

**ESTUDOS SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS
DA TRISTEZA DOS CITROS, E CONTROLE DA MOLÉSTIA
EM LIMÃO GALEGO POR PREMUNIZAÇÃO**

GERD WALTER MÜLLER
Engenheiro Agrônomo
SEÇÃO DE VIROLOGIA
INSTITUTO AGRONOMICO DE CAMPINAS
Bolsista do CNPq

Tese de doutoramento apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da
Universidade de São Paulo

PIRACICABA, SP - BRASIL

1972

À minha mãe
À minha esposa
dedico.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja consignar aqui, os seus sinceros agradecimentos:

ao Prof. Dr. Ferdinando Galli, orientador desta tese, pelo apoio e sugestões apresentadas;

ao Dr. Álvaro Santos Costa, pelo incentivo, discussões, sugestões e críticas estimulantes, durante o desenvolvimento do trabalho, e também pela revisão dos originais;

aos colegas da Seção de Virologia pelo apoio e colaboração prestada;

ao Dr. Carlos Roessing pela colaboração prestada;

aos funcionários da Seção de Virologia, particularmente aos Srs. Andreas Saviolli, Antônio Carlos de Godoy, Sra. Maria do Carmo Sarubbi da Costa e Srta. Ilka Maria Camargo Guimarães pela colaboração prestada;

ao Sr. Raphael Pompêu de Camargo pela execução dos desenhos;

a todos os funcionários e demais pessoas que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a execução e apresentação deste trabalho.

ESTUDOS SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DA
TRISTEZA DOS CITROS, E CONTROLE DA MOLÉSTIA EM LIMÃO
GALEGO POR PREMUNIZAÇÃO

ÍNDICE

	página
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. MATERIAL E MÉTODOS	9
A. <u>Coleta de isolados fracos do vírus da tristeza</u>	9
B. <u>Preparo das plantas testes utilizadas nos experimen-</u> <u>tos</u>	10
C. <u>Técnicas utilizadas na inoculação dos isolados do ví-</u> <u>rus da tristeza</u>	12
D. <u>Avaliação da reação à tristeza das plantas infetadas</u>	13
E. <u>Definição de alguns termos utilizados na tese</u>	14
IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS	15
A. <u>Reação de clones de limão Galego portadores de dife-</u> <u>rentes isolados do vírus da tristeza quando perpe-</u> <u>tuados em porta-enxertos intolerantes e tolerantes à</u> <u>tristeza</u>	15
B. <u>Correspondência da reação à tristeza entre propaga-</u> <u>ções de matrizes utilizadas como fontes de isolados</u> <u>fracos de limão galego e clones nucelares novos in-</u> <u>fetados com os mesmos</u>	16

C.	<u>Comparação da reação induzida por isolados fracos e fortes do vírus da tristeza em mudinhas de pé franco de limão Galego, quando inoculadas por intermédio do vetor em condições de casa de vegetação</u>	19
D.	<u>Estudo de métodos de inoculação para fins de premunização</u>	21
E.	<u>Tentativas preliminares para avaliar o valor de proteção de isolados fracos do vírus da tristeza</u> ..	25
	1. <u>Determinação através da inoculação com o vetor, utilizando plantas jovens</u>	25
	2. <u>Tentativas visando determinar o valor de proteção através da inoculação simultânea com isolados fortes do vírus</u>	27
F.	<u>Comportamento, em plantação experimental, de plantas premunizadas expostas à infecção natural, superinoculadas por intermédio de união de tecido, ou pelo inseto vetor</u>	30
	1. <u>Reação à tristeza (sintomas foliares, de caneluras e crescimento)</u>	32
	2. <u>Efeito da premunização sobre a produção dos clones de limão Galego (resultados de 5 colheitas)</u>	37
V.	COMPORTAMENTO DO MATERIAL DE LIMÃO GALEGO PREMUNIZADO EM ÁREAS CITRÍCOLAS	43
VI.	DISCUSSÃO	45
VII.	CONCLUSÕES	54
VIII.	RESUMO	56
IX.	SUMMARY	58
X.	LITERATURA CITADA	60

ESTUDOS SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE ISOLADOS DO VÍRUS DA
TRISTEZA DOS CITROS, E CONTROLE DA MOLÉSTIA EM LIMÃO
GALEGO POR PREMUNIZAÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O controle dos danos induzidos pelo vírus da tristeza na maioria das variedades comerciais de citros, após a sua introdução no País, foi conseguida através da utilização de porta-enxertos, denominados tolerantes ao vírus da tristeza. O uso desses porta-enxertos tolerantes permitiu o soerguimento da indústria citrícola. Novos pomares foram, então, formados com os principais tipos de citros que tiveram bom desenvolvimento e produção.

Observações posteriores, efetuadas em pomares comerciais no Brasil, mostraram, entretanto, que nem todos os tipos de copas comerciais desenvolviam-se satisfatoriamente em cavalos tolerantes, na presença do vírus da tristeza (Costa, 1956; Moreira, 1959; Giacometti, 1961). Nesse grupo, encontram-se o limão Galego (Citrus aurantifolia (Christm.) Swing), a laranja Pera (Citrus sinensis (L.) Osbeck) e os grapefruits (C. paradisi Macf.), assim como alguns outros tipos de citros de menor importância comercial. Foi determinado que esse prejuízo ocorria por ~~possuírem~~ tais tipos de citros, tecidos parcialmente intolerantes à infecção pelo vírus em questão (Costa et al., 1949). Dessa maneira, levando-se em consideração a forma de tristeza que estiver presente e a relativa intolerância dos tecidos hospedeiros, os danos causados nesses tipos de citros podem assumir proporções consideráveis, sejam eles de pé franco, ou enxertados sobre porta-enxertos tolerantes à tristeza (Costa, 1956).

Principalmente em plantações comerciais de limão Galego podem ser observados os danos induzidos pela tristeza, sendo que muitos pomares dessa variedade estão em franco declínio ou já deixaram de existir pela ação do vírus. Essa intolerância do limão Galego ao vírus da tristeza fez com que fosse aconselhada a sua substituição por outros tipos de citros de características aproximadas. No entanto, o abandono ou redução da cultura de uma variedade de citros como o limão Galego, cuja fruta tem excelente qualidade sob vários aspectos, é

um problema bastante complexo do ponto de vista comercial. Dessa maneira, considerou-se que a cultura do limão Galego não deveria ser abandonada, sendo que deveriam ser desenvolvidos métodos para propiciar a continuação do seu plantio de maneira satisfatória.

A ocorrência generalizada da tristeza no País exigia uma medida de controle que fosse funcional na presença do vírus. Esse fato limitava as possibilidades de controle nas quais se poderia pensar. Uma delas seria a criação de variedades resistentes, através de incorporação genética da tolerância existente em muitos tipos de citros, ou a imunidade existente em Poncirus trifoliata Raf., nas espécies que têm problemas com a tristeza. Esse método, porém, apresenta uma série de dificuldades devido a diversos fatores, tais como: (a) existência de embriões nucelar, o que torna difícil a obtenção e identificação dos híbridos de citros; (b) o fato de a maioria dos tipos comerciais de citros, devido à sua elevada heterozigose, produzirem progêneses sexuadas extremamente variáveis, mas, geralmente, de características inferiores às da planta mãe; (c) híbridos de citros necessitam de muito tempo para entrar em produção. Ademais, a necessidade de aliar resistência ou tolerância às características exigidas pelo mercado de consumo "in natura" ou pela indústria, torna a tarefa extremamente difícil pela sua complexidade genética.

Descartadas as possibilidades mencionadas acima, uma outra visando resolver o problema seria aquela baseada num dos fenômenos de interferência entre vírus de plantas, ao qual pode ser dado o nome de proteção. O conhecimento da existência de estirpes fracas do vírus da tristeza e o fato de que elas podem oferecer proteção, levaram o autor a trabalhar em um programa¹ experimental, visando o controle da tristeza no caso das copas sensitivas de limão Galego, laranja Pera e Ruby Red grapefruit, através da premunização.

A parte do programa relativa ao controle da tristeza em copas de limão Galego pela premunização, foi iniciada em 1961: a descrição dos experimentos executados e os resultados obtidos constituem a presente tese.

¹Esse programa foi parcialmente subvencionado pela P.L. 480 do U.S. Department of Agriculture no período 1961-1966.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A literatura sôbre o fenômeno da proteção é bastante vasta e, para maior clareza, vai ser apresentada na seguinte ordem: (a) trabalhos pioneiros; (b) natureza da proteção; (c) uso da proteção para fins de controle e as vantagens e desvantagens do metodo e (d) proteção em relação à tristeza.

(a) trabalhos pioneiros

O fenômeno da proteção de uma planta invadida por um vírus contra a invasão de uma outra estirpe desse vírus foi estudado por vários pioneiros da virologia vegetal: Wingard (1928) mostrou que diferentes espécies de plantas infetadas com o vírus do "tobacco ringspot" não permaneciam severamente afetadas indefinidamente, pois, algum tempo após a infecção, as plantas se recuperavam completamente. Propagações das plantas assim recuperadas davam origem a plantas que também tinham aparência sadia. No entanto, as folhas de aparência normal de plantas recuperadas, não apresentavam qualquer sintoma, quando inoculadas com suco de folhas severamente afetadas pela moléstia. McKinney (1929) verificou em experimentos com o TMV, que plantas infetadas com "light-green mosaic" não mostraram sintomatologia diferente, após três inoculações sucessivas com "yellow mosaic". Pouco tempo depois, Thung (1931) demonstrou que plantas de fumo infetadas com TMV não apresentaram sintomas adicionais após terem sido inoculadas com um variante que causava "white mosaic", quando inoculado em plantas sadias. Salaman (1933) verificou que plantas de fumo completamente invadidas por estirpes fracas do vírus X da batata estavam protegidas contra injúria subsequente, se inoculadas com estirpes que induziam "marked mottling", ou outro tipo distinto de injúria em plantas sadias. Kunkel (1934) demonstrou que plantas inoculadas com estirpes atenuadas do vírus do "tobacco mosaic" eram imunes às estirpes comuns e aucuba.

A maioria dos trabalhos mais antigos sobre o fenômeno da proteção foram efetuados com estirpes do vírus que causavam mosaicos e mancha anular. Estirpes de tais vírus deram proteção em alto grau, com pouquíssimas exceções. Os poucos casos havidos da estirpe de um de-

terminado vírus não oferecer proteção completa contra estirpes relacionadas, eram atribuídos a uma invasão incompleta da planta-teste, pelo primeiro vírus introduzido (Price, 1940). Baseado, porém, em grande número de resultados mais recentes obtidos em testes de proteção cruzada, chegou-se a conclusão que existe um largo espectro no grau de proteção a ser encontrado entre estirpes relacionadas de um vírus (Bawden & Sheffield, 1944; Bald, 1948; Giddings, 1950; Fulton, 1951; Bennett, 1955).

Como regra, a proteção tem sido mais completa entre estirpes de vírus que induzem mosaico, do que entre as dos vírus do grupo dos amarelos e do tipo "leaf curl" (Bennett, 1953). Também a proteção parece ser uma ocorrência mais comum entre vírus que se multiplicam no parênquima do que entre os que são restritos ao floema e tecidos adjacentes. Finalmente, um fato geralmente aceito é o de que a proteção é tanto melhor quanto mais completa for a invasão dos tecidos da planta pelo primeiro vírus (Costa, 1972b).

(b) Natureza da proteção

Nada de definitivo é conhecido sobre a natureza da proteção. Entretanto, diversos autores sugeriram hipóteses para explicá-la:

(1) Formação de substâncias de proteção. A idéia de que a proteção poderia resultar da formação de substâncias defensivas do tipo anticorpo dos animais foi formulada por Thung (1931). (2) Adsorção do segundo vírus. Hipótese apresentada por Kavanau (1949), que procura explicar o fenômeno através de adsorção das partículas do segundo vírus em agregados do primeiro vírus já existentes nas células, neutralizando, dessa forma, o segundo vírus. (3) Não separação do ácido nucléico do capsídio. Costa (1972b) tenta explicar o mecanismo de proteção, imaginando que, nas células já ocupadas pelo primeiro vírus, deixa de ser operativo o mecanismo que leva à separação do ácido nucléico do segundo vírus do seu capsídio e que assim não permitiria que o ácido nucléico do segundo vírus exercesse suas funções. (4) Recaptação imediata. Essa outra idéia, também formulada por Costa (1972b) não difere muito da de Kavanau (1949) anteriormente citada, mas oferece uma explicação um pouco diferente para o fenômeno. Nesse caso, é admitido que as partículas do segundo vírus, se separam em ácido nucléico e

em capa proteica, mas sistemas em funcionamento na célula levam a uma imediata recapeação do ácido nucléico do segundo vírus pela própria capa protéica ou por capa protéica do primeiro vírus, impossibilitando assim que o ácido nucléico do segundo vírus possa agir dentro da célula.

Alem dessas teorias existem outras baseadas em efeito competitivo, que visam explicar o fenômeno: (5) Ocupação dos sítios de multiplicação. Hipótese formulada por Kunkel (1934) e Bawden (1943), que explicaram a proteção na base de que o primeiro vírus ocuparia todos os sítios de multiplicação na célula, não restando assim sítios disponíveis para o segundo poder se multiplicar. (6) Competição para precursores. Hipótese também formulada por Kunkel (1934) e Bawden (1943), baseia-se na idéia de que o primeiro vírus estaria usando todo o material precursor do vírus existente nas células, pouco ou nada sobrando desse material para o segundo vírus. (7) Efeito competitivo constante entre o primeiro e o segundo vírus Costa, (1972b), formula a idéia de que a proteção pode resultar de um efeito competitivo que o primeiro vírus estabelecido nos tecidos da planta oferece ao estabelecimento do segundo vírus, admitindo que esse efeito competitivo possa ser exercido em qualquer uma das fases do ciclo do vírus, dentro da célula e dos tecidos da hospedeira: na separação da capa de proteína do ácido nucléico, no mecanismo de transmissão da informação e síntese do ácido nucléico, e da proteína e mesmo na fase de reunião do ácido nucléico e proteína para formar a partícula completa, na translocação na planta e até ao ser apanhado pelo vector.

(c) Uso da proteção para fins de controle e as vantagens e desvantagens do método

Salaman (1937) e Johnson (1937) foram possivelmente os primeiros a apontar um possível significado econômico da proteção conferida por estirpes fracas, contra estirpes virulentas.

A premunização foi utilizada com resultados satisfatórios por diversos pesquisadores: Posnette & Todd (1955) utilizaram-na em experimentos, nos quais protegeram plantas de cacau contra as estirpes mais prevalentes e normalmente severas do "swollen shoot" do cacau (Theobroma cacao L.) com estirpes fracas desse. Durante um período

de três anos, de 416 árvores infetadas com estirpes fracas, somente 35 mostraram sintomas severos, contra 273 de 387 árvores não protegidas. Também a produção das plantas protegidas foi muito superior à daqueles não premunizadas que foram infetadas naturalmente. Simmonds (1959) obteve proteção eficiente em Passiflora edulis Sims durante um período de 5 anos, premunizando as plantas com formas fracas do "woodiness virus".

Vários autores têm comentado sobre as vantagens e desvantagens, viabilidade e possíveis perigos do uso da proteção no controle de uma determinada moléstia de vírus. Posnette & Todd (1951, 1955) e Costa (1972b) fazem algumas considerações a esse respeito que, resumidas em linhas gerais, são as seguintes: (a) no caso de culturas anuais, tal técnica raramente pode justificar o trabalho envolvido, pois essas culturas geralmente se propagam por semente verdadeira, necessitando o processo de premunização ser repetido em cada geração. No entanto, poderia ser utilizada no caso de plantas anuais propagadas vegetativamente por tubérculos, bulbos etc.; (b) a presença de vírus fraco numa cultura pode servir de fonte para outra cultura, onde poderia originar moléstia de importância; (c) a presença da estirpe ou complexo fraco em todas as plantas pode originar o fenômeno de sinergismo, no caso de infecção da planta por outro vírus; (d) a existência de grande número de plantas com vírus pode aumentar a probabilidade de surgirem mutantes severos com possibilidades competitivas; (e) a doença deve estar bastante espalhada, sendo impossível a sua erradicação; (f) perdas induzidas pela mesma devem ser tão elevadas, que alguma redução na produção, decorrente da infecção pelas estirpes fracas durante um período longo, seria a alternativa preferível a escolher e (g) é necessário que exista evidência de que as estirpes fracas protegem efetivamente sem que elas próprias causem muitos danos.

(d) Proteção em relação à tristeza

Hughes & Lister (1953), trabalhando com a "lime disease" da Costa do Ouro, mencionam que essa moléstia seria causada por um vírus que existiria em pelo menos duas estirpes, uma delas causando sintomas mais severos. Oberholzer et al. (1949), em estudos sobre o "stem pitting" (Caneluras) do grapefruit na África do Sul, assinalam o fa-

to de ter encontrado plantas bastante afetadas por essa doença, e também algumas com poucos sintomas e bastante vigorosas. Verificaram ainda que plantas afetadas davam origem a clones com sintomas fortes de "stem pitting", enquanto que borbulhas retiradas de plantas aparentemente saudáveis davam origem a plantas igualmente saudáveis e vigorosas. Em trabalho subsequente, McClean (1950), baseado nas reações obtidas em limas ácidas inoculadas a partir de grapefruits afetados e grapefruits vigorosos, aparentemente saudáveis, sugeriu que o "stem pitting" do grapefruit seria causado por um vírus existente também em, pelo menos, duas estirpes uma induzindo sintomas severos e a outra sintomas fracos. Esses trabalhos foram realizados antes que se soubesse que essas manifestações eram induzidas pelo vírus da tristeza.

Evidência experimental da ocorrência de estirpes fracas e fortes do vírus da tristeza foi obtida inicialmente no Brasil por Grant & Costa (1951). Esses autores verificaram que plantas invadidas pela estirpe fraca não apresentavam injúria, quando superinoculadas pelas estirpes fortes. Esse fato mostrou que a proteção funcionava no caso de estirpes do vírus da tristeza.

No caso da tristeza, também foi observado que o grau de proteção conferido por estirpes fracas podia variar; Olson (1956, 1958) e Grant & Higgins (1957) mencionam níveis diversos de proteção entre isolados fracos e fortes do vírus da tristeza. Também Stubbs (1964), trabalhando em experimentos de proteção num período de 11 anos com mudas de pé franco de grapefruit, assim como combinações de laranja doce sobre azeda (Citrus aurantium L.) verificou que isolados fracos de grapefruit e limão verdadeiro (C. Limon (L.) Burm.f.) diferiam consideravelmente na sua capacidade inicial de proteção. No entanto, num período longo, mesmo um isolado de capacidade inicial de proteção baixa, exercia considerável influência.

A possibilidade de se utilizar a premunização em campo foi experimentada por vários autores. Costa et al. (1954), em trabalhos experimentais efetuados com diversas combinações de copa e porta-enxertos de citros, inoculadas com estirpes fracas do vírus da tristeza, mostraram que plantas de limão Galego e lima Key (C. aurantifolia (Christm.) Swing) inoculadas com isolados fracos do vírus da triste-

za, desenvolveram-se com maior vigor do que plantas comparáveis, que expostas em campo à infecção natural por um período de três anos se tornaram infetadas por estirpes comuns. Frazer (1966) obteve bons resultados com plantas de grapefruit Marsh Seedless crescendo em campo, infetadas com isolados fracos de tristeza, expostas à infecção natural por estirpes comuns desse vírus, pelo espaço de 10 anos. Além desses resultados, uma série de autores tem feito considerações de ordem teórica em torno da possibilidade de controle dos danos causados pelo vírus da tristeza, através do uso de estirpes fracas desse (Steyaert, 1952; Oberholzer & Hofmeyr, 1955; Costa, 1956; Grant et al., 1960).

III. MATERIAL E MÉTODOS

A. Coleta de isolados fracos do vírus da tristeza

O problema de encontrarem-se isolados fracos adequados do vírus da tristeza que viessem a proteger copas de limão Galego contra a invasão em campo por isolados fortes (causadores de caneluras) do vírus, foi considerado sob os seguintes ângulos: (1) as estirpes ou complexos de estirpes a serem utilizados nos testes de premunização deveriam ser realmente fracos para as copas em questão; (2) necessitariam possuir poder invasivo elevado, invadindo completamente os tecidos da planta; e (3) a sua taxa de multiplicação deveria ser de tal ordem a sobrepujar qualquer outro isolado que, ocasionalmente, viesse a se estabelecer em alguma parte da planta.

Com a finalidade de coletar isolados fracos do vírus da tristeza que preenchessem as condições consideradas necessárias, (mencionadas acima) para os estudos de premunização mais tarde efetuados, foram realizados levantamentos em pomares de limão Galego, laranja Pera e grapefruit Marsh Seedless² enxertados em cavalos tolerantes ao vírus da tristeza que, no entanto apresentavam-se severamente injuriados pela moléstia. Quando plantas de crescimento excepcional, aparentemente sadias, correspondendo ao tipo padrão da variedade, eram encontradas nesses pomares, fazia-se uma observação mais minuciosa para sintomas menos visíveis. Particularmente, no caso do limão Galego, eram feitos exames cuidadosos para sintomas foliares do tipo palidez das nervuras (veinclearing) e caneluras (stem pitting). O material dessas plantas supostas de elite foi coletado para fins experimentais.

Foi considerado que o vigor excepcional das plantas selecionadas poderia ser atribuído a um dos seguintes fatores: (a) estavam

²As coletas de Pera e grapefruit Marsh Seedless foram efetuadas, por também serem feitos com essas duas variedades, ensaios paralelos de premunização, que deixam de ser mencionados no presente trabalho, por não haver ainda resultados mais conclusivos, devido à menor sensibilidade desses tipos de citros ao vírus da tristeza.

naturalmente infetadas por uma estirpe ou complexo de estirpes fracas do vírus da tristeza de pouco ou nenum efeito sobre as plantas, que estavam protegendo as mesmas contra a invasão das estirpes fortes causadoras do declínio das plantas vizinhas, por um período de já vários anos; (b) essas plantas representavam mutantes que possuíam tecidos mais tolerantes às estirpes fortes locais do que o restante das plantas do pomar; (c) algumas dessas plantas estariam localizadas em pontos de fertilidade superior ao do resto do pomar e; (d) seriam plantas que teriam escapado à infecção pelo vírus da tristeza, embora essa hipótese fosse bastante improvável.

Para os testes de premunização, a alternativa (a) é a que interessava, embora a alternativa (b) também fosse de valor para controlar os danos induzidos pelas estirpes fortes em condições de campo, desde que o mutante possuísse as qualidades comerciais da fruta da variedade padrão.

Nos diversos levantamentos efetuados, coletaram-se cerca de 150 isolados do vírus da tristeza, dos quais 125 considerados fracos e 25 considerados severos de pomares de limão Galego, laranja Pera e grapefruit Marsh Seedless. Os isolados supostos fracos e fortes foram primeiramente comparados por estabelecimento em porta-enxertos intolerantes e tolerantes ao vírus da tristeza. Posteriormente os considerados melhores foram estudados de duas maneiras principais: (1) o seu efeito sobre os clones novos de Galego a serem protegidos; (2) a determinação do seu valor protetivo.

B. Preparo das plantas testes utilizadas nos experimentos

1. Obtenção de plantas testes de limão Galego e de porta-enxertos utilizados nos experimentos

Todas as sementes de limão Galego e de alguns outros tipos de citros para a formação das plantas utilizadas nos ensaios foram obtidas na Estação Experimental de Limeira. A fim de manter um suprimento contínuo de sementes viáveis, os lotes de sementes após retirados dos frutos e secos externamente foram tratados com fungicidas e colocados dentro de sacos plásticos e armazenados em um refrigerador do tipo doméstico (Montenegro & Salibe, 1960).

As sementeiras foram feitas em caixas de madeira nas dimensões 43 x 43 x 14 cm, num meio formado por terra e esterco de curral na proporção 3:1, coberto por uma camada de areia grossa de 1 - 2 cm. Essas caixas foram mantidas em casa de vegetação. As mudinhas foram transplantadas no estágio de 3 - 4 folhas, para vasos de barro nas dimensões 20 x 24 cm, sendo que das mesmas, parte foi mantida em casa de vegetação e parte foi subsequentemente transplantada para viveiros experimentais, geralmente no espaçamento normal de 1,20 x 0,40 m, aconselhado para viveiro.

Os porta-enxertos de limão Cravo (Citrus reticulata var. austera hib.), laranja Caipira (C. sinensis (L.) Osbeck) e tangerina Cleópatra (C. reticulata Blanco), utilizados nos vários testes, foram, salvo algumas exceções, obtidos de sementeiras já existentes na Estação Experimental de Limeira. Essas mudas foram trazidas de raiz nua para a Seção de Virologia e, a seguir, transplantadas para saquinhos plásticos nas dimensões 15 x 30 cm., sendo mantidas nos espaços entre as casas de vegetação até o seu perfeito pegamento. Nesse local, pulverizações semanais com inseticidas eram efetuadas, visando impedir a colonização das plantas pelo pulgão preto dos citros, (Toxoptera citricidus Kirk.) o vetor da tristeza. Posteriormente, as melhores mudas foram então plantadas em viveiros experimentais.

2. Preparo de material clonal sadio para uso nos teste de pre-munização

A necessidade de se ter material sadio comparável para os ensaios de pre-munização fez com que se preparassem clones nucelares nos vasos de limão Galego. Devido ao fato de o limão Galego ser altamente poliembriônico, e as plantas provenientes de sementes serem via de regra, típicas para a variedade (Hodgson, 1967), o preparo dos clones necessários foi efetuado a partir de mudas de pé franco de limão Galego, germinadas de sementes plantadas (como já foi mencionado) em casa de vegetação. Do lote germinado, foram selecionadas cinco mudas pelo seu vigor e tipo do padrão da variedade em questão. Assim que estas mudas atingiram o tamanho apropriado, retiraram-se gemas das mesmas, as quais foram multiplicadas em porta-enxertos de laran-

ja azeda. As plantas assim formadas foram mantidas na casa de vegetação.

Os clones novos foram enxertados em laranja Azeda a fim de que se pudessem reconhecer, com maior facilidade, possíveis casos de contaminação acidental pelo vírus da tristeza. A casa de vegetação em questão era semanalmente pulverizada com inseticidas, além de ser rotineiramente fumigada, tornando assim mínima a chance de infecção natural pela tristeza. As plantas conduzidas da maneira indicada forneceram as borbulhas dos cinco clones para os diversos ensaios efetuados.

C. Técnicas utilizadas na inoculação dos isolados do vírus da tristeza

As inoculações dos isolados do vírus da tristeza foram efetuadas, no presente trabalho, através de inoculação por união de tecido e por meio do inseto vetor do vírus, o pulgão preto dos citros.

1. Inoculação por união de tecido (borbulhas)

Nesse caso, retiravam-se gemas das plantas selecionadas para fontes de vírus, as quais eram então enxertadas da maneira usual nas plantas a serem infetadas, numa altura de 10 - 15 cm acima do solo. Normalmente, permitia-se que as gemas efetuassem um crescimento de cerca de 20 cm (Fig. 1-A), após o que eram cortadas e cegadas. Procedendo-se dessa maneira, conseguia-se uma boa infecção da planta a ser inoculada, pois, com o crescimento da gema inóculo, havia multiplicação do vírus nela existente, que então passava em maior concentração para a planta que se desejava infetar.

2. Inoculação por vetores (pulgão preto dos citros)

As transmissões de isolados do vírus da tristeza, utilizando-se o vetor, isto é, o pulgão preto dos citros, foram efetuadas como segue: os insetos originalmente coletados de plantas de citros foram mantidos em plantas de abóbora (Cucurbita moschata Duches) da variedade Redonda de Amparo (Costa et al., 1968), obtendo-se dessa maneira colônias sadias. Quando havia necessidade de grande número de insetos, eram os mesmos coletados em campo e colocados nessa variedade

de de abóbora por 48 horas, para perderem o vírus, o que permitia uma boa margem de segurança, pois já 24 horas após se alimentar numa planta sadia, os insetos se tornam não infetivos (Costa & Grant, 1951). Algumas vezes, a obtenção de insetos não virulíferos era feita em mudas de pé franco de laranja azeda com vários meses de idade, da mesma maneira que em abóbora, que, por ser tipo de citros resistente e de difícil infecção pelo vírus da tristeza, também se prestava a essa tarefa. Todas essas operações foram realizadas num insetário. Os insetos não virulíferos assim obtidos foram então utilizados nos diversos ensaios de transmissão do vírus da tristeza.

Algumas vezes, principalmente para aqueles ensaios em que se necessitava de estirpes severas do vírus da tristeza, os pulgões pretos eram obtidos de colonias naturalmente formadas nas brotações de árvores sabidamente infetadas por estirpes fortes do vírus e, a seguir, transferidos para as plantas a inocular. A transferência dos pulgões foi sempre feita colocando-se pedaços de folhas ou brotos das fontes de vírus, com o número de pulgões desejado, em ponteiros ou galhos das plantas a inocular. Após essa operação, cobriam-se as plantas com gaiolas constantes de uma armação de arame fino recoberta com meia feminina de nylon, de maneira a confinar os insetos (Fig. 1-B). Embora esse tipo de inoculação fosse utilizado principalmente para infetar plantas de campo, aonde poderia parecer, a uma primeira vista, não ser necessário um confinamento dos insetos, o mesmo era feito visando evitar a fuga dos pulgões dos galhos onde tinham sido colocados, garantindo, dessa maneira, uma melhor alimentação com uma conseqüente boa inoculação. O período de alimentação foi sempre no mínimo de 24 horas, tempo considerado suficiente para a inoculação do vírus. Decorrido esse espaço de tempo, eram os pulgões eliminados com um inseticida de pouca ação residual. O fato de se utilizar um inseticida com tais características era para permitir a reinoculação de uma planta num curto espaço de tempo.

D. Avaliação da reação à tristeza das plantas infetadas

A reação à tristeza observada nas plantas de linhão Galego dos diversos experimentos foi julgada: (1) pela manifestação de sinto-

mas foliares representados, pela intensidade de palidez das nervuras das folhas, suberificação das nervuras, amarelecimento e redução de tamanho das folhas nos casos mais severos. A avaliação do grau dos sintomas foliares foi feita segundo uma escala arbitrária que variava de 0 a 5, sendo dado, subjetivamente, de acordo com a sua severidade. Grau 0 correspondia à ausência de sintomas foliares; grau 5, aos mais severos sintomas (Fig. 2-A, B e C); (2) pela presença de sintomas de caneluras (stem pitting), seguindo-se nesse caso o mesmo critério para avaliar a intensidade de sintomas adotado acima, grau 0 correspondendo à ausência de sintomas de caneluras e grau 5 aos mais pronunciados sintomas (Fig. 3-A); (3) pelo crescimento efetuado pelas plantas. Nesse caso, a escala variava de 1 a 5, sendo que grau 5 correspondia ao crescimento máximo, e grau 1, ao mínimo (Fig. 3-B) e finalmente; (4) pela quantidade e qualidade dos frutos produzidos (Fig. 3-C).

E. Definição de alguns termos utilizados na presente tese

Para facilidade de compreensão foi considerado conveniente dar o significado de alguns termos utilizados na literatura que trata da proteção entre estirpes de vírus de plantas e que são utilizados na presente tese. Proteção é o fenômeno pelo qual uma planta ou parte de planta pode, após ter sido invadida por um vírus ou estirpe do vírus, se tornar imune ou altamente resistente à infecção ou invasão por um segundo vírus relacionado. Premunização seria a técnica de promover a infecção de uma planta com uma estirpe fraca de um vírus que venha a oferecer proteção contra a forte desta maneira levando a um controle das manifestações severas da doença. Nos testes para verificar o valor da premunização também denominado de teste de proteção faz-se uma segunda inoculação geralmente com estirpes fortes de vírus relacionados denominados nesse caso de desafiante. Essa segunda inoculação é chamada também de superinoculação desafiante. Recuperação de um vírus é a retroinoculação que se faz de uma planta previamente inoculada com um ou mais vírus, para fins de identificação.

IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

A. Reação de clones de limão Galego portadores de diferentes isolados do vírus da tristeza quando perpetuados em porta-enxertos intolerantes e tolerantes à tristeza.

Uma primeira tentativa para se efetuar a avaliação da real natureza dos isolados de tristeza coletados de plantas de limão Galego, julgadas como invadidas por isolados fracos ou severos do vírus, segundo a sintomatologia observada nessas plantas, quando da execução dos levantamentos, foi efetuada através da enxertia de borbulhas das árvores em questão, em cinco indivíduos de cada um dos seguintes tipos de porta-enxertos: (1) intolerantes à tristeza representados pela laranja Azeda e (2) tolerantes à tristeza, representados pelo limão Cravo e a laranja Caipira.

Esperava-se que o crescimento efetuado em laranja Azeda desse uma possível indicação sobre a natureza do isolado testado, isto é, se era fraco ou forte, como verificado para copas de laranja doce por Grant & Costa (1951). O crescimento em limão Cravo deveria fornecer indicações sobre a natureza do isolado, quando a copa estivesse se desenvolvendo em cavalos tolerantes à tristeza e indicar se havia ou não contaminação pelo vírus da exocorte (Moreira, 1955). A laranja Caipira foi introduzida como outro tipo de porta-enxerto tolerante à tristeza usado no Estado de São Paulo e com a finalidade de tornar possível a detecção de algum isolado de tristeza que, embora fraco a julgar pela sua reação em Azeda, estivesse associado ao vírus da exocorte, o qual mascararia o efeito da estirpe de tristeza em questão, quando o material infetado fosse estabelecido em limão Cravo.

O crescimento inicial feito pelas copas de limão Galego enxertadas em cavalo de azeda, verificado em 1963, quando as plantas contavam cerca de um ano de idade, mostrou que houve certa diferença regional. Essa diferença não foi observada quando o mesmo material estava enxertado em porta-enxertos tolerantes. A diferença regional inicial em laranja azeda desapareceu quando as plantas ficaram mais velhas.

Dados sobre a avaliação dos sintomas foliares de tristeza e do desenvolvimento das copas de limão Galego efetuada em 1966, quando es

sas contavam 4 anos de idade, estão apresentados no quadro 1. Verificou-se que as copas estabelecidas em porta-enxertos de azeda tiveram desenvolvimento muito ruim embora tivessem se originado de plantas de elite selecionadas em campo como matrizes. Constituíram exceção as fontes de vírus nºs 50, 82 e 100³ que tiveram melhor desenvolvimento e reação de tristeza mais fraca do que a média das reações obtidas para as outras fontes. Nos porta-enxertos tolerantes, o desenvolvimento dos clones de Galego foi bastante satisfatório, e os sintomas de tristeza geralmente fracos, correspondendo às características das matrizes de elite das quais se originaram. Nesses porta-enxertos, os clones 50, 82 e 100 que tinham apresentado melhor desenvolvimento em Azeda, não se distinguiram dos demais. Essa falta de paralelismo entre a reação de plantas enxertadas em cavalos de laranja Azeda e tolerantes também foi verificada em ensaios semelhantes de laranja Pera, não mencionados na presente tese.

B. Correspondência da reação à tristeza entre propagações de matrizes utilizadas como fontes de isolados fracos de limão Galego e clones nucelares novos infetados com os mesmos

Durante os levantamentos efetuados para localizar plantas consideradas de "elite" de limão Galego, desenvolvendo-se satisfatoriamente em pomares afetados pela tristeza, duas considerações principais foram feitas para explicar o bom desenvolvimento dessas: (1) tais plantas estariam naturalmente premunizadas com isolados fracos do vírus contra os danos causados pelos isolados severos, responsáveis pelo declínio das outras plantas do pomar, ou (2) que algumas dessas plantas poderiam representar mutantes com tecidos mais tolerantes às estirpes locais do vírus.

O interesse em determinar qual dos dois fenômenos mencionados acima seria responsável pelo bom comportamento das plantas consideradas de "elite", selecionadas como matrizes, levou a comparar-se a reação à tristeza, das propagações efetuadas em cavalos tolerantes

³Número de acesso das coletas dos isolados do vírus da tristeza no registro da Seção de Virologia.

Quadro 1. Reações apresentadas pelos clones de limão Galego fontes dos isolados do vírus da tristeza, agrupados por local de coleta perpetuados em porta-enxertos toletantes e intolerantes

Isolados de Galego nº	Procedência	Reações de tristeza representados por sintomas foliares (s), e crescimento (cr) observados nas copas de limão Galego perpetuadas nos tipos de porta-enxertos mencionados				
		Intolerantes		Tolerantes		
		Laranja Azeda		l.Cravo & l.Caipira		
		s	cr	s	cr	
Fracos	Pitangueiras	34	5,0 ^a	1,0	1,0	4,6
		35	4,5	1,5	1,0	5,0
		36	4,0	1,5	1,5	3,8
		37	4,5	2,0	1,0	4,5
		38	5,0	1,0	1,0	3,8
		39	5,0	1,0	2,0	4,3
		40	5,0	1,0	1,0	4,7
		41	3,3	2,0	1,0	4,5
		42	5,0	1,0	1,0	4,5
		Media		4,6	1,3	1,2
Fracos	Bebedouro	44	4,3	2,5	1,0	4,5
		45	5,0	1,0	1,0	4,5
		48	5,0	1,0	1,0	5,0
		49	4,0	2,0	1,0	3,5
		50	2,0	4,0	1,0	4,8
		52	5,0	1,0	2,5	4,5
		53	4,7	3,0	2,5	
Media		4,3	2,1	1,4	4,2	
Fracos	Limeira	72	-	-	1,0	3,8
		76	5,0	1,0	1,0	3,8
		82	2,5	3,5	1,0	4,1
		86	5,0	1,0	2,5	4,4
		87	5,0	1,0	3,0	4,2
		88	5,0	1,0	2,5	4,5
Media		4,5	1,5	1,8	4,1	
Fracos	Araras	100	2,0	3,0	1,0	3,8
		101	5,0	1,0	2,0	3,7
		Media		3,5	2,0	1,5

^aValores no quadro representam médias baseadas em número variável de plantas, não inferior a cinco.

Quadro 1 - Continuação

Isolados de Galego nº	Procedência	Reações de tristeza representados por sintomas foliares (s), e cresci- mento (cr) observados nas copas de limão Galego perpetuadas nos tipos de porta-enxertos mencionados				
		Intolerantes		Tolerantes		
		Laranja Azeda		l.Cravo & l.Caipira		
		s	cr	s	cr	
Fracos	123	Itapira	4,0	3,3	2,0	4,0
	124		4,6	1,8	3,5	3,5
	125		5,0	2,0	2,0	3,7
	126		4,3	1,0	3,0	4,0
	127		5,0	1,0	2,0	4,0
	128		4,3	1,7	2,0	4,3
	129		4,0	2,4	2,5	3,6
	130		3,5	2,5	2,0	4,0
	131		4,4	2,2	1,0	4,0
		Média		4,3	2,0	2,2
Fracos	141	Est. do Rio	5,0	2,0	1,0	3,7
	142		4,8	1,2	1,0	3,5
	143		4,5	1,5	1,0	4,0
	144		5,0	1,0	1,5	3,6
	Média		4,8	1,4	1,1	3,7
Fortes	51	Bebedouro	5,0	1,0	1,3	3,7
	83	Limeira	5,0	1,0	4,0	2,0
	Média		5,0	1,0	2,6	2,8

de algumas das plantas matrizes, com aquela apresentada por clones nucelares novos de limão Galego inoculados com os isolados de tristeza das matrizes em questão. Esperava-se que, caso alguma das matrizes selecionadas devesse o seu bom comportamento a tecidos tolerantes à isolados fortes de tristeza, esse fato seria verificado na reação severa de tristeza apresentada pelo clone nucelar novo, inoculado com o vírus dessa matriz.

No quadro 2 acham-se representados dados da avaliação da reação à tristeza das propagações de 10 matrizes de limão Galego, enxertadas em limão Cravo, quando essas contavam 9 anos de idade, comparadas com a reação de clones nucelares novos inoculados com os isolados de tristeza de cada uma dessas matrizes igualmente enxertados em limão Cravo, contando 7 anos de idade. Pelos valores contidos no quadro, verifica-se que, de uma maneira geral, ao bom desenvolvimento das propagações correspondeu um desenvolvimento igualmente bom dos clones novos inoculados.

C. Comparação da reação induzida por isolados fracos e fortes do vírus da tristeza em mudinhas de pé franco de limão Galego, quando inoculadas por intermédio do vetor em condições de casa de vegetação

Com a finalidade de determinar se a transmissão pelo vetor modificaria a reação provocada por isolados fracos de tristeza quando comparada com a transmissão por união de tecidos, inocularam-se 12 isolados considerados fracos provenientes de laranja Pera, 8 fracos vindos de limão Galego, 2 fracos de grapefruit, 6 severos de laranja Pera, 1 severo de Galego e 1 severo de grapefruit em plantas de limão Galego por intermédio do vetor. Esse teste efetuado em mudinhas novas possibilitaria também uma leitura rápida, permitindo dessa forma antever as reações a serem obtidas nos ensaios de premunização já sendo conduzidos.

As inoculações foram feitas confinando-se pulgões pretos não virulíferos em ramos de plantas selecionadas como fontes de vírus em campo. Nessas condições permitiu-se que os mesmos se reproduzissem por cerca de 15 dias. Após esse período, no qual já havia considerá

Quadro 2. Comparação da reação à tristeza apresentada por plantas de limão Galego estabelecidos como fontes de isolados vírus da tristeza com a reação obtida de clones nucelares novos inoculados com esses isolados

Número do isolado	Reações medias de sintomas foliares (s), caneluras (c) e crescimento (cr) observadas nas plantas de limão Galego conforme indicado					
	Propagações das plantas matrizes fontes dos isolados			Clone novo inoculado com o isolado		
	s	c	cr	s	c	cr
35	1,5 ^a	2,0	4,2	1,0	1,5	4,0
40	1,0	1,0	4,8	1,0	1,0	4,7
42	1,0	1,0	5,0	1,3	1,3	4,7
50	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	4,3
72	1,5	1,5	4,0	1,0	1,0	4,5
86	1,5	2,0	4,2	2,0	2,0	3,0
128	1,2	2,0	4,0	1,0	1,0	4,7
130	1,5	2,0	4,0	1,0	1,0	4,5
141	1,0	1,0	4,0	1,0	1,0	4,5
142	1,0	2,0	4,2	1,0	1,0	4,5
Média	1,2	1,5	4,3	1,1	1,2	4,3

^aValores no quadro representam médias baseadas em 3 plantas

vel número de insetos originários dos primeiros colocados, foram os mesmos transferidos e confinados em mudinhas de pé franco de limão Galego, com cerca de 2 meses de idade, colocadas num insetário. Três plantinhas de limão Galego foram inoculadas a partir de cada uma das fontes de vírus selecionadas. Em média, 30 insetos foram utilizados para inocular cada planta, onde se alimentaram durante 48 horas (espaço de tempo após o qual foram eliminados com pulverizações de inseticida) sendo as plantinhas a seguir colocadas na casa de vegetação.

As respostas às inoculações apareceram sob forma de palidez das nervuras na maioria das plantinhas de limão Galego, algumas vezes já aos 20 dias após a inoculação. Diferenças devidas à natureza dos isolados do vírus necessitaram de mais tempo para serem observadas, começando a ficar visíveis dois ou mais meses após a inoculação. No quadro 3, 5, são apresentados os resultados com os vários isolados testados, quando as plantas contavam cerca de 6 meses de idade.

Analisando-se os resultados do quadro 3 verifica-se que os isolados fracos vindos de limão Galego foram os que causaram sintomas foliares mais fracos e permitiram o melhor desenvolvimento às plantas com eles infetadas, entre todos os isolados testados. Particularmente os de nº 40, 42 e 141 permitiram excelente crescimento à mudinhas por eles infetadas. A inoculação dos isolados fracos de Galego por meio do vetor deu resultados semelhantes aos obtidos nos testes em que se usou a transmissão por união de tecidos, o que se pode verificar comparando os dados dos quadros nºs 2, 3 e 4 no caso dos isolados nºs 40, 42 e 141. Os resultados no quadro 3 mostram ainda que os isolados vindos de fontes de laranja Pera coletados quer como fracos, quer como severos, foram de uma maneira geral severos para mudas de Galego. Os isolados fracos vindos de grapefruit, embora não induzissem sintomas foliares acentuados, reduziram em muito o crescimento das plantas. Os isolados severos de Galego e de grapefruit causaram reações muito severas.

D. Estudo de métodos de inoculação para fins de premunização

Com a finalidade de determinar a maneira mais adequada de ob-

Quadro 3. Reação de mudas de pé franco de limão Galego quando inoculadas com isolados fracos e fortes do vírus da tristeza por intermédio do vetor

Isolados nº	Plantas fontes de vírus	Reações de tristeza representadas por sintomas foliares (s) e crescimento (cr) induzidas pelas fontes de vírus indicadas em mudas de pé franco de limão Galego 6 meses após a inoculação		
		s	cr	
Fracos	11	Pera	5,0 ^a	1,0
	16	"	5,0	1,0
	19	"	3,0	2,5
	21	"	4,0	1,5
	28	"	3,0	2,5
	67	"	5,0	1,0
	79	"	4,0	1,5
	85	"	4,0	1,1
	118	"	4,0	1,5
	137	"	5,0	1,0
	140	"	4,0	1,0
	150	"	3,5	1,5
Media			4,1	1,4
Fracos	35	Galego	1,2	3,0
	40	"	1,5	4,5
	42	"	1,6	4,5
	72	"	2,0	3,5
	82	"	1,7	3,5
	128	"	2,0	3,0
	141	"	1,0	4,5
	142	"	1,0	4,0
Media			1,5	3,7
Fracos	80	Grapefruit	2,0	2,0
	146	"	2,6	2,0
	Media		2,3	2,0
Severos	12	Pera	5,0	1,0
	94	"	5,0	1,5
	120	"	5,0	1,0
	138	"	5,0	1,0
	Barão		5,0	1,0
	Media		5,0	1,1
Severo	83	Galego	4,0	1,0
Severo	135	Grapefruit	5,0	1,0
Controles não inoculados			0,0	5,0

^a Números no quadro representam médias baseadas em 3 plantas

ter plantas premunizadas com os isolados fracos do vírus da tristeza, foi efetuada uma série de estudos que visavam: (a) comparar a inoculação dos porta-enxertos, precedendo a enxertia de gemas sadias; (b) a inoculação do porta-enxerto simultânea à enxertia de gemas sadias, e (c) a enxertia de gemas já infetadas pelos isolados.

Três grupos de porta-enxertos, cada um constituído por mudas de limão Cravo, laranja Caipira e tangerina Cleópatra foram tratados como segue: (a) o primeiro grupo foi inoculado por enxertia com 5 isolados fracos (nº 40, 42, 50, 130 e 141) e 3 isolados fortes (nº 33, 94 e 83) do vírus da tristeza. Cada isolado foi inoculado em 3 plantas de cada um dos porta-enxertos utilizados, num total de 9 plantas. Dois meses mais tarde, esses porta-enxertos foram enxertados com gemas de clones nucelares novos sadios, obtidos das plantas de limão Galego, crescendo na casa de vegetação, colocando-se a borbulha acima da usada para inoculação; (b) o segundo grupo foi inoculado também por enxertia com 3 isolados fracos (nº 40, 42 e 50) e dois isolados fortes (33 e 94), sendo também cada isolado inoculado em 3 plantas de cada tipo de porta-enxerto. Simultaneamente à inoculação, foram efetuadas as enxertias com gemas dos clones nucelares novos; (c) finalmente o terceiro grupo foi enxertado com gemas dos clones nucelares mencionados, já infetadas com os 5 isolados fracos e 3 fortes mencionados em (a).

No quadro 4 acham-se combinados os dados obtidos das plantas inoculadas das três maneiras, quando as mesmas contavam cerca de 3 anos e meio de idade. Por essa tabela podemos verificar que, praticamente, não houve diferença nas reações obtidas, quer os porta-enxertos tivessem sido inoculados previamente, simultaneamente à enxertia, quer enxertados com gemas portadoras do vírus. Por outro lado, podemos verificar que houve diferença muito acentuada entre o grupo de plantas que recebeu os isolados fracos e o que recebeu os isolados fortes, sendo o desenvolvimento das plantas inoculadas com os isolados fracos muito superior ao segundo.

Quadro 4. Reações comparativas induzidas por isolados fracos e fortes do vírus da tristeza em copas de limão Galego inoculadas por três métodos

Isolado	Reações médias de sintomas foliares (s), caneluras (c) e crescimento (cr) observadas em copas de limão Galego inoculadas pelo vírus da tristeza como indicado abaixo três anos após a inoculação									
	Porta-enxerto inoculado antes da enxertia			Porta-enxerto inoculado e enxerto simultaneamente			Gemas já infetadas por época da enxertia			
	s	c	cr	s	c	cr	s	c	cr	
Fraco	40	1,0 ¹	1,0	4,8	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,7
	42	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,2	1,0	1,0	4,5
	50	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,5	1,0	1,3	4,8
	130	1,0	1,5	3,9	-	-	-	2,0	1,5	4,0
	141	1,0	1,0	4,0	-	-	-	1,0	1,0	3,7
Média	1,0	1,1	4,4	1,0	1,0	4,5	1,2	1,2	4,3	
Severo	33	4,0	4,4	2,0	3,5	3,0	2,5	4,0	3,5	1,0
	94	4,0	3,2	1,9	3,5	3,5	2,0	3,7	3,0	1,3
	83	3,7	4,0	2,2	-	-	-	4,0	4,0	2,0
Média	3,9	3,9	2,0	3,5	3,2	2,2	3,9	3,5	1,4	

¹Valores no quadro representam médias baseadas em 9 plantas

E. Tentativas preliminares para avaliar o valor de proteção de isolados fracos do vírus da tristeza

1. Determinação através da inoculação com o vetor, utilizando plantas jovens

Resultados concretos sobre o valor da premunização com estirpes ou isolados fracos, no controle dos danos induzidos por estirpes severas de tristeza, só poderiam ser obtidos nos experimentos de premunização de campo, após diversos anos de exposição à inoculação natural. Julgou-se que uma indicação mais rápida do efeito da proteção de isolados fracos do vírus da tristeza poderia ser obtida, se esses estudos fossem efetuados com mudinhas jovens de limão Galego premunizadas e superinoculadas por intermédio do pulgão preto dos citros, e mantidas na casa de vegetação. Dessa maneira, seria possível estudar a premunização sob condições controladas, isto é, superinocular as plantas uma vez premunizadas com desafiantes conhecidos. Ademais, a superinoculação poderia ser feita de uma maneira mais eficiente.

A premunização das plantinhas de pé franco de Galego, foi feita poucos dias após a sua germinação, com 10 isolados considerados como pertencentes ao grupo dos mais fracos, provenientes de limão Galego, existentes na coleção da Seção de Virologia. Os afídeos usados na premunização tinham tido um período de aquisição nas plantas fontes de vírus, conforme já descrito anteriormente, sendo utilizados 10 - 15 insetos para inocular cada planta.

As superinoculações com os isolados desafiantes foram efetuadas dois meses após as plantas terem sido premunizadas com os isolados fracos, utilizando-se para isso, em média, 30 insetos colonizados nas fontes de isolados fortes do vírus. Visando aproximar-se às condições do experimento de campo, onde as plantas de citros estavam expostas à infecção natural por mais de uma estirpe do vírus da tristeza, as superinoculações desafiantes foram efetuadas com 3 isolados reconhecidamente severos, que foram sucessivamente inoculados em cada uma das plantas premunizadas a serem desafiadas.

No quadro 5, acham-se os valores representativos das reações

Quadro 5. Comparação sob condições de casa de vegetação do efeito de proteção de isolados fracos selecionados do vírus da tristeza inoculados em plantinhas de pé franco de limão Galego subsequentemente superinoculadas com isolados fortes do vírus

Origem e número do isolado	Reações de tristeza representadas por sintomas foliares (s) caneluras (c) e crescimento (cr) induzidas em mudinhas de limão Galego da maneira indicada									
	Premunizada			Premunizada e desafiada			Somente desafiada			
	s	c	cr	s	c	cr	s	c	cr	
Fracos	36	1,0 ^a	1,0	4,2	1,0	1,0	3,7			
	37	1,0	1,0	4,0	1,3	1,3	3,3			
	38	1,0	1,0	4,5	1,0	1,0	3,4			
	39	1,5	1,0	4,5	1,5	1,0	3,5			
	40	1,0	1,0	4,5	1,5	1,0	3,4			
	42	1,0	1,0	4,2	1,0	1,0	3,7			
	100	1,5	1,0	3,0	3,5	3,0	2,0			
	141	1,2	1,0	3,5	2,0	3,0	3,0			
	142	1,0	1,0	4,5	1,0	3,0	3,7			
	152	1,2	1,0	4,5	1,5	1,0	3,5			
Média	1,1	1,0	4,1	1,5	1,6	3,3				
Severos	12	4,0	5,0	1,0						
	83	5,0	5,0	1,0						
	94	5,0	5,0	1,0						
Média	4,7	5,0	1,0				5,0 ^b	5,0 ^c	1,0 ^d	
Controles não inoculados	0,0	0,0	0,5							

^aValores no quadro representam médias baseadas em 3 plantas

^{b,c,d}Valores representativos das reações de plantas testemunhas inoculadas somente com os 3 desafiantes ao mesmo tempo em que se efetuaram as superinoculações desafiantes.

induzidas pelos isolados em questão, nas plantas de limão Galego, quando essas contavam cerca de um ano de idade. Verifica-se que os isolados fracos testados, de uma maneira geral, protegeram as mudas contra os danos causados pelas estirpes severas. Comparando-se as médias do grupo premunizado ao daquele premunizado e desafiado, verifica-se que este último apresentou as reações à tristeza um pouco mais acentuadas do que o somente premunizado. Também o crescimento efetuado, de uma maneira geral, foi menor nas plantas premunizadas e subsequentemente desafiadas.

A diferença entre o grupo premunizado e aquele premunizado e desafiado poderia ter resultado de uma "quebra" da proteção conferida pelo primeiro vírus, com o consequente estabelecimento do isolado desafiante na planta, ou, então, devido a um efeito depressivo da alimentação dos insetos, injúria devida às pulverizações e, assim por diante, fatores que atuariam diretamente no crescimento da planta. Assim, numa tentativa de estabelecer esses pontos, efetuaram-se recuperações do vírus de plantas premunizadas com cinco dos isolados, respectivamente os de nºs 36, 38, 40, 42, e 141 e de plantas paralelas que tinham sido superinoculadas, para mudas sadias de pé franco de limão Galego, com cerca de 6 meses de idade, por intermédio da enxertia de 2 gemas.

Observações efetuadas nas plantas de Galego, decorrido cerca de um ano e meio após as inoculações terem sido efetuadas, mostraram que das cinco comparações efetuadas, em três casos, isto é, plantas com os isolados nºs 40, 42 e 141, os sintomas de tristeza apresentados pelos Galegos inoculados a partir de plantas premunizadas e a seguir desafiadas, foram ligeiramente mais acentuados do que aqueles induzidos nos Galegos, inoculados a partir das plantas somente premunizadas. Nos outros dois casos (isolados nº 36 e 38) as inoculações dos dois grupos induziram reações semelhantes.

2. Tentativas visando determinar o valor de proteção através da inoculação simultânea com isolados fortes do vírus

A mistura de um isolado fraco e um forte do vírus da tristeza, introduzidos simultaneamente na mesma planta, induz sintomas que ten

dem a ser intermediários aos dos dois componentes (Costa, 1956). Com base nesse conhecimento foi formulada a hipótese de que, talvez, a reação resultante da inoculação simultânea do isolado fraco e do forte poderia ser usada como indicação do efeito protetivo que o isolado fraco conferiria contra o forte, quando o primeiro fosse inoculado na planta, e esta posteriormente exposta à infecção pelo segundo. Em outras palavras, se a mistura de um isolado fraco e um forte levasse a uma reação mais próxima da reação do isolado fraco sozinho, isso seria considerado como indicação de melhor valor protetivo. Se a reação fosse intermediária ou mais próxima à do isolado forte sozinho, isto então seria indicação de pouca ou nenhuma proteção.

Num teste para verificar essa hipótese, mudas de pé franco de limão Galego em ponto de enxertia, criadas dentro da casa de vegetação e transplantadas para um viveiro experimental pouco antes do início dos testes, foram inoculadas simultaneamente com isolados fracos e fortes do vírus da tristeza. Quatro isolados fracos selecionados, respectivamente de nºs 34, 40, 50 e 141, vindos de limão Galego, foram testados individualmente com cada um de três isolados de nºs 12, 61 e 104, vindos de fontes de laranja Pera, que produzem sintomas fortes em Galego. Paralelamente, cada um dos quatro isolados fracos foi utilizado para premunizar outras mudas comparáveis. Estas foram superinoculadas cerca de 2 meses após a inoculação de premunização, separadamente, com cada um dos isolados fortes.

Os resultados obtidos de plantas simultaneamente inoculadas com um isolado fraco e um forte, aparentemente não estão correlacionadas com o valor protetivo do fraco em relação ao forte desafiante. Tal fato pode ser observado no quadro 6, no qual estão representados valores atribuídos às reações induzidas em plantas tratadas conforme mencionado acima. O isolado fraco nº 40, mostrou efeitos de proteção bem definidos, quando foi inoculado antes da superinoculação com os fortes. No entanto, esse efeito protetivo não foi observado quando as inoculações foram simultâneas. Já no caso das combinações em que entrou o isolado nº 141, as plantas inoculadas simultaneamente apresentaram desenvolvimento ligeiramente superior ao daquelas em que o isolado nº 40 entrava como um dos componentes. Em relação à prote-

Quadro 5. Comparação da reação de tristeza induzida por isolados fracos e severos do vírus quando inoculados simultaneamente, com aquela obtida nos testes de proteção utilizando os mesmos componentes

Isolados nº	Sintomas foliares (s), caneluras (c) e crescimento (cr) observados nas mudas de pé franco de limão Galego inoculados individuais ou combinados conforme indicado abaixo											
	s				c				cr			
	Fr. ¹	Ft. ²	M ³	P ⁴	Fr.	Ft.	M	P	Fr.	Ft.	M	P
34, 12	1,3 ^a	4,0	4,0	2,7	2,0	4,0	2,7	2,5	4,2	1,9	1,5	3,2
34, 61	1,3	4,2	3,5	2,0	2,0	5,0	3,0	2,0	4,2	2,1	2,0	2,7
34, 104	1,3	3,4	4,0	3,0	2,0	3,7	2,0	2,5	4,2	2,1	2,0	2,7
Media	1,3	3,9	3,8	2,6	2,0	4,2	2,6	2,3	4,2	2,0	1,8	2,9
40, 12	1,2	4,0	3,5	1,0	1,0	4,0	2,2	1,0	4,5	1,9	2,5	4,0
40, 61	1,2	4,2	3,1	-	1,0	5,0	3,0	-	4,5	2,1	2,3	-
40, 104	1,2	3,4	3,5	1,0	1,0	3,7	2,0	1,0	4,5	2,1	2,0	4,7
Media	1,2	3,9	3,4	1,0	1,0	4,2	2,4	1,0	4,5	2,0	2,3	4,3
50, 12	2,2	4,0	3,0	2,5	2,0	4,0	3,0	1,0	3,7	1,9	2,5	3,5
50, 61	2,2	4,2	3,0	-	2,0	5,0	1,5	-	3,7	2,1	3,0	-
50, 104	2,2	3,4	3,4	2,0	2,0	3,7	4,0	1,0	3,7	2,1	2,5	3,5
Media	2,2	3,9	3,1	2,2	2,0	4,2	2,8	1,0	3,7	2,0	2,7	3,5
141, 12	1,0	4,0	2,7	2,0	1,0	4,0	3,0	1,0	4,3	1,9	3,3	4,0
141, 61	1,0	4,2	2,5	2,0	1,0	5,0	1,5	1,0	4,3	2,1	3,2	3,5
141, 104	1,0	3,4	2,5	1,5	1,0	3,7	1,0	1,0	4,3	2,1	3,2	3,7
Media	1,0	3,9	2,6	1,8	1,0	4,2	1,8	1,0	4,3	2,0	3,2	3,7
5												
Contr., 12	-	5,0 ^b	-	-	-	2,5 ^c	-	-	-	2,0 ^d	-	-
Contr., 61	-	4,0	-	-	-	3,0	-	-	-	2,5	-	-
Contr., 104	-	2,5	-	-	-	2,0	-	-	-	2,7	-	-
Media	-	3,8	-	-	-	2,5	-	-	-	2,4	-	-

¹Fr. - representa a reação individual dos isolados fracos

²Ft. - representa a reação individual dos isolados severos

³M - representa a mistura simultânea dos isolados

⁴P - corresponde aos dados dos testes de proteção

⁵Contr. - os valores atribuídos aos controles sadios foram: (s) 0; (c) 0 e (cr) 5,0

^a - Valores no quadro representam médias baseadas em 5 plantas

^{b,c,d} valores representativos das reações das plantas controles inoculadas com os isolados severos ao mesmo tempo em que se efetuaram as superinoculações desafiantes nos testes de proteção.

ção, porém, o isolado nº 141 aparentemente não foi tão eficiente como o nº 40 nessa determinação.

F. Comportamento em plantação experimental de plantas premunizadas expostas à infecção natural, superinoculadas por intermédio de união de tecido ou pelo inseto vetor

Os testes de campo, relatados a seguir, constituem a parte mais importante dos estudos sobre a interferência protetiva entre es tirpes do vírus da tristeza apresentados na presente tese.

O experimento de interferência em questão foi iniciado através do preparo de um viveiro experimental constituído de três lotes de porta-enxertos, respectivamente formados por: limão Cravo, laranja Caipira e tangerina Cleópatra, obtidas de sementeiras em ponto de transplante para viveiro, da Estação Experimental de Limeira. As mu das dos três tipos de porta-enxertos foram plantadas no campo em can teiros experimentais de 5 plantas, no espaçamento de 0,5 m entre plantas, 1 m entre canteiros e 1,2 m entre linhas. Cada canteiro de cinco plantas constituiu a unidade básica utilizada nos testes. Pul verizações semanais com inseticidas sistêmicos foram efetuadas para evitar a formação de colônias do pulgão preto dos citros nas plantas, até as mesmas terem sido inoculadas com os isolados do vírus da tris teza selecionados como premunizadores.

As inoculações de premunização foram efetuadas por meio de enxertia, tão logo os porta-enxertos permitiram que esta fosse feita; no entanto, nessa ocasião, os cavalos tinham ainda diâmetro inferior ao normalmente utilizado na enxertia. As enxertias de inoculação fo ra m feitas numa altura de 10-15 cm acima do solo. Com base no desenvo l vimento realizado nos cavalos tolerantes, selecionaram-se 43 isolados fracos considerados os melhores dentre os 125 coletados, e 5 severos dentre os 25 coletados, para inocular os porta-enxertos. Dos 43 iso l lados considerados fracos, 31 foram obtidos de fontes de laranja Pera⁴, 10 de limão Galego e 2 de grapefruit. Dos isolados fortes, 2

⁴Conforme já mencionado em outra parte dessa tese, o trabalho de pre m unização foi conduzido paralelamente também com a laranja Pera e com grapefruit. Como dos três tipos de citros estudados a laranja Pera era a mais importante sob o ponto de vista comercial, procurou-se utilizar um maior número de isolados vindos dessa variedade.

vieram de fontes de laranja Pera, 2 de limão Galego e 1 de grapefruit.

O limão Cravo se desenvolveu mais rapidamente do que os outros dois porta-enxertos, podendo por isso ser inoculado em primeiro lugar. A inoculação da laranja Caipira e da tangerina Cleopatra foi iniciada dois meses após. Todas as inoculações foram efetuadas no período de setembro de 1963 a janeiro de 1964.

Uma fileira de 5 plantas de cada um dos porta-enxertos foi inoculada com cada fonte de vírus, utilizando-se para isso, em média, 2 borbulhas por planta. Dessa maneira, cada isolado estava repetido 3 vezes (cada um numa unidade básica de cada um dos três porta-enxertos). Seis fileiras (duas para cada porta-enxerto) foram mantidas não inoculadas, constituindo os controles. Essas foram enxertadas com duas gemas retiradas da própria planta.

Um mês após a inoculação ter sido efetuada, enxertaram-se os porta-enxertos (inoculados e controles) a uma altura de 20 cm acima do solo com borbulhas sadias provenientes de cinco clones nucelares novos de limão Galego (Fig. 1-A). O clone nº 1 forneceu borbulhas para todos os primeiros porta-enxertos de cada fileira básica de cinco plantas; o clone nº 2, borbulhas para o 2º porta-enxerto da fileira e assim por diante, até totalizar as 5 combinações que constituíram a unidade básica do experimento. O pegamento das borbulhas portadoras de vírus, assim como aquelas provenientes dos clones nucelares novos, foi excelente (90%) sendo os repasses efetuados até que todos os porta-enxertos tivessem todas as enxertias pegas. Permitiu-se que o crescimento das borbulhas portadoras de vírus (inóculo) atingisse aproximadamente 20 cm após o que foram cortadas e cegadas.

Deixou-se que as borbulhas dos clones novos crescessem normalmente, sendo a planta⁵ resultante⁵ tratada⁵ da mesma maneira que plantas preparadas em viveiro; a poda de formação foi efetuada assim que as plantas alcançaram o diâmetro adequado, permitindo-se a seguir o desenvolvimento de 3 ou 4 ramos para formação da copa. Quando as plantas atingiram o tamanho apropriado, foram transplantadas para o local definitivo, no próprio Centro Experimental de Campinas, num espaçamento de 4 m x

5 m, sendo que, em primeiro lugar, foram transplantadas as combinações enxertadas em limão Cravo, seguidas daquelas enxertadas em Cai-pira, e, finalmente, as enxertadas em tangerina Cleopatra. O transplante de todas as mudas foi efetuado no período de fevereiro a março de 1965. Dadas as condições favoráveis na época do plantio, com chuvas contínuas, todas as plantas transplantadas pegaram.

Decorrido cerca de um ano após as plantas terem sido transplantadas para o local definitivo, trataram-se as combinações copa-porta-enxerto isolado de tristeza como segue: (a) a quarta planta de cada unidade básica, constituída (como já mencionado) por cinco plantas, foi superinoculada por intermédio de união de tecido, utilizando-se três gemas por planta (uma enxertada em cada ramo principal, Fig. 1-C), obtidas de uma planta de clone nucelar de limão Galego, apresentando fortes sintomas de injúria induzida pelo vírus da tristeza, existente na Estação Experimental de Limeira; (b) a quinta planta da fileira foi superinoculada por intermédio de um mínimo de 50 indivíduos do pulgão preto dos citros, obtidos de colônias naturalmente formadas nas brotações novas de árvores de laranja Barão (C. sinensis (L.) Osbeck), sabidamente portadoras de isolados severos do vírus da tristeza, que já tinham sido utilizadas em trabalhos anteriores; e (c) as três primeiras plantas de cada unidade básica permaneceram somente premunizadas, ficando expostas à infecção natural.

1. Reação à tristeza (sintomas foliares, de caneluras e crescimento)

Num período de 6 anos, foram dados os tratos culturais usuais de um pomar de citros ao experimento de premunização. Foram feitos protocolos frequentes nos 3 primeiros anos e, pelo menos uma vez, cada 6 meses, nos anos seguintes. As observações periódicas mostraram, desde o início, o melhor desenvolvimento das copas de limão Galego premunizadas com isolados fracos vindos de Galego, quando comparadas com os controles ou com os clones premunizados com isolados considerados fracos vindos de outras fontes. Esses protocolos periódicos mostraram, ainda, que a reação das copas de limão Galego a um mesmo

isolado do vírus da tristeza foi semelhante nos três tipos de porta-enxertos utilizados. Pôde ser observado também, desde o início, que, de uma maneira geral, não houve diferença na reação à tristeza entre os 5 clones individuais que compunham cada unidade básica inoculada de cada um dos 3 porta-enxertos. Dessa maneira, os resultados finais da avaliação do grau de tristeza, de cada uma das combinações copa de Galego e porta-enxerto, foram agrupados independentemente do porta-enxerto, por origem dos isolados de tristeza, no quadro 7. Nesse quadro, acham-se representados separadamente os valores atribuídos à reação à tristeza representados pela sintomatologia foliar, caneluras e crescimento. Esses dados foram obtidos 8 anos após o início dos experimentos e 5 anos após a superinoculação. Por essa época (1971), foi iniciado o arrancamento das plantas piores do experimento, por se considerar que as mesmas não forneceriam mais in formações, sendo somente mantidas as fileiras com bom desenvolvimento.

Os grupos de clones de limão Galego que foram premunizados com isolados fracos, obtidos de fontes de limão Galego, fizeram o melhor crescimento (Fig. 3-B), mostrando apenas leves sintomas foliares e vestígios de caneluras. Fazendo-se um exame individual das reações aos isolados desse grupo, observamos que as mais fracas foram obtidas para os clones premunizados com os de nºs 40, 50 e 141. O grupo de clones premunizados com isolados fracos provenientes de grapefruit, apresentaram sintomas foliares e de caneluras acentuados, e crescimento inferior ao dos clones premunizados com isolados fracos vindos de plantas de limão Galego. Individualmente falando, foi o isolado nº 80 desse grupo que permitiu o melhor desenvolvimento aos clones de Galego.

Os isolados considerados fracos, provenientes de fontes de laranja Pera, reduziram consideravelmente o crescimento dos clones de Galego por eles infetados. Essa redução foi apenas ligeiramente inferior à dos clones infetados com os isolados severos, e comparável ao crescimento efetuado pelos controles não inoculados. O exame individual desse grupo revelou que clones premunizados com alguns isolados mostraram, como tendência, uma reação à tristeza um pouco mais

Quadro 7. Reação de copas de limão Galego premunizadas com o vírus da tristeza, expostas à infecção natural ou superinoculadas com isolados severos do vírus

Número do isolado	Reações médias de sintomas foliares (s), caneluras (c) e crescimento (cr) observadas nas plantas de limão Galego tratadas conforme indicado									
	Premunizadas ^a			Premunizadas ^b + desafiante 1			Premunizadas ^c + desafiante 2			
	s	c	cr	s	c	cr	s	c	cr	
Galego fraco	35	1,0	1,2	4,1	1,0	1,0	4,0	1,0	1,0	4,2
	40	1,0	1,1	4,8	1,0	1,0	5,0	1,0	1,0	5,0
	42	1,1	1,1	4,8	1,0	1,0	4,5	1,3	1,7	4,2
	50	1,0	1,0	4,8	1,0	1,0	4,7	1,3	1,5	5,0
	72	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,7
	86	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0	3,5
	128	1,0	1,1	4,2	1,0	1,0	4,7	1,0	1,0	4,5
	130	1,0	1,0	4,6	1,0	1,0	4,5	1,0	1,0	4,5
	141	1,0	1,0	4,7	1,0	1,2	4,7	1,0	1,0	4,8
	142	1,0	1,0	4,6	1,0	1,0	4,5	1,0	1,0	4,7
Media	1,1	1,1	4,4	1,1	1,1	4,4	1,2	1,2	4,5	
Grapft fraco	80	1,5	1,0	3,0	1,3	1,0	3,0	1,5	1,0	3,5
	146	3,5	3,7	2,6	3,0	4,0	3,0	3,0	4,0	3,0
	Media	2,5	2,3	2,8	2,1	2,5	3,0	2,2	2,5	3,2
Pera severo	33	3,5	4,0	1,8	3,3	4,0	2,2	3,0	4,0	2,0
	94	3,1	3,9	2,1	3,0	4,0	2,3	3,0	4,0	2,3
	Media	3,3	3,9	1,9	3,1	4,0	2,2	3,0	4,0	2,1
Galego severo	51	2,4	3,0	3,9	2,2	2,7	3,8	2,3	3,0	3,5
	83	4,0	3,9	1,7	3,5	3,5	2,0	4,0	4,5	1,7
	Media	3,2	3,4	2,8	2,8	3,1	2,9	3,1	3,7	2,6
Grapft severo	135	3,6	4,0	1,2	4,0	4,0	1,0	3,5	3,5	1,5
Controles não inoculados expostos à infecção natural		3,4	3,5	2,1						
Controle inoculado desafiante ¹					3,0	4,0	2,0			
Controle inoculado desafiante ²								3,3	4,0	2,0

^aValores no quadro representam médias baseadas em 9 plantas

^b e ^cValores representam medias baseadas em 3 plantas

Quadro 7 - continuação

Número do isolado	Reações médias de sintomas foliares (s), ca- neluras (c) e crescimento (cr) observadas nas plantas de limão Galego tratadas confor- me indicado								
	Premunizadas			Premunizadas + desafiante 1			Premunizadas + desafiante 2		
	s	c	cr	s	c	cr	s	c	cr
7	3,7	4,0	2,4	3,0	3,5	2,0	3,3	3,7	2,8
9	2,9	3,7	3,0	3,7	3,7	2,3	3,0	4,0	2,8
10	2,8	3,4	2,8	2,2	2,5	3,2	2,5	2,5	3,3
11	2,9	3,2	3,0	2,8	3,3	2,8	2,8	3,2	2,7
19	2,2	3,0	2,8	2,0	3,5	3,5	2,2	2,3	3,0
21	2,9	3,2	2,5	3,0	3,5	1,7	2,3	3,3	2,7
58	3,0	3,7	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,5	2,7
61	2,9	3,8	2,6	3,2	4,0	2,5	3,2	3,7	2,8
66	2,4	3,4	3,2	2,7	3,3	3,3	2,7	3,2	3,2
67	3,1	3,4	2,2	2,7	3,0	2,3	2,5	3,3	2,7
79	2,6	3,1	2,7	2,5	3,5	2,7	2,7	3,0	2,7
84	4,0	3,3	2,6	4,0	3,0	2,5	3,0	3,0	2,5
92	3,0	3,6	2,7	2,5	4,0	3,0	3,2	3,5	2,5
102	3,5	4,0	2,5	3,0	3,0	3,0	2,0	3,0	3,0
103	3,0	4,0	1,5	3,0	3,0	1,5	3,0	4,0	1,5
104	3,5	4,0	1,4	3,0	4,0	1,5	4,0	4,0	2,0
105	4,0	4,0	2,2	4,0	4,0	2,0	3,0	4,0	2,5
106	4,0	4,0	2,0	3,0	4,0	2,5	2,0	2,0	3,0
107	3,0	3,7	2,5	2,5	3,0	3,0	-	-	-
108	3,0	3,0	3,2	2,5	3,0	3,5	3,0	4,0	2,5
109	3,7	3,7	2,3	4,0	4,0	2,0	3,0	3,0	2,5
110	3,7	4,0	1,3	3,0	3,0	1,5	4,0	3,0	1,5
111	3,2	3,3	2,8	4,0	4,0	2,5	4,0	4,0	2,5
112	2,8	3,7	3,5	3,0	4,0	3,0	3,0	4,0	3,0
114	4,0	4,0	1,8	4,0	4,0	2,5	5,0	4,0	2,0
115	3,5	3,7	2,3	3,0	4,0	2,5	3,0	4,0	2,5
116	3,0	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,5
117	3,7	3,7	2,2	3,0	4,0	2,5	4,0	4,0	2,0
140	2,9	3,6	2,3	3,0	3,0	3,0	2,7	3,5	2,7
Pera ovo	3,1	3,6	2,7	2,7	3,2	2,7	3,0	4,0	3,5
Pera comprida	3,7	4,0	2,3	4,0	4,0	2,0	3,0	4,0	2,5
Média	3,2	3,6	2,5	3,1	3,5	2,5	3,0	3,5	2,6

fraca do que a da média do grupo. Esse foi principalmente o caso dos clones premunizados com os isolados nº 19, 66, 112 e 116. De uma maneira geral, essa ligeira diferença em reação se fez sentir nos sintomas foliares e no crescimento. Na sintomatologia de caneluras, por sua vez, não houve grandes diferenças. É necessário mencionar que, mesmo esses isolados mais fracos de Pera, induziram sintomas de tristeza bastante severos nas plantas por eles infetadas.

Examinando-se as médias das reações apresentadas pelas plantas dos três tratamentos, isto é, desafiadas por união de tecido, por vetores e aqueles em que as plantas permaneceram somente premunizadas e expostas à infecção natural, verificou-se que praticamente não houve diferença entre os mesmos. Esse fato pode ser observado principalmente pela avaliação do comportamento dos clones premunizados com isolados fracos de limão Galego, para os quais o desenvolvimento dos clones desafiados foi tão bom como o dos somente premunizados e expostos à infecção natural. Já no caso dos clones premunizados com os demais isolados, salvo algumas exceções, tal observação não pode ser feita, pois esses isolados, por si só, induziram reações de severidade comparável àquelas apresentadas pelos controles inoculados com os desafiantes.

As plantas controles não premunizadas, expostas à infecção natural, infetaram-se em diferentes épocas com o vírus da tristeza. Embora algumas tivessem se infetado já na fase de viveiro, declinando completamente pouco tempo após terem sido transplantadas para o local definitivo, a maioria se infetou após o transplante. Por ocasião da coleta dos dados que formaram o quadro em estudo, todos os controles estavam infetados com o vírus da tristeza, e a reação média dos mesmos, tomados como um grupo, era bastante severa. Duas plantas controles apresentaram reação à tristeza comparável à das plantas premunizadas com isolados fracos de limão Galego, não estando os valores dessas plantas incluídos no quadro 7, por não serem considerados representativos.

Foi verificado pela reação característica induzida no porta-enxerto de limão Cravo (Moreira, 1955) que algumas das plantas que forneceram os isolados estavam infetadas pelo vírus da exocorte.

Plantas infetadas com isolados de tristeza considerados fracos vindos das fontes de laranja Pera, mas que estavam contaminados com o vírus da exocorte, mostraram sintomas de declínio mais acentuados do que aqueles infetados com isolados não contaminados, quando em porta-enxertos de limão Cravo. Essa diferença não foi notada quando a comparação foi efetuada em plantas enxertadas em porta-enxertos de Caipira e Cleópatra, que são tolerantes ao vírus da exocorte.

As combinações inoculadas com o isolado nº 80, em borbulhas de grapefruit contaminadas com o vírus da exocorte, fizeram crescimento superior ao da maioria das plantas do grupo infetado com isolados fracos provenientes de laranja Pera, mas inferior ao crescimento efetuado pelos clones de Galego premunizados com esse isolado de grapefruit, enxertado nos outros dois porta-enxertos. No caso do isolado severo de grapefruit nº 135, igualmente contaminado com o vírus da exocorte, não foi possível constatar diferenças entre os clones enxertados em Cravo e aqueles em Caipira e Cleópatra, tal a severidade dos sintomas induzidos pelo isolado de tristeza em questão.

A reação das copas de Galego a um isolado de tristeza foi semelhante em qualquer um dos três porta-enxertos utilizados. No entanto, copas premunizadas de limão Galego fizeram maior crescimento no porta-enxerto de laranja Caipira do que em limão Cravo e tangerina Cleópatra. O crescimento das copas nos dois últimos porta-enxertos foi comparável.

2. Efeito de premunização sobre a produção dos clones de limão Galego (resultados de 5 colheitas)

Embora, como já mencionado no capítulo anterior, o bom desenvolvimento das copas de limão Galego premunizadas com os isolados fracos de Galego permitisse antever, desde o início, a superioridade desses quando comparados com os clones dos outros tratamentos, em última análise, a medida que realmente iria confirmar a superioridade de um clone premunizado com um determinado isolado fraco seria a mensuração de sua produção num período de vários anos.

Os dados sobre a produção das plantas do experimento de premunização puderam ser obtidos a partir de 1967, quando as plantas contavam com dois anos e meio de idade no local definitivo.

A determinação da produção de cada árvore individual foi efetuada, colhendo-se os frutos que foram a seguir contados e pesados. Frutos com um diâmetro inferior a 2,5 - 3 cm não foram computados, não sendo incluídos nos dados. Árvores com menos de 10 frutos não eram colhidas, e a produção era considerada nula.

Como não houve diferença significativa na produção das plantas somente premunizadas e daquelas superinoculadas, os dados de produção das cinco plantas de cada um dos três lotes básicos, por isolados, foram computados na determinação da média.

Os dados de produção por isolado e por ano estão no quadro 8. As médias dos totais de cinco anos de cada grupo de isolados acham-se representadas no gráfico 1. Examinando-se os dados referentes às médias obtidas para os diferentes grupos, observa-se que os clones de Galego premunizados com isolados fracos, produziram em peso cerca de 7 vezes mais do que as plantas controles não premunizadas. No grupo premunizado com isolados fracos vindos de Galego, clones premunizados com três isolados, respectivamente os de nºs 141, 40 e 128, tiveram produção destacada daqueles premunizados com os demais isolados, produzindo em média 47% a mais (quadro 8).

Os clones premunizados com gemas portadoras do isolado nº 80, contaminado com o vírus da exocorte, tiveram uma produção relativamente boa, próxima da produção obtida de alguns dos clones premunizados com isolados fracos de limão Galego. Convém mencionar que, no caso dos clones inoculados com essa mistura, enxertados em limão Cravo, verificou-se de uma maneira geral, um amadurecimento antecipado dos frutos em relação aos dos demais clones. Esse fato não pôde ser observado nos outros clones infetados com a exocorte, devido à diminuta produção havida, decorrente do declínio acentuado das plantas.

A produção dos controles foi bastante baixa, mas superior à do grupo premunizado com os isolados considerados fracos, vindos de laranja Pera e dos grupos premunizados com os isolados fortes. As duas plantas controles mencionadas anteriormente que tiveram o seu desenvolvimento comparável ao de clones premunizados com isolados fracos vindos de limão Galego, também tiveram produções comparáveis às daqueles clones.

Quadro 8. Produção de plantas de limão Galego premunizadas e não premunizadas expostas à infecção natural e superinoculadas com isolados severos do vírus da tristeza em condições de campo

Fonte de vírus	Número de frutos e produção de plantas de limão Galego infectadas conforme indicado												
	nº de frutos						peso em kg						
	1967	1968	1969	1970	1971	Total	1967	1968	1969	1970	1971	Total	
Galego fraco	35	20	34,5	393	564	429	1751	0,5	9,6	11,0	18,4	12,6	52,1
	40	60	51,3	910	740	412	2635	1,8	14,8	23,8	14,4	14,4	78,2
	42	41	46,4	773	648	378	2304	1,1	13,1	19,2	19,3	12,0	64,7
	50	34	50,7	707	728	543	2519	1,0	13,6	18,2	21,4	16,9	71,1
	72	31	32,2	489	675	417	1934	0,7	8,9	12,8	20,4	12,6	55,5
	86	12	12,9	230	374	338	1083	0,3	3,3	6,4	11,5	8,6	30,1
	128	49	46,2	739	895	503	2648	1,5	13,3	20,1	25,1	17,2	77,2
	130	11	33,1	373	544	605	1864	0,3	7,7	9,8	16,4	18,0	52,2
	141	37	45,3	914	1009	578	2991	1,0	12,7	24,7	29,7	18,9	87,0
	142	23	48,2	601	580	496	2182	0,6	12,4	14,8	17,6	15,0	60,4
Média	32	400	613	676	470	2190	0,9	11,0	16,1	20,3	14,6	62,8	
Grapft fraco	80	58	25,6	685	642	362	2003	1,4	6,1	17,0	16,9	10,4	51,8
	146	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Média	29	128	34,2	321	181	1001	0,8	3,0	8,5	8,4	5,2	25,9
Pera severo	33	0	0	0	10	0	10	0	0	0	0,2	0	0,2
	94	0	0	89	42	0	131	0	0	1,7	1,2	0	2,9
	Média	0	0	44	26	0	70	0	0	0,8	0,7	0,0	1,5
Galego severo	51	0	47	244	231	59	581	0	0,9	5,7	6,8	1,4	14,8
	83	0	0	31	0	0	31	0	0	0,7	0	0	0,7
	Média	0	23	137	115	29	306	0	0,4	3,2	3,4	0,7	7,7
Grapft severo	135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Controles não premunizados expostos à infecção natural e superinoculados por tecido e por inseto	23	136	99	107	45	410	0,4	2,7	2,3	2,5	1,3	9,2	

Quadro 8 - continuação

Fonte de vírus	Número de frutos e produção de plantas de limão Galego infectadas conforme indicado											
	Nº de frutos						peso em kg					
	1967	1968	1969	1970	1971	Total	1967	1968	1969	1970	1971	Total
7	0 ^a	0	0	23	0	23	0	0	0	0,7	0	0,7
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	20	80	67	57	224	0	0,3	2,1	1,9	1,4	5,7
11	0	0	12	38	0	50	0	0	0,3	0,9	0	1,2
19	16	150	218	190	291	865	0,3	3,1	5,5	5,9	4,7	19,5
21	0	107	58	122	46	333	0	2,6	1,5	4,0	1,3	9,4
58	0	0	22	19	0	41	0	0	0,5	0,4	0	0,9
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	17	36	141	148	69	411	0,2	0,7	3,2	3,8	1,5	9,4
67	0	0	0	15	0	15	0	0	0	3,7	0	3,7
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92	0	0	0	26	0	26	0	0	0	0,6	0	0,6
102	0	0	61	154	0	215	0	0	1,3	3,4	0	4,7
103	0	0	23	0	0	23	0	0	0,5	0	0	0,5
104	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105	0	0	0	30	0	30	0	0	0	0	0,8	0,8
106	0	160	156	420	175	911	0	3,4	4,2	8,3	5,0	20,9
107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	0	0	109	145	52	306	0	0	2,5	3,2	1,2	6,9
109	0	0	39	0	0	39	0	0	0,7	0	0	0,7
110	0	0	42	0	26	68	0	0	0,9	0	1,4	1,3
111	0	0	29	0	61	90	0	0	0,6	0	1,3	1,9
112	0	0	70	191	14	275	0	0	1,4	3,6	1,0	6,0
114	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
115	0	0	0	109	22	131	0	0	0	3,4	0,4	3,8
116	0	0	51	0	30	81	0	0	1,0	0	0,7	1,7
117	0	0	19	0	0	19	0	0	0,5	0	0	0,5
140	0	0	63	34	23	120	0	0	1,4	1,0	0,5	2,9
Pera ovo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pera comprida	0	15	0	0	0	15	0	0	0,2	0	0	0,2
Média	1	15	39	56	28	139	0,02	0,3	0,9	1,4	0,6	3,3

^aValores no quadro representam médias baseadas em 15 plantas

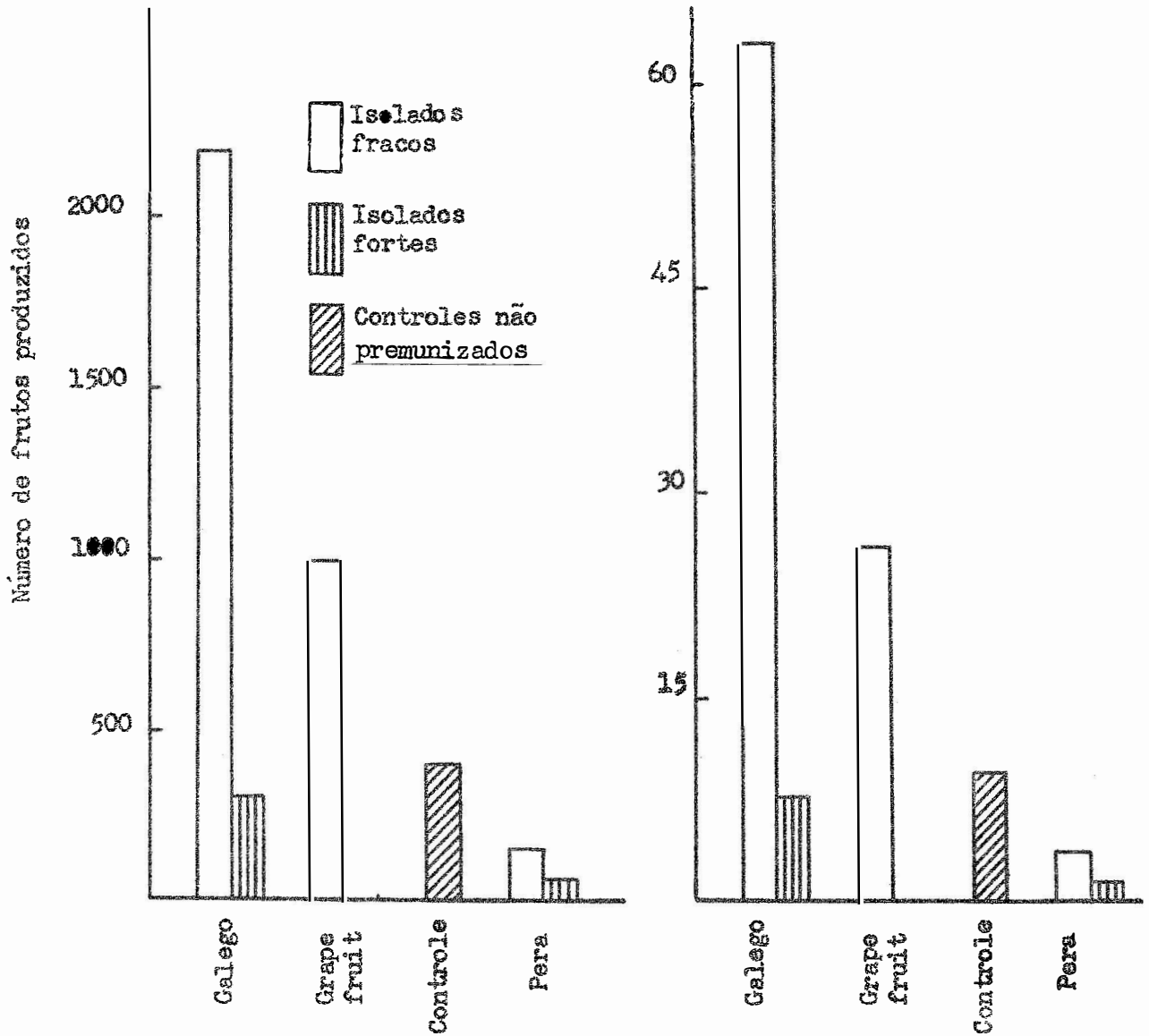


Gráfico 1. Número e peso de frutos em kg correspondente às médias dos totais de cinco anos de colheita de plantas de limão Galego premuni- zadas com os isolados do vírus da tristeza das fontes mencionadas.

O peso médio dos frutos dos clones premunizados com isolados fracos de Galego foi de 29 gramas, e de 22 gramas, o dos não premunizados. Também para os três clones premunizados com os isolados 40, 128 e 141, que mais produziram, foi o peso médio dos frutos maior que o dos não premunizados.

Nos três primeiros anos de colheita a produção dos clones premunizados com o isolado nº 40 foi ligeiramente superior ao daqueles premunizados com o isolado nº 141. Porém a partir do quarto ano de colheita o isolado nº 141 colocou-se em primeiro lugar.

Em média, os clones enxertados em limão Cravo premunizados com isolados fracos vindos de fontes de limão Galego produziram 40% a mais do que clones comparáveis enxertados em laranja Gaipira e 10% a mais do que clones em Cleópatra.

V. COMPORTAMENTO DO MATERIAL DE LIMÃO GALEGO PREMUNIZADO EM ÁREAS CITRÍCOLAS

O desenvolvimento e as produções satisfatórias dos clones de Galego premunizados nas condições de Campinas, tornou de interesse obter dados sobre o comportamento desses em outras regiões do Estado de São Paulo. Com esse objetivo em mente foi iniciado, a partir de 1968, o fornecimento de borbulhas dos clones de limão Galego premunizados com os isolados mais promissores à citricultores interessados. O esquema elaborado foi de fornecer pequena quantidade de gemas a grande número de citricultores, sendo que esses se comprometiam a enxertar, comparativamente, as gemas de Galego premunizadas com isolados fracos recebidas, e gemas dessa variedade provenientes das melhores matrizes existentes nas respectivas regiões. Tal procedimento, além de ser um teste do valor agrônomo para o material premunizado, oferecia a possibilidade de eventualmente permitir a detecção de algum material de outra procedência que fosse superior ao premunizado, podendo ser utilizado como fonte de isolados fracos melhores do que os originalmente utilizados.

Informações periódicas recebidas, bem como inspeções realizadas, têm mostrado que as plantas desses viveiros semi-experimentais, localizados em várias partes do Estado de São Paulo e mesmo em outros Estados do Brasil, formados a partir de gemas obtidas das plantas de limão Galego premunizadas, estão tendo excepcional desenvolvimento (Fig. 4-A e B), superior em todos os casos, ao desenvolvimento do material da mesma variedade de outras procedências, utilizado como controle.

Os clones novos, inicialmente protegidos com os melhores isolados, já sofreram multiplicações sucessivas, havendo plantações que representam 2ª e 3ª perpetuação. Estão fazendo excelente crescimento em, pelo menos, 97% dos casos, conforme verificado em pomares inspecionados.

O comportamento das plantas do ensaio de Campinas e os resultados obtidos com as propagações do material premunizado em viveiro, comparados com propagações de outras procedências, já induziu alguns

citricultores a fazer grandes plantações (Fig. 4-C). Estimativas conservadoras indicam que já devem existir pelo menos 200.000 plantas de limão Galego formadas a partir de material premunizado.

A procura de borbulhas de limão Galego premunizado tem feito com que essas sejam comercializadas por um preço superior ao do material comum.

VI. DISCUSSÃO

O uso da proteção com estirpes fracas, no controle da tristeza do limão Galego ou de outras copas de citros que possam sofrer danos por terem os tecidos sensíveis, pode ser considerado como não tendo as desvantagens mencionadas para alguns outros vírus. A tristeza já está completamente espalhada no Brasil (Paiva Neto, 1945; Oliveira, 1953; Matta & Silva, 1955; Costa, 1956, 1972a; Mendes, 1966; Rossetti et al., 1971). O uso de material premunizado com estirpes fracas do vírus, não aumentaria o risco de ocorrerem mutações nem da manifestação de sinergismo.

O vírus da tristeza é considerado como sendo restrito aos tecidos do floema (Costa et al., 1949; Price, 1966, 1968; Kitajima & Costa, 1968). Nesse grupo o fenômeno de proteção é mais raro (Costa, 1972b). Apesar desse fato, estirpes fracas usadas na premunização do limão Galego protegeram as plantas contra a invasão e o estabelecimento das estirpes fortes. Esse efeito de proteção foi comprovado em experimentos de casa de vegetação e de campo e, também, em plantações comerciais, estabelecidas a partir do material premunizado.

O desenvolvimento superior das plantas de limão Galego consideradas de "elite", selecionadas como matrizes, crescendo em pomares dessa espécie, constituídos na sua grande maioria, por plantas em decadência, deve ser atribuído, na sua quase totalidade, à infecção por isolados fracos de tristeza que as protegiam contra a injúria induzida pelas estirpes fortes. Plantas com tecidos mais tolerantes, se houverem, devem ocorrer com baixa frequência, uma vez que os clones nucelares novos de limão Galego, inoculados a partir das matrizes selecionadas, fizeram crescimento comparável ao das propagações das matrizes em questão. A possibilidade de que o bom crescimento de algumas das plantas selecionadas pudesse ser devido a que essas não estivessem infetadas pela tristeza não se concretizou, pois de todas foi possível obter tristeza nos testes efetuados. Aliás, de antemão, essa hipótese foi considerada bastante improvável graças à alta eficiência do pulgão preto dos citros como vetor.

Isolados de tristeza, obtidos de plantas de limão Galego consi

deradas de "elite", foram fracas para o limão Galego, enquanto que os isolados obtidos de plantas destacadas, de laranja Pera e de grapefruits, de uma maneira geral, induziram sintomas fortes em limão Galego, não se mostrando adequados para serem utilizados na premunização deste último.

O fato de isolados coletados a partir de boas plantas de limão Galego serem, de uma maneira geral, fracos, sugere que os tecidos dessa variedade são mais sensíveis à tristeza do que os das duas outras variedades mencionadas. Assim, plantas de Galego infetadas por estirpes ou isolados fortes de tristeza entrariam em declínio, enquanto que as invadidas naturalmente por isolados mais ou menos fracos teriam desenvolvimento razoável, sendo, dessa maneira, utilizadas pelos viveiristas e citricultores como fontes de propagação. Devido a essa maior sensibilidade dos tecidos do Galego, existe uma maior probabilidade de encontrarem-se estirpes mais fracas em pomares dessa variedade do que em pomares de Pera e grapefruit.

O critério adotado para selecionar plantas de excepcional desenvolvimento em pomares afetados pelo vírus da tristeza, na esperança de que as mesmas possam estar protegidas por isolados fracos foi adequado, a julgar pelos satisfatórios resultados obtidos com alguns dos isolados selecionados. Assim, na seleção de novos isolados fracos de tristeza que porventura possam vir a ser melhores do que os atualmente em estudo, tal técnica continuará a ser utilizada.

Os isolados do vírus da tristeza têm um efeito específico, pois verificou-se que certos isolados induzem reações comparáveis, quando infetando mudas de pé franco de limão Galego ou clones dessa variedade enxertados em porta-enxertos tolerantes, porém reações diferentes quando o mesmo material é enxertado em laranja azeda. Essa observação encontra apoio nos resultados obtidos em outros experimentos não mencionados na presente tese, pelos quais verificou-se que alguns dos isolados coletados de plantas de laranja Pera que permitiram excelente desenvolvimento a clones de Pera com eles infetados, induziram reações que, de uma maneira geral, eram severas ou no mínimo médias, quando infetando o limão Galego. Esses fatos reforçam a idéia de que a procura de isolados fracos do vírus da tristeza, para

fins de premunização, necessita ser efetuada em base específica. De se de se de se de se premunizar clones de limão Galego, a melhor possibilidade de se obter bons isolados para esse fim é de procurar os mesmos em plantas dessa variedade.

O fato de uma estirpe de tristeza ser fraca, não quer dizer ne cessariamente que a mesma tenha efeito protetivo. No caso, porém, da seleção feita de acordo com o critério seguido, em pomares comerciais, espera-se que os isolados fracos, se responsáveis pelo desenvolvimento excepcional de plantas de "elite" encontradas, tenham efeito de proteção: caso contrário as mesmas estariam injuriadas e superinvasadas pelas estirpes responsáveis pelo declínio da maioria das plantas do pomar. No entanto, a seleção de isolados de alto efeito de proteção, implica no teste dos mesmos na variedade a ser premunizada, o que, naturalmente, requererá vários anos, além de ser necessário também determinar-se o seu efeito de proteção nas diversas áreas onde o mesmo deverá ser utilizado.

A razão de se efetuarem as inoculações de premunização por intermédio de união de tecido, deveu-se ao fato de aceitar-se que a tristeza ocorre, na natureza, sob forma de complexos constituídos de diferentes estirpes, num estado de maior ou menor equilíbrio (Grant, 1959; Stubbs, 1964). Com base nesse raciocínio, considerou-se que plantas de "elite", selecionadas como fontes de vírus fracos, deviam o seu desenvolvimento excepcional a estarem invadidas por complexos fracos do vírus da tristeza, formados por um espectro de estirpes fracas num tal equilíbrio que seria responsável pelas condições de boa proteção, invasão completa dos tecidos, multiplicação rápida etc., em última análise, sendo responsável, no seu todo, pelo desenvolvimento satisfatório da árvore. Assim, considerou-se que, se por outro lado, as inoculações de premunização fossem efetuadas por intermédio do vetor, poderia ocorrer que os pulgões transmitissem apenas parte das estirpes dos vários complexos, rompendo dessa forma o equilíbrio dos mesmos, o que poderia acarretar uma premunização defi ciente nos clones nucelares assim premunizados, em contraste com a boa proteção atuante na planta original. Essa idéia aparentemente é válida, pois os experimentos conduzidos na casa de vegetação mostra-

ram que mudinhas de pé franco de limão Galego, premunizadas com os melhores isolados fracos por meio do vetor e, posteriormente, superinoculadas com isolados severos, quando comparados com aquelas somente premunizadas, apresentaram, em alguns casos, intensificação dos sintomas de tristeza. Testes de recuperação do vírus efetuados a partir dessas plantas, mostraram que aparentemente o vírus severo desafiante se estabeleceu em cerca de 60% dos casos nas plantas premunizadas com os isolados fracos. Já nos experimentos de campo, em que as inoculações de premunização foram efetuadas por intermédio de união de tecido (borbulhas), e as inoculações desafiantes por meio de tecido ou inseto vetor, o desenvolvimento das plantas somente premunizadas e daquelas premunizadas e desafiadas foi semelhante. Esses fatos sugerem que a premunização efetuada por intermédio do vetor foi menos eficiente.

Uma das razões para explicar o fato de que a premunização com insetos foi menos eficiente, poderia estar no pequeno número de insetos (10-15 indivíduos) utilizados na premunização das plantinhas na casa de vegetação, os quais não teriam transmitido totalmente o complexo fraco. Possivelmente, resultados satisfatórios poderiam ser obtidos, se grande número de insetos fosse utilizado, o que aumentaria a chance de transmitir todos os componentes do complexo fraco.

Reações uniformemente fracas foram apresentadas por cada uma das plantas individuais, compondo os lotes básicos, premunizados com os isolados fracos, obtidos de limão Galego, sobre cada um dos 3 porta-enxertos. Isso indica que, aparentemente, os porta-enxertos utilizados no ensaio principal de premunização, estavam livres do vírus da tristeza, na época da inoculação de premunização no campo. Caso contrário, possivelmente, ter-se-iam obtido reações de interação entre o isolado fraco utilizado na premunização e aquele já infetando o porta-enxerto antes da inoculação de premunização, que seriam provavelmente mais severas do que aquelas induzidas pelos isolados fracos num período tão longo (Müller & Costa, 1971). A provável ausência de infecção natural pelo vírus da tristeza, dos porta-enxertos, está de acordo com os resultados obtidos por Müller & Costa (1972) que verificaram baixa incidência da moléstia em viveiros de porta-en

xertos de citros na época da enxertia.

Tanto nos clones somente premunizados, como naqueles premunizados e superinoculados artificialmente que, além disso, se achavam expostos à infecção natural há já 9 anos, não foi notada nenhuma intensificação nos sintomas das plantas, nem mesmo nas plantas superinoculadas por união de tecido que é a maneira mais eficiente de se introduzir um vírus numa planta. Mesmo que, com o decorrer dos anos, venha a ocorrer uma intensificação dos sintomas nas plantas superinoculadas por união de tecido, esse fato não teria maior expressão na proteção das plantas em pomares comerciais, pois, sob o ponto de vista prático, é necessário haver premunização contra a superinoculação pelo vetor, que é a que ocorre em plantas protegidas, crescendo em viveiros e pomares.

O fato de as plantas de Galego premunizadas estarem fazendo crescimento satisfatório por 9 anos, apesar de se encontrarem em local cercado por plantas de limão Galego e outras, como a laranja Pera e grapefruit, infetadas por estirpes severas do vírus da tristeza, mostra que as mesmas estão sendo protegidas, uma vez que a possibilidade de essas plantas terem sido superinoculadas foi elevada. Isso é atestado pela verificação de que a quase totalidade dos controles não premunizados foram infetados com estirpes fortes no mesmo período. Apenas duas plantas controles, infetadas, continuaram a fazer bom crescimento. Isso é atribuído a terem sido, acidentalmente, infetadas com isolados fracos das plantas premunizadas com estes, estando, daí por diante, protegidas contra subsequente infecção pelos fortes. A constatação de que todos os controles que foram sadios para o campo, no ensaio de premunização, se infetaram num maior ou menor espaço de tempo, mostra que, no Estado de São Paulo, não adianta plantar no campo mudas sadias, que só poderiam ser obtidas em condições protegidas como casas de vegetação ou telados, pois certamente elas serão infetadas pelo vírus da tristeza, e provavelmente com estirpes fortes, que são aquelas que aparentemente predominam na disseminação natural. Assim, a alternativa preferível para reduzir os danos induzidos pela tristeza é a de propagar apenas material premunizado que terá, na maioria das vezes, desenvolvimento superior ao...

do não premunizado.

Uma vez que todas as plantas do experimento de premunização em campo representam clones nucelares novos, elas tiveram uma considerável demora para entrar em produção, tendo, além disso, as colheitas iniciais sido diminutas. Em média, entretanto, a produção dos clones premunizados com isolados fracos de Galego foi cerca de 7 vezes maior em peso do que aquela dos controles não premunizados, num período de 5 anos. É de se esperar que essa diferença venha a aumentar com o tempo, à medida que os clones premunizados com os isolados fracos venham a produzir mais e os não premunizados venham a declinar totalmente, nada produzindo.

Apesar das produções dos clones de limão Galego, premunizados com isolados fracos de tristeza provenientes de limão Galego, serem várias vezes maiores do que as dos outros tratamentos, o tamanho dos frutos foi, de uma maneira geral, superior ao dos tratamentos que deram menor produção.

A premunização dos clones de limão Galego do experimento de campo foi inicialmente feita com 43 isolados considerados fracos do vírus da tristeza, obtidos respectivamente de fontes de limão Galego, laranja Pera e grapefruit. Desses, 9 se mostraram fracos para as copas de limão Galego, sendo que todos vieram de fontes de limão Galego. Esse fato, aliado à observação de que 3 isolados se sobressaíram dos outros 6, e um foi superior a todos os demais, indica a necessidade de se executarem experimentos conduzidos a longo prazo, para determinar os melhores isolados a serem utilizados com o fim de premunização. De início, considerou-se que o mais adequado isolado para a premunização fosse o de nº 40. No entanto, os dados de produção dos últimos dois anos de colheita vem mostrando que o isolado nº 141 é aparentemente superior ao nº 40.

É de se prever que os melhores isolados fracos não causem danos, ou somente induzam perdas insignificantes nas copas por elas infectadas, pois o desenvolvimento e a produção dos clones premunizados com os isolados nº 141 e 40 têm sido excelentes e praticamente comparáveis aos de plantas, crescendo em outras partes do mundo onde a tristeza não ocorre.

Os ensaios realizados para determinar a maneira mais adequada de obter plantas premunizadas mostraram que os resultados foram igualmente satisfatórios, quer os porta-enxertos fossem inoculados previamente, simultaneamente às enxertias, quer se utilizassem gemas premunizadas. Esse fato é bastante importante, pois permite o preparo de mudas a partir de matrizes premunizadas, da maneira usual. No trabalho experimental em campo, quando se deseja preparar mudas básicas premunizadas, considera-se melhor adotar o método de inoculação prévia à enxertia, pois essa permite uma inoculação com maior segurança, uma vez que, na inoculação, somente haverá necessidade de se preocupar com as gemas inóculo, podendo, além disso, fazerem-se os repasses das inoculações que tenham falhado, até que todos os porta-enxertos tenham os inóculos pegados, após o que se efetua, então, a enxertia do clone nucelar novo a ser premunizado.

Experimentos utilizando mudinhas de pé franco, crescendo na casa de vegetação, inoculadas por intermédio do vetor, com isolados fracos e severos do vírus da tristeza, deram resultados diferenciais mais rápidos do que mudas crescendo em condições de campo, inoculadas por união de tecido. De uma maneira geral, houve um paralelismo nas reações observadas na casa de vegetação e no campo, indicando dessa forma que, através de testes conduzidos na casa de vegetação, é possível ter-se uma boa idéia quanto à natureza de isolados fracos ou fortes. Já o efeito de proteção terá que ser estudado no campo, a longo prazo.

Os resultados das reações obtidas da inoculação simultânea de um isolado fraco e um forte aparentemente não estão correlacionados com o valor protetivo do fraco contra o forte. As inoculações simultâneas tenderam, de uma maneira geral a produzir sintomas intermediários, mais para o lado severo, diferentes daqueles induzidos por cada um dos isolados utilizados na mistura quando sozinhos, enquanto que a proteção conferida por alguns desses isolados fracos contra os fortes foi bastante eficiente.

Os resultados obtidos com as plantas premunizadas nos testes de campo efetuados mostraram que alguns dos isolados fracos de tristeza utilizados tem um satisfatório poder de proteção. Existe, no

entanto, a possibilidade de encontrarem-se outros isolados fracos de tristeza superiores aos melhores atualmente em uso.

Em considerações de ordem teórica, foi imaginada a possibilidade de que o efeito protetivo de isolados fracos do vírus da tristeza pudesse vir a ser realçado através da mistura adequada dos mesmos. Considerou-se também que se fossem misturados isolados fracos de diferentes áreas citrícolas, obter-se-ia uma combinação com um mais amplo espectro de proteção. Finalmente, a combinação de certos isolados de tristeza de diferentes capacidades de invasão, ou que viessem a invadir diferentes tipos de tecidos de uma planta, poderia resultar num melhor valor de proteção, quando misturas assim preparadas fossem comparadas com seus componentes. É claro que a utilização de tais misturas estaria condicionada ao fato de que a resultante teria que ser obviamente fraca para as plantas a serem protegidas e, além disso, razoavelmente estáveis. Em testes não mencionados na presente tese, nos quais foram inoculados simultaneamente 3 isolados fracos do vírus da tristeza em plantas testes de limão Galego, verificou-se que as misturas induziam reações semelhantes às aquelas pelos componentes individuais. Plantas premunizadas com essas misturas e posteriormente desafiadas com isolados severos comportam-se tão bem como plantas premunizadas somente com cada um dos componentes da mistura, quando desafiadas, durante o tempo de duração dos experimentos. Considera-se, no entanto, que esses tópicos necessitam de mais investigação.

Pomares semi-experimentais, localizados em várias partes do Estado de São Paulo e mesmo em outros Estados, formados a partir de gemas obtidas de plantas de limão Galego premunizadas com os melhores isolados, estão tendo excepcional desenvolvimento, superior ao do melhor material da mesma variedade de outras procedências, utilizado como controle.

Aparentemente, o efeito de proteção dos isolados fracos do vírus da tristeza é perpetuado nas enxertias sucessivas, feitas a partir do material primeiramente premunizado, pois observações efetuadas em pomares de 2ª e 3ª perpetuação têm mostrado que, pelo menos

97% das plantas, estão fazendo excelente crescimento, comparável ao das matrizes. Em algumas plantações, 3% de plantas com sintomas moderados a fortes de tristeza foram observados. A razão desse fato não está ainda esclarecida, podendo ser devido a enganos cometidos por ocasião da formação da muda, ou infecção do cavalo prévia à enxertia.

Os bons resultados obtidos com a premunização do limão Galego asseguram a possibilidade da produção satisfatória desse tipo de citros nas várias áreas citrícolas do Estado e do País. Espera-se que o mesmo método venha a ser eficiente no caso de problemas causados pela tristeza em outras copas.

VII. CONCLUSÕES

(a) Muitos pomares de limão Galego estão em franco declínio, ou já deixaram de existir, pela ação de estirpes fortes do vírus da tristeza, situação esta que poderia levar ao desaparecimento dessa cultura.

(b) Entre os tipos de citros comerciais com tecidos parcialmente intolerantes ao vírus da tristeza, o limão Galego tem tecidos mais sensíveis ao vírus do que a laranja Pera ou os grapefruits.

(c) Árvores de limão Galego, fazendo bom crescimento em pomares fortemente injuriados pelo vírus da tristeza, devem essa condição a estarem premunizados naturalmente por estirpes fracas do vírus que as estão protegendo contra o estabelecimento de estirpes fortes, responsáveis pelo declínio das plantas restantes do pomar.

(d) Existe uma maior probabilidade de se encontrarem estirpes fracas de tristeza para limão Galego em pomares dessa variedade do que nos de laranja Pera e grapefruit.

(e) Isolados do vírus da tristeza tem efeito específico, isto é, o que é fraco para um tipo de citros pode não sê-lo para outro tipo.

(f) Os resultados das reações obtidas da inoculação simultânea de um isolado fraco e um forte não estão correlacionados com o valor protetivo do fraco contra o forte.

(g) Ensaio conduzidos em casa de vegetação podem, num espaço de tempo relativamente curto, fornecer uma indicação do efeito sobre a planta e do valor de proteção de isolados considerados fracos do vírus da tristeza.

(h) A seleção final dos melhores isolados fracos do vírus da tristeza, para premunização de clones de limão Galego, só poderá ser decidida após vários anos de exposição à inoculação natural pelo vírus da tristeza, em experimentos comparativos de campo e com base em resultados de produção.

(i) O efeito de proteção dos isolados fracos é perpetuado nas enxertias sucessivas, feitas a partir do material primeiramente premunizado.

(j) A premunização com isolados fracos do vírus da tristeza é uma técnica particularmente indicada para controlar os danos induzidos pelas estirpes fortes do vírus em copas sensitivas de citros. Esse método oferece excelentes resultados no controle dos danos induzidos pelo vírus em limão Galego, levando os Galegos premunizados a uma produção 7 vezes superior à dos não premunizados.

(l) Viveiros e pomares semi-experimentais localizados em várias partes do Estado de São Paulo e mesmo de outros Estados, constituídos por plantas formadas com gemas premunizadas, estão tendo desenvolvimento superior ao do material da mesma variedade de outras procedências utilizado como controle.

(m) Já existem grandes plantações formadas a partir de material premunizado desenvolvendo-se em condições muito satisfatórias.

VIII. RESUMO

O uso de porta-enxertos tolerantes ao vírus da tristeza possibilitou o cultivo de citros em áreas onde essa moléstia estava presente. Existem, entretanto, alguns tipos de citros, que enxertados nesses cavalos tolerantes ou mesmo de pé franco, mostram danos causados pela tristeza. O problema se torna bastante grave quando essas plantas são infetadas por formas severas do vírus capazes de induzir caneluras.

O conhecimento da existência de estirpes fracas do vírus da tristeza, e o fato de que elas podem oferecer proteção, levou à realização de estudos, visando o controle da tristeza em copas de limão Galego através da premunização com estirpes fracas do vírus.

Levantamentos foram efetuados em pomares de limão Galego, laranja Pera e grapefruit Marsh Seedless, severamente injuriados pelo vírus da tristeza, a fim de localizar plantas que se sobressaíam pelo seu vigor excepcional. Material dessas plantas consideradas destacadas foi coletado para fins experimentais.

Plantas de limão Galego consideradas de "elite", selecionadas como matrizes, devem o seu desenvolvimento superior, na maioria dos casos, a estarem infetadas por estirpes ou complexos fracos do vírus da tristeza que as estão protegendo contra as estirpes usuais responsáveis pelo declínio das árvores vizinhas.

Foi verificado que há evidência de especificidade entre as estirpes do vírus da tristeza. Isolados coletados como fracos de laranja Pera e grapefruit, foram de uma maneira geral fortes para Galego.

Experimentos conduzidos na casa de vegetação, utilizando mudinhas jovens inoculadas por meio do vetor da tristeza, o pulgão preto dos citros, com isolados fracos e severos do vírus, deram resultados diferenciais mais rápidos do que mudas crescendo em condições de campo inoculadas por união de tecido. Houve no entanto um paralelismo entre as reações observadas na casa de vegetação e no campo.

As reações obtidas da inoculação simultânea de um isolado fraco e um forte do vírus da tristeza, aparentemente não estão correla-

cionadas com o valor protetivo do fraco contra o forte.

Resultados obtidos após vários anos nas experiências de premunização, realizadas sob condição de plantação experimental, mostraram que clones nucelares novos de limão Galego, premunizados com determinados isolados fracos do vírus da tristeza, desenvolveram-se normalmente, expostos em condições de campo, à superinoculação com estirpes fortes. A produção desses vinha sendo em média, 7 vezes superior à das plantas controles não premunizadas.

O efeito de proteção dos isolados fracos do vírus da tristeza parece ser perpetuado nas enxertias sucessivas feitas a partir do material primeiramente premunizado, a julgar pelo crescimento uniforme verificado em pomares de 2ª e 3ª perpetuação do material premunizado original.

Considera-se já terem sido plantadas mais de 200.000 plantas dos clones premunizados de Galego. A crescente demanda de borbulhas premunizadas certamente assegura a continuidade do cultivo desse tipo de citros que muito tinha diminuído devido ao vírus da tristeza.

IX. SUMMARY

The use of tolerant rootstocks solved most of the problems concerning the production of citrus fruits in areas where the tristeza disease is present. Certain standard citrus types like the Galego lime, however, are injured by tristeza to varying degrees even when growing on a tristeza-tolerant rootstock. For these citrus types, yield losses may result from infection with certain stem-pitting strains or strain complexes of the tristeza virus.

Evidence indicating protective interference between components of the tristeza virus complex has been reported from several sources. Thus one possible control method for the losses induced by tristeza on the above-mentioned sensitive citrus types is the pre-immunization of virus free clones with mild strains or complexes that would protect the plants against further infection with the severe stem-pitting complexes.

Investigations were carried out with the purpose of determining whether or not injury induced by tristeza on Galego lime, could be prevented by the pre-immunization of virus-free plants with selected mild strains of the virus.

Outstandingly good plants, growing in Galego lime orchards where most of the individuals showed severe tristeza symptoms, were infected with mild strains or strain complexes, responsible for the satisfactory growth conditions of the plants. A number of these outstanding Galego lime plants, as well as Pera sweet orange and grapefruit plants selected likewise were used as mild strain virus sources for pre-immunization of new Galego lime clones.

A certain degree of specificity was noted in the relationship of the mild isolates. Virus isolates that were collected as mild from Pera sweet orange or grapefruits were generally rather severe to Galego lime plants.

The protection conferred to the pre-immunized plants by the mild isolates against further injury following the superinoculation with severe virus sources was evident in greenhouse tests carried out with Galego lime seedlings and vector transmission. Good protective

effect was not present in all pre-immunized plants, indicating that inoculation by the vector was not as efficient as inoculation by tissue union.

Pre-immunization of Galego lime plants further exposed to field isolates gave clear cut evidence of protection.

The yield of the pre-immunized clones (Galego sources) was about 7 times greater than that of the controls for the first five harvests. This difference is bound to increase as the plants become older, since all trees represent new clones, they were late to come into bearing and the early crops have been small.

The pre-immunization of Galego lime clones was initially made with 43 mild isolates from Galego lime, Pera sweet orange and grapefruit sources. Out of these, 2 were outstanding. Trees pre-immunized with them made apparently normal growth and bore the highest yield. The fact that out of 43 mild isolates only two were considered very satisfactory indicates the need of long range comparative experiments to determine the best mild isolates for pre-immunization purposes.

The protective effect of the mild isolates seems to last in the successive propagations made from the initially pre-immunized trees. This conclusion is supported by the good uniform growth observed in orchards of 2^a and 3^a perpetuation from the original pre-immunized material.

Over 200,000 trees of pre-immunized clones have already been planted and the great demand for pre-immunized budwood for further propagation of Galego limes insures the continuity of this crop that had practically disappeared because of tristeza injury.

X. LITERATURA CITADA

- Bald, J.G. 1948. Potato Virus X: effectiveness of acquired immunity in older and younger leaves. *J. Council Sci. Ind. Research* 21: 247-251.
- Bawden, F.C. 1943. Plant viruses and viruses diseases. *Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., U.S.A.* 294 pp.
- Bawden, F.C. & Sheffield, F.M.L. 1944. The relationships of some viruses causing necrotic diseases of the potato. *Ann. Appl. Biol.* 31:33-40.
- Bennett, C.W. 1953. Interaction between viruses and virus strains. *Advanc. Virus Res.* 1:39-67.
- Bennett, C.W. 1955. Recovery of water pimpernel from curly top and the reaction of recovered plants to reinoculation with different virus strains. *Phytopathology* 45:531-536.
- Bennett, C.W. & Costa, A.S. 1949. Tristeza disease of Citrus. *Jour. Agr. Res.* 78:207-237.
- Costa, A.S. 1956. Present status of the tristeza disease of Citrus in South America. *Fao Plant Protection Bulletin* 4:97-105.
- Costa, A.S. 1972a. Tristeza em limão Galego no Estado do Pará. Comunicação verbal.
- Costa, A.S. 1972b. Curso de pós-graduação de virologia vegetal, Piracicaba.
- Costa, A.S., Grant, T.J. & Moreira, S. 1949. Investigações sôbre a tristeza dos citros. II. Conceitos e dados sôbre a reação das plantas cítricas à tristeza. *Bragantia* 9:59-80.
- Costa, A.S. & Grant, T.J. 1951. Studies on the transmission of the tristeza virus by the vector. *Aphis citricidus*. *Phytopathology* 41:105-113.
- Costa, A.S., Grant, T.J. & Moreira, S. 1954. Behavior of various citrus rootstock-scion combinations following inoculation with mild and severe strains of tristeza virus. *Proc. Fla. Hort. Soc.* 67:26-30.

- Costa, A.S., Müller, G.W. & Costa, C.L. 1968. Rearing the tristeza vector Toxoptera citricida on Squash. In J.F.L. Childs (ed.) Proc. 4th Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. of Florida Press. Gainesville pp. 32-35.
- Frazer, L.R., Long, K. & Cox, J. 1968. Stem-pitting of grapefruit-field protection by the use of mild virus. In J.F.L. Childs (ed.) Proc. 4th Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. of Florida Press. Gainesville pp. 27-31.
- Fulton, R.W. 1951. Superinfection by strains of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 41:5 -592.
- Giacometti, D.C. 1961. Stem-pitting threat to Brazil Citrus. *Calif. Citrogr.* 46:243-244.
- Giddings, N.J. 1950. Some interrelationships of virus strains in sugarbeet curly top. *Phytopathology* 40:377-388.
- Grant, T.J. 1959. Tristeza virus strains. In J.M. Wallace (ed.) Proc. of the Conf. on Citrus Virus Diseases. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Berkeley pp. 45-55.
- Grant, T.J. & Costa, A.A. 1951. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* 41:114-122.
- Grant, T.J. & Higgins, R.P. 1957. Occurrence of mixture of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- Grant, T.J., Moreira, S. & Salibe, A.A. 1960. Report on general aspect of tristeza and stem pitting in citrus varieties in São Paulo, Brazil. *Proc. Fla. St. Hort. Soc.* 73:12-16.
- Hodgson, R.W. 1967. Horticultural varieties of Citrus. In Walther Reuther (ed.) *The Citrus Industry, Volume I*, Univ. of California, Division of Agricultural Sciences 611 pp.
- Hughes, W.A. & Lister, C.A. 1953. Lime dieback in the Gold Coast, a virus disease of the lime, Citrus aurantifolia (Christmann) Swingle. *J. Hort. Sci.* 28:131-140.
- Johnson, J. 1937. An acquired partial immunity to the tobacco streak disease. *Trans. Wisconsin Acad. Sci. Arts Letters* 30:27.
- Kavanau, J.L. 1949. On correlation of the phenomena associated with chromosomes, foreign proteins and viruses. *Am. Naturalist* 83: 111-138.

- Kitajima, E.W. & Costa, A.S. 1968. Electron microscopy of tristeza-infected leaf tissues. In J.F.L. Childs (ed.) Proc. 4th Conf. Intern. Organization Citrus Virol. Univ. of Florida Press. Gainesville pp. 59-64.
- Kunkel, L.O. 1934. Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba viruses. *Phytopathology* 24:437-466.
- Matta, E.A.F. & Silva, M.E. 1955. A "tristeza dos Citrus" na Bahia. *Bol. Inst. Biol. Bahia* 1:38-58.
- Mc Clean, A.P.D. 1950. Virus infection of citrus in South Africa. III. Stem-pitting disease of grapefruit. *Farming in S. Afr.* 25:289-296.
- McKinney, H.H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *Jour. Agr. Res.* 39:557-578.
- Mendes, C. 1966. Incidência da "tristeza" dos citros no vale do Curu, Estado do Ceará. *Bol. Soc. Cearense Agron.* 7:57-59.
- Montenegro, H.W.S. & Salibe, A.A. 1960. Conservação de sementes de porta-enxertos para citros. *Rev. Agric. (Piracicaba)* 35:111-114.
- Moreira, S. 1955. A moléstia "exocortis" e o cavalo de limão Cravo. *Rev. Agric. (Piracicaba)* 30:99-112.
- Moreira, S. 1959. Tristeza na laranja Pera. *Bol. Campo Blemco S.A.* 123:3-4.
- Müller, G.W. & Costa, A.S. 1971. Estudos sobre a interação entre o vírus da tristeza da copa e do porta-enxerto. In: I Congresso Brasileiro de Fruticultura. Campinas, 12-16 de julho (no prelo).
- Müller, G.W. & Costa, A.S. 1972. Incidência do vírus da tristeza no porta-enxerto de citros na época de enxertia. In: V. Reunião Anual da Soc. Bras. Fitop. Fortaleza, Ce., 17-20 de janeiro.
- Oberholzer, P.C.J., Mathews, I., & Stiemie, S.F. 1949. The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on so-called "Stem-Pitting". *Union S. Afr. Dept. Agr. Sci. Bull.* 297, 18 pp.

- Oberholzer, P.C.J. & Hofmeyr, J.D.J. 1955. The nature and control of clonal senility in commercial varieties of Citrus in South Africa. Faculty of Agriculture, University of Pretoria, Pretoria, South Africa 46 pp.
- Oliveira, A. 1953. Observações sobre a tristeza dos Citros. Rev. Agron. Porto Alegre, 16:30-38.
- Olson, E.O. 1956. Mild and severe strains of tristeza virus in Texas citrus. Phytopathology 46:336-341.
- Olson, E.O. 1958. Responses of lime and sour orange seedlings and four scion rootstock combinations to infection by strains of the tristeza virus. Phytopathology 48:454-459.
- Paiva, Neto, A. 1945. Nótulas fitossanitárias II. Boletim Agronômico, Pôrto Alegre, 9:12.
- Posnette, A.F. & Todd, J. McA. 1951. Virus diseases of cacao in West Africa. VIII The Search for Virus - Resistant Cacao Ann. appl. Biol. 38:785-800.
- Posnette, A.F. & Todd, J. McA. 1955. Virus diseases of cacao in West Africa. IX Strain variation and interference in virus 1A. Ann. appl. Biol. 43:433-453.
- Price, W.C. 1940. Acquired immunity from plant virus diseases. Quart. Rev. Biol. 15:338-361.
- Price, W.C. 1966. Flexuous rods in phloem cells of lime plants infected with Citrus tristeza virus. Virology 29:285-294.
- Price, W.C. 1968. Evidence for restriction of a plant virus to phloem cells. Indian Phytopathology 21:159-166.
- Rossetti, V., Mattos, J.K.A., Fonseca, J.M.L. & Fontes, A.C. 1971. A tristeza dos citros no Distrito Federal. In Reunião Anual da Soc. Bras. Fitop. Piracicaba, S.P., 15-17 de fevereiro.
- Salaman, R.N. 1933. Protective inoculations against a plant virus. Nature 131:468.
- Salaman, R.N. 1937. Acquired immunity against the "Y" potato virus. Nature 139:924-925.

- Simmonds, J.H. 1959. Mild strain protection as a mean of reducing losses from the Queensland woodiness virus in the Passion vine. Queensland Jour. Agr. Sci. 16:371-380.
- Steyaert, R.L. 1952. La tristeza des agrumes. Bull. Agric. Congo Belge 43:399-446.
- Stubbs, L.L. 1964. Transmission and protective inoculation studies with viruses of the citrus tristeza complex. Aust. J. Agric. Res. 15:752-770.
- Thung, T.H. 1931. Smetstof en plamtencel bij enkele viruzziekten van de tabaksplant. Handel. Neder. Ind. Naturawetenschap. Congr. 6:450-463.
- Wingard, S.A. 1928. Host and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. Journal of Agricultural Research 37:127-153.

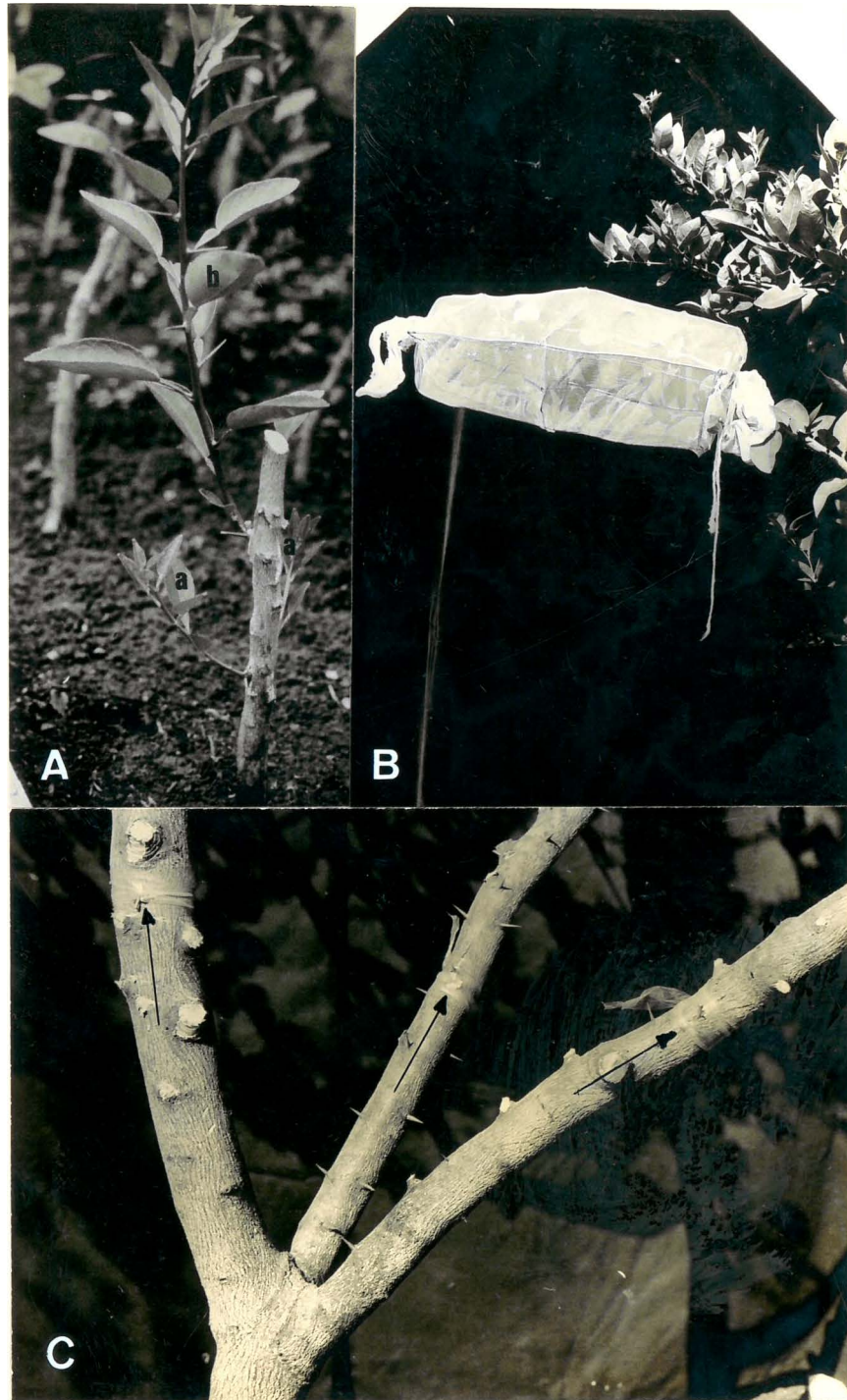


Fig. 1 - A - Preparo da muda básica premunizada; (a) gemas-inóculo, portadoras do isolado fraco de tristeza; (b) clone nucelar novo de limão Galego a ser premunizado. B - Superinoculação por intermédio do pulgão preto dos citros. C - Superinoculação com o vírus desafiante, por intermédio de união de tecido. Setas indicam as gemas inóculo.

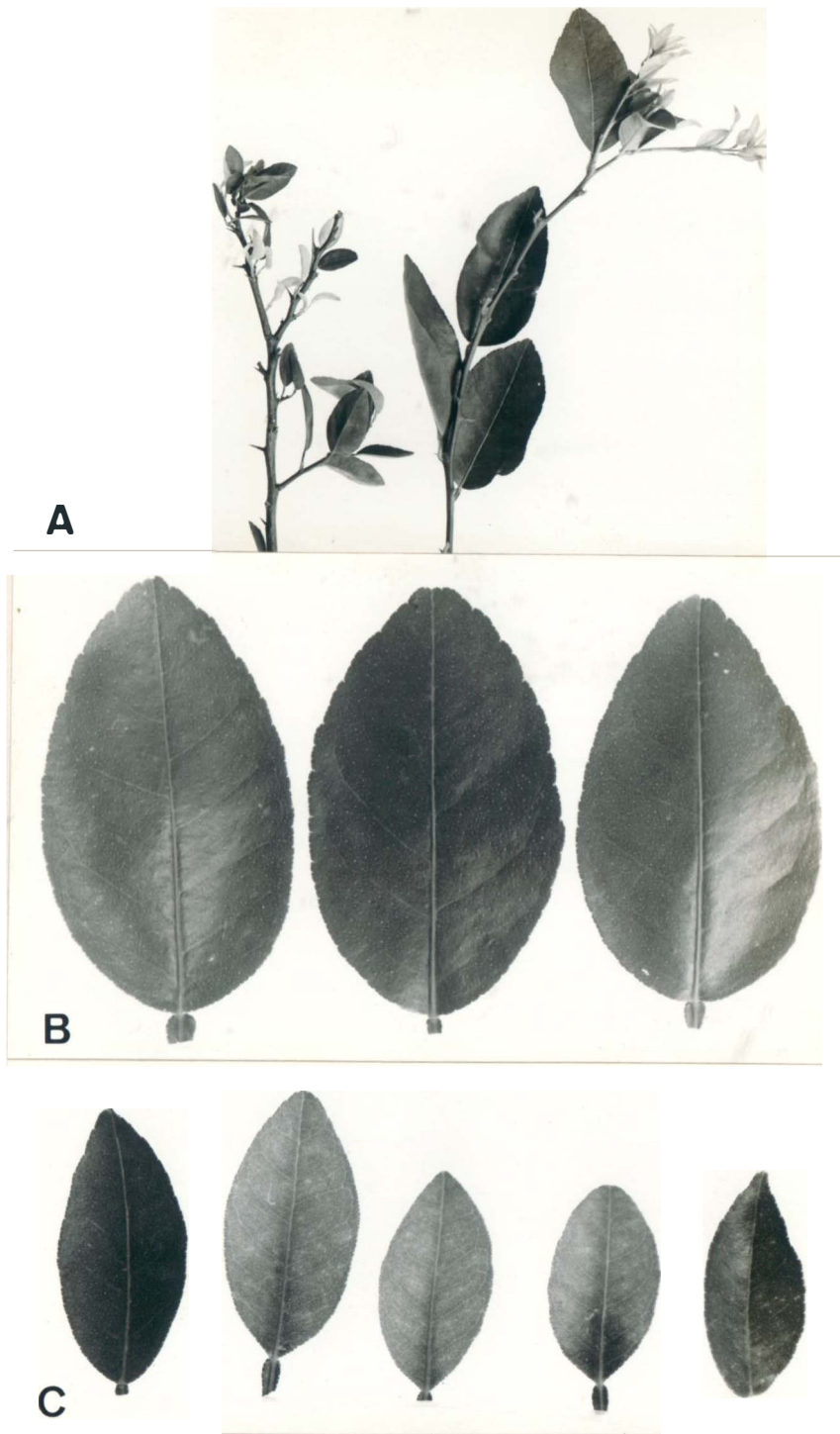


Fig. 2 - A - Ramos de limão Galego: à esquerda de planta não premunizada severamente afetada por estirpe forte do vírus da tristeza, à direita de planta premunizada, com desenvolvimento vigoroso. B - Folhas de plantas premunizadas, de tamanho normal e coloração verde uniforme. C - Fôlhas de plantas não premunizadas, de tamanho reduzido, ligeiramente cloróticas, acanoadas e com palidez das nervuras.

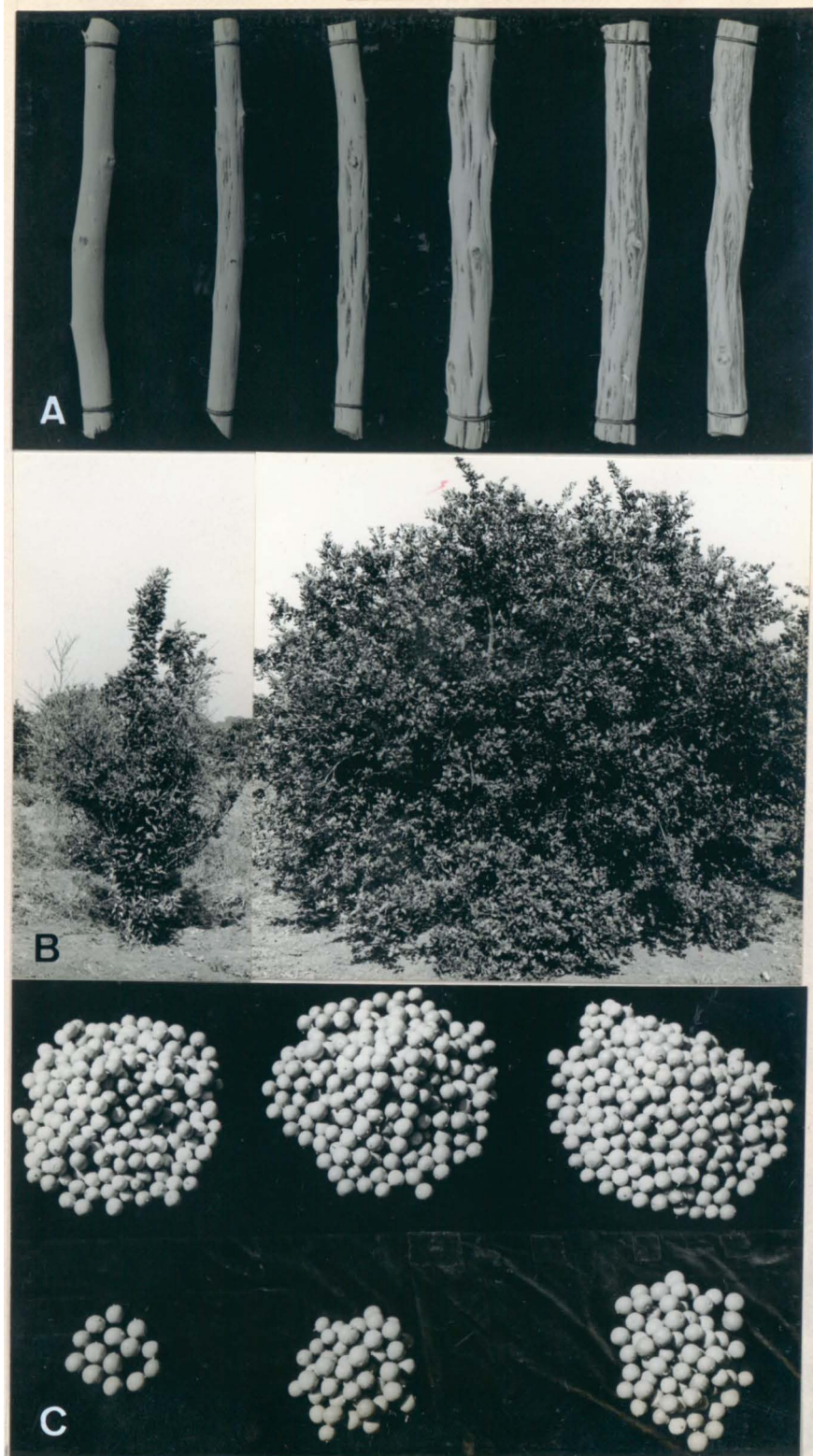


Fig. 3 - A - Escala utilizada para avaliar o grau de caneluras: esquerda 0, direita 5. B - Plan_{tas} de limão Galego do ensaio de campo com cerca de 8 anos de idade: à esquerda não premunizada em completo declínio; à direita, premunizada fazendo excelente crescimento. C - Produção: da esquerda para direita dos clones 1, 2 e 3; acima premunizados, notando-se a boa uniformidade, abaixo não pre_{munizados}, várias v_{ezes} menor.



Fig. 4 Pomares comerciais de limão Galego formados com gemas premunizadas de 2^a e 3^a perpetuação: A - No município de Araraquara com 2 anos de idade; B - No município de Severínia com cerca de 3 anos e meio de idade; C - No município de Araraquara compreendendo cerca de 3.500 plantas com 1 ano de idade.