

INVESTIGAÇÕES SOBRE A TRISTEZA DOS CITRUS

II — CONCEITOS E DADOS SOBRE A REAÇÃO DAS PLANTAS CÍTRICAS À TRISTEZA ⁽¹⁾

A. S. COSTA, engenheiro agrônomo da Seção de Genética, Instituto Agronômico de Campinas; T. J. GRANT, patologista do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e adido agrícola da Embaixada norte-americana, e S. MOREIRA, engenheiro agrônomo da Subdivisão de Horticultura, Instituto Agronômico de Campinas.

1—INTRODUÇÃO

Os estudos sobre a tristeza e moléstias afins das plantas cítricas receberam grande impulso nos últimos anos. Isto foi o resultado da grande importância econômica alcançada por este grupo de moléstias e evidenciada pelos resultados desastrosos que se seguiram ao seu aparecimento em novas áreas, onde as plantas cítricas eram cultivadas principalmente sobre cavalos de laranja azêda (*Citrus aurantium* L.).

Desde que foram primeiramente observadas, notou-se que estas moléstias causavam perdas, principalmente em certas combinações de cavalo-cavaleiro, das quais a combinação laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) sobre laranja azêda tem sido a mais bem estudada. Em contraste, plantas de laranja doce enxertadas sobre cavalos de laranja doce, sobre limão cravo (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle ou, possivelmente, um híbrido de tangerina, *C. reticulata* Blanco x *C. aurantifolia*) e sobre alguns outros cavalos, bem como plantas de pé franco de laranja doce e de outros tipos eram consideradas como sendo resistentes à moléstia.

Sabe-se agora que danos bastante severos podem ser causados pela tristeza a muitas combinações de cavalo-cavaleiro (4, 7), nas quais outros cavalos, que não a laranja azêda, foram usados. Até mesmo plantas de pé franco de certos tipos de *Citrus* podem mostrar-se afetadas pela tristeza, em graus variáveis, chegando a injúria apresentada a igualar, em muitos casos, a observada em combinações de doce sobre azêda.

Um plano de cooperação entre o Instituto Agronômico e o Departamento Federal de Agricultura dos Estados Unidos, para o estudo da tristeza, está em andamento nesta Instituição, desde 1946. Os trabalhos foram iniciados por C. W. Bennett e A. S. Costa e estão atualmente a cargo dos autores. Estes trabalhos constam do estudo da tristeza em seus diversos aspectos, como a relação da moléstia para com o vetor, possíveis plantas hospedeiras, métodos de controle e, principalmente, a determinação da reação de mais de trezentas variedades e espécies de *Citrus* à tristeza. Cada

⁽¹⁾ Segunda publicação de uma 2.ª série de trabalhos sobre a tristeza, feitos em cooperação entre o Instituto Agronômico de Campinas e o U. S. Department of Agriculture. Veja também citações 3, 4 e 7 na literatura citada.

um destes tipos está sendo estudado como cavaloço para variedades comerciais de *Citrus*, como cavaleiro sobre laranja azêda e também em sua reação de pé franco à moléstia. Os resultados parciais dos trabalhos efetuados já foram publicados (3, 4, 7).

2—REAÇÃO DAS PLANTAS CÍTRICAS À TRISTEZA

Fatores inerentes à própria planta são os principais responsáveis pela reação dos diferentes tipos de *Citrus* à tristeza, embora certas condições do ambiente também influenciem a maneira da reação. A este respeito tem-se notado principalmente que a manifestação dos sintomas de tristeza em plantas inoculadas da combinação doce sobre azêda é bastante retardada durante o inverno, necessitando-se três ou mais meses para que os sintomas apareçam, ao passo que nas épocas quentes é comum mostrarem as plantas inoculadas os sintomas em metade do tempo. A quantidade de água no solo pode apressar ou retardar a manifestação dos sintomas, e a luz parece também ter certa influência.

Entre os característicos mais importantes da planta, que parecem governar a sua reação à tristeza, podem ser citados: a) A idade da planta; b) A resistência da planta; c) A capacidade da planta em permitir a multiplicação do vírus; d) A resistência dos tecidos da planta, e especialmente do floema, ao princípio que causa injúria.

Está claro que no caso da reação de plantas enxertadas há uma interação entre os característicos de cada um dos componentes, principalmente entre a concentração que o vírus ou princípio tóxico pode atingir no cavaleiro ou no ponto de união entre ambos os componentes, e a sensibilidade ou tolerância dos tecidos de cada um ao princípio tóxico.

Sendo a reação à tristeza resultante de fatores que podem variar independentemente, é de se esperar a existência de um gradiente na reação manifestada pelas diferentes combinações de enxertia e também nas diferentes espécies, de pé franco.

2.1—IDADE DA PLANTA

Os resultados obtidos em muitos ensaios de inoculação parecem indicar que as plantas novas de laranja doce sobre azêda mostram sintomas de infecção mais rapidamente que plantas mais idosas. Tem também sido observado que é mais fácil infectar mudinhas novas do que plantas mais desenvolvidas dos tipos que mostram sintomas de pé franco. É possível que isto esteja ligado ao maior vigor vegetativo de plantas novas, que permite ao vírus atingir maior concentração nos tecidos; poderia ainda resultar da menor quantidade de tecidos condutores possuída pela planta jovem, mais rapidamente prejudicados, ou pela maior facilidade com que o vetor é estabelecido nestas.

2.2—RESISTÊNCIA DA PLANTA

Existe bastante variação na resistência à tristeza entre as diferentes espécies do gênero *Citrus*, entre variedades de uma mesma espécie e mesmo entre clones da mesma variedade.

Alguns tipos de *Citrus* parecem possuir certa resistência à moléstia sob condições naturais, mas uma vez infectados mostram os sintomas usuais da moléstia quando enxertados em cavalos não tolerantes. Tal é o que acontece com alguns "grapefruits" (*Citrus paradisi* Macf.) e algumas tangerinas. Plantas destes tipos, enxertadas sobre cavalo de azêda, crescendo nas proximidades de laranjais de doce sobre azêda, demoram mais tempo para mostrar sintomas do que plantas desta última combinação e, no caso dos "grapefruits", o declínio da planta é mais lento. Camp (6) relata que também na Argentina as plantas de mandarinas enxertadas sobre cavalos de azêda demoraram mais para mostrar os sintomas que plantas comparáveis de doce sobre azêda.

A resistência da planta à infecção, sob condições naturais, pode ser devida a dois fatores principais, agindo isolada ou conjuntamente: a) Resistência à infecção pelo vetor; b) Resistência fisiológica.

A resistência à infecção pelo pulgão prêto da laranjeira (*Aphis citricidus* Kirk = *A. tavaresi* Del Guercio) foi notada particularmente para a laranja azêda, mas é provável que exista também para alguns limões (*Citrus limon* (L.) Burn, f.), mandarinas, "grapefruits" e, possivelmente, outros tipos. Tem sido notado que é muito difícil inocular com sucesso plantinhas de laranja azêda, por meio do vetor, enquanto que por meio de união de tecidos a percentagem de infecção é relativamente maior. Em uma experiência inocularam-se mudinhas de laranja azêda, comparativamente, com o vetor virulífero e por enxertia. De 25 plantas inoculadas com os afídeos pôde-se recobrar o vírus de apenas 4, enquanto que de 28 plantas inoculadas por enxertia, o vírus foi recobrado de 18. Em outra experiência, prepararam-se 30 plantinhas com copa mista, composta de um galho de laranja azêda e de um galho de laranja doce, sobre cavalo de azêda. Estas foram separadas em três grupos de 10 plantas e inoculadas duas vezes com o vetor virulífero, da seguinte maneira: num grupo, os afídeos⁽¹⁾ foram colocados sobre o galho da copa de laranja azêda; no outro grupo, os afídeos foram colocados sobre o galho de doce; outro grupo não foi inoculado. Das 10 plantas inoculadas nos galhos de laranja doce, 7 mostraram logo sintomas de infecção na parte inoculada, sendo que, destas, 6 plantas também mostraram sintomas nos galhos de azêda. Das 10 plantas inoculadas na parte azêda, somente uma mostrou sintomas no galho de azêda e também no galho de doce, mas muito tempo mais tarde, isto é, cerca de doze meses após a inoculação. As 10 plantas usadas como testemunhas permaneceram sadias.

Dois hipóteses parecem mais prováveis para explicar a resistência da laranja azêda à infecção: a) A maneira de alimentação do vetor nesta planta talvez evite a introdução do vírus no tipo de tecido necessário para que haja multiplicação; b) A existência de princípios, nas folhas de laranja azêda, que inibem o vírus.

A observação de plantas no campo parece indicar que o pulgão prêto da laranjeira prefere as laranjas doces às laranjas azêdas, mas este fato

(1) Os afídeos foram encerrados em um saco de papel colocado sobre o galho que se queria inocular, a fim de evitar que passassem ao outro galho.

unicamente não poderia explicar a resistência da laranja azêda à inoculação. Além disso, têm sido observados casos de grande infestação da laranja azêda pelo mesmo inseto.

Schultz e outros (12), em estudos sobre a resistência de variedades de batata (*Solanum tuberosum* L.) ao vírus A, também verificaram que existiam tipos imunes ao vírus, por meio de inoculação com afídeos, mas suscetíveis à inoculação por enxertia.

Além da maior dificuldade em obter infecção da laranja azêda por meio do vetor, em comparação com enxertia, notou-se, também, em numerosas experiências, que não tem sido possível recobrar o vírus da tristeza por meio do vetor, de plantas de laranja azêda afetadas. Isto, entretanto, tem sido conseguido com relativa facilidade por enxertia.

Existe bastante variação na resistência fisiológica dos diferentes tipos de *Citrus* à tristeza, a julgar pela maior ou menor severidade dos sintomas que apresentam quando enxertados sobre laranjas azêdas ou outros cavalos não tolerantes. Até clones da mesma variedade podem diferir em sua resistência, conforme foi observado na Estação Experimental de Limeira. Neste local, clones da variedade Pêra, enxertados em laranja azêda, mostraram 100% de infecção. No caso de alguns clones, as plantas decaíram rapidamente e morreram em poucos anos, ao passo que as copas de outros clones permaneceram vivas, não obstante a folhagem ser esparsa e mais ou menos doentia. Embora estas reações não representem completa resistência à moléstia, indicam, entretanto, que há gradação na formação de vírus ou princípio tóxico, até entre os clones de uma mesma variedade.

Nos quadros 1 e 2 estão reproduzidos os resultados médios obtidos em estudos minuciosos efetuados em Campinas sobre a infecção e a reação de uma variada coleção de espécies e variedades do gênero *Citrus*, enxertadas sobre variedades de laranja azêda. Na discussão da reação destes tipos é preciso ser levado em consideração que o conceito de resistência à tristeza de uma variedade, quando enxertada sobre laranja azêda ou cavalo do mesmo tipo, não deve ser confundido com o conceito de tolerância da mesma variedade, quando usada como cavalo para laranjas doces ou tipos semelhantes. O conceito de tolerância será melhor explicado mais adiante.

A observação dos dados dos quadros 1 e 2 mostra que há bastante variação no comportamento dos diferentes grupos, embora haja também variação dentro dos grupos. De uma maneira geral, pode-se notar que há uma correlação entre a percentagem média de infecção obtida nas inoculações e o grau médio de severidade dos sintomas. É aparente que os tipos que apresentaram sintomas mais severos foram os que se mostraram mais suscetíveis à infecção. Parece constituir exceção o grupo das mandarinas que, não obstante apresentar sintomas relativamente severos, se mostrou menos suscetível à infecção.

As laranjas doces se mostraram mais suscetíveis à infecção e apresentaram sintomas mais severos que os representantes de todos os outros grupos. A variedade Barão mostrou-se mais suscetível que a Valência e apre-

sentou sintomas bastante severos, confirmando observações anteriores de que era muito suscetível à tristeza.

As mandarinas parecem possuir certa resistência à infecção, mas, quando afetadas, mostram sintomas severos. Os "grapefruits" são mais resistentes à infecção que as laranjas doces e mostram sintomas mais moderados. O "grapefruit" Leonardy mostrou-se mais suscetível que o Duncan, com sintomas mais severos. Bennett e Costa (4) atribuíram o fato de os "grapefruits" mostrarem sintomas menos severos, quando enxertados sobre azêda, à menor capacidade desses tipos em permitir multiplicação do vírus.

Os tângelos (*Citrus reticulata* x *C. paradisi*) foram incluídos no quadro em dois grupos, de acordo com o seu procedimento como cavalo. Os tângelos tolerantes, quando enxertados sobre azêda, se comportam aproximadamente como as laranjas doces, mostrando sintomas mais severos e sendo mais facilmente infectados que as tangerinas. Os tângelos não tolerantes se comportam da mesma maneira que os "grapefruits".

O comportamento dos "citranges" (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus sinensis*) foi também variado. Alguns se mostraram suscetíveis à infecção e apresentaram sintomas moderadamente severos. Outros "citranges", assim como os "citrumelos" (*P. trifoliata* x *C. paradisi*), se comportam como *P. trifoliata*, mostrando-se resistentes à infecção.

As toranjas e zamboas, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, são, em geral, bastante resistentes à infecção, e mostram sintomas menos severos que os outros tipos. A laranja azêda também reage de maneira mais ou menos semelhante.

QUADRO 1.—Resultados médios de três inoculações de representantes de vários grupos de *Citrus* enxertados sobre laranja azêda, com o vírus da tristeza, por meio do vetor.

Grupo	Plantas inoculadas	Plantas infectadas após três inoculações	Porcentagem de infecção	Grau médio ⁽¹⁾ dos sintomas	Porcentagem ⁽²⁾ de infecção de cada inoculação			
					1. ^a	2. ^a	3. ^a	Mé-dia
	N.º	N.º	%		%	%	%	%
Laranjas doces	48	48	100	4,5	83	75	100	86
Mandarinas	96	86	90	4,1	45	59	54	53
Tângelos (tolerantes)	100	95	95	4,6	57	72	58	62
Tângelos (não tolerantes) ..	30	28	93	3,7	40	56	75	57
"Grapefruits"	20	19	95	3,7	56	33	83	57
"Citranges" (suscetíveis) ...	15	14	93	3,0	53	43	75	57
Toranjas e zamboas	54	20	37	2,5	2	11	26	13
Laranjas azêdas	66	10	15	2,4	0	2	14	5
"Citranges" (resistentes) ...	15	0	0	0	0	0	0	0
"Citrumelos"	40	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. trifoliata</i>	15	0	0	0	0	0	0	0

(1) O grau dos sintomas varia de 0 a 5, sendo dado subjetivamente, de acordo com a sua severidade. Grau 0 corresponde à ausência de sintomas; grau 5 a sintomas bastante severos, com amarelecimento muito forte, queda das folhas, etc. Os graus intermediários, para sintomas intermediários.

(2) Porcentagem sobre o número de plantas que não foram infectadas nas inoculações anteriores.

QUADRO 2.—Resultados médios das inoculações de duas variedades de laranja doce e duas de “grapefruit”, enxertadas em quinze variedades diferentes de laranja azêda, com o vírus da tristeza, por meio do vetor.

Variedade	Plantas inoculadas	Plantas infectadas após três inoculações	Porcentagem de infecção	Grau médio dos sintomas	Porcentagem de infecção de cada inoculação			
					1. ^a	2. ^a	3. ^a	Média
	N.º	N.º	%		%	%	%	%
Barão A	75	73	97	4,8	70	77	...	74
Valência	75	68	90	4,6	50	50	40	47
“Grapefruit” Leonardy	62	50	81	4,0	47	27	54	43
“Grapefruit” Duncan	57	42	74	3,5	31	12	47	30

2.3—CAPACIDADE DA PLANTA EM PERMITIR MULTIPLICAÇÃO DO VÍRUS

Os tipos de *Citrus* estudados variam na sua capacidade em permitir a multiplicação do vírus da tristeza em seus tecidos, podendo-se enquadrar em três grupos: a) Aquêles nos quais o vírus parece atingir concentração elevada; b) Tipos nos quais o vírus só atinge concentrações moderadas; c) Tipos nos quais o vírus não parece capaz de se multiplicar.

Devido à inexistência, até o presente momento, de um método que permita a determinação direta da concentração do vírus da tristeza nas diferentes plantas, tem-se lançado mão do “teste da laranja azêda” (7). Êste é feito enxertando-se o tipo que se quer estudar sôbre cavalo de azêda e inoculando-se o enxêrto e admitindo-se que a severidade dos sintomas apresentados pelas plantas inoculadas é proporcional à concentração que o vírus ou princípio tóxico resultante da presença do vírus nelas atinge. A capacidade da planta em permitir, ou não, a multiplicação do vírus, tem sido determinada pela inoculação do tipo a ser estudado com o vetor ou pela união de tecidos e posterior recuperação do vírus para plantas-teste de doce sôbre azêda.

2.4—TOLERÂNCIA DOS TECIDOS DA PLANTA E ESPECIALMENTE DO FLOEMA AO PRINCÍPIO QUE CAUSA INJÚRIA

A tolerância ou sensibilidade dos tecidos, e principalmente do floema ao princípio que causa injúria, tem sido estudada usando-se os diferentes tipos como cavalos para tipos nos quais se sabe que o vírus ou princípio tóxico atinge concentrações mais ou menos elevadas. Se os sintomas apresentados pelo enxêrto forem severos, os tecidos do cavalo são considerados sensíveis, ao passo que, se os enxertos não apresentarem sintomas, os tecidos

do tipo usado como cavalo serão considerados tolerantes. Quanto a estes caraterísticos, os tipos de *Citrus* estudados podem ser classificados em três grupos: a) Bastante sensíveis; b) Moderadamente sensíveis; c) Tolerantes.

Baseados nos conceitos atrás emitidos sobre a multiplicação do vírus, tolerância dos tecidos ao princípio tóxico e reação observada de várias combinações de cavalo-cavaleiro, Bennett e Costa (4) sugeriram que as variedades e espécies cítricas podem ser classificadas em cinco grupos principais quanto à sua relação para com o vírus da tristeza. Resultados adicionais sobre a reação de numerosas combinações entre cavalo-cavaleiro foram publicados posteriormente (7). Em geral, estes dados confirmam a existência dos grupos apontados por aqueles autores, embora tenha sido reconhecido que a inclusão de certos tipos nesses grupos deva ser alterada. Os cinco grupos principais, indicados por Bennett e Costa, são:

Grupo 1 — A multiplicação do vírus na planta é nula ou muito pequena, mas os tecidos do floema são bastante sensíveis ao vírus ou toxina. Aquêles autores (4) incluíram neste grupo a laranja azêda, alguns limões verdadeiros e o tângelo Sampson.

Os resultados das experiências mais recentes têm mostrado que neste grupo, chamado "grupo da azêda", podem ser incluídos ainda outros tipos como a espécie *Severinia buxifolia* (Poir) Tenore, alguns híbridos de *Fortunella*, como os denominados "kumquat" Meiwa e "kumquat" Nippon. A inclusão do tângelo Sampson nesta classe, feita por Bennett e Costa (4), tinha sido baseada nas informações procedentes da África (8), de que este tângelo, quando usado como cavalo, se comportava como a laranja azêda, complementadas com observações feitas na Estação Experimental de Limeira, onde plantas de um tângelo, que se supunha ser Sampson, enxertadas sobre laranja azêda, se mostraram resistentes à moléstia. As observações mais recentes sobre os vários tângelos, entre os quais o tângelo Sampson (7), têm mostrado que eles se comportam de duas maneiras diferentes, mas nenhum deles pode ser incluído nesta categoria. Algumas toranjas e zamboas podem ser também incluídas neste grupo.

Grupo 2 — A planta pode permitir a formação de concentrações moderadas de vírus ou toxinas e possuir floema moderadamente tolerante à injúria. A este grupo parecem pertencer algumas toranjas e zamboas e algumas limas. São tipos que, enxertados sobre azêda, mostram sintomas de tristeza; quando usados como cavalo para laranja doce ou outros tipos no qual o vírus atinge concentrações mais elevadas, há também manifestação do sintoma. Bennett e Costa (4) incluíram os "grapefruits" neste grupo. Embora seja possível que alguns deles possam ser aqui incluídos, parece que a maioria dos que têm sido ensaiados pertence ao grupo 5 daqueles autores. Na verdade, não existe uma diferenciação nítida entre os representantes deste e aquêles do grupo 5, adiante descrito.

Grupo 3 — A planta pode permitir a produção de concentrações médias ou elevadas de vírus ou toxinas e possuir floema bastante tolerante à injúria. A este grupo pertencem as laranjas doces, as mandarinas e tangerinas, alguns tângelos, alguns híbridos de *Poncirus trifoliata*, alguns

limões, etc. Os representantes dêste grupo, quando enxertados sôbre laranja azêda ou sôbre cavalos que pertençam aos grupos 1, 2 e 5, mostram sintomas de tristeza. De outro lado, os tipos dêste grupo podem ser usados como cavalos para enxertos de qualquer outro tipo. Quando enxertados com representantes da classe 5, pode haver manifestação de tristeza na copa.

Grupo 4 — A planta pode permitir pouca ou nenhuma multiplicação do vírus, mas possuir floema tolerante a concentrações elevadas de vírus ou toxinas. A êste grupo pertencem *Poncirus trifoliata* e alguns dos seus híbridos. Os representantes dêste grupo não mostram sintomas quando enxertados sôbre laranja azêda ou outros cavalos não tolerantes, mesmo quando inoculados repetidas vêzes ou expostos à infecção pelo vírus da tristeza. Inúmeras tentativas têm sido feitas para recobrar o vírus de plantas dêste grupo, que foram inoculadas várias vêzes, mas nenhum sucesso foi obtido.

As plantas de *P. trifoliata* e alguns de seus híbridos, que pertencem ao presente grupo, comportam-se como cavalos tolerantes e podem ser usados como cavalos para outros tipos de *Citrus*. Quando enxertados com representantes da classe 5, pode haver manifestação de sintomas na copa.

Grupo 5 — A planta pode permitir a produção de concentrações relativamente elevadas de vírus ou toxinas e possuir floema sensível à injúria. A êste grupo pertencem as plantas cujo caraterístico principal é mostrar sintomas de pé franco, incluindo algumas limas (Kirk, Beledy), alguns "grapefruits" (Leonardy, Mexican, Duncan, etc.) e alguns limões.

3—NATUREZA DA INJÚRIA CAUSADA PELA TRISTEZA

Toxopeus (13) foi talvez o primeiro autor que procurou explicar a natureza da injúria causada por uma moléstia semelhante à tristeza, que ocorre em Java. Êle concluiu, de suas experiências de enxertia e interenxertia com cidra japonesa, laranja doce e laranja azêda, que o cavaleiro provâvelmente tinha uma ação letal sôbre o cavalo, principiando esta ação quando o cavaleiro iniciava o fornecimento de assimilados ao cavalo. Acrescentou ainda que essa ação letal era possivelmente devida à produção, pelo cavaleiro, de uma substância tóxica ao cavalo, ou porque a folhagem daquele não fôsse capaz de produzir determinada substância alimentar necessária a êste.

Vários autores sugeriram que a tristeza era provâvelmente uma moléstia de vírus. Bitancourt (5), entretanto, foi o primeiro que formulou a hipótese de que a injúria causada pela tristeza poderia resultar da falta de translocação para as raízes, devido ao bloqueio do floema na proximidade da união entre o cavalo e cavaleiro.

Os estudos de Schneider sôbre o "quick decline" (10) e os de Schneider, Bitancourt e Rossetti, sôbre a tristeza (11), apresentaram evidência de que, no caso de plantas de laranja doce enxertadas sôbre cavalo de azêda, infectadas por estas moléstias, há uma degeneração bem definida dos tubos crivados da laranja azêda na região de união entre cavalo e cavaleiro ou

ligeiramente abaixo desta. Nos estados mais avançados da moléstia, a degeneração dos tubos crivados pode-se estender até cerca de 45 cm acima ou abaixo do ponto de união entre os componentes do enxerto.

Em relação à causa da degeneração dos tubos crivados, Schneider (10) primeiramente sugeriu que alguma substância tóxica aos tubos crivados da laranja azêda e não aos tubos crivados da laranja doce é formada nas copas das plantas afetadas. Esta substância transloca-se no floema e, quando alcança os tubos crivados do cavalo da laranja azêda, induz o tubo crivado à degeneração. Schneider, Bitancourt e Rossetti (11) também sugeriram que o vírus da tristeza, ou um subproduto dêste, presente na copa da laranja doce, se move em direção às raízes, junto com os alimentos elaborados, e causa a degeneração dos tubos crivados do cavalo de laranja azêda.

Bennett e Costa (4) reconheceram as possibilidades sugeridas pelos autores acima citados, mas acrescentaram também que a degeneração dos tubos crivados da laranja azêda, no caso de combinações de doce sobre azêda, afetadas por estas moléstias, pode resultar da atual multiplicação do vírus *in situ*, isto é, no conteúdo do floema da laranja doce ao mover-se no floema da azêda.

Uma terceira hipótese poderia também ser sugerida para explicar as dificuldades de translocação nas combinações afetadas: Como resultado da presença do vírus na planta, o mecanismo funcional das células do floema da laranja azêda na translocação poderia ser prejudicado, sendo o colapso do floema já um resultado da diminuição na translocação e não a sua causa.

Schneider (10) e outros (5, 11) atribuíram a manifestação dos sintomas da copa de combinações afetadas pelo "quick decline" e pela tristeza, à morte das radículas que ocorre devido ao bloqueio na passagem das substâncias elaboradas em direção às raízes. Bennett e Costa (4) discutiram estes pontos em relação à tristeza e, como resultado de observações e testes efetuados, concluíram que os primeiros sintomas da copa podem talvez resultar da acumulação excessiva de substâncias elaboradas e que êste acúmulo pode preceder a morte das raízes que ocorre em seguida ao desaparecimento do amido de seus tecidos. Está claro, porém, que a morte das radículas influencia consideravelmente a manifestação posterior dos sintomas. Evidência a favor do acúmulo de substâncias na copa tem sido obtida em inoculações de plantas de laranja doce sobre azêda, as quais, em grande número de casos, mostram um entumescimento dos tecidos logo acima da zona de enxertia (est. 1-4). Êste fato é mais comum em plantas que mostram sintomas moderadamente severos e que podem continuar vivas por bastante tempo. Plantas muito severamente atacadas podem morrer antes que o acúmulo de substâncias chegue a apresentar modificações tão visíveis.

Algumas experiências de anelagem, efetuadas pelos autores, confirmam o ponto de vista, já expresso anteriormente (4), de que a maioria dos sintomas mostrados por plantas de doce sobre azêda, afetadas pela tristeza, corresponde àqueles que se obtêm quando um anel de casca é retirado de

plantas da mesma combinação. Por outro lado, experiências de interenxertia com plantas compostas de copa e raízes de laranja doce, com um interenxerto de azêda, parecem indicar que o colapso do floema com a resultante diminuição na taxa de translocação não é a única causa operante na reação dos tecidos da laranja azêda.

Um interenxerto de laranja azêda, de 10 cm de comprimento, entre raízes e copa de laranja doce foi suficiente para causar injúria na copa, semelhante à de árvores de doce sôbre azêda. Observa-se, além disso, que nestas plantas há um estrangulamento do interenxerto de azêda (est. 1-B), sendo a haste da laranja doce mais grossa tanto acima como abaixo do interenxerto. Isto sugere que, embora haja colapso do floema da laranja azêda, pelo menos no início, continua a haver translocação através do interenxerto para a parte inferior, translocação essa que é suficiente para permitir que a haste da laranja doce, abaixo, tenha um desenvolvimento correspondente ao da parte acima do interenxerto. É possível, portanto, que a razão da falta de desenvolvimento do interenxerto de azêda não seja atribuível à diminuição na translocação devida ao colapso do floema, mas a um efeito da moléstia sôbre o câmbio ou outros tecidos da laranja azêda, evitando que a parte da azêda da haste se desenvolva na mesma proporção que a laranja doce.

3.1—RELAÇÃO ENTRE FATÔRES RESPONSÁVEIS PELA INJÚRIA E AS RAÍZES

Sendo a morte das radículas e raízes um dos sintomas predominantes do quadro sintomatológico da tristeza, pensou-se que as raízes dos cavalos de combinações suscetíveis pudessem ser diretamente afetadas pelo vírus e responsáveis pelos sintomas da parte aérea. Embora tenha sido verificado que os tecidos das raízes, da mesma maneira que os da haste de cavalos não tolerantes, podem ser afetados pela moléstia, a morte das radículas é principalmente manifestação secundária, não sendo necessária a presença de raízes de laranja azêda ou de cavalos do mesmo tipo para que haja manifestação de tristeza na copa das combinações suscetíveis.

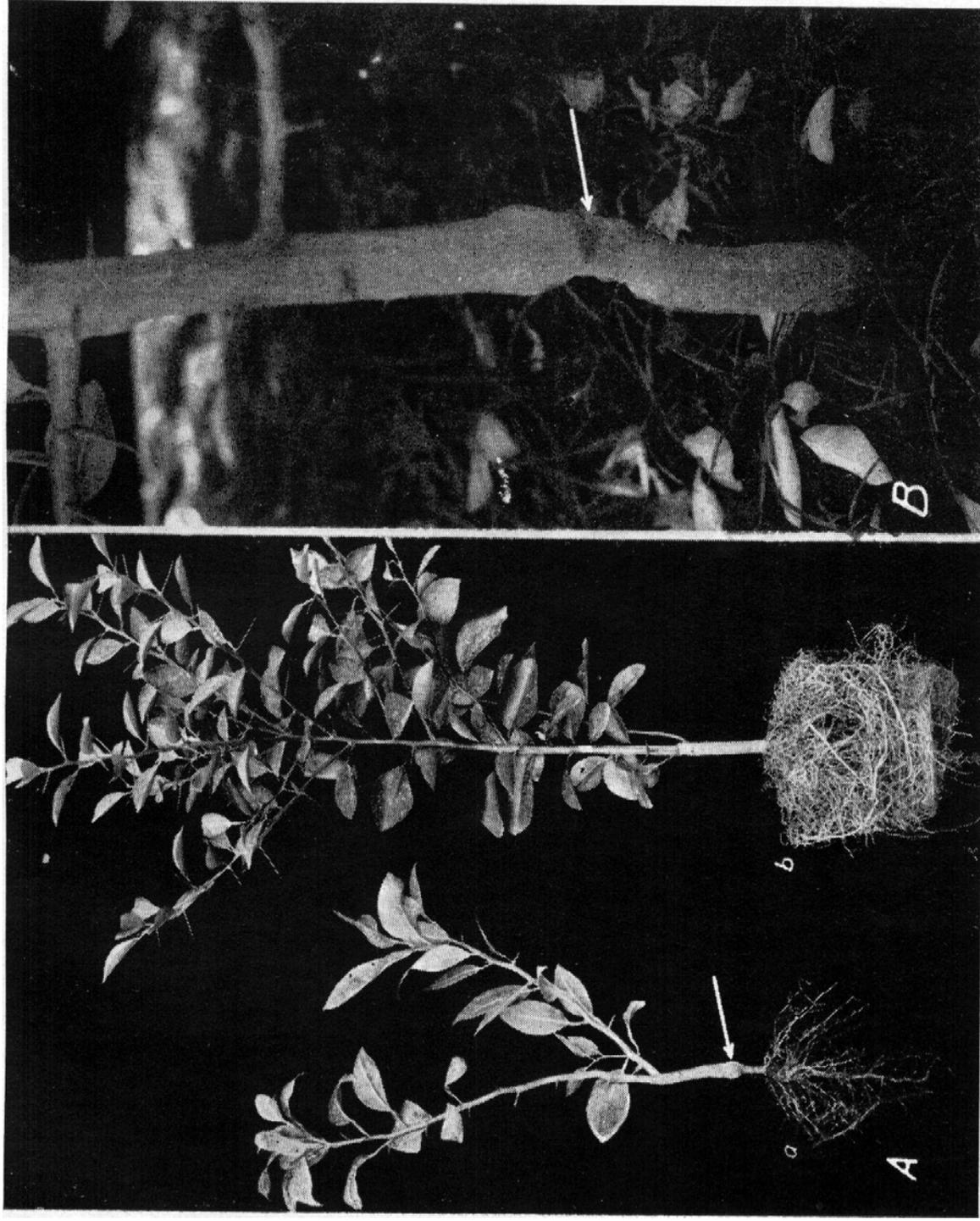
A evidência neste sentido foi obtida em várias experiências :

a) Nas experiências de interenxertia já mencionadas, plantas compostas de copa e raízes de laranja doce, com um interenxerto de azêda, mostraram sintomas usuais de tristeza. Estes resultados confirmam as experiências relatadas por Toxopeus (13).

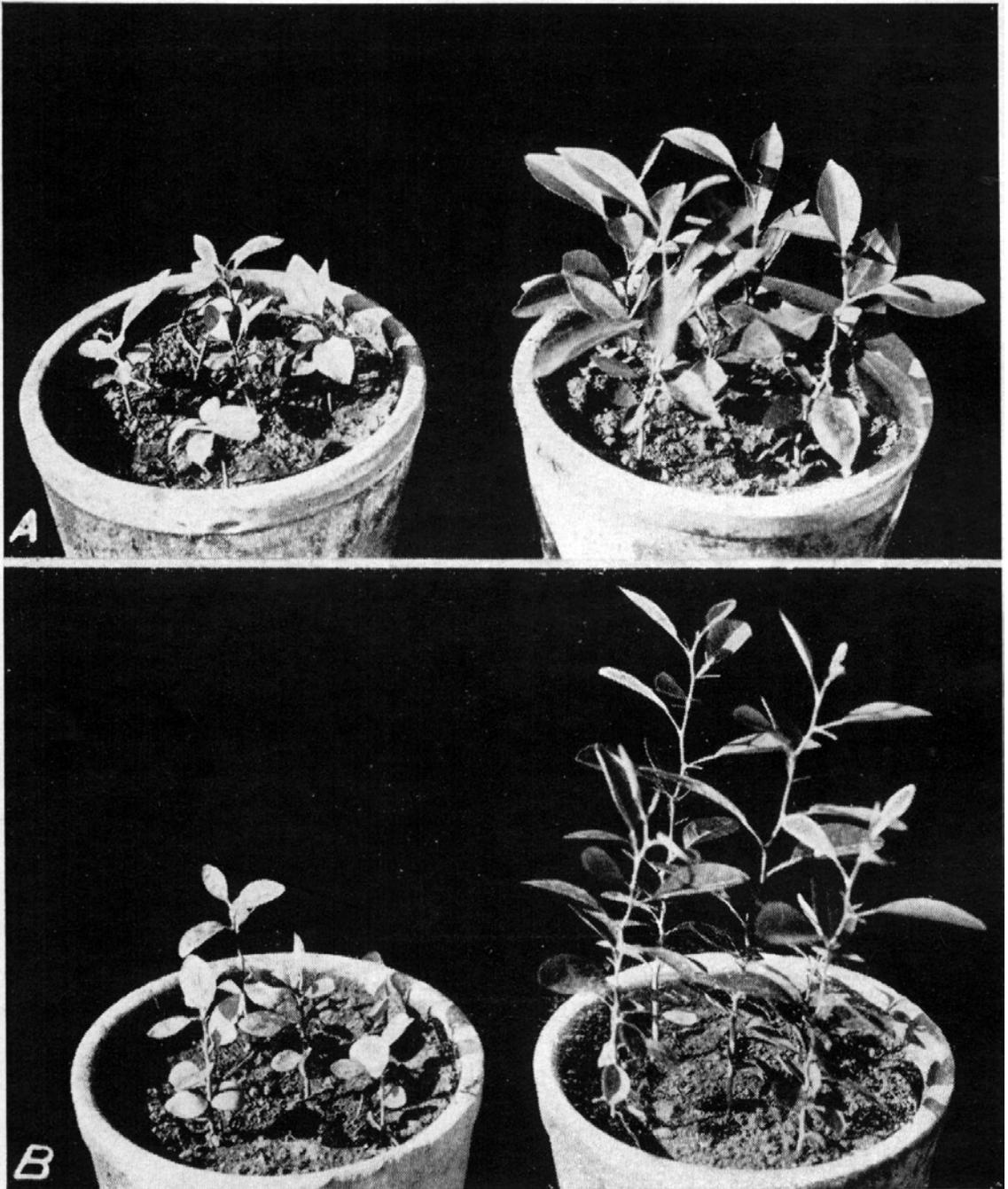
b) Experiências feitas com tipos de *Citrus* que apresentam sintomas de pé franco mostraram que êsses tipos podem exibir sintomas de tristeza mesmo quando enxertados sôbre cavalos tolerantes, como a laranja doce e alguns tângelos.

c) Em experiências de anelagem, verificou-se que plantas sadias, aneladas, mostram também morte das radículas, em tudo semelhante à que se observa em plantas de combinações afetadas pela tristeza.

d) Em uma outra experiência, efetuou-se o enxerto de garfos de laranja doce diretamente sôbre as raízes de laranja azêda. Após pegamento



A — Plantas de laranja Caipira enxertadas em laranja azêda; a — afetadas pela tristeza, vendo-se o entumescimento da haste logo acima da zona de enxertia; b — contrôlo sadio. B — Intercxerto de laranja azêda entre copa e raízes de laranja doce; notar sua constricção.



Sintomas de tristeza em mudinhas de pé franco inoculadas (esquerda), em comparação com os controles. A — Tângelo Pearl 116. B — Lima Key.

do enxerto, as plantas assim obtidas, compostas de parte aérea de laranja doce e unicamente raízes de laranja azêda, foram inoculadas e mostraram posteriormente os sintomas usuais de tristeza.

É, pois, de se concluir que, no caso de cavalos não tolerantes, tanto os tecidos da haste como das raízes são sensíveis à ação do vírus ou toxina, não sendo, entretanto, necessária a presença de raízes com tecidos sensíveis para que haja manifestação da moléstia. Consoante já foi apontado por Bennett e Costa (4), para que os sintomas de tristeza se manifestem, basta haver uma copa na qual haja formação de vírus ou toxina e presença de tecidos sensíveis entre a copa e as raízes ou nas próprias raízes.

3.2—PRESENÇA DO VÍRUS DA TRISTEZA NAS RAÍZES DE PLANTAS DE COMBINAÇÕES TOLERANTES

A fim de verificar se o vírus da tristeza estava presente nas raízes de plantas de laranja Barão enxertadas sobre Caipira, descobriram-se as raízes de várias plantas em um laranjal e seccionaram-se algumas de cerca de 1 a 2 cm de diâmetro. A extremidade cortada, ligada à parte distal (sem conexão com a planta), foi então levantada acima do solo e deixada em posição oblíqua, a fim de facilitar a emissão de brotos. Protegeu-se a extremidade da raiz com uma caixa à prova de insetos. Alguns meses após, formaram-se brotos nas extremidades cortadas das raízes e, sobre estes brotos, colocaram-se afídeos não virulíferos que, após 24 horas, foram transferidos para plantas-teste de laranja doce sobre azêda. Em alguns casos usaram-se também as gemas desses brotos como inóculo. Dos brotos das raízes de três plantas diferentes, que foram ensaiadas dessa maneira, recobrou-se o vírus de todas três.

Em outra experiência aproveitaram-se os brotos desenvolvidos naturalmente das raízes de plantas da mesma combinação. Grupos de afídeos, retirados de 10 brotos nascidos das raízes de 10 plantas diferentes, transmitiram o vírus em nove casos para plantas-teste de doce sobre azêda.

Ainda está para ser verificado se o vírus da tristeza está presente nas raízes de laranja azêda no caso de plantas afetadas pela moléstia e enxertadas sobre este cavalo.

4—SINTOMAS DE TRISTEZA EM PLANTAS DE PÉ FRANCO

Contrariamente ao que se pensava no início dos estudos sobre a tristeza, as plantas de pé franco de certos tipos de *Citrus* mostram sintomas de tristeza quando infectadas. Este fato foi observado em numerosas inoculações realizadas em estufas, sob condições controladas, e também em experiências de campo.

As observações têm indicado que as mudinhas novas são mais suscetíveis e mostram sintomas mais visíveis que as mudas mais desenvolvidas. Entretanto, plantas de pé franco de um ano ou mais, de certos tipos, têm-se mostrado afetadas. Uma lista completa dos tipos que mostraram sintomas de pé franco é dada no quadro 3. Vê-se que mudinhas de alguns "grape-

fruits”, limas, tângelos e de alguns limões mostram sintomas de pé franco, assim como de laranja azêda. Até mesmo mudinhas de laranja doce podem mostrar sintomas moderados de tristeza, após infecção.

Os sintomas apresentados pelos tipos de *Citrus*, que mostram tristeza de pé franco, pouco se diferenciam daqueles mostrados pelas plantas de combinações de enxertia, não tolerantes. Em linhas gerais, constam de cessação ou retardamento do crescimento, clorose e amarelecimento das fôlhas e morte das radículas. Esta parece ser mais acentuada no caso de mudinhas de laranja azêda e de certos limões, do que no caso de alguns “grapefruits” e de laranjas doces. A clorose das nervuras principal e secundárias não é sintoma tão notável como no caso das combinações de enxertia suscetível à injúria, mas foi observada em mudinhas de laranja Barão, de pé franco.

A observação parece indicar que os tipos de *Citrus* que possuem floema e outros tecidos relativamente tolerantes à presença do vírus podem mostrar sintomas moderados de pé franco em seguida à infecção, havendo mais tarde tendência para restabelecimento aparente. Os tipos de *Citrus* que possuem tecidos não tolerantes, quando infectados de pé franco, parecem mostrar sintomas mais severos e menor tendência para restabelecimento.

QUADRO 3.—Variedades de *Citrus* que mostraram sintomas de tristeza de pé franco em experiências de inoculação

Grupo	Variedades
Laranja azêda	Azêda comum, azêda n.º 2, Oklawaha, Paraguai, Dummett, Bitter Sweet (Stow), Tiawanica, Arancia Bizzarria A, Azêda sem Espinho.
Toranjias e zambos	Ogami, Thong Dee, Siamese, Nakorn, Natsu Mikan, Fleming, Hawaiian, Índia Red.
Limões	Des 4 Seasons, Kulu, Lemelo, <i>Citrus sp.</i> (Lemon P. I. 10785), Lima Selvagem, Eureka.
Laranjas doces	Barão, Mediterrânea, Pêra, Flórida Sweet.
“Grapefruits”	Leonardy, Foster, Duncan, Marsh, Red Mexican, Royal, Thompson, Ruby Red (Hennings), Red Blush (Webb), Poorman’s Orange, Tresca x tangerina Dancy.
Tângelos	Watt, Pina, Pearl, Tângelo 18-D-14, Tângelo 18-V-13, Tângelo 18-T-2.
Limas	Kadu Mul (Pink), Beledy, Kirk, Key, Lima de Umbigo.
Miscelânea	<i>Citrus longispina</i> (*) <i>Micromelum tephrocarpon</i> (*)

(*) Não há certeza sobre a classificação destas espécies.

O fato de plantas de pé franco de certas variedades mostrarem sintomas, quando infectadas pela tristeza, indica que a ação do vírus ou de uma toxina pode dar-se mesmo na ausência de uma zona crítica semelhante ao ponto de união entre o cavalo e cavaleiro. Em uma experiência procurou-se verificar se a enxertia tinha alguma importância em relação à manifestação de sintomas de tristeza pelos tipos que mostram sintomas de pé franco. Prepararam-se as seguintes plantas : 7 plantas de "grapefruit" Leonardy enxertadas sobre cavalo da mesma variedade e 7 plantas de "grapefruit" Duncan também enxertadas sobre a mesma variedade. Cada um destes enxertos foi inoculado, em comparação a plantas de pé franco da mesma variedade, com o vírus da tristeza, conservando-se o mesmo número de plantas como testemunhas não inoculadas. Nenhuma das testemunhas mostrou sintoma algum ; tanto as 7 plantas de "grapefruit" Leonardy enxertadas como as 7 de pé franco mostraram sintomas. Das 7 plantas de "grapefruit" Duncan enxertadas, 5 mostraram sintomas, e também, das 7 plantas de pé franco, 5 mostraram sintomas. O grau de severidade dos sintomas foi também o mesmo, tanto para as plantas enxertadas como para as de pé franco.

Caso se procurasse explicar a manifestação dos sintomas de tristeza em plantas de pé franco como devida unicamente à degeneração do floema, seria necessário postular que essa degeneração poderia ocorrer de maneira dispersa, em níveis diferentes da planta, visto não haver uma zona crítica como o ponto de união do enxerto. Em virtude, porém, da pouca translocação lateral das plantas cítricas, o resultado final, devido ao colapso do floema em vários pontos da planta, não seria diferente daquele obtido quando este se dá principalmente em uma zona definida.

Como já foi referido em outra parte desta publicação, verificou-se que alguns tipos de *Citrus* que mostram sintomas severos de tristeza de pé franco, apresentam sintomas da moléstia também quando enxertados sobre laranjas doces ou sobre outros cavalos tolerantes, embora possam ser menos severos.

É possível que alguns dos tipos de *Citrus* que mostram sintomas de pé franco possam vir a ser usados diretamente como plantas-teste em experiências com a tristeza, substituindo a combinação doce sobre azêda, que vem sendo usada até agora. Será mais provável encontrar-se essa planta entre as limas ou tângelos não tolerantes. Estão em andamento algumas experiências visando esclarecer este ponto para estabelecer também, com maior rigor, a influência de outros fatores, como idade, vigor e suscetibilidade na manifestação dos sintomas de plantas de pé franco.

5—OBSERVAÇÕES GENÉTICAS SOBRE A REAÇÃO À TRISTEZA

Embora seja pequeno o número de progênies de híbridos e de tipos semelhantes a seus progenitores que foram até agora estudados quanto à sua reação à tristeza, os resultados obtidos são de interesse, razão pela qual será feita uma tentativa de análise genética dos característicos principais que resultam na manifestação da moléstia. As progênies dos híbridos ensaiados foram obtidas a partir de sementes vindas dos Estados Unidos e

produzidas por plantas híbridas, obtidas em cruzamentos controlados feitos naquele país.

As interpretações feitas em seguida estão baseadas na suposição de que a reação à tristeza resulta principalmente da interação entre os fatores — multiplicação do vírus na planta e tolerância ou sensibilidade dos tecidos da planta à presença do vírus ou toxina.

5.1—*PONCIRUS TRIFOLIATA* E HÍBRIDOS

Este grupo é dos que apresenta maior interêsse. Tôdas as tentativas feitas até agora para recobrar o vírus da tristeza de plantas de *P. trifoliata*, repetidamente inoculadas, falharam. As tentativas para recobrar o vírus de plantas inoculadas desta espécie têm sido feitas por meio de afídeos e também por enxertia de borbulhas em plantas-teste de doce sôbre azêda. Em muitos casos a borbulha de *P. trifoliata*, inserida nas plantas-teste, se desenvolveu, aumentando assim a possibilidade de transmissão, caso contivesse o vírus, mas os resultados foram sempre negativos.

Tentativas feitas para recobrar o vírus de plantas de *P. trifoliata*, que estão em cultivo na Estação Experimental de Limeira há muitos anos, sob condições onde existe abundância de inóculo, também falharam. Êstes ensaios foram feitos enxertando-se borbulhas e garfos destas plantas sôbre plantas-teste de laranja doce sôbre azêda.

Os resultados atrás relatados parecem indicar que o vírus da tristeza não é capaz de se multiplicar nesta espécie ou que, pelo menos, não atinge nestas plantas uma concentração que permita ser recobrado pelos métodos usuais.

Resultados de numerosos ensaios feitos no campo mostram, por outro lado, que plantas de *P. trifoliata* podem ser usadas como cavalo para laranjas doces e outros tipos de *Citrus*, nos quais o vírus da tristeza se multiplica e atinge concentrações elevadas, sem que estas copas desenvolvam os sintomas da moléstia, mesmo quando o vírus está nelas presente. Isto parece indicar que o floema do cavalo *P. trifoliata* é tolerante à presença do vírus ou da toxina responsável pela injúria ao floema dos tipos sensíveis.

Híbridos entre *P. trifoliata* e laranjas doces (“citranges”) podem reagir da mesma forma que qualquer um dos pais. A maioria dos tipos estudados tem demonstrado possuir floema tolerante à presença do vírus, nos ensaios em que foram usados como cavalos para laranjas doces portadoras do vírus. Quando ensaiados como enxertos sôbre cavalos de laranja azêda, alguns dos “citranges” se comportam como *P. trifoliata*, não dando nenhuma reação e indicando que provávelmente o vírus não se multiplica ou atinge apenas concentração muito diminuta nestas plantas. Outros tipos de “citranges” reagem da mesma forma que a laranja doce, mostrando sintomas de tristeza quando enxertados sôbre cavalos de azêda.

A observação dêstes híbridos tem mostrado que não há correlação entre a forma da fôlha de *P. trifoliata* e a inabilidade em permitir multiplicação do vírus da tristeza. Alguns dos “citranges” ensaiados possuem essa forma de fôlha, mas permitem multiplicação do vírus.

Os retrocruzamentos de "citranges" para laranjas doces ("citrangor") mostram maior tendência para se comportarem como a laranja doce, o que é compreensível, pois nestes retrocruzamentos há naturalmente maior concentração de fatores da laranja doce do que no híbrido F_1 .

Híbridos entre *P. trifoliata* e "grapefruits", denominados "citrumelos", parecem comportar-se, na maioria dos casos, como o progenitor *P. trifoliata*. Este fato parece indicar que os caracteres floema tolerante e inabilidade em permitir multiplicação do vírus do pai *P. trifoliata* são dependentes de fatores genéticos aparentemente dominantes sobre os fatores responsáveis por floema sensível, e habilidade em permitir multiplicação do vírus, características do outro progenitor, "grapefruit".

Os resultados com híbridos de composição genética mais complexa, como os "citrangedins" e "citrangequats", não têm sido bem definidos e não permitem ainda nenhuma interpretação.

5.2—*CITRUS PARADISI*

As variedades de *C. paradisi* estudadas têm demonstrado possuir floema intolerante à presença do vírus, quando são enxertadas com copa de laranja doce. Quando usadas como enxertos sobre laranja azêda, mostraram sintomas de tristeza, demonstrando, assim, que também permitem a multiplicação do vírus nos seus tecidos. A associação desses dois caracteres na mesma planta resulta na manifestação de sintomas de tristeza em indivíduos de pé franco, consoante já tinha sido previsto por Bennett e Costa (4). Do ponto de vista genético em relação à tristeza, as variedades de *C. paradisi* são de pouco valor para uso em cruzamentos visando a obtenção de cavalos tolerantes, a não ser quando se visa melhorá-las, cruzando-as com tipos que possuam tecidos tolerantes.

5.3—*CITRUS RETICULATA*, *C. SINENSIS* E HÍBRIDOS

As variedades de *C. reticulata* e de *C. sinensis* até agora estudadas, têm demonstrado possuir floema relativamente tolerante à presença do vírus na própria copa ou na copa de enxertos para os quais foram usadas como cavalos. Híbridos entre *C. reticulata* e *C. paradisi* (tângelos) reagem de duas maneiras diferentes. Alguns deles se comportam como o progenitor *C. reticulata*, demonstrando possuir floema tolerante e permitir multiplicação do vírus, enquanto que outros se comportam como *C. paradisi*, mostrando possuir floema intolerante e a capacidade para permitir multiplicação do vírus.

Cêrca de metade dos tângelos que têm sido estudados parecem reagir como *C. reticulata*, não sendo possível afirmar que o característico floema tolerante também funciona como sendo devido a fatores dominantes ou parcialmente dominantes sobre floema sensível neste tipo de cruzamento.

No melhoramento genético dos *Citrus*, em relação à tristeza, parece mais interessante considerar-se apenas o problema da obtenção de melhores cavalos, possuidores de tecidos tolerantes à presença de vírus na copa, pois

esta terá que ser de variedades comerciais que, na maioria dos casos, permitam a multiplicação do vírus. É, portanto, de grande importância genética, para o melhoramento dos cavalos, o fato de ser o característico floema tolerante devido aparentemente a fatores dominantes, pelo menos em alguns tipos de cruzamentos. Este fato sugere que híbridos entre *Poncirus trifoliata* x *Citrus aurantium*, *C. reticulata* x *C. aurantium* e *C. sinensis* x *C. aurantium*, poderão dar origem a indivíduos que combinem a resistência e rusticidade da laranja azêda com os característicos de floema tolerante de outro progenitor. Caso tais híbridos possuíssem percentagem elevada de embriões nucelares, poderiam ser usados com vantagem como cavalo a partir de sementes de indivíduos F_1 , pois neste caso não haveria perigo de recombinações fatoriais desvantajosas na progênie nucelar do híbrido, como no caso da progênie proveniente de embriões sexuais.

6—REAÇÃO DE GEMAS SADIAS E PORTADORAS DO VÍRUS SÔBRE DIFERENTES CAVALOS

Toxopeus (13), em suas observações sobre a moléstia semelhante à tristeza que ocorre em Java, relatou que os enxertos de laranja doce, feitos sobre cavalos de azêda, principiam a mostrar sintomas de declínio de dois a três meses após enxertia, e que usualmente as plantas morriam de oito a doze meses depois daquele período.

Oberholzer (9) verificou, na União Sul-Africana, que enxertos de laranja Valência sobre laranja azêda, feitos com borbulhas de árvores do campo, principiavam a mostrar sintomas de declínio de um a três meses após enxertia, e que as plantas resultantes permaneciam sempre definhadas.

Bennett e Costa (4), usando borbulhas da variedade Baianinha, retiradas de plantas afetadas pela tristeza, observaram que os sintomas não apareciam tão rapidamente, e que, mesmo após doze meses, as plantas assim obtidas ainda possuíam certo vigor. Observações posteriores de Grant e Costa (7) mostraram, entretanto, que o brôto do enxerto proveniente de borbulhas portadoras de vírus, da variedade Barão (doce), sobre laranja azêda era, a princípio, aparentemente sadio, mas já começava a mostrar sintomas de tristeza cerca de três meses, ou menos, após enxertia, permanecendo os enxertos doentes definhados por períodos variáveis. Os resultados de Bennett e Costa devem, pois, ser interpretados como uma reação peculiar do clone de Baianinha usado ou porque essas borbulhas estavam invadidas por uma estirpe mais fraca do vírus.

O conhecimento adquirido em ensaios de cavalos enxertados com borbulhas portadoras e não portadoras do vírus da tristeza, das variedades Barão, Valência, tangerina Dancy, "grapefruits" Leonardy e Duncan, laranja azêda, limões, etc., tem mostrado que a reação das borbulhas portadoras de vírus varia de acordo com o tipo e vigor do cavalo, e também com a variedade do enxerto, sendo dependente do seu tipo de reação individual à tristeza. Têm-se observado dois tipos principais de reação, quando se enxertam borbulhas portadoras de vírus sobre cavalo de azêda: a) Reação de gemas portadoras de tipos de *Citrus* que possuem tecidos tolerantes;

b) A reação das gemas portadoras dos tipos de *Citrus* que possuem tecidos sensíveis.

No primeiro caso, que inclui o desenvolvimento de gemas portadoras de vírus, de laranja doce (est. 3), mandarinas, etc., o primeiro fluxo de crescimento é aparentemente normal e comparável ao de gemas sadias. Depois dêsse período de desenvolvimento normal, que varia geralmente de um a três meses mais ou menos, os brotos até então vigorosos principiam a mostrar os sintomas de declínio, sob a forma de amarelecimento, clorose das nervuras, mosqueado, etc. Está claro que nem tôdas as variedades dos grupos citados reagem igualmente, existindo variação entre elas como já foi relatado. Algumas demoram muito mais para mostrar os sintomas.

A fase de desenvolvimento normal da gema dêste tipo, portadora de vírus, parece corresponder, como já foi apontado por Toxopeus (13), ao período em que a translocação se faz principalmente em direção ao brôto em crescimento, e o declínio se faz sentir algum tempo depois que os alimentos assimilados, formados no enxêrto, principiam a se mover em direção às raízes, pois só então poderia o vírus ou toxina alcançar o floema do cavalo da azêda e assim causar injúria. Êste fato é perfeitamente compreensível e constitui evidência de que o movimento do vírus da tristeza é correlato ao movimento da seiva elaborada, no floema, conforme foi verificado por Bennett (1, 2), para outros vírus.

A reação das gemas portadoras de vírus, dos tipos de *Citrus* que possuem tecidos sensíveis, difere da anterior porque os sintomas da moléstia são mostrados quase que imediatamente após o início da brotação e constam de crescimento muito retardado, clorose e aparência definhada do enxêrto (est. 4).

No quadro 4 estão reproduzidos os dados de mensurações efetuadas em brotos de borbulhas portadoras de vírus e sadias, de vários tipos de *Citrus*, enxertados sôbre cavalos tolerantes e não tolerantes. Os dados representam a média para os representantes de cada grupo ensaiado. Vê-se que o crescimento das borbulhas portadoras, de tipos possuidores de tecidos tolerantes, foi aproximadamente o mesmo, até os dois meses, sôbre cavalos tolerantes e não tolerantes. Aos cinco meses, entretanto, o crescimento dos brotos dêste tipo de borbulha tinha quase que duplicado sôbre cavalos tolerantes, tendo permanecido estacionário sôbre cavalos não tolerantes. No caso de borbulhas portadoras de tipos possuidores de tecidos sensíveis, já as mensurações feitas aos dois meses mostraram grande diferença de desenvolvimento em comparação com o crescimento das borbulhas sadias.

Os tipos de reação atrás relatados são compreensíveis quando se interpretam êsses fenômenos na base do aumento do vírus ou toxina e na tolerância ou sensibilidade dos tecidos de enxêrto e do cavalo ao princípio que causa injúria. No caso dos enxertos com tipos nos quais o vírus se multiplica, mas cujos tecidos são tolerantes, durante o primeiro fluxo de crescimento, do enxêrto, a translocação no floema se faz principalmente em direção ascendente, havendo pouca possibilidade de que o vírus ou toxina se transloque em quantidades apreciáveis em direção às raízes e possa assim causar injúrias aos tecidos sensíveis do cavalo. No caso de enxertos com

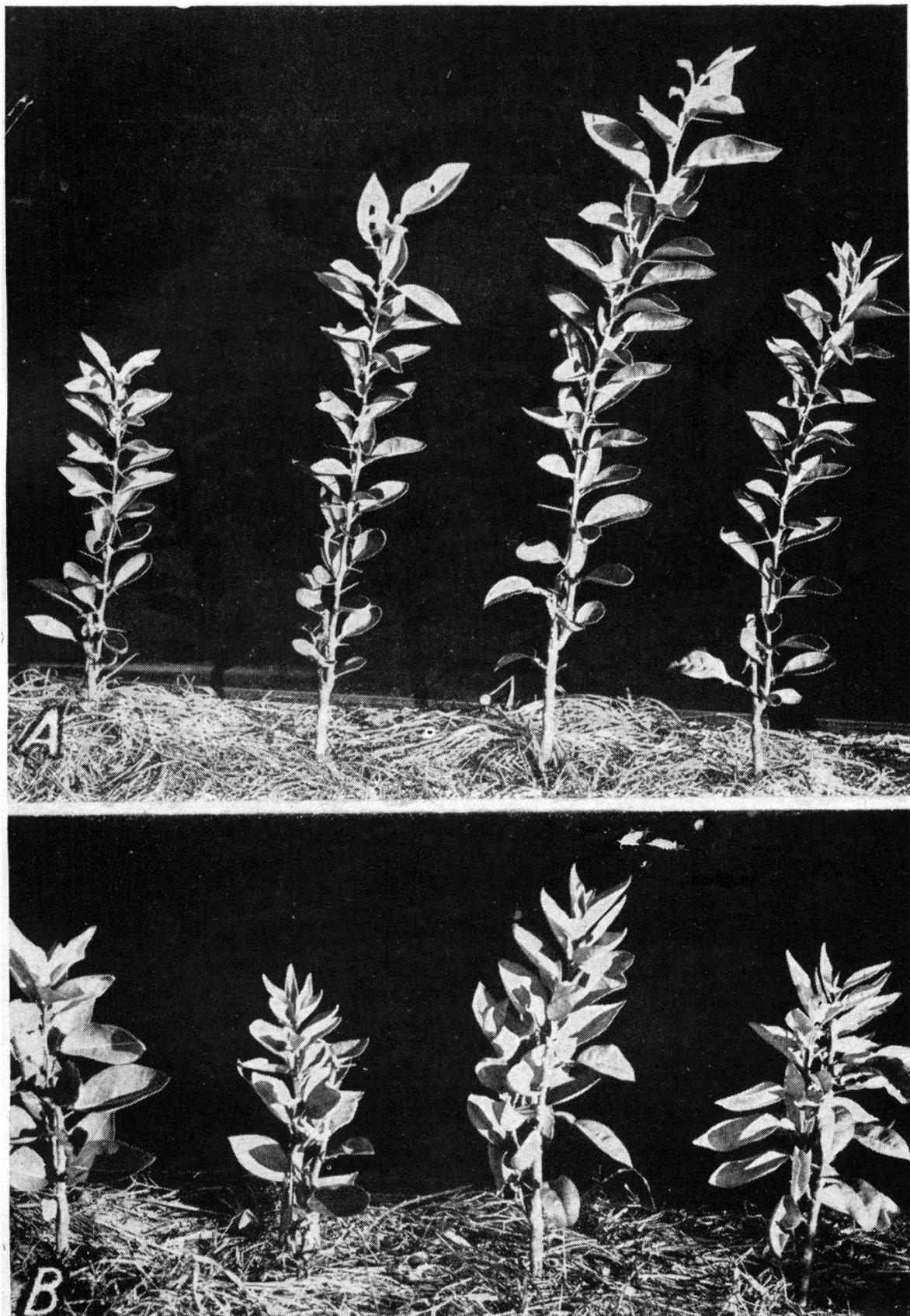
QUADRO 4.—Comprimento do enxerto proveniente de borbulhas sadias e portadoras de tipos de *Citrus* com tecidos tolerantes e não tolerantes, enxertadas sobre cavalos tolerantes e não tolerantes, aos 2 e 5 meses após enxertia

Tecidos do enxerto	Estado da borbulha	Comprimento do enxerto nas épocas indicadas após enxertia, sobre cavalo			
		tolerante		não tolerante	
		2 meses	5 meses	2 meses	5 meses
		<i>cm</i>	<i>cm</i>	<i>cm</i>	<i>cm</i>
TOLERANTES :					
Caipira (clone).....	Sadia	18	38
	Portadora	14	14
Barão A.....	Sadia	23	50	30	48
Barão B (clone).....	Portadora	16	30	17	17
NÃO TOLERANTES :					
"Grapefruits".....	Sadia	23	59
	Portadora	11	12
Tângelos.....	Sadia	30	51
	Portadora	5	7
Limões.....	Sadia	40	63
	Portadora	6	8
Limas.....	Sadia	46	70
	Portadora	8	20

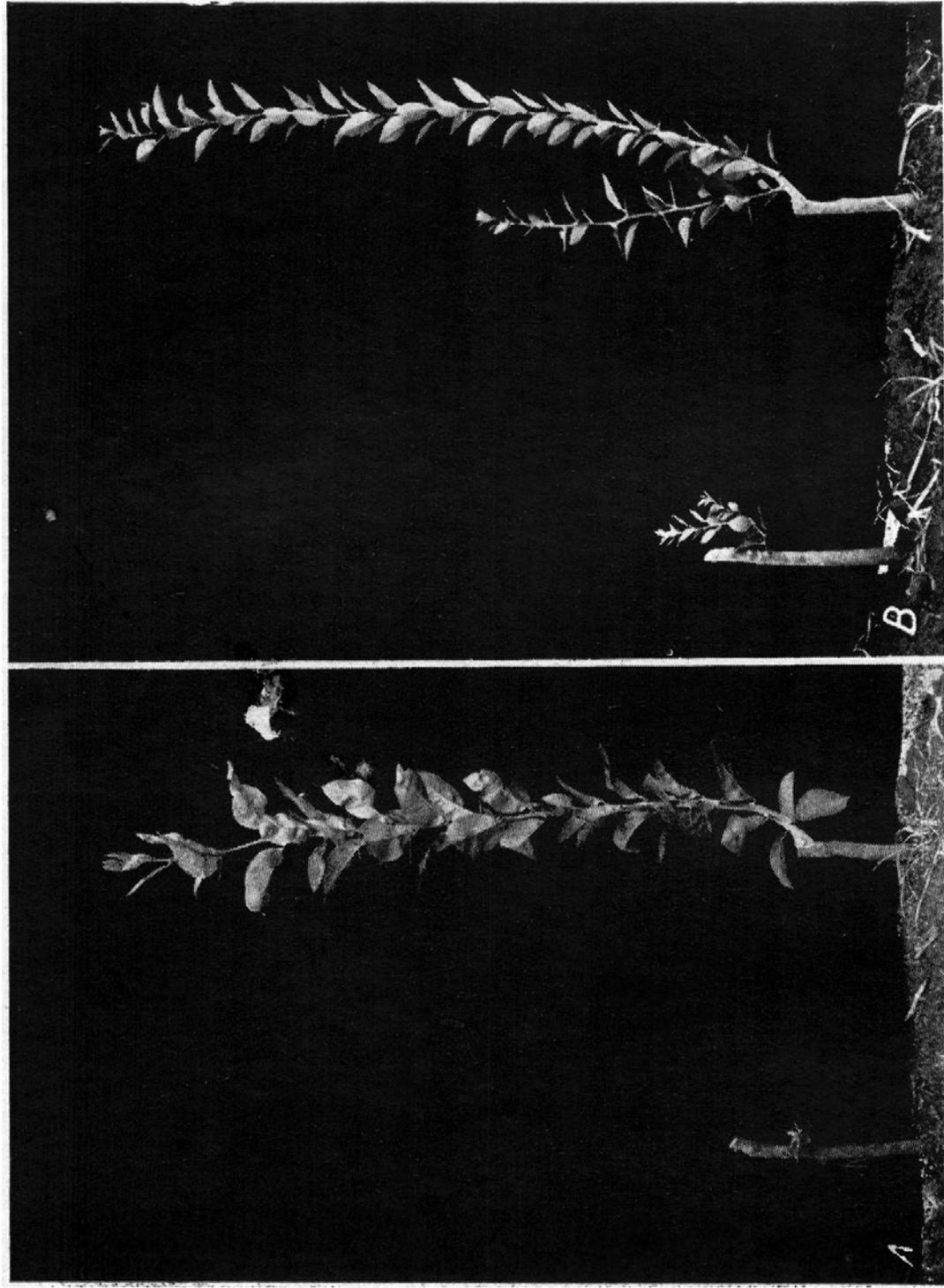
tipos nos quais o vírus se multiplica, mas que também possui tecidos sensíveis, embora a direção de translocação no início seja ascendente, a presença do vírus nos tecidos sensíveis provavelmente induz degenerescência do floema e injúria a outros tecidos, logo de início, com os resultantes distúrbios na translocação e desenvolvimento do brôto. Disto resulta o imediato aparecimento dos sintomas da moléstia.

Explicação semelhante poderia ser dada para o aparecimento de fluxos de crescimento, aparentemente sadios a princípio, em plantas bastante afetadas pela tristeza. É de se julgar que o crescimento mantém-se aparentemente sadio apenas durante a fase em que a translocação se faz principalmente em direção ao brôto, à custa das reservas da planta. Assim que os brotos principiam a enviar assimilados em direção às raízes, há degenerescência do floema ou de outros tecidos do cavalo correspondentes ao novo brôto, com o conseqüente aparecimento de sintomas nestes.

De grande importância prática é o conhecimento do comportamento de borbulhas portadoras e sadias sobre os cavalos tolerantes. A maioria das observações feitas parece indicar que os enxertos feitos com borbulhas



Brotos de laranja Barão enxertados sôbre laranja azêda e fotografados cinco meses após enxertia. A — Brotos sadios provenientes de borbulhas sadias, retiradas de mudinhas obtidas de semente. B — Brotos provenientes de borbulhas portadoras do vírus, principiando a mostrar os sintomas de tristeza, embora o fluxo de crescimento inicial tivesse aparência sadia.



Brotos provenientes de borbulha portadora (esquerda) e de borbulha sadia, cinco meses após enxertia. A — Limão "Des Quatre Saisons"; B — Lima Kirk.

portadoras de vírus, em cavalos tolerantes, se desenvolvem normalmente, a não ser quando as borbulhas pertencem a tipos cujos tecidos são sensíveis, caso êste em que os enxertos poderão mostrar sintomas. Por outro lado, é possível que algumas combinações de enxertia, em que a árvore foi formada com borbulha livre de vírus, possam mostrar-se tolerantes à moléstia, ao passo que a mesma combinação pode mostrar-se parcialmente intolerante se a enxertia fôr feita com borbulha portadora. Esta tendência parece estar sendo observada com o limão rugoso nacional e com a lima da Pérsia. Experiências minuciosas a êsse respeito estão em andamento, e permitirão uma melhor elucidação dêstes problemas.

7—DISTRIBUIÇÃO DO VÍRUS NA PLANTA

Um dos pontos fundamentais ainda para ser determinado definitivamente em relação à tristeza, é saber-se se o vírus causador da moléstia é vírus do parênquima ou do floema. Em experiências preliminares de anelagem, visando estabelecer isto, obtiveram-se resultados que parecem indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Plantas da variedade Barão (doce), sôbre cavalos de azêda, foram preparadas de tal forma que possuíssem dois galhos principais apenas. De um dos galhos de cada planta retirou-se então um anel da casca, de mais ou menos 2 cm de largura, eliminando-se assim tôda a conexão do floema entre a parte superior do galho e o restante da planta, permanecendo apenas as ligações vasculares do xilema e de parênquima. Posteriormente, inocularam-se sômente os galhos anelados destas plantas, a fim de verificar-se se o vírus da tristeza era capaz de atravessar a região do anel. De cinco plantas preparadas da maneira indicada, três foram prejudicadas por forte vento que quebrou o galho anelado. As duas plantas restantes permaneceram em boas condições e, 16 meses após a inoculação, foram testadas para presença de vírus.

Nos dois casos verificou-se que o vírus estava presente no galho inoculado e anelado, ao passo que o restante da planta não possuía vírus algum. Isto indica que o vírus não foi capaz de mover-se através dos tecidos da parte anelada em um período de 16 meses, e, embora não seja evidência conclusiva, parece indicar que o vírus da tristeza é vírus do floema.

Em outros testes tentou-se também determinar se o vírus da tristeza está presente em tecidos de parênquima, efetuando-se enxertia de aproximação de garfos de laranja doce afetada pela moléstia em plantas-teste de doce sôbre azêda, tendo-se o cuidado de retirar a casca do garfo na região do enxerto. Desta maneira, caso houvesse passagem do vírus do garfo para a planta-teste, esta ter-se-ia dado em virtude da presença do vírus em tecidos de parênquima ou xilema do garfo, visto que êstes eram os únicos tipos de tecido em contacto com a planta-teste. Não foi, entretanto, possível obter pegamento dêstes enxertos.

Em outros ensaios, procurou-se verificar se o vírus da tristeza poderia ser transmitido, introduzindo-se, sob a casca de plantas-teste de doce sôbre azêda, pedaços de tecidos do lenho de plantas afetadas. Caso houvesse

transmissão, poder-se-ia afirmar que o vírus era provavelmente um vírus de parênquima. Nenhum caso positivo de transmissão foi obtido nestas experiências, mas o resultado negativo neste caso tem pouco valor, pois pode ser devido à falta de união orgânica entre o tecido introduzido e os tecidos da planta-teste.

7.1—PRESENÇA DO VÍRUS NAS GEMAS DE PLANTAS AFETADAS

A enxertia de várias centenas de gemas obtidas de plantas adultas da variedade Barão, portadoras do vírus da tristeza há vários anos, tem demonstrado que o vírus está presente em tôdas as gemas da planta retiradas de galhos de cerca de um ano. Por outro lado, enxertias feitas com borbulhas de plantas infectadas em tempo relativamente recente, mostrou que nem tôdas as gemas da planta encerram o vírus. Êste fato foi observado em maior escala para gemas retiradas de plantas afetadas de "grapefruit" Duncan e de laranja azêda e, em menor número de casos, para plantas de tangerina Dancy e laranja Valência.

Duas explicações parecem mais prováveis para estas observações: a) Em plantas infectadas em época relativamente recente, a distribuição do vírus na planta não é total e as gemas que já se achavam maduras antes da infecção podem deixar de ser invadidas pelo vírus. Já as gemas formadas em galhos desenvolvidos após infecção contêm, tôdas, o vírus. b) Como o fato foi observado principalmente para "grapefruit" e laranja azêda, é possível que as plantas cujos tecidos não são tolerantes apresentem certo obstáculo à invasão pelo vírus, e que êste não seja totalmente sistêmico na planta. Experiências mais minuciosas estão em andamento, a fim de esclarecer êstes pontos.

SUMMARY

The writers review previous concepts concerning the reaction of citrus plants to the tristeza disease. It is recognized that environmental factors such as temperature, humidity and light can influence plant reaction, but these are considered of relatively minor importance. Characteristics of the plant itself govern its reaction to the disease and among those, resistance to infection, ability to permit virus increase and tolerance or non-tolerance of tissues are considered most important.

Tests using viruliferous oriental citrus aphids for inoculation of various citrus types budded over sour orange rootstocks (table 1 and 2) showed a correlation between susceptibility to infection and severity of symptoms. The sweet oranges proved to be the most susceptible to infection and showed severe disease symptoms. The Barão sweet orange appeared to be more susceptible than Valencia. The mandarins tended to show some resistance to infection, but when infected, severe symptoms developed. The tolerant tangelos (7) behaved similarly to sweet oranges: They were very susceptible to infection and showed severe symptoms. The non-tolerant tangelos, susceptible citranges (7) and grapefruits behaved more or less alike, and showed medium susceptibility to infection and moderately severe disease symptoms. Among the grapefruits, Leonardy was observed to be relatively more susceptible and showed more severe symptoms than Duncan. The pummelos, shaddockes and sour oranges were comparatively very resistant to infection and showed only moderate symptoms when infected. It has been found that the sour oranges can be more easily infected by tissue union than by the aphid vector. *Poncirus trifoliata*, citrumelos and resistant citranges showed no symptoms and no virus could be recovered from the inoculated plants even after three inoculations.

The nature of injury caused by tristeza in the non-tolerant graft and intergraft combinations is discussed. The observation of symptoms shown by plants consisting of a sour orange inter-stem-graft between sweet orange roots and foliage seems to indicate that phloem collapse of the sour intergraft does not entirely prevent food translocation, since under field conditions the sweet stem below the sour intergraft continued, for almost two years, to increase in size at about the same rate as the sweet stem above. The growth of the sour intergraft was observed to be constricted and its lack of developments indicates a possible injurious effect of the disease on tissues other than the phloem.

Root tissues of sour oranges have been found to be sensitive to injury, since sweet orange tops grafted directly onto sour orange roots and subsequently inoculated showed the usual tristeza symptoms. Death of rootlets and roots was found to occur not only in infected plants with tolerant tops and non-tolerant rootstocks but also on infected tolerant plants having an inter-stem-graft of non-tolerant sour orange. These observations and those made of root reaction on mechanically ringed plants indicate that although the root tissues of non-tolerant stocks may be sensitive to injury the rootlet and root symptoms are mostly secondary reactions.

Tests carried out showed that the tristeza virus was recovered from insect protected sprouts grown at the ends of severed roots of Caipira sweet orange stock thus indicating that the virus was definitely present in the roots of a tolerant rootstock.

Previously tristeza has been recognized as being associated with various citrus stock-scion combinations. In the present paper 50 seedling types have been reported as showing tristeza symptoms following heavy aphid inoculation. The symptoms shown by infected seedlings are similar to those shown by non-tolerant stock-scion combinations. Small sweet orange seedlings have been observed to show some symptoms of tristeza following heavy inoculations, but citrus types possessing tolerant tissues have shown a tendency toward recovery from symptom expression.

The writers, on the basis of observed plant responses, have discussed the mode of inheritance of the main characteristics involved in plant reaction to tristeza. Some seedling progenies of known crosses between *Poncirus trifoliata* and sweet oranges (citranges) have been found to permit virus increase as the sweet orange parent does, whereas others behave like *P. trifoliata* and apparently do not permit virus multiplication. No relationship has been found between the trifoliata leaf-shape and inability to permit virus increase, since some of the hybrids that possess the trifoliata leaves, permit virus multiplication. Backcrosses of citranges to sweet oranges show a tendency to behave like the sweet orange parent. Hybrids between *P. trifoliata* and grapefruits (citrumelos) have behaved in most cases as the parent *P. trifoliata*. This seems to indicate that tolerant tissues and inability to permit virus increase are dependent on dominant factors in this type of cross. Hybrids between *Citrus reticulata* and *C. paradisi* (tangelos) do not show a clear-cut type of inheritance. Some tangelos behave like the mandarin parent, possessing tolerant tissues; others behave like the grapefruit parent indicating possession of non-tolerant tissues. The inability to permit virus increase is a characteristic of little value in a rootstock improvement since tops of most commercial citrus varieties permit virus multiplication. It is pointed out that improvement of citrus rootstock with respect to tristeza should be aimed at combining tolerant tissues such as found in *P. trifoliata* or hybrids, *C. sinensis*, *C. reticulata*, etc., with other favorable characters such as vigor, resistance to gummosis, etc.

Field tests showed that the reaction of infective buds on different rootstocks varies not only according to the tolerance or non-tolerance of the rootstock tissues, but also according to whether the buds themselves belong to types that possess non-tolerant or tolerant tissues. Infective buds of tolerant types, as sweet oranges, when budded on non-tolerant stocks produce a first flush of growth that is apparently healthy, but which later shows disease symptoms. For a period of about two months from date of budding, there is little or no difference between sprouts from healthy or infective buds of tolerant types. In contrast, when infective buds of non-tolerant types are budded on non-tolerant stocks, disease symptoms appear practically as soon as the buds start to grow. Observations indicate that infective buds from tolerant citrus types when budded on tolerant stocks usually do not develop symptoms even though the plant is a carrier of the virus. On the other hand observations indicate that infective buds of non-tolerant citrus types

when budded on tolerant stocks may at times produce some symptoms. A possible explanation for the above-mentioned reactions is presented and is based on the relation between virus movement and food translocation in the plant.

In the study of the relationship of tristeza virus to host tissues, plants composed of a sweet top over sour orange rootstock were allowed to develop two sweet orange branches. One branch of each plant was then ringed and inoculated by the vector. The branch not inoculated did not develop symptoms and 16 months after inoculation, buds were taken from the inoculated and the non-inoculated branches and tested for presence of virus. All buds taken from the inoculated ringed branches were found to be carrying the virus, whereas the buds taken from the other branch of the same plant did not have any virus. This experiment shows that the tristeza virus was not able to move across the ringed portion of the stem during that period, thus indicating that the tristeza virus is probably a phloem virus.

Results from extensive buddings of various citrus stocks in the field indicate that buds taken from old sweet orange plants that have been known to be infected for a long time have been found to carry the virus in all buds. On the other hand, tests with buds taken from young plants recently infected, of Duncan grapefruit, sour orange and in some cases of Dancy tangerine and Valencia sweet orange, showed that not all buds were carrying the virus. It is not yet known whether buds that are mature prior to infection may temporarily escape virus invasion or whether citrus types which have non-tolerant tissues may limit to a certain extent complete systemic invasion of the tristeza virus.

LITERATURA CITADA

1. **Bennett, C. W.** Correlation Between Movement of the Curly Top Virus and Translocation of Food in Tobacco and Sugarbeet. *Jour. Agr. Res.* **54** : 479-502. 1937.
2. **Bennett, C. W.** Relation of Food Translocation to Movement of Virus of Tobacco Mosaic. *Jour. Agr. Res.* **60** : 361-390. 1940.
3. **Bennett, C. W. e A. S. Costa.** A Preliminary Report of Work at Campinas, Brazil, on Tristeza Disease of Citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1947). **60** : 11-16. 1948.
4. **Bennett, C. W. e A. S. Costa.** Tristeza Disease of Citrus. *Jour. Agr. Res.* **78** : 207-237. 1949.
5. **Bitancourt, A. A.** Um Teste para Identificação Precoce da Tristeza dos Citrus. *O Biológico* **10** : 169-175. 1944.
6. **Camp, A. F.** The Tristeza Disease of Citrus in Argentina. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1948). **61** : 15-19. 1949.
7. **Grant, T. J. e A. S. Costa.** A Progress Report on Studies of Tristeza Disease of Citrus in Brazil. 1. Behavior of 2 Number of Varieties as Stocks for Sweet Orange and Grapefruit, and as Scions over Sour Orange Rootstock, when Inoculated with the Tristeza Virus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* (1948). **61** : 20-33. 1949.
8. **Marloth, R. H.** The Citrus Rootstock Problem : Citrus Tree Propagation. *Farming in South Africa* **13** : 226-231. 1938.
9. **Oberholzer, P. C. J.** Bitter-Seville Rootstock Problem. *Farming in South Africa* **22** : 489-495. 1947.
10. **Schneider, H.** A Progress Report on Quick Decline Studies : Histological Studies (Part III). *Calif. Citrog.* **31** : 198-199. 1946.
11. **Schneider, H., A. A. Bitancourt e V. Rossetti.** Similarities in the Pathological Anatomy of Quick-Delcline-and Tristeza-Diseased Orange Trees. (Abstract) *Phytopathology* **37** : 845-846. 1947.
12. **Schults, E. S., C. F. Clark e F. J. Stevenson.** Resistance of Potato to Viruses A & X, Components of Mild Mosaic, *Phytopathology* **30** : 944-951. 1940.
13. **Toxopeus, H. J.** Stock-Scion Incompatibility in Citrus and Its Cause. *Jour. Pomol. and Hort. Sci.* **14** : 360-364. 1937.