado, uma vez que sintomas de deficiência são freqüentemente semelhantes aos induzidos pelo vírus. Normalmente, as gemas das plantas a serem indexadas devem ser enxertadas sobre o porta-enxerto, que recebe ao mesmo tempo, borbulhas da planta indicadora (dupla enxertia), ou podem ser enxertadas diretamente sobre a combinação indicadora/ porta-enxerto (MÜLLER & COSTA, 1991).

A espécie de citros comumente usada como planta indicadora para a tristeza é a lima ácida Galego, cuja característica é apresentar graus distintos de sintomas que permitem classificar os isolados como fracos ou severos. Os sintomas observados em Galego foram caracterizados por CARVALHO et al. (1997) em diferentes formas de severidade, ou seja:

1. Isolado fraco: induz leve palidez das nervuras foliares; pouco ou nenhum sintoma de caneluras. Praticamente, não há redução do porte da planta.

2. Isolado forte ou severo: induz palidez em boa parte das nervuras foliares e sintomas medianos de caneluras. Mediana redução do porte da planta.

3. Isolado muito forte ou muito severo: induz intensa palidez e suberização de nervuras e curvamento do limbo. Lenho totalmente tomado por caneluras e paralisação quase total do crescimento.

Em adição, e isso é muito importante, serão utilizadas também indicadoras do tipo de citros que se pretende premunizar, como, por exemplo, na premunização da laranja Pêra, em que ela própria terá forçosamente que ser incluída como indicadora. Isso é necessário, uma vez que existe certa especificidade dos isolados, cuja reação passaria despercebida, sem o uso da variedade a ser premunizada. O isolado da Pêra IAC induz sintomas médios de CTV em lima ácida Galego, porém, logicamente, sintomas fracos na Pêra. Dessa forma, o isolado proveniente de uma planta-élite só será considerado como um isolado potencial para premunização se apresentar sintomas típicos de isolado fraco nas plantas indicadoras empregadas. Isolados protetivos e severos do CTV já caracterizados serão utilizados como padrão de referência.

b.2. Inoculação do isolado protetivo e desafio com isolado severo

Os isolados de CTV anteriormente ensaiados e que forem considerados promissores serão, então, submetidos aos testes de proteção. Inicialmente, a inoculação do isolado candidato a protetivo nas plantas sadias é feita por enxertia de borbulhas inóculo (contendo o isolado) ou por pulgões previamente alimentados nas plantas contendo o isolado. O uso de pulgões para inoculação é mais trabalhoso, uma vez que, quando coletados no campo, devem ser inicialmente colocados em plantas livres de vírus e transferidos para outras até certificação de que estejam sadios. Por via de regra, três transferências (permanecendo os pulgões 24 horas em cada planta sadia) são suficientes, pois o CTV é um vírus de transmissão semipersistente, e o afídeo o vai perdendo quando se alimenta. Somente após a “limpeza” dos pulgões é que estes serão colocados nas plantas contendo o isolado protetivo para posterior aquisição. Normalmente, permite-se que a

colônia de pulgões se alimente por cerca de 72 horas na planta fonte de vírus, sendo, então, transferidos para as plantas que se pretende infectar. Nessas, permanecerão por outras 72 horas, para que se obtenha alta porcentagem de infecção (utilizar pelo menos 50 afídeos). Em face ao exposto, pela maior facilidade de manuseio, o uso de borbulhas contendo o isolado protetivo para inoculação nas plantas a serem desafiadas é mais comum. A vantagem de usar borbulhas é que estas levam todo o complexo protetivo do CTV para a nova planta, enquanto, no caso dos pulgões, pode acontecer de os mesmos não levarem todo o complexo, podendo haver uma perda da proteção. A desvantagem de usar borbulhas como inóculo é que se a fonte de vírus fraco estiver contaminada por algum vírus ou viróide, a nova planta será contaminada. Nesse caso, o vetor é imprescindível, sendo, conforme se mencionou, adequado utilizar grande número de insetos.

Após a inoculação, as plantas são novamente avaliadas pelo teste de ELISA, utilizando anticorpos produzidos contra a proteína do capsídeo do CTV, sendo selecionadas apenas as plantas comprovadamente infectadas pelo isolado potencialmente protetivo, as quais serão então desafiadas com o(s) isolado(s) forte(s).

Normalmente, utilizam-se dois sistemas de desafio (pulgão e união de tecido) e um tipo de porta-enxerto que, por via de regra, é o limão Cravo. O desafio mais importante é aquele realizado com os pulgões, pois reproduzirá o que acontece na natureza. Se o isolado selecionado for capaz de proteger contra o isolado forte trazido pelos insetos, o problema estará resolvido. A inoculação por união de tecidos é muito drástica, e em maior ou menor período de tempo, a proteção será rompida (MÜLLER, 2006, comunicação pessoal). No entanto, é muito importante que seja incluída no esquema, pois quanto mais tempo demorar a quebra de proteção por esse método, maior será o poder de proteção de determinado isolado fraco. Para o desafio com os afídeos, permite-se que as plantas cresçam cerca de 20 a 30 cm, quando, então, serão inoculadas por afídeos colonizados na(s) planta(s) fonte(s) do(s) isolado(s) forte(s). Para se obter uma boa infecção, realizam-se três inoculações, com cerca de 50 indivíduos por vez. É importante escolher a época do ano onde ocorrem picos de populações dos afídeos.

Os insetos são, inicialmente, colonizados em plantas sabidamente infetadas com isolados fortes do CTV, estabelecidas em casa de vegetação ou campo experimental, conforme mencionado. Para o desafio por união de tecido, permite-se que as plantas cresçam cerca de 50 cm quando, então, serão inoculadas com duas borbulhas cada uma. O Centro APTA Citros Sylvio Moreira trabalha principalmente com dois isolados severos denominados Barão B (BB) e Capão Bonito (CB), sendo ambos comprovadamente capazes de induzir sintomas de tristeza severa em laranja-doce e lima ácida Galego (CARVALHO et al., 1997; SOUZA et al. 2000 a, b).

c) Avaliação molecular quanto à estabilidade do isolado protetivo

Após o(s) desafio(s) com o(s) isolado(s), efetuam-se dois tipos de avaliação para verificar se o isolado candidato a protetivo foi capaz de atuar na planta, protegendo-a contra os efeitos da infecção pelo isolado severo. A primeira avaliação é quanto à estabilidade do isolado protetivo, ou seja, se os variantes contidos no isolado protetivo se mantiveram estáveis mesmo após a inoculação do isolado severo. Essa avaliação necessita de técnicas da biologia molecular. Uma das utilizadas é denominada Polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP), (SOUZA et al., 2002a): ela permite conhecer o padrão molecular de alguns genes dos variantes contidos tanto no isolado protetivo quanto no isolado severo antes do desafio (Figura 2a). Assim, nova avaliação é feita após o desafio para verificar se o padrão do isolado protetivo continua o mesmo ou se alguns ou todos os variantes do isolado severo foram capazes de infectar a planta premunizada (Figura 2b). Se o padrão do isolado protetivo continua o mesmo após o desafio, há indicação de que o isolado foi estável e apresenta potencial para proteger a planta diante dos isolados severos (Figura 2b, canaletas 1-2). Se o isolado protetivo não foi estável, ou seja, não foi capaz de impedir a infecção pelo isolado severo (Figura 2b, canaleta 3), este não pode ser incorporado ao programa de premunização. Algumas vezes, há uma mistura entre os padrões moleculares dos dois isolados (protetivo e severo) logo após o desafio. Neste caso, as avaliações são feitas de forma temporal para verificar a permanência ou instabilidade do isolado protetivo.

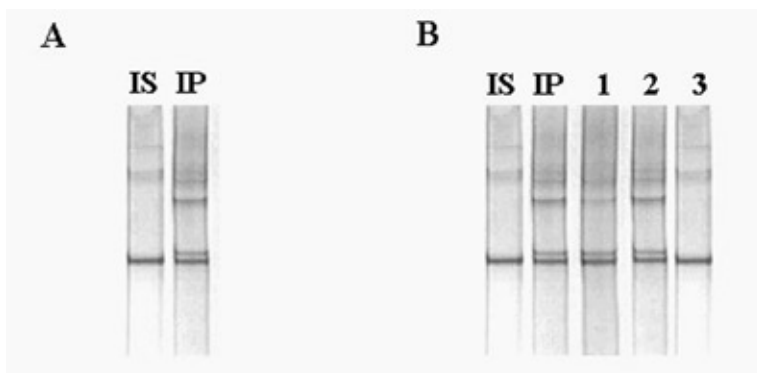


Figura 2. Padrões de SSCP do gene da capa protéica de isolados do Citrus tristeza virus A. Padrão do isolado severo (IS) e do isolado protetivo (IP) antes do desafio; B) Padrões dos isolados protetivos após desafio com isolado severo 1-2: Isolado protetivo estável após desafio: 3: Isolado protetivo instável após desafio.

d) Avaliação do valor protetivo em condições de campo

A avaliação da capacidade protetiva do isolado após o desafio consiste na observação de sintomas em plantas de laranja-doce enxertadas sobre um porta-enxerto que, por via de regra, é o limão Cravo. Dado o crescimento vigoroso das combinações em Cravo, as árvores com isolados fracos irão crescer com todo o seu potencial, enquanto aquelas com isolados severos, num tempo razoavelmente curto (3 a 5 anos), apresentarão caneluras. Quando as combinações estão em outros porta-enxertos, principalmente aqueles de crescimento mais lento, o aparecimento de caneluras é mais demorado, o que poderia mascarar os resultados.

As avaliações são feitas quanto à presença ou à ausência de caneluras, seguindo uma escala de notas de 0 a 5 (Figura 3). Para um isolado ser considerado protetivo e, portanto, ser incorporado aos programas de premunização, são toleradas notas de 0 a 2. Posteriormente, tais plantas são levadas a campo, de preferência em área com grande pressão de inóculo, para observações ante as condições naturais. Os parâmetros a serem avaliados no experimento incluem, principalmente: desenvolvimento das plantas e posterior mensuração da produção de, pelo menos, três safras. Todo este processo normalmente demora, pelo menos, 5 anos.

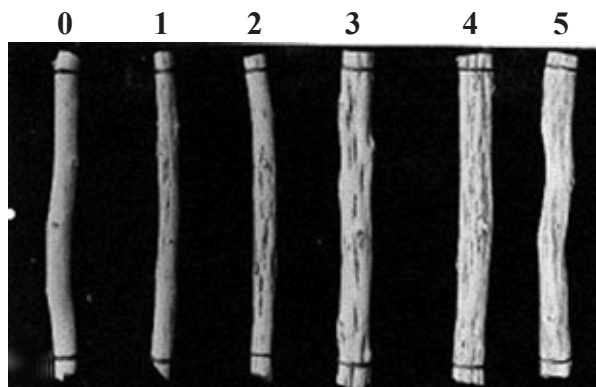
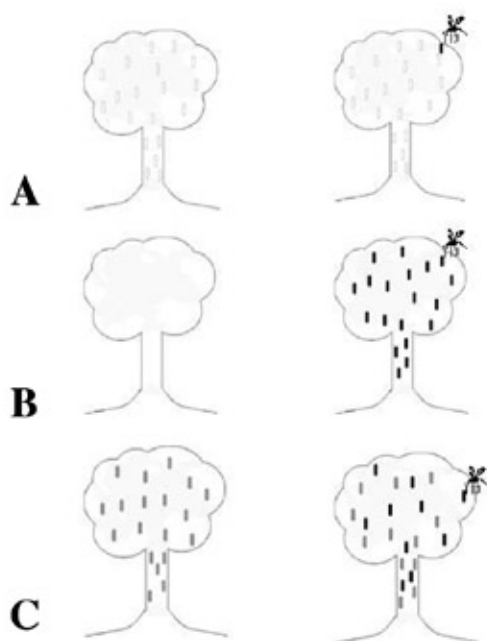


Figura 3. Escala de sintomas de caneluras (ou “stem pitting”) causados pelo *Citrus tristeza virus*. 0: ausência de sintomas; 1-2: sintomas fracos; 3: sintomas moderados; 4-5: sintomas severos. Foto: Gerd W. Müller.

Os isolados de CTV que se destacarem nos testes de proteção serão utilizados diretamente nas plantas de origem, ou transferidos para material sadio, visando à formação de matrizes premunizadas.

3. COMO FUNCIONA A PREMUNIZAÇÃO?

Ainda não é conhecido o funcionamento biológico da premunização nem por que alguns isolados são capazes ou não de induzir os sintomas de tristeza. Para conhecer algumas teorias e sugestões oferecidas na tentativa de explicar a proteção entre vírus de plantas, aconselha-se consultar REZENDE & MÜLLER (1995). Estudos utilizando o teste de ELISA e PCR quantitativo em tempo real têm demonstrado que os isolados protetivos ou fracos multiplicam-se no interior do hospedeiro mais rapidamente do que os severos (TARGON, 1997; TARGON 2006 comunicação pessoal). Esses resultados sugerem que, possivelmente, os isolados fracos apresentam melhor interação com a planta hospedeira, colonizando de forma sistêmica os vasos do floema. Essa eficiente colonização poderia, então, impedir a colonização pelo isolado severo, uma vez que a planta já se encontra totalmente infectada pelo isolado protetivo. Um esquema didático do funcionamento da premunização é apresentado na Figura 4.



- Representação dos variantes que compõe o isolado fraco protetivo
 → Representação dos variantes que compõe o isolado fraco severo
 → Representação dos variantes que compõe o isolado fraco não protetivo

Figura 4. Esquema do funcionamento da premunização. A: Planta premunizada impedindo que o isolado severo, inoculado pelo pulgão, colonize o hospedeiro. B: Planta microenxertada, sem premunização, suscetível à colonização por isolados severos. C: Planta contendo isolado fraco, porém sem potencial protetivo, suscetível à colonização por isoladas severas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da criteriosa seleção dos isolados a utilizar no programa de premunização, já foi constatada, algumas vezes, a ocorrência de quebra de proteção, ou seja, variantes severas que foram capazes de infectar

plantas contendo o isolado protetivo. Não se sabe precisar quanto tempo foi necessário para que ocorresse essa quebra de proteção, porém, como visto, a obtenção de um isolado protetivo demanda tempo. Dessa forma, há necessidade de uma busca contínua de isolados com potencial protetivo diante de novas variantes severos que, eventualmente, são detectados nos pomares citrícolas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARVALHO, S.A.; MACHADO, M.A.; BAPTISTA, C.R.; MÜLLER, G.W. & SILVÉRIO, J.L. Caracterização biológica de isolados do vírus da tristeza dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 22:79-84, 1997.
- MÜLLER, G.W. & COSTA, A.S. doenças causadas por vírus, viróides e similares em citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIÉGAS, F.; POMPEU JR. J. & AMARO, A.A. (Eds.). **Citricultura brasileira**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. v.2. p.735 -762.
- 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. p. 567-604. In: MATTOS JUNIOR, D., DE NEGRI, J.D., PIO, R.M. & POMPEU JR, J. **Citros**. Instituto Agrônomo, Fundag, 2005. 927p.
- PAZ, O.P. & PASQUAL, M. Microenxertia. Parte II, v.1 p. 147-159. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia. EMBRAPA, 1998, 509p.
- RÉ, M.L.Z. Caracterização de isolados do vírus da tristeza dos citros pela sintomatologia e análise de RFLP do gene do capsídeo. 2004. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração Proteção de Plantas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.
- REZENDE, J.A.M. & MÜLLER, G.W. Mecanismos de proteção entre os vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, v.3, p.185-226, 1995.
- SANTOS FILHO, H.P. & SILVA, M.J. Efeito da premunização sobre uma nova variante do vírus da tristeza no Estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 24., 1991, Rio de Janeiro. **Resumo...** Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 1991, p.23.

- SOUZA, A.A.; CARVALHO, S. A.; MÜLLER, G.W. & MACHADO, M.A. Characterization by SSCP of CP gene of CTV isolates in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. **Proc. of the 14th Intl Organ Citrus Virol.** p.131-135, 2000b.
- SOUZA, A.A.; MÜLLER, G.W; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D & MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do vírus da tristeza dos citros em plantas pré-imunizadas com Sintomas de Tristeza. **Summa Phytopathologica**, 28: 154-159, 2002a.
- SOUZA, A. A.; MÜLLER, G.W; TARGON, M.L.P.N. & MACHADO, M.A. Evaluation of changes occurred in mild protective CTV isolates in Pêra sweet orange trees using RFLP and SSCP of the coat protein gene. **Proc. of the 14th Intl Organ Citrus Virol.**, 2000a, p.136-139.
- SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N.; TAKITA, M.A.; MÜLLER G.W. & MACHADO, M.A. Stability of the mild protective "PIAC" isolate of Citrus tristeza virus. **Proc. of the 15th Intl Organ Citrus Virol.**, p.131-135, 2002b.
- TARGON, M.L.P.N. **Expressão e análise do gene do capsídeo de isolados do vírus da tristeza de diferentes espécies e variedades de citros.** Tese de Doutorado. 1997. Universidade Estadual de Campinas (SP), Brasil. 143p.
- TARGON, M.L.P.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. & MULLER, G. W. Ocorrência do Complexo Capão Bonito do citrus tristeza virus (CTV) em tangerina 'Poncan' sobre limão 'Cravo' em plantio comercial em Campanha (MG). **Laranja**, v.24, n.1, p.157-164, 2003.