

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Presidente da República

Fernando Henrique Cardoso

Vice-Presidente da República

Marco Antonio de Oliveira Maciel

Ministro da Ciência e Tecnologia

José Israel Vargas

Secretario Executivo

Lindolpho de Carvalho Dias

Secretário de Acompanhamento e Avaliação

Ubirajara Pereira de Brito

Secretário de Desenvolvimento Científico

Caspar Erich Stemmer

Secretário de Desenvolvimento Tecnológico

Cláudio Luiz Fróes Raeder

Secretário de Política de Informática e Automação

Roberto Pinto Martins

Subsecretário de Assuntos Administrativos

Paulo de Queiroz Rocha Pinto

Subsecretário de Planejamento e Orçamento

Antônio Maria Amazonas Mac Dowell

Chefe de Gabinete do Ministro

Oskar Klingl

Chefe da Assessoria de Programas Especiais

Luiz Antonio Barreto de Castro

Assessor Especial de Assuntos Internacionais

Manuel Montenegro

Consultor Jurídico

Fábio Guilherme Vogel

Financiadora de Estudos e Projetos

Lourival Carmo Monaco - Presidente

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

José Galizia Tundisi - Presidente

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Ozório José de Menezes Fonseca - Diretor

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

Marcio de Nogueira Barbosa - Diretor

Instituto Nacional de Tecnologia

Maria Aparecida Stallivieri Neves - Diretora

Fundação Centro Tecnológico para a Informática

Arthur João Catto - Presidente

Este trabalho foi elaborado sob a coordenação da seguinte equipe da Secretaria de Acompanhamento e Avaliação (SECAV) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT):

- Isabel Felicidade Aires Campos
- José de Anchieta Moura Fé
- Ludmila Brito Ribeiro
- Maria do Socoro Fernandes Araújo
- Norma Sueli Batista Gomes
- Ubirajara Brito
- Valdenir Ferreira

Tiragem: 3.000 exemplares

COSTA, A. S.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N.
Contribuições do Instituto Agrônomo de
Campinas - IAC na área das viroses e
moléstias semelhantes dos citros. Brasília:
MCT/SECAV, 1998.
75p. (Contribuições Brasileiras à Ciência
e à Tecnologia, 1)
1. Citricultura I. Título

EDITORES

Adalberto Luís Val
Alberto Elfes
Aldo Pinheiro da Fonseca
Amós Tropper, Antenor Correa
Ari de Oliveira Marques Filho
Arthur João Catto
Attilio Travalloni
Carlos Ignacio Zamitti Mammana
Eduardo Moacyr Krieger
Efrem Jorge Gondim Ferreira
Eloi de Sousa Garcia
Francisco Cleodato Porto Coelho
Guita Grin Debert
Ivan Rocha Neto
Jacob Palis Júnior
João Bosco de Carvalho Lima Freitas
João da Rocha Hirson
José de Anchieta Moura Fé
Jurgen Dobereiner
Leonardo Goldstein Júnior
Lewis Joel Greene
Luís Antonio Marcuschi
Luiz Fernando Osório
Luzia Maria Mazzeo
Maria de Nazaré Freitas Pereira
Marylin Peixoto da Silva Nogueira
Oskar Klingl
Palmira Maria Caminha Moriconi Valério
Paulo Prado Batista
Roberto Pereira da Cunha
Rodrigo Bellingrodt Marques Coelho
Rogério Amauri Medeiros
Ruy de Araújo Caldas
Ubirajara Brito
Vera Maria da Cruz Silva
Volker W. J. H. Kirchhoff

SUMÁRIO

p.

APRESENTAÇÃO

INTRODUÇÃO

1. O DESASTRE CAUSADO PELA *TRISTEZA* EM SÃO PAULO E OUTRAS PARTES DO BRASIL E O REERGUMENTO DA CITRICULTURA NO PAÍS ATRAVÉS DA PESQUISA

- 1.1. Controle da *tristeza* através do uso do cavalo tolerante
- 1.2. Confirmação da natureza viral da *tristeza* e a sua transmissão pelo pulgão *Toxoptera citricidus* K.
- 1.3. A morfologia da partícula do vírus *tristeza* e comprovação da sua relação etiológica com a doença
- 1.4. Caneluras com sintomas associados à *tristeza*
- 1.5. Purificação e serologia
- 1.6. Influência da *tristeza* sobre a pressão osmótica e transpiração
- 1.7. Composição mineral de plantas de combinações sadias e afetadas pela *tristeza* e outros vírus
- 1.8. Os testes de laranja “Azeda” e de limão “Galego” como indicadores do vírus *tristeza*
- 1.9. Termoterapia do vírus da *tristeza in vivo*. Minicâmara térmica
- 1.10. Isolados fracos e proteção
- 1.11. “Blending” e quebra de proteção por enxertia ou por alta pressão de inóculo com o vector
- 1.12. Controle da *tristeza* em copas sensíveis por premunização
- 1.13. A premunização com isolados fracos beneficia também as copas tolerantes
- 1.14. A premunização também funciona no caso da *tristeza* de Capão Bonito
- 1.15. Atratividade pelo amarelo de *Toxoptera citricidus* e repelência promovida pela casca de arroz, um paradoxo aparente
- 1.16. Efeito do som sobre *Toxoptera citricidus*
- 1.17. Possibilidade de reutilização da laranja “Azeda” como cavalo
- 1.18. Hospedeiras do vírus da *tristeza* fora de Rutaceae
- 1.19. Benefícios indiretos resultantes das investigações sobre a *tristeza* dos citros

2. EXOCORTE

- 2.1. Importância da exocorte e variedades infetadas
- 2.2. Fendilhamento e depressão da casca do tronco do limão “Taiti” associados à exocorte
- 2.3. Testes de identificação do material infetado pela exocorte
- 2.4. Procura de melhores indicadoras para o viróide da exocorte
- 2.5. Efeito ananicamente induzido pela exocorte pode ser usado para obter maior adensamento de plantio

3. XILOPOROSE

- 3.1. Trabalho pioneiro de Moreira sobre a xiloporose dos citros
- 3.2. Combinações indicadoras
- 3.3. Teste rápido para a detecção de xiloporose
4. SOROSE
 - 4.1. Tipos de sorose constatadas no Estado de São Paulo
 - 4.2. Distribuição dos agentes causais da sorose, exocorte e xiloporose na planta cítrica
 - 4.3. Vigor e produtividade de laranjeiras “Baianinha” nuclear em presença e ausência dos vírus da sorose, exocorte e xiloporose
 - 4.4. Avaliação de 7 variedades de laranja “Doce” e 2 tangerinas como indicadoras para a sorose
 - 4.5. Choque térmico para indução rápida da manifestação de sintomas em indicadoras para a sorose
5. CRESPEIRA
6. LEPROSE
 - 6.1. Incidência da leprose em variedades cítricas
 - 6.2. Visualização da partícula viral
 - 6.3. A leprose como modelo para estudos sobre interferentes de inoculação
7. ELIMINAÇÃO DE VÍRUS E VIRÓIDES DE MATERIAL PROPAGATIVO DE CITROS
 - 7.1. Limpeza através da obtenção de clones nucelares
 - 7.2. Microenxertia de ápices caulinares para limpeza de clones de citros
8. DECLÍNIO
 - 8.1. Regiões onde ocorre
 - 8.2. Importância econômica e incidência do declínio na laranja “Pera” vacinada
 - 8.3. Combinações críticas
 - 8.4. Combinações tolerantes
 - 8.5. Cavalos resistentes ou tolerantes
 - 8.5.1. Árvores de pé-franco de limão “Cravo” não são afetadas pelo declínio dos citros
 - 8.6. Dispositivo que facilita a realização do teste diagnóstico de absorção de água para o declínio
 - 8.7. Tratamento visando promover recuperação de árvores afetadas
9. PSEUDO-VIROSE DOS CITROS
 - 9.1. Falso exantema
 - 9.2. Superbrotamento ou envassouramento da laranja “Pera”
 - 9.3. Chicote da Piralima e galha no ponto de união da enxertia

BIBLIOGRAFIA

APRESENTAÇÃO

Esta publicação, que trata das “Contribuições do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC na Área das Viroses e Moléstias Semelhantes dos Citros”, escrita pelos pesquisadores A. S. Costa, G. W. Müller e N. Guirado, abre a série “Contribuições Brasileiras à Ciência e à Tecnologia”, de publicações do Ministério da Ciência e Tecnologia.

É do conhecimento de muitos brasileiros que as pesquisas realizadas pelo IAC, por mais de meio século, a respeito de pragas e doenças dos citros, têm sido de grande importância econômica para o país.

No que tange às viroses e doenças semelhantes, objeto deste trabalho, os estudos dos pesquisadores do IAC contribuíram, decisivamente, para que o Brasil atingisse o patamar, hoje, de maior produtor e maior exportador de suco concentrado dessa importante fruta, atingindo cerca de US\$ 1,7 bilhões anuais de suco de citros e gerando em torno de 400 mil empregos.

Os resultados alcançados somente foram possíveis graças à dedicação e incansável trabalho de pesquisadores do IAC, que, desde a década de 40, enfrentaram essas doenças, conseguindo sucessos, que sustentam este imenso complexo agro-econômico.

As pesquisas, vitais para o sucesso da citricultura, vão desde a criação e lançamento de clones, 3 a 4 vezes mais produtivos, até a preimunização da variedade de laranja “Pera”.

O Ministério da Ciência e Tecnologia entende que as pesquisas conduzidas nos laboratórios e campos experimentais do IAC são um exemplo a seguir na pesquisa pura e aplicada. Pesquisas que resolvem problemas concretos e que geram renda e emprego que o País tanto precisa.

Agradeço ao IAC e aos seus pesquisadores, que escreveram este trabalho, e que continuem pesquisando novas soluções para novos problemas.

JOSÉ ISRAEL VARGAS
Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia

ABSTRACT

Investigations carried out in the Instituto Agronômico, Campinas, State of São Paulo, Brazil, on citrus virus and virus like diseases for more than half a century are described. Particularly focused are the studies on citrus *tristeza* virus (CTV), that resulted in the recovery of the citrus industry in Brazil in presence of the diseases. Mentioned are the co-operation programs between the Instituto Agronômico and the United States Department of Agriculture in the early days of the CTV studies and later when preimmunization was successfully applied in the control of the virus in sensitive scions. The paper further deals among other topics with the pioneering works on xyloporosis, exocortis and psorosis that go back to 1938. Emphasis is also given to the obtention and distribution of citrus nucellar clones, that is considered as one of the most relevant contributions of science to the Brazilian agriculture.

Finally, the leprosis virus, disease of great importance, leaf curl, virus-like diseases as blight-declinio and the pseudo-virus false exanthema and witches broom are also mentioned.

RESUMO

São descritas as investigações realizadas no Instituto Agronômico, Estado de São Paulo, por mais de meio século em viroses e doenças semelhantes que afetam os citros. São enfocados particularmente os estudos sobre o vírus da *tristeza* dos citros, que resultaram no reerguimento da cultura da laranja no Brasil em convivência com o vírus. São mencionados programas de colaboração entre a Instituição e o United States Department of Agriculture na fase inicial dos trabalhos com *tristeza* e em fase posterior, quando das investigações sobre a preimunização que culminaram no controle do vírus em copas sensíveis. O trabalho aborda entre outros tópicos, os estudos pioneiros que remontam a 1938 realizados com os viróides da xiloporose e exocorte e o vírus da sorose. É dada ênfase à obtenção e distribuição dos clones nucelares de citros, trabalho esse considerado como uma das mais relevantes contribuições da ciência para a agricultura brasileira.

Finalmente, São abordados também a leprose, doença atribuída a vírus de grande expressão, a crespeira e aqueles semelhantes a vírus como o declínio dos citros e os pseudo-vírus compreendendo o falso exantema, superbrotamento e chicote.

INTRODUÇÃO

O Instituto Agronômico sempre dedicou bastante atenção aos problemas relacionados com a cultura dos citrus através do trabalho de seus técnicos, como Felisberto de Camargo e outros. As investigações mais antigas abrangeram também a seleção de matrizes de “Baianinha” , “Pera” e outras variedades, além de avaliações de cavalos e, conseqüentemente, podem ter tido um reflexo indireto sobre as moléstias de vírus das variedades comerciais. Entretanto, foi somente após a vinda do Eng^o Agr^o Sylvio Moreira para a Instituição que os problemas ligados diretamente às viroses dos citros começaram a receber atenção. Inicialmente, esse investigador preocupou-se principalmente com os problemas que se sabe hoje serem causados por viróides e que são relacionados com as interações entre copas portadoras do patógeno e determinados cavalos sensíveis. Estas interações levam às manifestações de xiloporose e exocorte e serão discutidas com mais detalhes posteriormente.

O advento da *tristeza* no Brasil, que provavelmente se deu na terceira década do século, provocou uma destruição dos laranjais comerciais de diversas regiões do país, inclusive de São Paulo. Os trabalhos sobre a *tristeza* no Instituto Agronômico inicialmente estavam mais ligados à área agronômica do que à de fitopatologia. Havia tendência entre fitopatologistas de São Paulo, para evitar duplicidade de trabalho, em aceitar que as moléstias de citros seriam de atribuição do Instituto Biológico e do grupo chefiado pelo conhecido pesquisador Dr. A. A. Bitancourt. Esta situação foi alterada com a vinda ao Brasil do Dr. W. C. Bennett, eminente fitovirologista norte-americano, em 1946. Esse técnico, enviado para estudar a *tristeza* no Brasil antes da moléstia ter se espalhado em plantações comerciais dos Estados Unidos, visitou o Instituto Biológico em São Paulo e a Fazenda Mato Dentro em Campinas, como opções para sua permanência no Brasil. Um dos autores esteve em contato com o Dr. Bennett na Fazenda Mato Dentro e o convidou a visitar o Centro Experimental Campinas, naquela ocasião conhecido como Fazenda Santa Elisa, a sede de campo do Instituto Agronômico. Após efetuar essa visita, decidiu-se o Dr. Bennett pela sua vinda para o Instituto Agronômico e assim iniciou-se um programa cooperativo entre o U.S. Department of Agriculture (USDA) e o Instituto Agronômico de Campinas para o estudo da *tristeza*.

Os trabalhos de Moreira sobre a *tristeza* e outras viroses dos citros, os que se seguiram ao estabelecimento do convênio com o USDA e os feitos sobre outras viroses ou possíveis viroses, pelos técnicos e o Instituto Agronômico, serão revisados em seguida. (54) Muitos dos trabalhos efetuados foram pioneiros na pesquisa virológica mundial em citros.

Em adição aos recursos fornecidos pela Administração Direta do Estado de São Paulo, as pesquisas efetuadas na área das viroses dos citros no Instituto Agronômico muito devem a entidades estrangeiras (Fundação Rockefeller e U.S. Department of Agriculture dos Estados Unidos e as comunidades Econômicas Européias) ou nacionais (Banco do Brasil, Companhia Souza Cruz, CNPq, Embrapa, Fapesp, Finep, Fundecitrus, Fundepag, Fundação Cargill, Coopercitrus e Procitrus) que colaboraram com recursos humanos ou financeiros para o sucesso obtido.

1. O DESASTRE CAUSADO PELA *TRISTEZA* EM SÃO PAULO E OUTRAS PARTES DO BRASIL E O REERQUIMENTO DA CITRICULTURA NO PAÍS ATRAVÉS DA PESQUISA

A introdução da *tristeza* no Brasil provocou a destruição das áreas produtoras de citrus mais importantes do país, pois eram as que, de preferência, utilizavam o então reconhecido como o melhor cavalo para as copas comerciais, a laranja “Azeda” (*Citrus aurantium L.*). Esse cavalo origina, na maioria dos casos, combinações intolerantes à *tristeza* com quase todas as copas comerciais de citros. A *tristeza* tornou-se em poucas décadas onipresente no Brasil, matando todos os pomares de laranjas “Doces” sobre “Azeda” e praticamente eliminando o uso deste cavalo na cultura.

O reerguimento da cultura da laranja no Brasil em convivência com a *tristeza*, é consequência principalmente das pesquisas realizadas por técnicos do Instituto Agrônomo e serão comentadas em seguida.

1.1. Controle da *tristeza* através do uso do cavalo tolerante

Mesmo antes que a etiologia da *tristeza* fosse esclarecida, técnicos do Governo do Estado de São Paulo relataram observações feitas em plantações, indicativas de que a moléstia não afetava certas combinações de citros em que o cavalo não era a laranja “Azeda” ou a lima da “Persia” (*C. limettioides Tan.*). Mas foram os trabalhos de Moreira (46) e o resultado de seus ensaios de cavalos nas estações experimentais do Instituto Agrônomo, iniciados em 1933, que forneceram a base experimental comprovando observações feitas por ele e outros investigadores em pomares comerciais de que a laranja “doce” (*C. sinensis Osb.*), o limão “Cravo” (*C. reticulata Blanco*), usadas como cavalo para copas de laranjais doces, mexericas e tangerinas, originavam combinações tolerantes à *tristeza*. Esse conhecimento permitiu o plantio de novos pomares em substituição aos destruídos pela *tristeza*, sendo utilizado, na maioria dos casos, o cavalo de limão “Cravo”, também de preferência de viveiristas e citricultores. Com base nesses conhecimentos, a citricultura brasileira superou um de seus maiores problemas.

1.2. Confirmação da natureza viral da *tristeza* e a sua transmissão pelo Pulgão *Toxoptera citricidus k.*

A natureza viral da *Tristeza* descoberta por Meneghini (42) e sua transmissão por *T. Citricidus* foram confirmadas no Instituto Agrônomo por Bennett & Costa (3). Também foi demonstrada a sua transmissão por união de tecidos e pela cuscuta. Verificou-se, em adição, que pulgões individuais alados ou apteros podiam transmitir a *tristeza* (11). Determinou-se ainda que *T. Citricidus* pode ser criado em abóbora (18), podendo esta cucurbitácea ser também utilizada para “limpar” pulgões Virulíferos. *T. citricidus* é encontrado naturalmente em uma espécie de ornamental (116). Com várias espécies de pulgão, a transmissão do vírus da *tristeza* foi negativa ou a eficiência deles foi tão baixa que não foi reconhecida nos testes realizados.

1.3. A morfologia da partícula do vírus da *tristeza* e comprovação da sua relação etiológica com a doença

A partícula do vírus da *tristeza* foi primeiramente visualizada no Brasil por técnicos do Instituto Agronômico (37). A sua relação etiológica com a doença foi comprovada por inoculações com o vector em diversas hospedeiras, acompanhadas por exames periódicos de preparações das plantas inoculadas, ao microscópio eletrônico. Verificou-se que as partículas alongadas de 2.000 nm, características do vírus, só apareciam em preparações de plantas inoculadas e não nas dos controles. Mesmo nas plantas inoculadas, a presença de partículas do vírus nas preparações feitas só era positiva 16 dias ou mais após as inoculações e não antes. Esse período coincide com o necessário para haver recuperação do vírus de plantas inoculadas através de pulgões não virulíferos alimentados nelas.

Os trabalhos realizados sobre a morfologia do vírus da *tristeza* no Instituto Agronômico foram mais tarde confirmadas por investigadores que trabalhavam com a *tristeza* em outras partes do mundo (85).

2.4. Caneluras como sintomas associados à *tristeza*

Estudos efetuados com mais de 300 tipos de citrus como cavalos para a laranja “Doce”, como copas para laranja “Azeda” ou como muda de pé franco, mostraram que variedades de grapefruit e de limão do tipo galego (*C. aurantifolia*) apresentavam sintomas de caneluras (“stem pitting”) (13). Essas caneluras são depressões longitudinais no lenho de galhos novos ou ligeiramente maduros, visíveis quando se destaca a casca nos locais onde elas se manifestam. Como resultado dessas investigações foi concluído que as caneluras representavam um sintoma da relação de determinados tipos de citrus ao vírus da *tristeza* e não uma moléstia devida a um vírus diferente. Foi também sugerido a técnicos sul-africanos que a situação na África seria similar a do Brasil (correspondência e manuscrito enviado), onde a moléstia “stem pitting” do grapefruit tinha sido descrita como uma nova virose (75). A reação dos técnicos sul-africanos foi primeiramente um tanto contrária a essa suposição (epistolamente), embora logo mais tenham publicado trabalho no qual expressam a mesma conceituação (40).

Observações posteriores confirmaram os resultados iniciais e mostraram que os sintomas de caneluras como resultados de inoculações com o vírus da *tristeza* podem ser encontrados em numerosos outros tipos de citros (27).

2.5. Purificação e serologia

As tentativas de purificação do vírus da *tristeza* foram inicialmente feitas no Instituto Agronômico em 1958 (108), antes mesmo que a morfologia do vírus tivesse sido determinada. Muitas das tentativas de purificação foram feitas com o fim de preparar antígenos para injeção em coelhos e posterior obtenção de antissoros (77). Como material de citros doador do vírus para purificação foram utilizadas plantas de limão “Galego”, laranja “Pera” e *Aeglopsis chevalieri* infectadas pelo vector. Preparações parcialmente purificadas foram obtidas tanto por Oliveira (76) como por Silva et al., (108) e levaram à obtenção de antissoros. Com estes foram feitas reações de precipitina em tubos, tendo sido verificado por microscopia eletrônica que nos precipitados específicos ocorria um aumento de diâmetro das partículas, que não se verificava com o soro normal. Essa observação parece ter sido uma menção do que hoje se descreve como decoração da partícula viral pelo anticorpo.

Mais recentemente, com o avanço havido na área da serologia e desenvolvimento do método ELISA, passou esta técnica a ser utilizada para determinação da presença do vírus da *tristeza* em diferentes materiais (69). Também a técnica de microscopia eletrônica de imuno-absorção vem sendo utilizada para determinar a presença do vírus da *tristeza* em plantas infetadas (112, 113). Esta técnica permitiu mais recentemente (78) que fosse obtida reação serológica positiva com o antissoro do vírus da *tristeza* e antígeno presente em videira, que tinha sido determinada por teste em indicadores, como estando afetada pela moléstia enrolamento da folha.

2.6. Influência da *tristeza* sobre a pressão osmótica e transpiração

Utilizando métodos crioscópicos Franco & Bacchi (23) determinaram a pressão osmótica em folhas e caule do cavaleiro acima do enxerto, no caule abaixo do enxerto e nas raízes do cavalo de combinações de “Bahia” sobre laranja “Azeda”, sadias e infetadas pela *tristeza*. Os resultados obtidos com as amostras das folhas e do caule do enxerto de laranja “Bahia” acima do ponto de união mostraram que houve uma ligeira redução na pressão osmótica de 18,73 para 16,81 atm e de 13,25 para 12,45 atm devido à infecção, para os dois locais de amostragem da copa. A redução osmótica provocada pela *tristeza* foi muito mais significativa no caso das amostras retiradas do cavalo de laranja “Azeda” caindo de 13,37 e 18,20 atm para 8,71 e 9,30 atm, respectivamente, nas amostras tiradas do cavalo abaixo do enxerto e das raízes.

A transpiração de plantas de laranja “Barão” em cavalo de laranja “Azeda”, sadias e afetadas pela *tristeza*, foi determinada por Mendes (41) em 5 plantas experimentais de cada tratamento. Elas foram pesadas a intervalos de 1 hora no período das 10 às 16 horas, durante 4 dias e tiveram a área foliar determinada. Os resultados obtidos, reduzidos a mg de água perdidos pela transpiração por decímetro quadrado de folha/minuto, foram de 2,72 para os controles e 1,06 para as plantas infetadas. Isso mostra que a *tristeza* reduz consideravelmente a transpiração das combinações feitas em laranja “Azeda”.

Rodrigues & Inforzato (87) estudaram a taxa de transpiração de plantas de “Baianinha” afetadas pela exocorte, sorose e xiloporose em cavalos de laranja “Caipira” e citrange “Troyer” (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*). Cada um desses vírus ou viróides foi estudado individualmente, apenas em presença do vírus da *tristeza*; em um dos tratamentos, os 2 vírus estavam presentes.

O vírus da sorose, acompanhado do da *tristeza*, reduziu a transpiração da copa de “Baianinha” nos dois cavalos. O viróide da exocorte junto com o vírus da *tristeza* não afetou a transpiração das copas em cavalo de laranja “Caipira”, mas aumentou-a no cavalo de citrange “Troyer”. O contrário se deu com o viróide da xiloporose juntamente com o vírus da *tristeza*, que não afetou a transpiração das copas de “Baianinha” em cavalo de “Troyer”, mas reduziu bastante a transpiração na copa em cavalo de laranja “Caipira”. A presença dos 2 vírus e 2 viróides nas copas “Baianinha” reduziu bastante a transpiração desta nos dois cavalos.

2.7. Composição mineral de plantas de combinações sadias e afetadas pela *tristeza* e outros vírus

Embora reconhecendo que a introdução da *tristeza* no Brasil e a sua posterior disseminação eram indicativas de uma moléstia infecciosa, técnicos do Instituto Agrônomo acharam de interesse determinar se haveria diferenças significantes na composição de plantas sadias e afetadas pela *tristeza*. Franco e Bacchi (23) relataram que análises efetuadas pela Seção de Química Mineral, dos teores de K, P, N, Mg, Fe e Ca no cavaleiro de laranja “Doce” e no cavalo de laranja “Azeda”, na região próxima ao enxerto, não revelaram nenhuma diferença significativa.

Resultados de análises efetuadas posteriormente (80) em 5 plantas afetadas (4 meses após a inoculação) e em 5 sadias de laranja “Doce” sobre cavalo de laranja “Azeda”, com 12 meses de idade, forneceram as seguintes indicações: **(a)** redução significativa no teor de CaO nas folhas e hastes das plantas Afetadas, menos significativa nas raízes; **(b)** maior teor de Na₂O nas folhas e hastes das plantas infetadas, mas não nas raízes; **(c)** redução no teor de Mn nas folhas e raízes de plantas afetadas.

Sintomas de deficiência de micronutrientes foram notados em plantas enxertadas e de pé franco infetadas pela *tristeza*, sendo mais frequente o de deficiência de zinco. Testes de aplicação de zinco por pulverizações frequentes não trouxeram correção da deficiência (25). Esses resultados foram interpretados como indicando que a deficiência de zinco é um efeito secundário da *tristeza*. O teste de aplicação de micronutrientes pela meia-folha (09) deu resultado positivo após fricção com zinco em folhas de laranja “Pera” de pé franco infetadas pela *tristeza* com sintomas de deficiência.

Gallo et al. (24) analisaram folhas de copas de laranja “Baianinha” e “Pera” infectadas pela *tristeza* quando enxertadas em 5 cavalos diferentes (laranja “Pera”, tangerina “Cleópatra” (*C. reticulata* Blanco), laranja “Caipira”, limão “Cravo” e limão “Rugoso Nacional” (*C. limon* (L.) Burn f.). Esses autores comentam que houve diferenças na constituição mineral entre as duas copas, sendo a maior diferença em potássio. Acrescentaram que algumas diferenças no teor de macronutrientes entre as duas copas podem ser devidas à presença de exocorte no material da laranja “Baianinha”.

Rodrigues & Gallo (86) determinaram o teor de 5 micronutrientes em copas de laranja “Baianinha” afetadas pela *tristeza*, enxertadas em laranja “Caipira” e em limão “Cravo” quando inoculadas com a exocorte, sorose e xiloporose individualmente e em combinação. Os autores apontam que os teores de Zn foram reduzidos pelos 3 patógenos isoladamente, mas não quando combinados. O teor de boro foi menor em plantas com exocorte e xiloporose. Algumas diferenças de macronutrientes também foram notadas.

2.8. Os testes da laranja “Azeda” e de limão “Galego” como indicadores do vírus da *tristeza*

Os primeiros investigadores que trabalharam com a *tristeza* (42, 3) usaram mudinhas novas de laranjas “Doces” sobre laranja “Azeda” como indicadores do vírus da *tristeza*. Estes últimos autores preparavam as combinações por enxertia de aproximação entre plantas jovens (12 a 15 cm de altura) de desenvolvimento igual, fazendo-se o corte de junção na aproximação entre o cavalo e o cavaleiro do tipo inglês complicado. Mais tarde, o cavalo de laranja “Doce” e a copa de laranja “Azeda” eram igualmente eliminados abaixo e acima do enxerto, respectivamente, até que a muda final fosse constituída de copa de laranja “Doce” e cavalo de “Azeda”. O preparo dessas mudas era feito sob condições de estufa (15).

Posteriormente, passou também a ser utilizado o que se determinou de teste de “Azeda”, em que borbulhas de tipos de citros suspeitos de conterem o vírus da *tristeza* eram enxertados em cavalos de laranja “Azeda” em viveiros no campo, paralelamente à enxertia de borbulhas do mesmo tipo, sadias (12).

Foi verificado em trabalhos iniciais sobre a *tristeza* que a moléstia não se manifestava somente em condições de enxertia, mas podia induzir sintomas em determinadas variedades e espécies em plantas de pé franco (12). Nesse trabalho foi sugerido que variedades que reagem com bons sintomas em plantas inoculadas de pé franco poderiam ser utilizadas como indicadores do vírus da *tristeza*. Foi dito, além disso, que seria mais provável encontrá-las entre as limas ácidas, pomelos e tângelos (*C. reticulata* x *C. paradisi*). Posteriormente, o limão “Galego” também lima ácida, facilmente obtível localmente, passou a ser usado em testes de rotina para determinação da presença do vírus da *tristeza* no Instituto Agrônômico, nas inoculações com o afídeo vector ou união de tecidos.

2.9. Termoterapia do vírus da *tristeza in vivo*. Minicâmara térmica

As primeiras tentativas de inativação do vírus da *tristeza in vivo* foram feitas no Instituto Agrônômico por tratamento de estacas infetadas em banho-maria, à temperatura de 40°-55° graus, por períodos de tempo entre alguns minutos a algumas horas (10). Os resultados obtidos mostraram que o vírus da *tristeza* não foi inativado por nenhum dos tratamentos efetuados, que permitiram a sobrevivência das borbulhas quando posteriormente enxertadas em laranja “Azeda”.

Posteriormente, Yuki et al., (117) trataram estacas de borbulhas de limão “Taiti” (*C. latifolia* Tan.) com *tristeza* em estufa a 38°C por períodos variáveis de tempo, depois de preparadas e bem acondicionadas para evitar dessecação. Os resultados obtidos em três experimentos feitos em épocas diferentes mostraram que o vírus da *tristeza* pode ser inativado em estacas de limão “Taiti” tratadas a 38°C por períodos de 14 dias ou mais.

Em algumas das estacas tratadas o vírus tinha sido inativado em algumas borbulhas, mas não em outras.

A inativação do vírus da *tristeza* em borbulhas de citros pelo calor foi também obtido por enxertia em cavalos sadios resistentes ou imunes e tratamento térmico localizado da borbulha infetada. A parte da haste do cavalo que recebia a borbulha era colocada dentro de uma minicâmara onde o calor radiante de uma lâmpada externa ficava restrito à borbulha e essa parte da haste, mas não atingia a parte

aérea e raízes da planta (58). A inativação térmica do vírus da *tristeza* em borbulhas para propagação experimental tornou-se tratamento de rotina com essa minicâmara. Um anteparo entre a fonte de calor e a borbulha deu melhores resultados no tratamento de material de laranjas “Doces” das variedades “Pera” e “Folha Murcha” (66). A incidência direta do calor sobre a borbulha pode também ser evitada no tratamento térmico com a minicâmara comum, girando-se a posição da planta submetida a tratamento de modo que a radiação da lâmpada que aquece a minicâmara não incida diretamente sobre a gema.

2.10. Isolados fracos e proteção.

A descoberta de que um isolado fraco poderia ser obtido a partir de borbulha retirada de planta portadora de um complexo natural forte (26) foi a primeira demonstração da existência de isolados fracos e fortes no complexo do vírus da *tristeza*. Os resultados descritos no trabalho acima mostraram também que o isolado fraco segregado através da borbulha deu origem a um crescimento melhor mesmo em cavalo não tolerante e que, apesar de superinoculado várias vezes com pulgões virulíferos, ofereceu proteção.

O conhecimento acima abriu caminho para os testes de inoculação cruzada com o fim de estudar relações de parentesco entre diferentes isolados e também para os estudos de proteção com o fim de controlar os efeitos negativos da infecção pelo complexo comum do vírus da *tristeza*.

2.11. “Blending” e quebra de proteção por enxertia ou por alta pressão de inóculo com o vector

Borbulhas portadoras de um isolado fraco do vírus da *tristeza*, enxertadas individualmente em laranja “Azeda” em comparação com outras infetadas por um isolado forte, mostraram expressivas diferenças em crescimento, favoráveis às primeiras. Quando os dois tipos de borbulhas foram enxertadas simultaneamente no mesmo cavalo de “Azeda”, uma acima da outra (em ordem direta e inversa), o crescimento feito por estas foi intermediário, representando aparentemente uma média da somatória dos dois (08). Não houve nenhum tipo de interferência de exclusão. A essa combinação de efeitos foi dado o nome de “blending”.

Em testes nos quais foi estudado o efeito protetor de isolados fracos em copas de laranja “Pera”, limão “Galego” e pomelo Ruby Red (59), foi verificado que a premunização oferece proteção satisfatória e praticamente permanente quando as plantas premunizadas são expostas à superinfecção natural ou experimental por meio do pulgão vector. Há entretanto, quebra de proteção quando a superinoculação é feita por união de tecidos, podendo haver ou não “blending”. Quebras de proteção podem ser obtidas com o vector só ocasionalmente quando se promove excessiva pressão de inóculo.

A aparente quebra de proteção, observada raramente em pomares de combinações premunizadas, formadas sob condições de campo, pode resultar de infecção prévia do cavalo no viveiro, geralmente como resultado de “blending”(57; 64).

2.12. Controle da *tristeza* em copas sensíveis por premunização

O controle da *tristeza* pelo uso de cavalos tolerantes solucionou o problema para grande número de copas comerciais de laranja “Doce”, mexericas e tangerinas. Mas, com o passar do tempo, foi notado que algumas variedades de citros como a laranja “Pera”, o limão “Galego” e os pomelos apresentavam problemas devidos à *tristeza* mesmo quando enxertados em cavalos tolerantes. Esse fato ocorria sempre que a copa era do tipo que permitia multiplicação do vírus e tinha tecidos sensíveis. Tornou-se então necessário desenvolver um método de controle para esses tipos de citros, pois a laranja “Pera” sempre foi de grande importância citrícola para São Paulo, assim como o limão “Galego”.

A abordagem mais prometedora para solucionar o problema de controle da *tristeza* em copas sensíveis foi a baseada na premunização, isto é, a inoculação de material sadio de copas sensíveis com isolados fracos para esses tipos de copas e que oferecessem proteção em campo à superinfecção natural pelo complexo normal forte. Resultados preliminares favoráveis obtidos anteriormente (14) justificavam essa abordagem.

Como resultado da visita de técnicos norte-americanos do U. S. Department of Agriculture ao Instituto Agrônomo em 1959 (Claud L. Horn, Earl R. Glover e Bert Lexen) foi iniciado um novo projeto cooperativo com a duração de 5 anos entre o Instituto Agrônomo e o Governo Norte-Americano, tendo por tema a possibilidade de controle da *tristeza* em copas de citros sensíveis através da premunização. Esse projeto foi subvencionado com recursos obtidos pela venda de excedentes agrícolas dos Estados Unidos ao Brasil (US PL 480), tendo recebido a referência Grant FG-Br 107.

Os resultados obtidos no projeto acima, que se prolongou por mais de 10 anos, mostrou conclusivamente que as copas de laranja “Pera”, limão “Galego” e pomelo podem ser grandemente beneficiadas pela premunização do material de propagação com isolados fracos protetores. A laranja “Pera” premunizada é campeã em produções (110) e permitiu que essa variedade sensível pudesse continuar a servir de estio na produção de citros em São Paulo (59; 117).

Mais recentemente (68) foi verificado que o limão “Taiti” é também, bastante sensível como copa em cavalos tolerantes e tem sua produção grandemente beneficiada pela premunização com isolados fracos adequados.

2.13. A premunização com isolados fracos beneficia também as copas tolerantes.

A premunização foi primeiramente considerada como uma solução para o problema representado pelas copas sensíveis enxertadas em cavalos tolerantes. Posteriormente foi verificado que também a proteção obtida pela premunização com isolados fracos pode ser benéfica até no caso de combinações de cavalo/cavaleiro consideradas como tolerantes (73). Esse fato, além de beneficiar a produção, é indicativo de que mesmo as combinações tolerantes sofrem um efeito depressivo induzido pela infecção com o complexo normal do vírus da *tristeza*.

2.14. A premunização também funciona no caso de *tristeza* de Capão Bonito

A *tristeza* de Capão Bonito, registrada na década de 60 na região desse nome, constituiu nova ameaça à citricultura brasileira. O complexo lá existente, introduzido (92) ou localmente evolvido tem a propriedade de afetar praticamente quase todas as copas de laranja “Doce” tolerantes à *tristeza* comum, induzindo sintomas severos de caneluras (72). Felizmente para a produção citrícola brasileira, as medidas de quarentena adotadas e a presença da *tristeza* comum nos pomares oferecem uma barreira à distribuição e disseminação dessa forma de *tristeza* para as regiões maiores produtoras de citros do país mesmo após mais de 20 anos (67).

Experimentos executados na Estação Experimental de Capão Bonito (63) mostraram que a premunização funcionou em grande número de casos de maneira satisfatória protegendo as plantas contra a superinfecção pelo vírus da *tristeza* de Capão Bonito, mas houve aparente quebra de proteção em alguns casos. Estas exceções podem ter sido por ter falhado a premunização, não se tratando de verdadeira quebra de proteção. O cavalo de limão “cravo”, que se comporta como satisfatoriamente tolerante à *tristeza* comum, é bastante sensível à *tristeza* de Capão Bonito.

2.15. Atratividade pelo amarelo de *Toxoptera citricidus* e repelência promovida pela casca de arroz, um paradoxo aparente

Toxoptera citricidus é o mais importante vector do vírus da *tristeza* no Brasil e em outros países onde está presente. Foi a espécie de pulgão cujos alados mostraram possuir mais atratividade pela cor amarela de várias espécies de afídeos estudadas por Costa (22). Foi também mais sensível aos efeitos repelentes de certos “backgrounds”, sendo o alado fortemente repelido pela casca de arroz, como verificado pelo mesmo autor.

As vantagens do emprego de casca de arroz como repelente para a fase de formação do cavalo para citros, promovendo redução de infecção pela *tristeza* das mudas nessa fase, foi verificada por Costa (22) e Yuki (115). Este último investigador discutiu as vantagens desse controle na formação da muda premunizada, como forma de evitar o “blending” de isolados contaminantes do vírus da *tristeza* que infetam o cavalo antes do enxerto, com o isolado fraco de borbulha premunizada enxertada posteriormente. Em trabalho posterior (118) foi mostrado que os picos de revoada de *T. citricidus* coincidem com o crescimento de novos lançamentos dos citros e que localidades sem culturas de laranjas se prestam melhor para a formação de cavalos sadios na preparação de mudas premunizadas.

2.16. Efeito do som sobre *Toxoptera citricidus*

Rossetto et al., (96) determinaram que o movimento rítmico de colônias de *Toxoptera aurantii* em cacau é resposta a som. Nesse trabalho são também mencionadas observações de que colônias do pulgão em brotação nova de citros também respondiam ao som com movimentos rítmicos sincrônicos. Estas últimas observações devem se referir a *Toxoptera citricidus*, pois esta é a espécie que

comumente se encontra em brotação nova de citros. *T. aurantii*, embora o nome indique, só é encontrada excepcionalmente em citros no Estado de São Paulo.

Na década de 50, um dos autores observou que *T. citricidus* mostrava tendência para se desprender das folhas de citros quando estas eram cortadas com uma tesoura. Este efeito foi atribuído à vibração produzida pelo cinzalhamento. A fim de verificar se os afídeos se desprenderiam como resposta a vibrações, solicitou-se ao colega Coaracy M. Franco, da Seção de Fisiologia do Instituto Agronômico de Campinas - (IAC), a sua colaboração de violinista. Este colega levou seu violino à Seção de Virologia e utilizou-o para emitir sons altos e baixos perto de galhos e de plantinhas de citros colonizadas por *T. citricidus*. Infelizmente, a experiência não surtiu o efeito desejado, pois os afídeos não se desprenderam das folhas como era esperado.

2.17. Possibilidade de reutilização da laranja “Azeda” como cavalo

A possibilidade de reutilizar a laranja “Azeda” para tipos de citros que usualmente parecem sobre esse cavalo, em áreas onde a *tristeza* é endêmica, vem sendo considerada pelos técnicos do Instituto Agronômico há muitos anos, desde que a moléstia foi introduzida no país. Muitos pomares no Estado de São Paulo, enxertados em laranja “Azeda”, foram nessa ocasião observados cuidadosamente à procura de plantas que se mostrassem tolerantes à moléstia e cujo cavalo pudesse ser mutante tolerante de “Azeda”. Observações feitas em muitos milhares de plantas mostraram que só excepcionalmente uma ou outra planta escapava aparentemente aos danos causados pela *tristeza*. A observação continuada dessas plantas e a obtenção de brotos a partir das raízes do cavalo mostraram que em alguns casos a planta não tinha ainda sido infetada, sendo-o posteriormente; em outros, tratava-se de engano de cavalo, tendo a planta sido enxertada em cavalo tolerante. Posteriormente o problema continuou a ser abordado sob o ângulo da procura de tipos de laranja “Azeda” que pudessem ser tolerantes ao vírus, de isolados do vírus da *tristeza* que fossem fracos para esses cavalo com vistas à premunização, ou por combinação dos dois (15).

Nos testes primeiramente efetuados no Instituto Agronômico, entre 22 tipos de “Azeda” e “Agro-doce”, não foi encontrado nenhum que possuísse nível promissor de tolerância à *tristeza*. Posteriormente, foram testados outros 60 tipos de “Azeda” (60) sem que também se encontrasse tolerância à *tristeza* em nível satisfatório.

Nos testes em que foram procurados isolados fracos do vírus da *tristeza* para fins de premunização da laranja “Pera” e do limão “Galego”, todos aqueles selecionados em copas sensíveis, mas que se comportavam como plantas de elite, foram avaliados experimentalmente em cavalos tolerantes e em laranja “Azeda” (53). Houve alguma variação na severidade dos sintomas produzidos por esses isolados nessas combinações em “Azeda”, mas mesmo os que revelaram menos severos (de nº 21 e 50) pareciam não ter nível aceitável para fins aplicados. O fato de esses isolados (21 e 50) terem se destacado para a “Azeda” fez com que fossem testados em comparação com um isolado normal em combinações de copas de tangerina poncan, pomelo “Marsh Seedless”, limão “Galego” e laranja “Pera” enxertadas em 10 variedades de “Azeda” (70).

A idéia de reutilização da laranja “Azeda” como cavalo recebeu grande estímulo após a constatação da existência do declínio dos citros no Brasil (88), pois esse cavalo é tolerante a essa doença e a sua reutilização em nossos laranjais iria concomitantemente solucionar esse novo problema.

Como o complexo do vírus da *tristeza* que ocorre naturalmente na Flórida, EUA, é geralmente fraco para o cavalo de laranja “Azeda” lá utilizado, foi programada a introdução de alguns isolados fracos do complexo floridiano para testes em São Paulo, primeiramente em condições de estufa. A proposta de introdução do vírus foi submetida a uma espécie de plebiscito entre os fitopatologistas que compareceram ao V Congresso do Grupo Paulista de Fitopatologia, (Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz - ESALQ, Piracicaba 18-20 de janeiro de 1982 (61) e recebeu aprovação praticamente geral. Essa introdução foi posteriormente feita na forma de vírus purificado, para evitar a introdução de outros possíveis vírus. De 15 isolados introduzidos só foram estabelecidos 3 (74). Os bons resultados obtidos inicialmente com quatro copas inoculadas com os 9 isolados, enxertadas em laranja “Azeda” em estufa, levaram a que o material em questão fosse ensaiado em campo. O crescimento das plantas em viveiro a céu aberto foi satisfatório, o que estimulou o transplante para o local definitivo. Durante cerca de 3 anos plantas inoculadas com alguns isolados; “Pera” com os isolados 30-T4, T-11 e T-30, “Galego” com os isolados T-11^a e T-30, pomelo “Marsh Seedless” com os isolados 50, T-26 e 53-T35b e “Poncan” com os isolados 50 e “Satsuma”, cresceram razoavelmente, embora fossem muito menores do que seria de esperar se as copas estivessem em cavalos tolerantes. No entanto, os resultados finais do experimento não mostraram plantas viáveis, indicando que nenhum dos isolados testados foi capaz de proteger as combinações em “Azeda”, contra o desafio dos isolados fortes do vírus existentes no local (62).

2.18 Hospedeira do vírus da *tristeza* fora de Rutaceae

Até 1970 o círculo de hospedeira conhecido do vírus da *tristeza* limitava-se à família Rutaceae. Isso apesar de terem sido ensaiadas algumas centenas de espécies de plantas fora da família em inoculações com pulgões virulíferos (*Toxoptera citricidus*), pois não foram observados sintomas reconhecíveis quando as plantas inoculadas foram comparadas com controles não inoculadas (Costa, A.S. Trabalho não publicado).

Em 1970, o fitopatologista peruano Dr. Arturo Ozores informou ao segundo autor que tinha reconhecido sintomas de uma virose em plantas de maracujá (*Passiflora* sp.) que cresciam em laranjeiras infetadas pela *tristeza* no Peru. Essa observação estimulou os autores a efetuar uma revisão do assunto e foram obtidas 10 espécies de *Passiflora* para testes.

Mudinhas novas dessas 10 espécies foram inoculadas por meio do vector virulífero com o vírus da *tristeza*. Das 10 espécies ensaiadas somente *P. gracilis* mostrou sintomas de infecção e a presença do vírus da *tristeza* nas plantas infectadas foi verificada em preparações examinadas ao microscópio eletrônico (65)

2.19. Benefícios indiretos resultantes das investigações sobre a *tristeza*

dos citros

Além dos benefícios diretos resultantes das pesquisas sobre a *tristeza* conduzidas na Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, em cooperação com o U.S. Department of Agriculture - USDA, como por exemplo a metodologia de controle da *tristeza* em copas sensíveis por premunização, o projeto trouxe vantagens indiretas : **(a)** foi introduzida grande coleção de tipos de citros para avaliação com cavalo, muitos dos quais não existiam na coleção do Instituto Agronômico - IAC, e passaram a fazer parte desta; **(b)** a cv Murcote entrou em produção em São Paulo a partir de árvores de um ensaio de cavalos para copas de “Barão” com *tristeza* plantado na estação experimental de Limeira do Instituto Agronômico (atualmente Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”).

3. EXOCORTE

Moreira (46) parece ter sido o primeiro investigador a registrar, no Brasil a ocorrência da exocorte, ao descrevê-la em determinadas combinações cavalo-cavaleiro de ensaio de cavalos instalado em 1936 na estação Experimental de Limeira. Nessa menção, a exocorte no cavalo de limão “Cravo” foi confundida com gomose e atribuída a um aumento de suscetibilidade desse cavalo a esta moléstia quando a copa era de laranja “Baianinha” e pomelo “Marsh Seedless”. Comentário semelhante já tinha sido feito por Salibe em sua tese de doutoramento sobre a exocorte (98) ao se referir a trabalhos de Moreira, nos quais é mencionada a grande suscetibilidade do limão “Cravo” a certa gomose, quando utilizado como cavalo para copas de “Baianinha” e para o pomelo “Marsh Seedless” e não como cavalo para a “Pera”. A observação de Moreira é talvez uma das primeiras no mundo feitas sobre a reação do cavalo de limão “Cravo” à presença da exocorte na copa.

Moreira descreveu e identificou corretamente a exocorte do limão “Cravo” em trabalho posterior (47) e foi também o primeiro investigador a reconhecer o paralelismo na reação dos cavalos de *Poncirus trifoliata* e de limão “cravo” ao viróide da exocorte (48).

3.1. Importância da exocorte e variedades infetadas

A exocorte nunca tinha sido registrada como moléstia de importância no Brasil antes da renovação dos laranjais brasileiros após a devastação causada pela *tristeza*. Moreira (47) comentou esse aspecto do problema, apontando que os cavalos utilizados anteriormente a 1955, entre os quais o predominante era laranja “Azeda”, comportavam-se como tolerantes à exocorte. Com a renovação dos laranjais, principalmente em limão “cravo”, sensíveis à exocorte, começaram a aparecer os problemas da moléstia na propagação de copas portadoras do viróide.

Os problemas causados pela exocorte se intensificaram na década de 50. Moreira e um dos autores fizeram parte da comissão designada pela Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo para avaliação do problema e sugestões de medidas de controle. Em relatório preparado por essa comissão (79) foi apontado que praticamente 100% dos clones de “Baianinha”, “Hamlin” e “Maracanã”, existentes em São Paulo achavam-se infetados pela exocorte; clones de “Barão”, “Natal”, “Pera”, “Piralima”, “Valência” e “Grapefruit”, “Marsh Seedless” estavam, em parte, infetados. Aqueles de limoeiro “Galego”, limão “Eureka”, tangerina “cravo” laranja “lima” estavam, em sua maioria, livres da exocorte. Foi apontado que os clones de variedades que eram ocasionalmente propagadas por semente mostravam maior frequência de clones isentos de exocorte e que o Estado de São Paulo deveria iniciar um serviço de registro de matrizes isentas dos agentes causadores da exocorte, sorose, xiloporose e de outras viroses, mas que não adiantava procurar também excluir o vírus da *tristeza* dada a facilidade com que o material isento voltaria a ser infetado em campo.

Salibe (98) testou a maior parte da coleção de germoplasma de citros da Estação Experimental de Limeira, do Instituto Agrônomo, para determinar a presença do viróide da exocorte em combinações portadoras. Os testes foram feitos, em parte, por enxertia de duas borbulhas de cada tipo de citros a ser avaliado em

cavalos de limão “Cravo” , para leitura dos sintomas na brotação destes. Outra parte da coleção foi avaliada por sobre-enxertia das copas a serem investidas que estavam enxertadas em cavalos de “caipira” , ainda no viveiro de enxertia, com borbulha das indicadoras limão “Cravo” e *Poncirus trifoliata*. Foram testadas 222 amostras de 13 grupos de citros. Destas, 86 deram resultados positivos para presença do viróide. Dos 13 tipos de citros testados, 12 tiveram amostras positivas. Somente limões rugosos (2 amostras) deram testes negativos.

No mesmo trabalho (98) esse investigador descreveu resultados de um teste de 116 tipos de citros para determinar sensibilidade (desenvolvimento de sintomas) à exocorte. O teste foi efetuado por enxertia de borbulha do material a ser testado em cavalos de “Caipira” previamente infetados com a exocorte. Após o pegamento, foram os cavalos decapitados para permitir o desenvolvimento das borbulhas dos tipos a serem avaliadas. Observações feitas nos lançamentos dessas borbulhas permitiram reconhecer sintomas indicativos do viróide da exocorte em 44 variedades das 116 testadas. Os sintomas desenvolvidos permitiram a colocação das variedades sensíveis em 5 grupos distintos, mas as manchas amarelas ou rachaduras da casca estavam presentes em todos os grupos. O período para manifestação dos sintomas variou de 120 a 400 dias. Comentário feito pelo autor sugere que muitas dessas variedades que apresentaram sintomas na casca dos ramos, quando infetadas pela exocorte, poderão desenvolver lesões ou rachaduras no tronco se usadas como cavalo para copas infetadas. Observações de campo mostraram que isso parece ter acontecido em um pomar experimental enxertado em lima da “Pérsia”, na Estação Experimental de Limeira.

3.2. Fendilhamento e depressão da casca do tronco do limão “Taiti” associados à exocorte

Entre os tipos de citros sensíveis à exocorte, determinados por Salibe (98), está o limão “Taiti” que, quando infetado, desenvolve rachaduras longitudinais ou depressões na casca do tronco e galho. Investigações foram efetuadas por Salibe & Moreira (105) sobre uma moléstia da copa de plantas adultas de limão “Taiti” , comum no Estado de São Paulo, caracterizada por fendilhamentos e depressão de casca, é capaz de matar 5% de plantas anualmente de uma plantação comercial dessa lima ácida. Os resultados mostraram que ela é associada à infecção pela exocorte. A evidência obtida resultou de estudos com seis clones diferentes de “Taiti” (IA-1 a IA-6) plantados na estação experimental de Limeira em 1961. A observação das matrizes e propagações desses seis clones mostrou que cinco deles apresentavam a escamação da casca e apenas o IA-5 (“Bears”line) não apresentava esses sintomas. Amostras de gemas desses seis clones foram testadas para a presença do viróide da exocorte , por inoculação e observação dos sintomas produzidos em cavalos de limão “Cravo”. Avaliações finais feitas quinze meses após a inoculação mostraram que os cinco clones de limão “Taiti” , que apresentavam escamação da casca, testaram positivos para presença do viróide da exocorte. O clone IA-5, sem escamação, produziu teste negativo. Nos testes positivos houve correlação entre a severidade dos sintomas de escamação apresentados pelos clones de limão “Taiti” e aquela do isolado do viróide da exocorte, como avaliado pelo tamanho das manchas e grau de fendilhamento desenvolvidos nas plantas-teste inoculadas de limão “Cravo”.

Num teste posterior, Salibe & Moreira (105) compararam um clone velho de limão “Taiti” (IA-4 invadido por um isolado fraco do viróide da exocorte) com um clone suposto de origem nucelar livre do patógeno. Esses dois clones foram enxertados em cavalos de laranja “Caipira” e concomitantemente inoculadas de três maneiras diferentes: **(a)** em uma primeira série com borbulhas de “Hamlin” portadoras de um isolado forte da exocorte; **(b)** numa segunda série com borbulhas de “Taiti IA-1 infetadas com um isolado fraco do viróide e **(c)** em uma série com borbulhas de um clone nucelar de “hamlin” livre do viróide.

Avaliações feitas cinco meses após a enxertia mostraram que os lançamentos do clone velho de “Taiti” , quando comparados com os do controle, sofreram uma redução no vigor de crescimento (comprimento do lançamento) de 49% na série inoculada com o isolado forte; de 10% na série inoculada com o isolado fraco. No caso dos lançamentos do clone de “Taiti” suposto de origem nucelar e livre do viróide, as diferenças foram maiores. A redução do vigor dos lançamentos foi de 61% no caso da inoculação concomitante com o isolado forte e de 39% com o isolado fraco.

Salibe & Moreira (104) fazem referência ao fato de que o limão “Perrine” (híbrido de *C. aurantifolia* x *C. limon*) também desenvolve moléstia semelhante à do limão “Taiti” quando infetado pela exocorte.

3.3. Testes de identificação de material infetado pela exocorte

Combinações infetadas que têm cavalo tolerante à exocorte, em geral não apresentam sintomas indicativos da presença do viróide, a não ser que se manifeste na copa se esta for sensível. Combinações infetadas sobre o limão “Cravo” , *Poncirus trifoliata* ou outro cavalo sensível podem levar vários anos para desenvolver sintomas neste (49).

Em testes de sobre-enxertia em plantas infetadas pelo exocorte, de “Hamlin” e “Baianinha” em cavalo tolerante, com borbulhas de limão “Cravo” e *P.trifoliata*, Moreira (50) verificou que os lançamentos dessas borbulhas apresentavam, após algum tempo, manchas amarelas alongadas na casca que mais tarde se tornavam fendilhadas. Essas observações serviram de base para o desenvolvimento de testes de identificação do viróide da exocorte usando essas indicadoras.

Moreira (50) avaliou três modalidades de teste para identificação da exocorte com base no reconhecimento das manchas amarelas alongadas na casca do tronco de limão “Cravo” : **(a)** através da sobre-enxertia de plantas adultas de combinações ou de planta de pé fraco que se quer testar, com borbulhas das indicadoras, obtendo resultados que podem ser lidos em seis meses; **(b)** idem de combinações novas ainda no viveiro de enxertia, com leitura em cinco meses; **(c)** usando cavalos de limão “Cravo” que são enxertados com as borbulhas a serem testadas, promovendo-se primeiramente a brotação dessas e posteriormente de ramos do cavalo para observação das manchas amarelas. Esta leitura pode ser feita em cerca de quatro meses.

Salibe (98) fez uma revisão do teste da exocorte em limão “Cravo” . Ele inoculou cavalos desta espécie em viveiro com borbulhas infetadas pela sorose,

xiloporose e *tristeza*, sós ou em mistura, acrescentando em uma série também o viróide da exocorte. Esse investigador verificou nesses experimentos que nenhum dos outros agentes patogênicos, só ou em mistura, induziu sintomas no limão “Cravo” . Foi somente nas inoculações em que foi introduzido também o agente causador da exocorte é que apareciam as manchas alongadas na casca dos ramos; ele assinalou também, que elas não diferiam entre si nas diferentes misturas do viróide da exocorte. A presença de outros agentes infecciosos, portanto, não interferiu no teste de indexação em limão “Cravo” .

Salibe (98) acrescentou uma outra modalidade de utilização do limão “Cravo” como indicadora para reconhecimento da exocorte: a de dupla enxertia que possibilita o aproveitamento de qualquer cavalo suscetível disponível. Nessa modalidade, uma ou duas gemas das plantas a serem avaliadas são enxertadas no cavalo disponível e, logo acima enxerta-se a gema indicadora. Após o pegamento , poda-se o cavalo acima da gema indicadora e cuida-se para que esta se desenvolva vigorosamente para leitura dos sintomas.

A técnica descrita por Salibe apresenta a possibilidade de que alguma outra espécie de cavalo, quando infetada pelo viróide da exocorte, permita que este atinja maior concentração na planta, com conseqüente melhor ou mais rápida leitura dos sintomas nos lançamentos da gema da indicadora.

3.4. Procura de melhores indicadoras para o viróide da exocorte

Salibe & Moreira (104) compararam 30 tipos de citros (incluindo variedades de cidra, limões “Doces”, limas-mandarinas, limões e seleções de limão “Cravo” e de *Poncirus trifoliata*) como indicadoras para o viróide da exocorte por dupla enxertia (gema inóculo e gema indicadora) em cavalos de laranja “caipira” . o viróide foi introduzido nos cavalos por três borbulhas de laranja “hamlin” portadora do patógeno da exocorte e também do vírus da *tristeza*. As borbulhas foram enxertadas individualmente acima daquelas do inóculo, em grupos de seis plantas por indicadora. A parte superior do cavalo foi podada logo acima da borbulha indicadora vinte dias após a enxertia e a brotação desta foi avaliada a intervalos. O limão “Harvey” e a cidra “Etrog” comportaram-se com indicadoras mais rápidas, desenvolvendo sintomas facilmente reconhecíveis. As variedades de lima-mandarina reagiram de maneira semelhante à do limão “Cravo” e podem ser usadas como indicadoras. Em outro ensaio descrito no trabalho acima citado, os mesmos investigadores compararam cinco das melhores indicadoras (limão “Harvey” , cidra “Etrog” , lima-mandarina “Ling Ming”, uma seleção de limão “Cravo” e uma de *Poncirus trifoliata*). A comparação foi feita pelo teste de dupla enxertia, usando-se inóculo de um isolado severo e de um isolado fraco do viróide. Uma das séries recebeu borbulha de material não infetado.

Todas as cinco variedades testadas comportaram-se satisfatoriamente como indicadoras para ambos isolados do viróide da exocorte. Todas, exceto *P. trifoliata*, foram também boas indicadoras para o isolado fraco. Os autores destacam o limão “Harvey” e a cidra “Etrog” como as melhores.

Usando a técnica de dupla enxertia, Pompeu et al., (81) compararam onze variedades de cidra como indicadoras para o viróide da exocorte em limão “Cravo”.

Verificaram que a cidra “Kerkachi” desenvolveu sintomas que permitiram a diagnose de material infetado pela exocorte em cerca de dez semanas , com antecipação de três a quatro semanas em relação à cidra “Etrog” . Nos mesmos experimentos foi determinado que, usando-se o cavalo de limão “Volkameriano” , de crescimento mais rápido do que o limão “Cravo” , para a dupla enxertia, a leitura dos sintomas nos lançamentos da borbulha indicadora de cidra “Kerkachi” puderam ser feitos em oito semanas.

3.5. Efeito ananicante induzido pela exocorte pode ser usado para obter maior adensamento de plantio

O viróide da exocorte pode exercer um efeito ananicante em certas combinações de citros. O uso de isolados fracos para obter essa resposta e permitir maior adensamento no plantio está sendo investigado em várias partes do mundo e no Brasil (109).

4. XILOPOROSE

4.1. Trabalho pioneiro de Moreira sobre a xiloporose dos citros

As investigações de Moreira (43,44 e 45) sobre a xiloporose representam os primeiros trabalhos efetuados na área de viroses dos citros feitos no Instituto Agrônômico Moreira verificou que a anomalia se manifestava principalmente em combinação de laranja “Barão”(*C. sinensis Osbeck*) sobre cavalo de lima “da Pérsia” (*C. limettioides Tan.*). Verificou também que árvores afetadas da combinação poderiam ser recuperadas por sub-enxertia com cavalo laranja “Azeda” ou por sobre-enxertia com laranja “Pera” ou com a própria lima “da Pérsia”.

Moreira identificou corretamente a moléstia da combinação “Barão” sobre lima “da Pérsia” como sendo idêntica à xiloporose da Palestina, embora tenha atribuído tanto à doença de Limeira como à daquele país, a mesma causa - incompatibilidade entre o cavalo e enxerto. Esta suposição de Moreira era perfeitamente aceitável na ocasião, pois a natureza da xiloporose era confusa. Mesmo, posteriormente, durante muitos anos, a etiologia da xiloporose permaneceu em dúvida, embora as evidências indicassem que poderia ser um vírus. Só mais recentemente é que a sua verdadeira natureza foi determinada, tendo sido verificado ser causa da por um viróide e não vírus (90).

4.2. Combinações indicadoras

Muitas das copas de citros podem estar infetadas por xiloporose sem apresentação de sintomas. Quando enxertadas em cavalos sensíveis como a lima “da Pérsia” , limão “Cravo” e alguns tângelos, desenvolvem-se sintomas no cavalo próximo ao ponto de enxertia, depois de alguns anos. Estes são caracterizados por depressões arredondadas e alongadas no lenho que correspondem a saliências dos tecidos na parte interna da casca. Eventualmente ocorre a situação inversa. Em estado mais avançados, observam-se depressões ou rachaduras superficiais da casca e ocasionalmente um inchaço do enxerto ou porta-enxerto no ponto de união.

Os primeiros resultado de Moreira nos estudos sobre a xiloporose foram obtidos sobre a lima “da Pérsia” , sendo esta a indicadora. O teste foi denominado então o da lima “Doce”. Posteriormente, Moreira (51) comparou borbulhas de vários tipos de citros portadoras de xiloporose ou cachexia em três cavalos: lima “da Pérsia” , tângelo “Orlando” e limão “Rugoso da Flórida”. Sintomas foram observados somente na lima “da Pérsia” e tângelo “Orlando” seis anos após as enxertias. Posteriormente foi verificado que tângelo “Orlando” é uma indicadora que apresenta sintomas mais depressa e mais conspícuos que a lima “da Pérsia”. Mesmo assim, os sintomas só foram conhecidos três anos após a enxertia.

4.3. Teste rápido para a detecção de xiloporose

Salibe (99) desenvolveu um teste de dupla enxertia para caracterização de xiloporose utilizando o tângelo “Orlando” como indicadora. Esse teste permite leituras em pouco mais de um ano. O teste é efetuado enxertando-se a borbulha a ser avaliada em um cavalo vigoroso suscetível e simultaneamente ou um mês após, a borbulha indicadora, acima da anteriormente enxertada. Posteriormente poda-se o

cavalo acima da indicadora, para promover a brotação desta. A leitura do teste é feita na base do ramo da indicadora, próximo ao ponto de enxertia após a retirada da casca. As lesões de xiloporose no lenho podem surgir em cerca de 12-18 meses.

5. SOROSE

Embora a sorose estivesse bastante disseminada em algumas variedades de clone velho no passado, esta virose aparentemente nunca foi muito importante no estado de São Paulo.

5.1. Tipos de sorose constatadas no Estado de São Paulo

Em 1960 Rosseti & Salibe (95) percorreram cinco regiões citrícolas do Estado de São Paulo, avaliando diversas variedades de plantas cítricas quanto à presença de sorose. Constataram cinco tipos de sorose nas diferentes variedades examinadas: sorose A, sorose alvear, gomose côncava, marca de dedos e pipoca.

5.2. Distribuição dos agentes causais da sorose, exocorte e xiloporose na planta cítrica

Salibe (102) conduziu uma série de ensaios para investigar a distribuição dos agentes responsáveis pelas doenças da sorose, exocorte e xiloporose na planta cítrica. Utilizou como inóculo porções de folhas, gemas de ramos novos, porções de casca de tronco, da copa e do porta-enxerto e da raiz de laranjeiras infectadas.

Selecionou para os testes como fonte de inóculo plantas de laranja “Doce” em porta-enxertos de laranja “caipira”, limão “Cravo”, “trifoliata”, “Lima da Pérsia” e tângelo “Orlando”, infectadas com uma daquelas doenças, mas não com as demais. Os indicadores foram o limão “Cravo” para a exocorte, a laranja “caipira” para a sorose e o tângelo “orlando” para a xiloporose, obtidas de clones nucelares e enxertadas sobre seedling de limão “cravo”. O período de incubação observado foi de 4-6 semanas para a sorose, 4-12 meses para a exocorte e 10-36 meses para a xiloporose. Todas as plantas testes revelaram resultados positivos para os testes da sorose e da xiloporose, revelando que estas doenças estão bastante distribuídas nas plantas infectadas. O viróide da exocorte foi encontrado quando se utilizou inóculo representado por gemas e tecidos da casca, tronco e da raiz. Entretanto, as folhas parecem estar livres desse viróide ou infectadas apenas com estirpes atenuadas.

5.3. Vigor e produtividade de laranjeiras “Baianinha” nucelar em presença e ausência dos vírus da sorose, exocorte e xiloporose

Plantas de laranja “Baianinha” nucelar em porta-enxerto de limoeiro “cravo” e de laranja “caipira” foram inoculadas com o vírus da sorose, e os viróides da exocorte e da xiloporose para comparação do vigor e produtividade das plantas sadias e infectadas. Os tratamentos realizados foram: 1) sorose; 2) exocorte; 3) xiloporose; 4) sorose + exocorte + xiloporose; 5) controles não inoculados.

No viveiro não foram observadas diferenças de crescimento das plantas após a inoculação. Cinco anos após o plantio em local definitivo, as plantas enxertadas sobre porta-enxerto de limoeiro “Cravo” e infectadas com as três doenças, mostraram desenvolvimento 15,5% inferior aos controles e as infectadas apenas com a exocorte eram 4,3% menores. A diferença de vigor nas plantas dos demais tratamentos era inferior a 4% em relação aos controles. As maiores diferenças na

produtividade foram observadas entre as plantas enxertadas em limoeiro “Cravo” e em laranja “caipira” : independente do tratamento, as primeiras produziram safras 2 vezes maiores. Não observaram diferenças na produtividade das plantas em laranjeira “caipira”. As plantas em limoeiro “cravo”, infectadas com as três doenças, produziram safras ligeiramente maiores que as plantas saudáveis, não ocorrendo diferença significativa na produtividade das plantas dos demais tratamentos. Os autores consideram esta maior produtividade nas plantas com as três doenças devido ao efeito de estrangulamento do porta-enxerto (107).

5.4. Avaliação de 7 variedades de laranja “Doce” e 2 tangerinas como indicadoras para a sorose.

Nos testes de indexação biológica para a sorose dos citros no estado de São Paulo utilizava-se a laranja “caipira” como indicadora, cujos sintomas não eram bem nítidos, mesmo sob condições favoráveis para manifestação de sintomas. Face a este fato, procurou-se obter uma indicadora mais sensível para o vírus da sorose, testando-se 7 variedades de laranja e 2 de tangerinas, além de laranja “caipira”. Sintomas evidentes e característicos causados pelo vírus foram obtidos nas laranjas “Baianinha” e “do Céu”. Sintomas fracos de difícil reconhecimento foram observados nas laranjas “Hamlin”, “Pineapple” e “Caipira”. As laranjas “Azeda”, “Valência” e as tangerinas “Kara” e “King” não exibiram sintomas. Os resultados mostraram que as laranjas “Baianinha” e “do Céu” são indicadoras mais adequadas que a “Caipira” para testes de indexação da sorose (33).

5.5. Choque térmico para indução rápida da manifestação de sintomas em indicadores para a sorose

Em viveiro ou em casa-de-vegetação os sintomas foliares do vírus da sorose eram observados somente na brotação de primavera, em períodos de temperatura amena. Além disso, mesmo utilizando-se indicadoras sensíveis, os sintomas eram fracos, o que dificultava a indexação desses vírus. Procurou-se então desenvolver uma metodologia para obtenção rápida dos sintomas, e a mesma foi conseguida colocando-se as plantas em um ambiente refrigerado à temperatura de 20°C e sob 10 horas de iluminação diária, fornecidas por 2 lâmpadas fluorescentes de 40 W, do tipo luz do dia. Os primeiros sintomas manifestaram-se 2 dias após o tratamento, sendo que 5 dias após o início do tratamento, todas as plantas exibiam sintomas foliares bastante nítidos (31).

6. CRESPEIRA

A moléstia denominada crespadeira dos citros foi descrita em 1959, em São Paulo, em umas poucas árvores naturalmente infetadas (97). Ela recebeu essa designação por ser o encrespamento das folhas novas o sintoma mais característico do mal. Além do encrespamento das folhas, ocorria morte de ponteiros, seguida pelo depericimento geral das plantas afetadas. Estas florescia abundantemente, mas só poucos frutos eram produzidos, os quais permaneciam anormalmente pequenos. Testes de transmissão demonstraram que o patógeno podia afetar um grande número de variedades e espécies do gênero *Citrus* (100). O patógeno foi aparentemente transmitido para *Vigna sinensis* (101).

Todas as plantas encontradas afetadas pela crespadeira foram eliminadas. Desde então, a moléstia não mais ocorreu.

7.LEPROSE

A leprose dos citros era considerada moléstia de distribuição restrita nos laranjais de São Paulo no passado (05), embora fosse julgada de importância econômica. Nos últimos anos a sua importância tem aumentado e é presentemente considerada como a doença associada à vírus, mais importante da cultura de citros.

7.1. Incidência da leprose em variedades cítricas

Roessing & Salibe (89) realizaram estudos para determinar a susceptibilidade à leprose de diferentes variedades e espécie do gênero *Citrus* e afins. Sintomas típicos da doença foram observados em folhas e frutos de 130 das 369 variedades existentes na plantação em estudo.

A leprose foi observada em 121 variedades de laranja “Doce”, 4 tangores (Reticulata, Tangerona, São João del Rei e Italiano), 4 limões (Rio Claro, Camargo, Gigante e Rugoso Nacional) e no citrange Troyer. Mostraram-se aparentemente resistentes à leprose as plantas de 239 variedades compreendendo: 35 tangerinas, 35 limões, 27 limas ácidas, 22 pomelos, 19 laranjas azedas, 17 toranjas, 16 tangelos, 15 citranges e outros híbridos de trifoliata e 23 outras variedades diversas. A doença foi mais severa em algumas variedades de laranja “Doce”, especialmente na “Caipira”, “Bahia” e “Baianinha”. O limão “Rio Claro” apresentou grande número de lesões nas frutas e poucos nas folhas. O tamanho das lesões também mostrou-se bastante variável de variedade para variedade.

7.2. Visualização da partícula viral

A causa da leprose permaneceu desconhecida por muito tempo. Bitancourt (04) sugeriu ser a leprose uma doença de vírus. Evidência apontando a leprose como provavelmente devida a um vírus foi obtida por Kitajima et al., (35,36) que descreveram uma partícula com a forma de bastonete (40 nm x 100-120 nm) encontrada em associação com lesões da leprose em folhas de diversas variedade de laranja “Doce”.

7.3. A leprose como modelo para estudos sobre interferentes de inoculação

Costa et al., (19) relatam que a maioria de viroses que servem de modelo para testes de interferentes na inoculação, a avaliação do efeito interferente é baseado na resposta sistêmica da planta inoculada. Nesse caso, a leitura da interferência na inoculação é mais dificultada, pois bastam umas poucas picadas com sucesso do vetor para que haja invasão sistêmica da planta, passando despercebido um efeito interferente positivo, a não ser quando se aproxima de 100%.

No caso de lesão de leprose nas várias partes das plantas de citros, é aceito que cada lesão representa pontos de infecção localizados, onde o vírus foi introduzido nos tecidos das folhas, hastes ou frutos pelo ácaro vetor. Dessa maneira, cada lesão representa um ponto independente de inoculação e a avaliação de substâncias interferentes na inoculação poderia ser facilmente observada e

computada através da contagem das lesões individuais presentes nas partes de plantas que recebem tratamento e nos respectivos controles (19).

8. ELIMINAÇÃO DE VÍRUS E VIRÓIDES DE MATERIAL PROPAGATIVO DE CITROS

Com exceção dos vírus da *tristeza* e da leprose que têm vectores eficientes e do viróide da exocorte que pode passar ocasionalmente por transmissão mecânica, os outros vírus e viróide dos citros são apenas perpetuados por propagação de material infetado ou por contaminação no viveiro de enxertia, através de reaproveitamento de cavalos anteriormente enxertados com material infetado. A propagação por enxertia de borbulha de matrizes sadias em cavalos originários de sementes praticamente assegura a obtenção de mudas sadias.

Duas maneiras de eliminação de vírus e viróides de material vegetativo utilizados nos trabalhos experimentais do Instituto Agronômico são relatadas em seguida.

8.1. Limpeza através da obtenção de clones nucelares

A história de clones nucelares de citros no Brasil está intimamente ligada à atuação do pesquisador Sylvio Moreira do Instituto Agronômico de Campinas. Clones nucelares foram desenvolvidos na Estação Experimental de Limeira a partir de 1938 (52). Muitos desses clones foram obtidos inicialmente como resultados de trabalhos sobre poliembrionia de citros e em tentativas de cruzamento de variedades para fins de melhoramento. Os trabalhos com clones nucelares permaneceram estacionários por alguns anos até que três acontecimentos levaram Moreira a reativar seu interesse nessa área de pesquisa. Esses foram: (a) em 1952 Moreira efetuou viagem de estudos aos Estados Unidos e estagiou na “Citrus Experiment Station” de Riverside na Califórnia, Estados Unidos, onde esteve em contato durante vários meses com alguns investigadores pioneiros em trabalho com clones nucelares em citros; (b) ao reassumir seus trabalhos, após retorno dessa viagem, , inteirou-se através de avaliações feitas em viveiros de enxertia da estação experimental de Limeira, da presença de sintomas de sorose em grande número de lançamentos das borbulhas enxertadas de matrizes da coleção de variedades da estação; (c) no início da década de cinquenta, surgiram sérios problemas relacionados com a presença do então considerado como vírus da exocorte em material de propagação de muitas variedades comerciais de citros e o uso bastante generalizado do cavalo de limão “Cravo” (91; 48; 70).

Os fatos acima apontados levaram Moreira a empreender o projeto que representa uma de suas maiores contribuições para a citricultura brasileira: a implantação do uso de material de propagação limpo de vírus e viróide através de clones nucelares, embora esses viessem a se infetar mais tarde pelo vírus da *tristeza*. Moreira, para ganhar tempo, aproveitou clones nucelares já anteriormente existentes na Estação Experimental de Limeira para iniciar a distribuição desse material de propagação. Moreira & Salibe (52) mencionam que já em 1955 foram distribuídas 40.000 gemas de nucelares e viveiristas e citricultores pela Estação Experimental de Limeira e que até 1962 esse número somou 1.000.000 de gemas. Salibe (103) avalia que em 1987 já existiam no país cerca de 100 milhões de citros originários de clones nucelares como resultado dessa distribuição.

Moreira empreendeu também a obtenção de clones nucelares de toda a coleção de germoplasma de citros da Estação Experimental de Limeira a partir da década de 50, tendo tido a colaboração de Ary A. Salibe que ingressou no Instituto Agrônomo na segunda metade desse período. Como aquela Estação experimental tem sido a principal fornecedora de material propagativo de citros para São Paulo e outras partes do país, isso explica o excelente estado de sanidade da maioria de pomares comerciais paulistas e de outras partes do Brasil no que tange a vírus e viróides que não têm vectores. Como foi apontado por Salibe (103), a Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência considerou o trabalho de produção e seleção de clones nucelares de citros, realizado por Moreira, como uma das mais relevantes contribuições da ciência para a agricultura brasileira.

8.2. Microenxertia de ápices caulinares para limpeza de clones de citros

Em 1972, a microenxertia em citros já tinha sido idealizada na Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agrônomo, sem conhecimento dos trabalhos realizados nos Estados Unidos. No entanto, as tentativas levadas a efeito na ocasião foram infrutíferas por uma série de razões (114). Subsequentemente, a mesma Seção foi, depois do Centro de Fruticultura e Mandioca da Embrapa, localizado em Cruz das Almas, Bahia, o 2º lugar no Brasil a empregar a propagação de ápices caulinares de citros (microenxertia). Os trabalhos foram desenvolvidos durante uma década (1982-1992) dentro de um programa que visava obter material propagativo sadio de citros, rosáceas e videira com importância potencial para São Paulo. Durante o período considerado foram obtidos clones sadios de laranja “Hamlin (02), limão “Taiti” e laranja “Folha Murcha” (55), “Pera”(01), “Valencia”, “Natal” e “Baianinha” (Muller et al. 1992 resultados não publicados).

9. DECLÍNIO

9.1. Regiões onde ocorre

O declínio dos citros despertou inicialmente a atenção de citricultores e técnicos da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, no fim da década de 1970, sendo considerado do mesmo grupo da doença "blight" (88). Foi posteriormente constatado nos Estados da Bahia, de Sergipe, de Minas Gerais, do Rio de Janeiro e de Goiás (93).

9.2. Importância econômica e incidência do declínio na laranja "Pera" vacinada

O declínio dos citros é doença atribuída a patógeno transmissível (111) de grande importância. Estima-se ter havido uma perda da ordem de várias dezenas de milhões de plantas cítricas, desde sua constatação em 1979 (34). Pomares afetados têm uma redução na produção de frutos/pé de 4-5 caixas para 1, 5-2, 0 caixas (84).

Relato de Rossetti et al., (94), mencionando que a incidência do declínio dos citros em "Pera" premunizada parecer ser maior do que na não premunizada constituiu fator de preocupação, pois se fosse confirmado representaria ameaça direta para parte expressiva do parque citrícola paulista e deveria cessar o uso desse material na formação de novos pomares. Preocupados com tal relato, os autores, através da CATI, realizaram um levantamento em três Divisões Regionais Agrícola do Estado de São Paulo, inspecionando 916.000 plantas e chegaram às seguintes conclusões: a) que o relato acima não parece fundamentado; b) também contrariam afirmações de alguns técnicos de que clones novos apresentariam mais declínio do que os velhos (83).

Num estudo preliminar sobre aspectos econômicos do declínio dos citros no Estado de São Paulo foi possível verificar que as variedades "Valência", "Hamlin", "Pera" e "Natal" se destacam como as mais afetadas. Das tangerinas a mais afetada foi a "Cravo". Não se observou incidência na mexerica. Verificou-se também que a lima ácida "Taiti" apresentava 7,7% de plantas afetadas (30).

9.3. Combinações críticas

Foi verificado que em pomares de primeira produção (4-5 anos) das variedades de laranjas doces "Valência" e "Pera" o índice de plantas afetadas tem sido mais elevado. Nas outras variedades a incidência mais elevada foi verificada em pomares a partir de 8 anos: "Valência", "Pera", "Natal", "Hamlin" e "Baianinha", todas enxertadas sobre limão "Cravo". As laranjas doces "Valência" e "Natal", enxertadas em *Poncirus trifoliata*, declinam mais vagarosamente do que quando enxertadas em limão "Cravo". O declínio também já foi verificado em pomares de limão "Taiti", tangerina "Poncã" e tangerina "Cravo" enxertados em limão "Cravo" (71).

9.4. Combinações tolerantes

As combinações em limão "Cravo" são altamente suscetíveis ao declínio, o que torna o problema extremamente grave, uma vez que esse é o principal porta-enxerto utilizado na nossa citricultura. Entretanto observações de campo indicam que é possível formar e manter pomar sem o declínio utilizando combinações tolerantes, tais como: laranjas doces enxertadas sobre porta-enxertos de laranja "Caipira", tangelo "Orlando", tangerina "Cleópatra" e tangerina "Sunki" (71 & 30).

9.5. Cavalos resistentes ou tolerantes

Observações de campo indicam que os porta-enxertos tangelo "Orlando", tangerina "Cleópatra", tangerina "Sunki", "Citrange", "Norton" e laranja "Caipira" são tolerantes ao declínio. Por outro lado, pomares de laranjas doces enxertadas sobre limão "Cravo", *Poncirus trifoliata*, *Citrus Volkameriano* e *Citrange troyer* são suscetíveis. Tal fato desaconselha o uso de porta-enxertos suscetíveis para replantar ou formação de pomares em locais de alta incidência de declínio (30).

9.5.1. Árvores de pé-franco de limão "Cravo" não são afetadas pelo declínio dos citros

Em 1985, numa propriedade situada no município de Terra Roxa, SP, encontraram-se 22 árvores de pé-franco de limão "Cravo" (*C. limonia* Osb.) com 14 anos de idade, espalhadas em meio a talhões de citros das combinações laranja "Pera" e "Hamlin" sobre limão "Cravo" de mesma idade, que apresentavam alta incidência de declínio. Das 22 árvores de limão "Cravo", 8 apresentavam sintomatologia semelhante à induzida pelo declínio. Entretanto, realizando teste diagnóstico de absorção de água no lenho, por seringa acionada por alavanca, constatou-se que essas plantas estavam sadias. Exames no sistema radicular indicaram a existência de raízes necrosadas, sintomatologia essa possivelmente causada pelo fungo *Phytophthora* sp. Como essas plantas apresentavam bastante radículas vivas, o que não ocorre em plantas com declínio, resolveu-se tratá-las com fungicida. Após 10 meses de tratamento foi verificada a recuperação das plantas (32). Tais resultados apontam para o fato de que plantas de pé-franco de limão "Cravo" mesmo sob condições de alta incidência de declínio, não são afetadas pela doença. Tal constatação reforça a hipótese de que o declínio é uma doença de combinação principalmente de laranja doce, tendo o limão "Cravo" como porta-enxerto.

9.6. Dispositivo que facilita a realização do teste diagnóstico de absorção de água para o declínio

O teste de absorção de água para o diagnóstico do "blight" foi inicialmente visualizado e aplicado na Flórida, Estados Unidos por Cohen (7). Através deste teste é possível mensurar num tempo de 24 horas a menor absorção de água por gravidade no tronco de plantas afetadas pela doença. Na fase inicial dos estudos do declínio em São Paulo, esse método passou a ser utilizado como auxiliar de diagnóstico (28, 29). A partir de 1983, o teste de absorção de água passou a ser realizado em 30 segundos, utilizando-se uma seringa hipodérmica de 20-25 ml de volume, contendo 10 ml de água, que é injetada no tronco da planta sob pressão manual (38).

O método da seringa desenvolvido por Lee e colaboradores (38) foi aperfeiçoado por Lima et al. (39) recebendo o nome de teste de absorção de água pelo método da seringa acionada por alavanca (39). O equipamento utilizado para este teste consiste basicamente de duas ripas de cerca de 35 cm de comprimento, 5 cm de largura e 1 cm de espessura, unidas numa das extremidades por uma dobradiça, uma das ripas é furada no centro para encaixe da seringa. O teste que é realizado em 10 segundos, com volume de 10 ml de água na seringa, tem a vantagem de permitir uma maior precisão que o anterior, uma vez que o operador necessita de menos esforço, principalmente quando se trata de realizar grande número de testes.

9.7. Tratamento visando promover recuperação de árvores afetadas

Plantas apresentando sintomas de declínio, em estágio inicial, foram pulverizadas em 1981/1983 com reguladores vegetais, à base de ácido giberélico associado ao 2,4 D, mostrando significativa recuperação das plantas tratadas em relação aos controles (12). Motivados pelos bons resultados obtidos, instalou-se novo ensaio em 1984 em plantas de laranja "Pera" sobre limão "Cravo", com 10 anos de idade apresentando declínio unilateral acentuado. Foi obtida remissão de sintomas com os tratamento à base de ácido giberélico 50 ppm + ácido naftaleno acético 20 ppm e ácido giberélico 100 ppm + 2,4 D 10 ppm (6). É importante ressaltar que as plantas tratadas com os reguladores vegetais, tiveram uma recuperação apenas aparente que durou por aproximadamente 1 ano, período após o qual definharam rapidamente, possivelmente por ter cessado o efeito desses produtos.

10. PSEUDO-VIROSES DOS CITROS

10.1. Falso exantema

A moléstia denominada "falso exantema dos citros", descrita por Bitancourt em 1933 (05), foi redescrita sob a denominação de "varíola" em 1963 por Salibe e Moreira (106) que a consideraram uma ameaça potencial à citricultura do Estado de São Paulo. Estes autores aventaram a possibilidade da anomalia em questão ser de natureza viral. Quase que simultaneamente, Müller & Costa (56) demonstraram que o falso exantema era resultado da ação toxicogênica do mirídeo *Platytylus bicolor*. Os sintomas iniciais da moléstia foram obtidos nas plantas testes pela alimentação do inseto, sendo observados em cerca de 5 a 10 dias após a infestação. Os sintomas manifestaram-se primeiramente como intumescências que podiam ser vistas externamente e que correspondiam à bolsas de goma sob a casca. Em alguns casos, houve exudação de goma das intumescências na forma de gotas ou filamentos. Posteriormente as intumescências evoluíram para lesões que se fendilharam no sentido longitudinal da haste. Na época em que o falso exantema foi verificado sob condições de campo, constatou-se também nestas áreas a presença do *P. bicolor*. Posteriormente, tanto a anomalia como o mirídeo não foram mais encontrados. A hipótese aventada na ocasião foi de que devido à seca havida em 1963 (uma das mais fortes do século) o *P. bicolor* não mais encontrando as suas hospedeiras naturais, migrou para os citros, voltando para o seu "habitat" natural, assim que as condições se normalizaram.

10.2. Superbrotamento ou envassouramento da laranjeira "Pera"

Em 1950 uma forma de superbrotamento ou envassouramento da laranja "Pera" foi observado em pomar situado em Limeira (16). As plantas com envassouramento apresentavam ramificação extremamente anormal, cheia de galhos extranumerários que cresciam em posição mais vertical que a normal, alguns galhos basais apresentando um crescimento tipo cipó. Sintomas de fasciação também estavam presentes em alguns galhos em fase de rápido crescimento. As plantas envassouradas cresciam mais rapidamente que as plantas normais mas a vegetação era mais amarelada. A produção das plantas superbrotadas era extremamente reduzida. Duas possibilidades foram aventadas para explicar a natureza da anomalia: a) a causa genética, tratando-se de mutação que foi propagada inadvertidamente talvez porque as plantas envassouradas possuísem porte mais vigoroso; b) o superbrotamento seria de causa patológica, sendo mais provável neste caso tratar-se de moléstia de vírus.

A fim de verificar a última possibilidade foram realizados ensaios visando determinar se borbulhas de plantas normais enxertadas em copas de plantas com envassouramento iriam produzir plantas normais ou envassouradas. Simultaneamente foi realizada a enxertia de borbulhas de plantas superbrotadas em plantas normais, visando induzir a anomalia nestas. Os resultados obtidos mostraram ser o superbrotamento de causa genética, indicando a importância da escolha cuidadosa de árvores matrizes para retiradas de borbulhas para enxertia.

10.3. Chicote de "Piralima" e galha no ponto de união de enxertia

Essa anomalia descrita em árvores de laranja "Piralima" sob o nome de *chicote* (20) ocorria em determinados galhos, que se tornavam mais alongados que os normais, adquirindo a forma de um S ou circular, assemelhando-se a um *chicote*. Bolbulhas de galhos com *chicote* enxertados em cavalos sob condições de estufa, deram origem a hastes que cresceram rapidamente e que eram geralmente de coloração mais amarelada que a da vegetação normal. Uma constante foi o aparecimento de um calo bastante desenvolvido ou galha no ponto de união de enxertia, formado principalmente do tecido do enxerto. O *chicote* foi considerado semelhante ao superbrotamento descrito no tópico anterior, sendo ainda ambos considerados muito semelhantes à moléstia brotação múltipla dos citros ("citrus multiple sprouting"), descrita em diversas variedades de laranja doce na África (21). A evidência obtida indicou que o *chicote* não é moléstia infecciosa ou, se houver um patógeno associado a ela, ele é de difícil transmissão por união de tecidos, embora haja invariavelmente perpetuação da condição anômala através da borbulha. A hipótese que melhor se prestou para explicar os fatos observados foi a de ser o *chicote* anomalia resultante de transformação genética. Para justificar a aparente disseminação em campo, foi imaginado ser essa anomalia resultante de alteração somática de pontas de crescimento, que poderiam ser estimuladas pela ação do ácaro das gemas, *Aceria sheldoni* (Ewing), do psílideo *Diaphorina citri* Kuw ou de qualquer outro inseto ou ácaro. Outra alternativa, considerada mais provável, seria a de resultar o *chicote* da incorporação de um plasmídeo ou fragmento deste associado a um patógeno bacteriano, nas células do ápice de crescimento dos citros, com desaparecimento posterior do organismo, havendo assim perpetuação da condição anômala induzida pelo DNA incorporado mesmo na ausência de infecciosidade. Essa incorporação poderia também estar associada a insetos e ácaros.

10. BIBLIOGRAFIA

1. BAPTISTA, CÉLIA R., MÜLLER, G. W.; BETTI, J. A. ; KUNIYUKI, H. Obtenção de citros comerciais livres do vírus da tristeza por microenxertia. I. laranjas Pera Bianchi, Pera Olímpia e Pera E. E. L. **Fitopatologia Brasileira**, v. 2, n. 15, p. 142, 1990. Resumo.
2. BELLATO, CLAUDIA M., SONDHAL, M. R.; MÜLLER, G. W.; POMPEU JR., J. Resultados preliminares de microenxertia em clones velhos de citros, cultivar "Hamlin", para obtenção de mudas isentas de vírus. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 34., Campinas: SP, 1982. Resumo.
3. BENNETT, C. W.; COSTA, A. S. Tristeza disease of citrus. **J. Agric. Research**, Washington: v. 78, p. 207-237, 1949.
4. BITANCOURT, A. A. **As manchas das laranjas**. São Paulo, Instituto Biológico: 1934, p. 135. (Folheto, 53).
5. BITANCOURT A. A. ; FONSECA, J. P. da; AUTUORI, M. **Manual de citricultura**. II Parte: Doenças, pragas e tratamento. São Paulo: Ed. Chácaras e Quintais, p. 212, 1933.
6. CASTRO, P. R. C.; PRATES, HELOISA S.; GUIRADO, N. Declínio dos citros em São Paulo: aplicação de reguladores vegetais visando a recuperação de plantas afetadas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 11, n. 1/2, p. 68, 1985. Resumo.
7. COHEN, M. Diagnosis of young decline, blight and sandhill decline of citrus by measurements of water uptake using gravity injection. **Plant Disease Reporter**, St. Paul: v. 58, p. 801-805, 1974.
8. COSTA, A. S. Present statu of the tristeza disease of citrus in South America. **Plant Protection Bulletin**, FAO, Roma: v. 4, nº 6-7, p. 19-27, 1956.
9. COSTA, A. S. Novos resultados na determinação de deficiências de micronutrientes pela técnica da meia-folha. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 2, p. 53-56, 1976.
10. COSTA A. S.; GRANT, T. J. 5 - Tentativas para inativar o vírus da tristeza "in vivo" In: Grant, T. J.; Costa, A. S.; Mendes, H. C.; Paiva Neto, J. E.; CATANI, R. A. Investigações sobre a tristeza dos *Citrus*. VI - Alguns estudos fisiológicos sobre a moléstia: tentativas para inativar o vírus da tristeza "in vivo". **Bragantia**, Campinas: v. 10, p. 54-56, 1950.
11. COSTA A. S.; GRANT, T. J. Studies on transmission of tristeza virus by the vector, *Aphis citricidus*. **Phytopathology**, St. Paul: v. 41, p. 105-113, 1951.

12. COSTA A . S.; GRANT, T. J.; MOREIRA, S. Investigações sobre a tristeza dos citrus. 2. Conceitos e dados sobre a reação das plantas cítricas à tristeza. **Bragantia**, Campinas: v. 9, p. 59-80, 1949.
13. COSTA A . S.; GRANT, T. J.; MOREIRA, S. A possible relationship between tristeza and the stem-pitting disease of grapefruit in Africa. **California Citrograph**, Los Angeles: v. 35, n. 12, p. 504, 526-528, 1950
14. COSTA A . S.; GRANT, T. J.; MOREIRA, S. Behavior of various citrus rootstock-combination combinations following inoculation with mild and severe strains of tristeza virus. **Proceedings of the Florida State horticultural Society**, Tallahassee, Fla.: v. 67, p. 26-30, 1954.
15. COSTA A . S.; GRANT, T. J.; MOREIRA, S. Reação da laranjeira azeda à tristeza. **Bragantia**, Campinas: v. 13, p. 199-216, 1954.
16. COSTA A . S.; MOREIRA, S., ARRUDA, L. F., ROESSING, C.; TOLEDO, I. D. Superbrotamento ou envassouramento da laranjeira. **Bragantia**, Campinas: v. 10, p. 149-150, 1950.
17. COSTA A . S.; MÜLLER, G. W. Tristeza control by cross protection. A. U. S. - Brazil Cooperative Succes. **Plant disease**, St. Paul, Minn.: v. 64, p. 538-541, 1980.
18. COSTA A . S.; MÜLLER, G. W., COSTA C. L. Rearing the tristeza vector, *Toxoptera citricida*, on squash. In: CONFERENCE INTERNATIONAL OF THE ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., Italy, 1966. **Proceedings**. Gainesville, University of Florida Press, p. 32-35, 1968.
19. COSTA A . S.; NARDO, ELIZABETH A . B. DE.; MÜLLER, G. W. Leprose dos citros-excelente modelo de virose para testes de interferentes na inoculação. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna: v. 18, n. 2, p. 77-78, 1992. Resumo.
20. COSTA A . S., PRATES, HELOISA S.; MÜLLER, G. W. Chicote, anomalia da Piralima de causa desconhecida. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 7, nº 1, 2, p. 18-19, 1981.
21. COSTA A . S., PRATES, HELOISA S.; MÜLLER, G. W. Possível identidade entre o chicote da laranjeira Piralima, o envassouramento da laranja Pera e a brotação múltipla dos citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9., Campinas, 1987. **Anais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 1, p. 417-422, 1988.
22. COSTA, C. L. **Emprego de superfícies reflectivas repelentes ao afídeos vectores, no controle de moléstias de vírus de plantas**. Piracicaba: ESALQ-USP, 94 p. 1972. Tese de Doutorado.

23. FRANCO, C. M.; BACCHI, O. Investigações sobre a "tristeza dos citrus". 1 - Alterações da pressão osmótica. **Bragantia**, Campinas: v. 4, p. 541-551, 1944.
24. GALLO, R. J.; MOREIRA, S.; RODRIGUEZ, O.; FRAGA JR., C. G. Influência da variedade e do porta-enxerto, na composição mineral das folhas de citros. **Bragantia**, Campinas: v. 19, p. 307-318, 1960.
25. GRANT, T. J.; COSTA A. S. 6. - Sintomas de deficiência. In: Grant, T. J.; Costa, A. S.; Mendes, H. C.; Paiva Neto, J. E.; Catani, R. A. Investigações sobre a tristeza dos citrus. VI. Alguns estudos fisiológicos sobre a moléstia. **Bragantia**, Campinas: v. 10(2), p. 56-57, 1950.
26. GRANT, T. J.; COSTA A. S. A mild strain of the tristeza virus of citrus. **Phytopathology**, St. Paul: v. 41, p. 114-122, 1951.
27. GRANT, T. J.; COSTA A. S.; MOREIRA, S. Variations in stem pitting on tristeza-inoculated plants of different citrus groups. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, Fla.: 1951, p. 42-47.
28. GUIRADO, N.; LIMA, J. E. O.; PRATES, HELOISA S.; MÜLLER, G. W. Comparação entre testes diagnósticos de absorção de água para o declínio dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 9, p. 430, 1984. Resumo.
29. GUIRADO, N.; PRATES, HELOISA S.; MÜLLER, G. W.; HIROCE, R. Resultados de testes diagnósticos aplicados em pomares cítricos afetados pelo declínio. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 10, p. 136, 1984. Resumo.
30. GUIRADO, N.; PRATES, HELOISA S.; MÜLLER, G. W. O declínio dos citros em São Paulo no ano agrícola 1984/85. **Laranja**, Cordeirópolis: n. 6, p. 113-137, 1985.
31. GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; BETTI, J. A.; PRATES, HELOISA S. Manifestação rápida de sintomas foliares do vírus da sorose dos citros em ambiente refrigerado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 11, p. 336, 1986. Resumo.
32. GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; PRATES, HELOISA S. Árvores de pé-franco de limão "Cravo" não são afetados pelo declínio dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 11, p. 367, 1986. Resumo.
33. GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; PRATES, HELOISA S.; BETTI, J. A.; ARRUDA, H. B. Avaliação de 7 variedades de laranja doce e 2 tangerinas como indicadoras para o vírus da sorose dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 12, p. 30, 1986. Resumo.
34. GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; PRATES, HELOISA S. O declínio dos citros. In: **Citricultura Brasileira**. Campinas: Ed. Fundação Cargill, v. 2, p. 722-729, 1991.

35. KITAJIMA, E. W.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Partículas baciliformes associadas à leprose dos citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1., Campinas, 1971. **Anais**. Campinas, Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 2, p. 419-430, 1971.
36. KITAJIMA, E. W.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; YUKI, V. A. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York: v. 50, p. 254-258, 1972.
37. KITAJIMA, E. W.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, A. R.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. **Nature**, London: v. 201, n. 4923, p. 1011-1012, 1964.
38. LEE, R. F.; MARAIS, J. F.; TIMMER, L. W.; GRAHAM, J. H. Syringe injection of water in to the trunk. A rapid diagnostic test for citrus blight. **Plant Disease**, St. Paul, Minn.: v. 68, p. 511-513, 1984.
39. LIMA, J. E. O. de; VASCONCELOS, L. A. B. C.; GUIRADO, N.; POMPEU JR., J. Use of a simple device to test the specificity of the water-injection test for decline of citrus. In: **Proc. Int. Soc. Citriculture**, São Paulo: v. 1, p. 402-404, 1984.
40. MacCLEAN, A. P. D. Virus infection of citrus in South Africa. III. Stem pitting disease of grapefruit. **Farming in South Africa**, Pretoria: v. 25, p. 289-296, 1950.
41. MENDES, H. C. Influência da tristeza sobre a transpiração. **Bragantia**, Campinas: v. 10, p. 51-52, 1950.
42. MENEGHINI, M. Sobre a natureza e transmissibilidade da doença "tristeza" dos citros. **O Biológico**, São Paulo: v. 12, p. 285-287, 1946.
43. MOREIRA, S. Um interessante caso de desharmonia na enxertia de citros. **Jornal de Agronomia**, Piracicaba: v. 1, p. 57-61, 1938.
44. MOREIRA, S. Xyloporosis. **Hadar**, Jaffa: v. 11, p. 234-237, 1938.
45. MOREIRA, S. Xiloporose. **Jornal de Agronomia**, Piracicaba: v. 1, p. 217-226, 1938.
46. MOREIRA, S. Cavalos para citros em São Paulo. **Revista de Agricultura**, Piracicaba: v. 21, p. 206-226, 1946.
47. MOREIRA, S. Exocortis - outra moléstia de vírus nos laranjais paulistas. **O Agrônomo**, Campinas: v. 6, nº 65/66, p. 10-12, 1954.
48. MOREIRA, S. Sintomas de "exocortis" em limoeiro cravo. **O Agrônomo**, Campinas: v. 14, p. XIX-XXI, 1955.

49. MOREIRA, S. Rangpur lime disease and its relationship to exocortis. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 1., Riverside, California, 1957. **Proceedings**. Berkeley: University of California-Div. Agric. Sci., p. 135-140, 1959.
50. MOREIRA, S. A quick field test for exocortis. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 2., Florida, 1959. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 40-42, 1961.
51. MOREIRA, S. Cachexia and xyloporosis. Are they caused by the same virus? In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 56-60, 1965.
52. MOREIRA, S.; SALIBE A. A. Nucellar lines in the State of São Paulo, Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 309-313, 1965.
53. MÜLLER, G. W. **Estudos sobre a interação entre isolados do vírus da tristeza dos citros e controle da moléstia em limão Galego por premunização**. Piracicaba: ESALQ-USP, 68 p., 1972. Tese de Doutorado.
54. MÜLLER, G. W. Contribuição do Instituto Agrônômico ao estudo dos vírus de citros nos seus cem anos de existência. **Laranja**, Cordeirópolis: v. 8, p. 467-480, 1987.
55. MÜLLER, G. W.; BETTI, J. A. ; KUNIYUKI, H. Obtenção de clones sadios de citros através da microenxertia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, BA: v. 8, p. 57-64, 1986.
56. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Citrus False Exantema Induced by Feeding of a Myrid. **FAO Plant Protect. Bull.**, v. 12, p. 97-104, 1964.
57. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Estudos sobre a interação entre o vírus da tristeza da copa e do porta-enxerto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1., Campinas, 1971. **Anais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 2, p. 463-473, 1971.
58. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Virus inactivation in infected buds or grafts on imune rootstocks by localzade heat treatment in mini-chambers. **Ciência e cultura**, São paulo: v. 26, p. 1173-1175, 1974.
59. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Tristeza control in Brazal by preimmunization with mild strains. **Proc. Int. Soc. Citric**. Orlando, Florida: v. 3, p. 868-872, 1977.

60. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Utilização da laranja azeda como cavalo em presença da tristeza. **Summa Phytopathologica**, Campinas: v. 5, n. 1-2, p. 31 e 52, 1979. Resumo.
61. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Devem ser introduzidos isolados fracos do vírus da tristeza para laranja azeda do exterior? **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 8, p. 62-65, 1982. Resumo.
62. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Evaluation of exotic mild CTV strains for cross protection in Brazil. In: PROCEEDINGS OF A WORKSHOP (FINAL REPORT) CITRUS TRISTEZA AND *TOXOPTERA CITRICIDUS* IN CENTRAL AMERICA: Development of Management Strategies and Use of Biotechnology for Control. Maracay, Venezuela: 15-18 de setembro, p. 220-224, 1992.
63. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; CASTRO, J. L.; GUIRADO, N. Results from preimmunization tests to control the Capão Bonito strain for tristeza. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 10., Valencia, Spain, 1986. **Proceedings**. Riverside: University of California, p. 82085, 1988.
64. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; COSTA, C. L. Incidência do vírus da tristeza no porta-enxerto de citros na época de enxertia. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Fortaleza: v. 5, p. 157-158, 1972. Resumo.
65. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; CAMARGO, I. J. B. Additional evidence that virus multiplies in Passiflora spp. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 6., Swaziland, 1972b. **Proceedings**. California: University of California-Division of Agricultural Sciences, p. 75-78, 1974.
66. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; KUNIYUKI, H. Resultados favoráveis obtidos na inativação do vírus da tristeza em citros pelo uso de minicâmaras de termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 12, p.150, 1987. Resumo, 182.
67. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; PESSENDA, C. E. Tristeza de Capão Bonito após 20 anos continua restrita à área sul do estado. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 14, n. 1,2, p. 40, 1988. Resumo.
68. MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Melhor produção inicial de limão Taiti premunizado com isolados fracos do vírus da tristeza. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 133, 1988. Resumo.
69. MÜLLER, G. W.; GASPAR, J. O .; LEE, R.; BRLANSKY, R.; BERIAM, L. O . S. Determinação da incidência do vírus da tristeza em porta-enxertos de citros pelo teste ELISA. . **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 12, p. 147, 1987. Resumo.
79. MÜLLER, G. W.; POMPEU JR., J.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; COSTA, A. S. Investigações sobre a re-utilização da laranja azeda em São Paulo: I.

Triagem de diferentes tipos de azeda com isolados locais do vírus da tristeza dos citros fracos para esse cavalo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: 11, n. 1-2, p. 59-61, 1985. Resumo.

71. MÜLLER, G. W.; PRATES, HELOISA S. Observações sobre o declínio dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis: n. 3-5, 1981.
72. MÜLLER, G. W.; RODRIGUEZ, O. ; COSTA, A. S. A tristeza virus complex severe to sweet orange varieties. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., Italy, 1966. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 64-71, 1968.
73. MÜLLER, G. W.; TEÓFILO SOBRINHO, J., POMPEU JR., J.; COSTA, A. S. Estirpes fracas dos vírus da tristeza podem melhorar o comportamento de clones dos cultivares de laranja doce e tolerante. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 10, p. 98-100. 1984. Resumo.
74. MÜLLER, G. W.; VEGA, J., GASPAR, J. O.; COSTA, A. S.; VEIGA, R. F. de A. Investigações sobre a re-utilização da laranja azeda em São Paulo: II. Estabelecimentos de isolados do vírus da tristeza, fracos, para a laranja azeda, introduzidos do exterior. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 8., Brasília, 1986. **Anais**. Brasília: EMBRAPA-DDT, v. 1, p. 259-263, 1986.
75. OBERHOLZER, P. C. P.; MATHEWS, I.; STIMIE, S. F. The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on the so-called stem pitting. **Union of South Afr. Dept. Agr. Sc., Bull.**, v. 297, 18 p, 1949.
76. OLIVEIRA, A. R. Serologia com o vírus da tristeza dos citros. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 16, n. 2, p. 149, 1964. Resumo.
77. OLIVEIRA, A. R. Alguns aspectos de aplicação de serologia no estudo dos vírus de plantas. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 16, n. 2, p. 235-236, 1964. Resumo.
78. OLIVEIRA, A. R.; VEGA, J.; KUNIYUKI, H.; BAPTISTA, CÉLIA R. DE.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Detecção de vírus serologicamente idêntico ao da tristeza dos citros, em calos de videira Seibel 2 com enrolamento da folha através de MEIAD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 2, p. 133, 1988. Resumo.
79. PROBLEMA da exocorte e a Secretaria. **O Agrônomo**, Campinas: v. 7, p. 1-13, 1955.
80. PAIVA NETO, J. E.; CATANI, R. A. Composição química mineral de plantas sadias e afetadas pela tristeza. **Bragantia**, Campinas: v. 10, p. 57-58, 1950.
81. POMPEU JR., J.; DONADIO, L. C.; TEÓFILO SOBRINHO, J. Cidra kerkachi: novo indicador para o vírus da exocorte. In: CONGRESSO BRASILEIRO

- DE FRUTICULTURA, 2., Viçosa, 1973, editado por Victoria Rossetti.
Anais. Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 1, p. 105-110, 1973.
82. PRATES, HELOISA S.; CASTRO, P. R. C.; SOUZA, W.; DIONÍSIO, A.; APEZZATO, B. Ação de reguladores vegetais no declínio dos citros. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 9, p. 220-229, 1983. Resumo.
83. PRATES, HELOISA S.; GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S. Incidência menor do declínio dos citros na laranja Pera premunizada. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba: v. 9, p. 87-89, 1983. Resumo.
84. PRATES, HELOISA S.; GUIRADO, N.; MÜLLER, G. W.; Declínio dos citros no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis: nº 5, p. 195-222, 1984.
85. PRICE, W. C. Flexous rods in phloem cell of lime plants infected with citrus tristeza virus. **Virology**, New York: v. 29, p. 285-294, 1966.
86. RODRIGUEZ, O.; GALLO, J. R.; The influence of viruses on the mineral composition of citrus leaves. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., Italy, 1966. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 307-310, 1968.
87. RODRIGUEZ, O.; INFORZATO, R. The influence of viruses on the transpiration of citrus plants. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., Italy, 1966. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 304-306, 1968.
88. RODRIGUEZ, O.; ROSSETTI, VICTORIA.; MÜLLER, G. W.; MOREIRA, C. S.; PRATES, HELOISA S.; NEGRI J. D.; GREVE. A. Declínio de plantas cítricas em São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 5., Pelotas, 1979. **Anais**. Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p. 927-932, 1979.
89. ROESSING, C.; SALIBE, A. A. Incidência da leprose em variedades cítricas. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 19, n. 2, p. 303, 1967. Resumo.
90. ROISTACHER, C. N.; GUMPF, D. J.; NAUER, E. M.; GONZALES, R. Cachexia disease: Virus or Viroid. **Citrograph**, Los Angeles, Cal.: v. 68, p. 111-113, 1983.
91. ROSSETTI, VICTORIA. A doença do limoeiro Cravo nos laranjais de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo: v. 21, p. 1-8, 1955.
92. ROSSETTI, VICTORIA. Strains of tristeza in South America. In: Description and Illustration of virus and virus-like diseases of citrus, a collection of color-slides. France: Institut Français des Recherches Frutiers Outre-Mer (IFAC). V, 3 (Addendum 2), p. 1-7, 1975.

93. ROSSETTI, VICTORIA.; BERETTA, MARIA JÚLIA G. Declínio of citrus trees in Brazil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CANCRO CÍTRICO E DOENÇAS SIMILARES DAS PLANTAS CÍTRICAS, 1., São Paulo, 1988, coordenado por Victoria Rossetti. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, p. 262-273, 1988.
94. ROSSETTI, VICTORIA; CHAGAS, C. M.; FEICHTENBERGER, E. Declínio: resultados preliminares de pesquisas sobre declínio de plantas cítricas desenvolvidas pelo Instituto Biológico. **Pesquisas em Citrus**, São Paulo: n. 2, p. 32-33, 1982.
95. ROSSETTI, VICTORIA; SALIBE, A. A. Incidence of different types of psorosis in citrus varieties in the State of São Paulo, Brazil. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 150-153, 1965.
96. ROSSETTO, C. J.; YUKI, V. A.; EASTOP, V. F. Movimento rítmico de *Toxoptera aurantii* é resposta à som. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 30, p. 731-732, 1978. Resumo.
97. SALIBE. A. A. Leaf curl - a transmissible virus disease of citrus. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, Md.: v. 43, p. 1081-1083, 1959.
98. SALIBE. A. A. **Contribuição ao estudo da doença exocorte dos citros**. Piracicaba: ESALQ-USP, 71 p., 1961. Mimeografado. Tese de Doutorado.
99. SALIBE. A. A. A quick field test for Xiloporosis virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 207-209, 1965.
100. SALIBE. A. A. Susceptibility of citrus varieties to leaf-curl virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 175-178, 1965.
101. SALIBE. A. A. Crespeira: uma nova doença de vírus dos citros. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 19, p. 302, 1967. Resumo.
102. SALIBE. A. A. Distribuição na planta cítrica dos vírus da sorose, exocorte e xiloporese. **Ciência e Cultura**, São Paulo: v. 19, n. 2, p. 299-300, 1967. Resumo.
103. SALIBE. A. A. Clones nucelares de citrus no Estado de São Paulo. **Laranja**, Cordeirópolis: v. 8, p. 443-466, 1987.
104. SALIBE. A. A.; MOREIRA, S. New test varieties for exocortis virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS

- VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 119-123, 1965.
105. SALIBE, A. A.; MOREIRA, S. Tahiti lime bark disease is caused by exocortis virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963, edited by W. C. Price. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 143-147, 1965.
106. SALIBE, A. A.; MOREIRA, S. Variola - A probable virus disease of citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 207-209, 1965.
107. SALIBE, A. A.; RODRIGUEZ, O. Vigor e produtividade de laranjeiras Baianinha nuclear em presença e ausência dos vírus da sorose, exocorte e xiloporose. **Ciência e Cultura**, São Paulo: SP, v. 19, n. 2, p. 304, 1967. Resumo.
108. SILVA D. M.; OLIVEIRA, A. R.; KITAJIMA, E. W. Partial purification of tristeza virus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 3., Brazil, 1963. **Proceedings**. Gainesville: University of Florida Press, p. 10-13, 1965.
109. TEÓFILO SOBRINHO, J. Adensamento de plantio para os citros. **Laranja**, Cordeirópolis: v. 6, p. 259-269, 1985.
110. TEÓFILO SOBRINHO, J.; POMPEU JR., J.; RODRIGUEZ, O. ; FIGUEIREDO, J. O. ; BARBIN, D. Melhoramento de clones de laranjeira "Pera" no Estado de São Paulo, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 4., Cruz das Almas (BA), **Anais**. P. 111-116, 1977.
111. TUCKER, D. P. H.; LEE, R. F.; TIMMER, L. W.; ALBRIGO, L. G.; BRLANSKY, R. H. Experimental transmission of citrus blight. **Plant Disease**, St. Paul: v. 68, n. 11, p. 979-980, 1984.
112. VEGA, J.; GASPAR, J. O. ; MÜLLER, G. W. Utilização da microscopia eletrônica imuno-específica na detecção do vírus da tristeza dos citros em São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 7, p. 548, 1982. Resumo.
113. VEGA, J.; MÜLLER, G. W.; GUIRADO, N.; COSTA, A. S.; GASPAR, J. O. ; FIGUEIREDO, J. O. Confirmação da presença do vírus da tristeza dos citros em cultivares de limão verdadeiro sobre laranja azeda através de ELISA e MEIAD. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna: v. 14, n. 1-2, p. 54, 1988. Resumo.
114. YUKI, V. A. Relatório de bolsa da FAPESP: 1972/1973. Processo 71/1031, 1973.

115. YUKI, V. A. **Controle da tristeza em cavalos de citros por repelência do vector, na formação da muda premunizada.** Piracicaba: ESALQ-USP, 43 p. Tese de Mestrado, 1979.
116. YUKI, V. A.; MÜLLER, G. W.; BETTI, J. A. COSTA, A. S.; *Maclura aurantiaca* hospedeira não Rutaceae do afídeo vetor *Toxoptera citricidus*. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3., e CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5., Ilhéus, Itabuna, 1978. **Resumos.** Ilhéus-Itabuna: Sociedade Entomológica do Brasil/CEPLAC, 1978.
117. YUKI, V. A.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; Inativação do vírus da tristeza dos citros em limão Taiti por termoterapia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2., Viçosa, 1973. **Anais.** Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, v. 1, p. 201-209, 1973.
118. YUKI, V. A.; MÜLLER, G. W.; COSTA, A. S.; TEÓFILO SOBRINHO, J.; RAMOS, V. J.; CASTRO, J. L.; ISHIMURA, I.; GODOY JUNIOR, G. Population fluctuation of the aphid vector of citrus tristeza virus (CTV), *Toxoptera citricidus* in 6 localities of São Paulo, Brazil. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF CITRICULTURE, São Paulo: v. 1, p. 346-348, 1984.

BRASIL
GOVERNO FEDERAL