

TENTATIVAS DE PREMUNIZAÇÃO PARA O CONTROLE DO
MOSAICO DO MAMOEIRO

JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

Orientador: Dr. Álvaro Santos Costa

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia – Área de concentração:
Fitopatologia

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Setembro, 1985

Aos meus pais,
Marisa e nossos filhos Adriana e Gustavo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor deseja expressar seus agradecimentos às pessoas e instituições que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado:

- Ao Dr. Álvaro Santos Costa, pela valiosa orientação, discussões, sugestões e críticas estimulantes durante o desenvolvimento do trabalho e também, pela revisão dos originais;
- Ao Dr. Gerd Walter Müller, pelo estímulo, apoio e facilidades concedidas para que os estudos de pós-graduação e trabalhos de pesquisa, que originaram a presente dissertação, fossem desenvolvidos de modo satisfatório, sem detrimento das demais atividades de pesquisa que o autor desenvolve na Seção de Virologia Fitotécnica do Instituto Agrônomo de Campinas;
- Aos colegas da Seção de Virologia Fitotécnica, pelo estímulo na elaboração desta dissertação;
- Aos funcionários da Seção de Virologia Fitotécnica que, de uma maneira ou outra, contribuíram na elaboração desta dissertação; agradecimento especial à Sra. Maria do Carmo Sarubi da Costa pelos serviços de datilografia;
- Ao Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, pela oportunidade de aperfeiçoamento;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq, Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, pelo apoio financeiro concedido que contribuiu de forma decisiva para a realização desta dissertação;
- A Marisa Brolio Marques Rezende meus sinceros agradecimentos pelo entusiasmo e cooperação.

ÍNDICE

	Página
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DA LITERATURA	8
4.1. Generalidades sobre o mosaico do mamoeiro.....	8
4.2. Uso da proteção entre vírus no controle de fitoviruses.....	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1. Preparo de plantas-teste de mamoeiro.....	17
5.1.1. Para os testes em casa de vegetação.....	17
5.1.2. Para os testes de campo	18
5.2. Técnicas utilizadas para inoculação	18
5.2.1. Inoculação mecânica	18
5.2.2. Inoculação com afídeos vetores	19
5.2.3. Superinoculação com o VMM	19
5.3. Testes de recuperação	20
5.4. Avaliação da reação de mosaico nas plantas-teste de mamoeiro	20
5.5. Tentativas de controle do mosaico por premunização com isolados fracos do vírus	21
5.5.1. Procura de isolados fracos em pomares severamente afetados pelo mosaico	21
5.5.2. Procura de isolados fracos a partir de inóculo selecionado	22
5.6. Tentativas de controle do mosaico por premunização com outros potyvirus	24
5.6.1. Escolha dos potyvirus	24
5.6.2. Tentativas de estabelecimento dos potyvirus..	24

	Página
5.7. Teste do valor protetivo dos isolados fracos	25
5.7.1. Em casa de vegetação	25
5.7.2. Em plantas expostas no campo	25
5.7.2.1. Escolha do local	25
5.7.2.2. Ensaio no município de Taiapu	26
5.7.2.3. Ensaio no município de Monte Alto ...	26
6. RESULTADOS	28
6.1. Obtenção de isolados fracos em pomares severamente afetados pelo mosaico	28
6.1.1. Relação de pomares visitados	28
6.1.2. Estudo da reação dos isolados coletados	28
6.2. Obtenção de isolados fracos a partir de inóculo sele- cionado.....	34
6.2.1. De "bolhas" das folhas com mosaico	34
6.2.2. De "lesões locais" em folhas de mamoeiro Solo.	36
6.2.3. De discos das folhas com mosaico	36
6.3. Teste do valor protetivo de isolados fracos em condi- ções de casa de vegetação	41
6.4. Avaliações do comportamento de plantas premunizadas em testes de exposição no campo	41
6.4.1. Ensaio no município de Taiapu	45
6.4.2. Ensaio no município de Monte Alto	45
6.5. Teste de premunização com outros potyvirus	49
7. DISCUSSÃO	51
8. CONCLUSÕES	57
9. LITERATURA CITADA	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	"Bolhas" em folha de mamoeiro com mosaico	23
2	"Lesões locais" do VMM em folha de mamoeiro Solo	23
3	Planta sadia de mamoeiro Formosa (A), premunizadas com um derivado do isolado fraco Monções (B), premunizadas e superinoculadas com afídeos virulíferos (C) e sadias inoculadas com afídeos usados na superinoculação (D)..	44
4	Mamoeiro Baiano premunizado com o isolado fraco Aparecida D'Oeste 5A (A) e infetado naturalmente pelo complexo normal (B), após 8 meses de exposição no campo em Taiacu, SP	47

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página	
1	Número de isolados do VMM coletados em pomares de mamoeiro visitados e inspecionados em diferentes localidades do Estado de São Paulo	29
2	Reação de mamoeiros Comum e Solo inoculados com isolados coletados em campo	31
3	Inoculações com preparações de discos retirados de "bolhas" e de áreas ao redor das mesmas (controle) em mamoeiros Solo	35
4	Inoculações com preparações de "lesões locais" de folhas de mamoeiro Solo em plantas da mesma variedade	37
5	Inoculação de mamoeiros com isolados de discos de folhas retirados de regiões sem sintomas evidentes de mosaico (área verde normal)	38
6	Reação de mamoeiros Solo inoculados com discos de folhas e que foram transplantados para o campo ...	40
7	Reação de mamoeiros Comum, IAC-98 e Solo no teste de proteção com o isolado fraco Aparecida D'Oeste.	42
8	Reação de mamoeiros Formosa e Solo no teste de proteção com o derivado do isolado fraco Monções	43
9	Testes de exposição em campo de mamoeiros Baiano premunizados e não premunizados (controles) realizado em Taiacu	46
10	Teste de exposição em campo de mamoeiros Formosa premunizados e não premunizados (controles) realizado em Monte Alto	48

Tabela	Página
11 Reação induzida pelos diferentes potyvirus testados em mamoeiros	50

TENTATIVAS DE PREMUNIZAÇÃO PARA O CONTROLE DO MOSAICO
DO MAMOEIRO

Autor: Jorge Alberto Marques Rezende

Orientador: A. S. Costa

1. RESUMO

Entre as diferentes maneiras de se obter o controle em convivência do mosaico do mamoeiro ("papaya ringspot"), a de premunização vem recebendo especial atenção na Seção de Virologia do Instituto Agrônômico de Campinas, São Paulo.

Isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro (VMM) foram localizados em plantas de mamoeiro com desenvolvimento destacado de pomares severamente afetados, obtidos a partir de "bolhas" de folhas com mosaico, de "lesões locais" e de discos de áreas selecionadas de folhas com mosaico.

Os isolados fracos obtidos mostraram geralmente efeito protetivo adequado em testes de exposição em campo e nos realizados em casa de vegetação por superinoculação mecânica e por meio de vetores.

Em testes de exposição em campo realizados em Taiacu e Monte Alto, as plantas premunizadas mostraram uma intensificação na severidade dos sintomas, 6 - 8 meses após a premunização, ocorrendo

essas alterações de maneira sincronizada, ou seja, em grande número de indivíduos simultaneamente. Essas mudanças nos sintomas não foram interpretadas como quebra de proteção mas sim devido a alterações dos isolados fracos nas plantas (aparecimento de mutantes mais severos e competitivos) que podem ser auxiliadas por queda de temperatura.

Êxito na premunização como medida de controle do mosaico do mamoeiro está dependente de obtenção de isolados fracos estáveis que não sofram alterações durante o período de vida útil (econômica) da cultura.

ATTEMPTS TO CONTROL PAPAYA RINGSPOT BY PREIMMUNIZATION

Author: Jorge Alberto Marques Rezende

Adviser: A. S. Costa

2. SUMMARY

Among the various options that may eventually permit papaya ringspot control under the conditions of heavy inoculum pressure as those existing in São Paulo, special attention is being given to preimmunization at the Virus Department, Instituto Agrônômico.

Mild isolates of papaya ringspot virus were obtained from papaya plants with good growth in orchards severely affected, from green blisters of leaves with mosaic, from "local lesions" on Solo papaya leaves, and from disks of selected leaf areas with mosaic.

The selected mild isolates afforded satisfactory protection in test carried out under greenhouse and field conditions where preimmunized plants were challenge-inoculated mechanically or by means of viruliferous aphids.

In field tests carried out at Taiacu and Monte Alto, State of São Paulo, the preimmunized papaya plants showed an intensification in the severity of the symptoms 6 - 8 months after the

preimmunization. These changes occurred in a synchronized manner for many plants in the same virus-variety combinations. They were not interpreted as a break in protection, but to changes of the mild isolates present in the plants (development of mutants more severe and competitive) that could be helped by lower temperatures.

Success on preimmunization as a method of controlling papaya ringspot in São Paulo is dependent on finding stable mild isolates that will remain unchanged during the growth and commercial bearing period of the crop.

3. INTRODUÇÃO

O vírus causador do mosaico do mamoeiro (*Carica papaya* L.), conhecido na língua inglesa por "papaya ringspot virus", tem assumido um papel importante em todos os países onde ocorre por ser um fator limitante da produção dessa frutífera.

No Brasil, foi reconhecida a ocorrência do mosaico do mamoeiro no final da década de 60, primeiramente na região de Monte Alto, Estado de São Paulo e anos mais tarde nos estados do Ceará, Paraná e Pernambuco. Em viagem feita pelo autor em 1984, a presença do mosaico foi verificada no Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, podendo com o tempo vir a ocorrer em todas as áreas produtoras do país.

Em São Paulo, após o aparecimento e disseminação do mosaico, a cultura do mamoeiro desapareceu da região de Monte Alto, que era a principal produtora de mamão do estado. Esse desaparecimento ocorreu porque os agricultores, com o objetivo de escapar do problema, abandonaram aquelas áreas à procura de novas regiões onde o vírus não tinha sido constatado. Nestas, inicialmente a cultura tinha produção satisfatória, porém o vírus não demorava a chegar, obrigando os agricultores a novas mudanças. Atualmente é conhecida a característica endêmica dessa virose em todas as regiões de São Paulo, além de ser comum a ocorrência de plantas infetadas em pequenos pomares de chácaras, fundo de quintais etc. Esse último aspecto faz com que haja fontes constantes de vírus espalhadas por todo o estado, o que torna

inexequível qualquer tentativa de erradicação da moléstia.

Devido a essa característica endêmica do mosaico, Costa *et al.* (1978) apontaram que as investigações de medidas de controle deveriam ser desenvolvidas de modo que pudessem funcionar em convivência com a presença do patógeno. A procura de métodos de controle em convivência, vem sendo considerada há anos em diversos países, principalmente através da obtenção de variedades resistentes, tanto dentro da espécie cultivada *C. papaya*, como através de tentativas de transferência para esta, de fatores de imunidade encontrados em espécies selvagens do mesmo gênero. Os resultados alcançados nessas linhas de abordagem do problema, todavia, não têm sido animadores. No primeiro caso, porque os níveis de resistência encontrados dentro da espécie cultivada não têm sido satisfatórios como método de controle, enquanto que no segundo, as tentativas de cruzamento têm falhado devido à existência de barreiras genéticas. Por outro lado, a existência de alto nível de tolerância ao mosaico, encontrado em progênies da variedade IAC-98, oferece várias possibilidades para o controle da moléstia (Rezende *et al.*, 1985).

A procura de solução para o problema através do controle químico dos afídeos vetores, também já foi avaliada, porém não tem sido promissora devido ao grande número de espécies envolvidas na transmissão e por ser o vírus de relação do tipo não persistente com os mesmos.

A erradicação sistemática de plantas infetadas, associada com o isolamento parcial do pomar, vem sendo considerada por diversos autores, até o momento, como a única forma de controlar o problema preventivamente (Harkness, 1967; Costa *et al.*, 1978; Martinez, 1980). Por razões desconhecidas esse método não parece ter sido utilizado em plantios comerciais em São Paulo, embora se tenha notícias do seu uso em pomares do Hawaii, USA (Namba e Higa, 1977) e no Estado do Espírito Santo.

Diante da necessidade constante de se procurar uma solução para o problema dessa virose, de sorte que o cultivo dessa frutífera possa ser mais uma opção economicamente rentável para os agricul-

tores, a Seção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas, vem desenvolvendo investigações sobre métodos de controle, através de diferentes abordagens, tais como: (a) procura de variedades resistentes, com resistência de campo ou tolerância ao patógeno; (b) procura de características morfológicas naturais ou induzidas, em plantas de mamoeiro, que promovam uma alteração na relação vírus-vetor-planta, quer seja no processo de aquisição como no de transmissão do patógeno; (c) procura de isolados do vírus, de valor protetivo e que possam ser utilizados no controle por premunização. Esses isolados deverão ter também estabilidade durante sucessivas repicagens e efeito negligível sobre o desenvolvimento das plantas, produção e manchamento dos frutos; (d) procura de outros vírus, especialmente aqueles do mesmo grupo do mosaico do mamoeiro (potyvirus), capazes de infetar plantas de mamoeiro, causar sintomas fracos e ter efeito protetivo contra o vírus do mosaico do mamoeiro (VMM). Os resultados obtidos nas investigações conduzidas nessas duas últimas linhas de abordagem do problema, com ênfase no item (c), serão apresentados nesta dissertação.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Generalidades sobre o mosaico do mamoeiro

O mosaico do mamoeiro ("papaya ringspot") parece ter sido constatado pela primeira vez em plantas dessa frutífera na Jamaica em 1928 (Smith, 1929). Nos anos subsequentes essa moléstia foi encontrada em plantas de mamoeiro de outros países como República Dominicana (Ciferri, 1930), Trinidad (Baker, 1938), Hawaii (Parris, 1938), Cuba (Acuña e Zayas, 1940), Porto Rico (Adsuar, 1947a), Índia (Capoor e Varma, 1948), Venezuela (Pontis Videla, 1953), Florida (Conover, 1964a), Colômbia (Torres e Giacometti, 1966), alguns estados do Brasil (Costa *et al.*, 1969; Lima e Gomes, 1975; Almeida e Carvalho, 1978; Páguio e Barbosa, 1979), Taiwan (Wang *et al.*, 1978), Nigéria (Lana, 1980).

No Brasil, embora haja referências bastante antigas sobre o aparecimento do mosaico do mamoeiro em São Paulo (Bitancourt, 1935; Gonçalves-Silva, 1941), na verdade a sua ocorrência se deu anos mais tarde na década dos sessenta (Costa *et al.*, 1969), sendo aquelas primeiras menções referentes aos danos causados por uma espécie de ácaro, conforme foi relatado por Costa (1941) e que hoje sabe-se ser o ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* Banks (Costa *et al.*, 1969). A denominação de mosaico erroneamente atribuída aos ataques do ácaro branco no passado provocaram incorreções na literatura (Jensen, 1949a; Herold e Weibel, 1962).

O nome dessa virose tem trazido algumas confusões na literatura, visto que ela é conhecida por "papaya mosaic" ou "papaya ringspot" em inglês, "deformación foliar y manchas en anillos" ou "mancha anular de la papaya" em castelhano, mosaico ou mancha anelar do mamoeiro em português, conforme já foi discutido por Rezende (1984).

Em todos os países onde ocorre, o mosaico do mamoeiro vem sendo considerado um fator limitante para a produção dessa frutífera (Jensen, 1949a; Torres e Giacometti, 1966; Harkness, 1967; Costa *et al.*, 1969; Luque e Martínez López, 1976; Conover, 1976), além de provocar o aparecimento de manchas nos frutos que depreciam sua qualidade junto ao consumidor (Costa *et al.*, 1969).

Avaliação quantitativa das perdas causadas pelo mosaico do mamoeiro, tanto no desenvolvimento como na produção das plantas afetadas, foi feita por Hendrix (1948) no Hawaii. O autor verificou que plantas de mamoeiro com 20 meses de idade apresentaram uma redução de 7,9% e 29,5% no desenvolvimento e produção, respectivamente, quando foram previamente inoculadas na idade de 4 meses. Quando a inoculação se processou em plantas com 7 meses, as reduções foram de 3,4% no desenvolvimento e 3,1% na produção. Jensen (1949a), também no Hawaii, concluiu diferentemente daquele autor, ao afirmar que plantios comerciais de mamoeiro ficavam totalmente inaproveitáveis depois de um ou dois anos da infecção das plantas pelo vírus.

No Brasil, Barbosa e Paguio (1982b) avaliaram o efeito dessa moléstia sobre a produção em Pernambuco. Os resultados apontaram uma redução de 72,1% na produção por planta, 61,5% no número de frutos por planta e 25% no peso médio dos frutos por planta, no experimento conduzido na região de Condado. Em Aliança essas perdas foram avaliadas em 68; 59,1; 19,4%, respectivamente.

Em São Paulo há evidências de que as perdas são bastantes superiores às encontradas no Hawaii e semelhantes ou até superiores às de Pernambuco. Todos aqueles que escreveram sobre o mosaico em São Paulo, sempre deram grande ênfase ao fato de ele ser limitante para a produção do mamoeiro. Além disso, sempre apontaram o desaparecimento da cultura da região de Monte Alto e posteriormente de outras

áreas onde se procurou estabelecer a mesma, confirmando o caráter destruidor da virose.

Além da espécie cultivada *C. papaya*, o VMM já foi transmitido experimentalmente para outras espécies do mesmo gênero como *C. goudotiana* (Tr. et Planch) Solms, *C. horovitziana* Badilo, *C. microcarpa* Jacquin, *C. monoica* Desf., *C. parviflora* (A.DC.) Solms, *C. quercifolia* (St. Hil.) Hieron (Conover, 1964a; Torres e Giacometti, 1966; Horovitz e Jiménez, 1967; Costa e Carvalho, 1971).

Outras hospedeiras do VMM têm sido encontradas em diferentes espécies da família Cucurbitaceae. As seguintes espécies já foram testadas com resultados positivos de infecção sistêmica: *Citrullus vulgaris* Schard., *C. fistulosus* L., *Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naud., *C. sativus* L., *Cucurbita maxima* Duchesne, *C. pepo* L., *C. pepo* var. *medullosa*, *C. pepo* var. *melo pepo*, *C. moschata* Duchesne, *Cyclanthera pedata* Schrad., *Lagenaria vulgaris* Ser., *L. siceraria* Standl., *Luffa acutangula* Roxb., *Melothria guadalupensis* (Spring) Cogn., *M. pendula* L., *Momordica charantia* L., *Trichosanthes anguina* L. (Capoor e Varma, 1948; 1958; Adsuar, 1950; Ishii e Holtzman, 1963; Conover, 1964b; Bokx, 1965; Zettler *et al.*, 1968; Story *et al.*, 1968; Costa *et al.*, 1969; Cook, 1972; Lopez Pinto, 1972; Lima e Gomes, 1975; Luque e Matínez López, 1977; Wang *et al.*, 1978; Chang, 1979; Lana, 1980).

Tentativas feitas por Conover (1964b) e Barbosa e Paguio (1982b) para recuperar esse vírus de diversas espécies de cucurbitáceas que estavam ocorrendo junto ou dentro de pomares de mamoeiro afetados, deram resultados negativos. Resultados positivos, por outro lado, foram obtidos em São Paulo, na recuperação desse vírus de plantas de abóbora que estavam ocorrendo dentro de um pomar de plantas de mamoeiro com mosaico (A.S. Costa, informação pessoal). Costa *et al.* (1969) acreditavam que plantas do grupo das cucurbitáceas poderiam funcionar como fontes de inóculo do VMM em condições de campo.

Como indicadora por manifestação de lesões locais já foram apontadas *Chenopodium amaranticolor* Coste e Reyn e *C. quinoa* Willd. (Cook e Milbrath, 1971; Sureka *et al.*, 1977; Wang *et al.*,

1978; Chang, 1979; Lana, 1980; Lin, 1980; Yeh e Gonsalves, 1984) porê^m esses resultados não têm sido muito consistentes, pois diversos outros investigadores não têm conseguido obter sintomas de lesões locais nas tentativas de inoculação de plantas dessas espécies com o VMM (Bokx, 1965; Story *et al.*, 1968; Cook, 1972; Lopez Pinto, 1972; Lima e Gomes, 1975; Luque e Martínez López, 1977). Em São Paulo, tentativas feitas anos atrás na Seção de Virologia do Instituto Agrônômico, também falharam na obtenção de lesões locais em plantas de *Chenopodium* (A.S. Costa, informação pessoal).

As partículas do VMM caracterizam-se por apresentar comprimento médio de 800 nm, 12 nm de diâmetro e por serem do tipo flexível (Herold e Weibel, 1962; Bokx, 1965; Costa *et al.*, 1969; Lana, 1980). Apresentam as seguintes propriedades físicas: perda da infectividade após 10 min. de exposição às temperaturas de 54-56°C; inativação após 8 horas à temperatura ambiente; ponto final de diluição de 10^{-3} (Adsuar, 1947b; Capoor e Varma, 1948; Ishii e Holtzman, 1963; Conover, 1964b; Wang *et al.*, 1978). Esse vírus é enquadrado no grupo dos potyvirus de acordo com o sistema de classificação em grupos proposto por Harrison *et al.* (1971).

Quanto à transmissão, sabe-se que esse vírus não passa pela semente. No campo, a transmissão natural se dá por meio de afídeos, sendo a relação vírus-vetor do tipo não persistente (Jensen, 1949b; Capoor e Varma, 1958; Bhargava e Khurana, 1970; Namba e Higa, 1975; 1977). Vinte espécies de afídeos já foram testadas experimentalmente e consideradas vetoras desse vírus em outros países. No Brasil, já foram estudadas com resultados positivos de transmissão: *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis gossypii* Glover, *A. fabae* Scop., *A. coreopsidis* (Thos.), *Aphis* sp., *Toxoptera citricidus* Kirk. (Costa *et al.*, 1969; Paguio e Barbosa, 1979; Barbosa e Paguio, 1982a). Experimentalmente esse vírus é facilmente transmitido através da inoculação mecânica (Adsuar, 1947a; Jensen, 1949a; Costa *et al.*, 1969; Lana, 1980), embora esta modalidade de transmissão não tenha significado do ponto de vista epidemiológico da moléstia.

4.2. Uso da proteção entre vírus no controle de fitoviro- ses

A proteção é um fenômeno há bastante tempo conhecido e ocorre quando um isolado do vírus, já estabelecido na hospedeira, impede a posterior infecção por outros isolados do mesmo ou de outro vírus diferentes. Além do nome proteção, esse fenômeno também é conhecido por "cross protection", "cross immunization", "mutual antagonism" (Bennett, 1953) e premunização no Brasil (Costa, 1972).

A natureza do mecanismo envolvido na proteção ou premunização tem sido motivo de estudos e sugestões de diversos investigadores (Thung, 1931; Kunkel, 1934; Bawden, 1943; Kavanau, 1949; Costa, 1972; Shalla e Petersen, 1978; Fulton, 1982), porém nada de definitivo é conhecido até o momento, conforme foi apontado recentemente por Matthews (1981) e Fulton (1982). De acordo com Costa (1972) e Fulton (1982), é possível que parte das dificuldades encontradas nas tentativas de explicação dos mecanismos envolvidos na premunização se devam ao fato de se procurar explicações simples para o que pode ser um conjunto de diferentes reações.

A proteção entre vírus relacionados, ou seja, entre estirpes de um mesmo vírus, é evento comum em viroses de plantas e foi primeiramente relatada por Wingard (1928). Observou o autor que plantas de fumo infetadas pelo "tobacco ringspot virus", que inicialmente mostravam sintomas fortes, depois de algum tempo recuperavam-se completamente, dando idéia de plantas saudáveis. No entanto, as tentativas de recuperação do vírus dessas folhas deram resultados positivos e as mesmas não foram infetadas quando reinoculadas com o mesmo vírus, cujo inóculo foi obtido de folhas de plantas com sintomas.

McKinney (1929) em experimentos com o TMV, verificou que plantas de fumo infetadas pela estirpe que causava "light green mosaic" não mostravam alterações nos sintomas após repetidas inoculações com a estirpe causadora de "yellow mosaic". Observação semelhante foi feita por Thung (1931) em que plantas de fumo, previamente infetadas pelo TMV, não mostraram alterações dos sintomas quando inoculadas com uma estirpe que causava "white mosaic" em plantas inicialmente sadias.

Salaman (1933) determinou que estirpes fracas do vírus X da batata em plantas de fumo ou *Datura* exerciam uma interferência total na posterior infecção pelas estirpes mais severas. Anos mais tarde, Salaman (1937) demonstrou o mesmo efeito entre estirpes fracas e severas do vírus Y da batata.

Kunkel (1934) demonstrou que plantas infetadas pelas estirpes atenuadas do TMV, eram imunes à infecção pelas estirpes comuns e "aucuba".

Costa e Carvalho (1961), no Brasil, verificaram que plantas de fumo inoculadas com uma estirpe super fraca de "tobacco streak virus", não foram infetadas pelas estirpes mais severas e tiveram um desenvolvimento tão bom quanto o das plantas sadias.

Desde a sua constatação, até os dias atuais, a proteção entre vírus de plantas tem sido amplamente empregada principalmente na taxonomia de vírus, para determinar o grau de parentesco entre os vírus ou estirpes que estão sendo estudadas (Matthews, 1981; Fulton, 1982). O seu emprego no controle de algumas fitoviroses, onde plantas previamente infetadas por uma estirpe fraca, ficam protegidas contra a infecção pelas mais severas do complexo, conforme foi sugerido pela primeira vez por Salaman (1937) e Johnson (1937), tem recebido pouca atenção dos fitovirologistas. Apesar de a idéia ser antiga, poucos são os exemplos em que foi seguida consistentemente até o fim com resultados práticos para a agricultura.

Um primeiro caso em que o uso da premunização teve resultados satisfatórios de controle, foi obtido em experimentos com o "swollen shoot" do cacau (*Theobroma cacao* L.) por Posnette e Todd

(1955) na África. Esses investigadores, depois de selecionarem estirpes fracas do vírus a partir de plantas vigorosas encontradas em plantios totalmente arruinados pela moléstia, verificaram experimentalmente que quase todas as plantas com elas inoculadas, ficaram protegidas contra a infecção pelas estirpes mais severas. Esse mesmo efeito protetivo foi verificado em experimentos sob condições de campo. Durante um período de 3 anos, de 416 árvores infetadas com estirpes fracas, somente 35 (8,4%) mostraram sintomas severos, contra 273 (71%) de 387 árvores não premunizadas. Dois anos mais tarde, as porcentagens de árvores mostrando sintomas severos foram de 14 e 76%, respectivamente.

Simmonds (1959) selecionou, a partir de plantas do campo, estirpes fracas do "woodness virus" do maracujá (*Passiflora edulis* Sims.) que protegeram eficientemente as plantas com elas inoculadas, contra a infecção pelas estirpes que causavam sintomas fortes, durante um período de 5 anos. Verificou também que essas estirpes fracas mantiveram-se como tal, ou seja, sem alterações, após sucessivas repicagens durante aquele período de tempo. Entretanto, por razões desconhecidas, tanto este como o programa anterior de Posnette e Todd (1955) parecem não ter tido continuidade.

Resultados consistentes, e possivelmente os únicos exemplos em que o uso da premunização trouxe benefícios para a agricultura, foram os obtidos no controle da tristeza do citrus no Brasil (Müller e Costa, 1968; Müller, 1972; Müller e Costa, 1977) e do mosaico do tomateiro na Holanda (Rast, 1972;1975).

No primeiro caso, Grant e Costa (1951) mostraram a existência de estirpes fracas e fortes do vírus da tristeza do citrus e verificaram que plantas infetadas pelas fracas ficaram protegidas contra o posterior estabelecimento das mais severas. Em 1961, Müller e Costa (1968), aproveitando esse conhecimento, iniciaram um programa de pesquisa para controle da tristeza do citrus no Estado de São Paulo. Após sucessivos anos de investigações os autores selecionaram estirpes fracas em pomares severamente afetados pela moléstia em São Paulo e obtiveram resultados altamente satisfatórios de proteção em plantas de laranja Pêra (*Citrus sinensis* Osb.) e limão Galego (*C. aurantifolia* (Christm.)

Swing), em condições de campo (Müller, 1972; Müller e Costa, 1977). Segundo esses investigadores (Müller e Costa, 1981) o uso da premunização com estirpes fracas, para o controle da tristeza em plantas de laranja Pêra, é praticamente o único caso no mundo onde essa técnica atingiu escala comercial de desenvolvimento, provocando o ressurgimento do cultivo dessa variedade que havia praticamente desaparecido do Estado, devido sua alta suscetibilidade à essa moléstia. Anos atrás (Müller e Costa, 1981) foi estimado em 10.000.000 o número de árvores premunizadas sob forma de plantas crescendo em viveiros, pomares novos e em produção, além do que, cada planta de Pêra premunizada estava produzindo meia caixa a mais do que a Pêra da mesma idade não protegida. O controle da tristeza do citrus por premunização atingiu um significado comercial tão importante para a citricultura em geral que atualmente ela vem sendo aplicada na América do Norte, África do Sul, Japão e Israel (Hamilton, 1979).

Na Holanda, o tomateiro cultivado em casas de vegetação sofre enormes prejuízos causados por uma estirpe do TMV e que causa a moléstia conhecida por mosaico do tomateiro. Rast (1972; 1975) obteve resultados satisfatórios no controle dessa virose através da premunização das plantas com a estirpe fraca do vírus, designada MII-16 e que foi obtida pelo tratamento do complexo normal do vírus com ácido nitroso, que é mutagênico químico. Nesse país, segundo o autor, o uso da técnica de premunização trouxe benefícios para a cultura do tomateiro aumentando a média de produção por metro quadrado de 9,00 Kg em 1971, para 10,80 Kg em 1972 e 11,30 Kg em 1973. Depois do uso da premunização de plantas de tomateiro na Holanda, a estirpe fraca obtida por Rast, e outras posteriormente selecionadas, têm sido usadas no controle dessa virose em cultivos na Inglaterra, França, Dinamarca, Canadá e Japão (Hamilton, 1979). Na Inglaterra, plantas de tomateiro premunizadas pela estirpe fraca MII-16, produziram 5% mais do que plantas não premunizadas, conforme observações de Upstone (1974), citado por Fletcher e Rowe (1975).

Outros exemplos da proteção de plantas através do uso de estirpes fracas, para o controle de fitoviroses, foram obtidos por Marenaud *et al.* (1976) para a mancha clorótica das folhas da macieira e por Tomlison e Shepherd (1978) para o mosaico da couve flor. No entanto, apesar de a proteção ter sido eficiente e de os autores terem levantado a possibilidade de vir a ser utilizada comercialmente, quando necessário, até o momento os resultados estão ainda no campo das experimentações.

O uso da premunização como medida de controle para o mosaico do mamoeiro foi discutido por Costa *et al.* (1978). Mas foi Lin (1980) que, em Taiwan, selecionou diferentes estirpes ou isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro a partir de lesões locais formadas em plantas de *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, inoculadas com isolados do complexo normal do vírus. Testes para verificar o valor protetivo dos isolados fracos, mostraram que este foi positivo na maioria dos casos, embora possa falhar em algumas superinoculações com isolados que causam sintomas severos.

Yeh e Gonsalves (1984) obtiveram 2 isolados fracos do VMM a partir de lesões locais de plantas de *C. quinoa*, inoculadas com isolados do complexo normal, cujo inóculo foi inicialmente tratado com ácido nitroso. Plantas de mamoeiro inoculadas com esses isolados fracos ficaram protegidas contra a infecção por um isolado que causa sintomas severos, em teste de superinoculação mecânica conduzido em condições de casa de vegetação. Embora os testes de exposição de plantas premunizadas em campo encontrem-se em andamento, os autores apontaram a possibilidade de esses isolados fracos terem valor prático no controle da moléstia.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Preparo de plantas-teste de mamoeiro

5.1.1. Para os testes em casa de vegetação

Nos testes conduzidos em casa de vegetação, na Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas, foram utilizadas plantas de mamoeiro das variedades Solo (mamão do Hawaii), IAC-98 e Comum. Sementes de mamão Solo e Comum foram obtidas de frutos adquiridos em supermercados, enquanto as de IAC-98 foram fornecidas pela Seção de Fruticultura Tropical do IAC.

Com o objetivo de se ter constantemente plantas-teste disponíveis para as experimentações, as sementeiras foram feitas a intervalos de 20 dias. Essas sementeiras foram feitas em vasos de barro de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, cheios de terra misturada com composto de matéria orgânica e adubo mineral, previamente preparado na Seção de Virologia. Na sementeira foram colocadas 5 sementes por vaso, devidamente espaçadas uma das outras e numa profundidade de aproximadamente 0,5 cm. Quando as plantas já tinham 3 folhas bem desenvolvidas foi feito o desbaste, deixando-se as duas melhores plantas por vaso. A utilização dessas plantas-teste geralmente ocorreu quando as mesmas tinham atingido uma altura mínima de aproximadamente 10 cm. Plantas com mais de 20 cm de altura não foram utilizadas.

5.1.2. Para os testes de campo

Nos testes de campo foram utilizadas plantas de mamoeiro das variedades Baiano e Formosa, sendo que, o preparo das mudas foi feito de duas maneiras diferentes.

Num primeiro caso, as plantas foram obtidas diretamente no campo, através da sementeira em covas previamente preparadas com esterco de galinha curtido, na base de 1 Kg por cova. Em cada cova foram colocadas entre 10 e 15 sementes, numa profundidade de aproximadamente 0,5 cm. Após a germinação, quando as plantas estavam com 15 cm de altura, fez-se o desbaste, deixando-se as duas melhores plantas por cova.

Em outro caso, as plantas foram obtidas em viveiro, através da sementeira em sacos plásticos pretos, de 16 cm de altura por 10 cm de diâmetro de boca, cheios com mistura de terra mais esterco de curral curtido. Em cada saco plástico foram colocadas 5 sementes, numa profundidade de aproximadamente 0,5 cm. Depois da germinação, quando as plantas atingiram altura aproximada de 10 cm, fez-se o desbaste, deixando-se duas plantas em cada recipiente. O transplante das mudas no campo ocorreu quando as mesmas estavam com 20 cm de altura, e foi feito em covas previamente preparadas com matéria orgânica. No transplante foram retirados os sacos de plástico.

5.2. Técnicas utilizadas para inoculação

5.2.1. Inoculação mecânica

Os inóculos do VMM ou de outros potyvirus foram obtidos a partir de folhas de plantas infetadas pelo vírus, macerando-as em almofariz de porcelana, em presença de tampão fosfato de potássio 0,02M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio até atingir a mesma molaridade.

As inoculações foram feitas geralmente nas folhas mais jovens das plantas, previamente polvilhadas com carborundo malha 500, que funcionou como abrasivo, friccionando-se aquelas com o indicador umedecido na solução de inóculo. Em seguida as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de abrasivo e inóculo existentes.

5.2.2. Inoculação com afídeos vetores

Para inoculação do VMM por meio de vetores utilizaram-se *Myzus persicae* e/ou *Aphis gossypii* obtidos de colônias em plantas de rabanete selvagem e algodoeiro, respectivamente, mantidas em pequenos insetários na Seção de Virologia do IAC.

Para aquisição do vírus pelos afídeos, inicialmente foram coletadas folhas das plantas onde os mesmos estavam colonizando. Em seguida, essas foram colocadas sobre plantas de mamoeiro infetadas pelo VMM e que tinham sido escolhidas como fontes de inóculo. Com o murchamento das folhas colocadas sobre as fontes de vírus, os afídeos gradativamente passavam para esta, onde, ao efetuarem a picada de prova, tinham chance de adquirir o vírus. Esse procedimento foi geralmente adotado com o objetivo de se evitar o manuseio dos insetos, que pode provocar danos nos mesmos, prejudicando conseqüentemente o teste de transmissão.

Para a transmissão do vírus adquirido pelos afídeos, para as plantas-teste desejadas, procedeu-se de forma semelhante à da aquisição. Pedacos de folhas de mamoeiro, contendo número conhecido de afídeos, foram cortados e colocados sobre as plantas-teste a serem inoculadas. Da mesma forma, após o murchamento desses pequenos pedacos de folhas, os afídeos passavam para as plantas de mamoeiro e, ao efetuarem nova picada de prova, podiam transmitir o vírus adquirido.

Um dia depois, foi feita a pulverização das plantas com um aficida, para matar os afídeos ainda presentes e em seguida elas foram levadas para casa de vegetação.

5.2.3. Superinoculação com o VMM

A superinoculação com o VMM, quando necessária, foi feita através dos métodos de inoculação mecânica e com afídeos vetores, conforme encontram-se descritos nos itens anteriores (5.2.1 e 5.2.2).

5.3. Testes de recuperação

Decorrido tempo suficiente para permitir a invasão sistêmica pelo VMM ou outro potyvirus inoculados em plantas de mamoeiro foi realizado teste de recuperação dos mesmos. Esta foi feita geralmente a partir de folhas inoculadas e de folhas novas que pudessem estar invadidas sistemicamente pelo vírus, separadamente, por inoculação mecânica. A inoculação foi em plantas-teste sabidamente hospedeira do vírus a ser recuperado.

5.4. Avaliação da reação de mosaico nas plantas-teste de mamoeiro

A leitura dos sintomas em plantas de mamoeiro geralmente iniciou-se 15 dias após a inoculação, tempo este suficiente para que ocorresse a invasão sistêmica do vírus. As leituras foram feitas periodicamente, durante o tempo necessário para conclusão do teste.

Para avaliação dos sintomas utilizou-se de uma escala de grau de sintomas, dando grau 1 para plantas apresentando mosaico pouco evidente, sem deformações foliares e poucas estrias oleosas na haste e pecíolos; grau 5 para aquelas exibindo intenso sintoma de mosaico, deformações foliares bem pronunciadas e estrias oleosas na haste e pecíolos; e graus 2, 3 e 4 para sintomas intermediários crescentes entre os dois extremos.

Um isolado foi considerado fraco quando as plantas com ele infetadas mantiveram grau médio de sintomas entre 1 e 2, enquanto as plantas com sintomas variando entre 3 e 5 foram consideradas infetadas por isolados fortes, semelhantes aos do complexo normal.

5.5. Tentativas de controle do mosaico por premunização com isolados fracos do vírus

5.5.1. Procura de isolados fracos em pomares severamente afetados pelo mosaico

Na procura de isolados fracos de valor protetivo, foram efetuados levantamentos em pomares de mamoeiro, no Estado de São Paulo, severamente afetados pelo mosaico, visando localizar plantas que se destacassem das demais em relação ao desenvolvimento e sintomas da moléstia. Essas plantas poderiam ser portadoras de isolados fracos do vírus, os quais vinham naturalmente protegendo-as contra a infecção pelo complexo normal presente no restante das plantas do pomar. Procedimento igual foi seguido por Müller (1972) na procura das estirpes fracas do vírus da tristeza dos citros e que são utilizadas no controle por premunização em São Paulo.

Localizadas essas plantas, foram coletadas amostras de folhas do ponteiro, colocadas em saco plástico e em seguida acondicionadas em caixa de isopor, para conservação da turgescência, de sorte a permitir a posterior extração do inóculo para estabelecimento do vírus em plantas-teste de mamoeiro, na Seção de Virologia do IAC. A identificação de cada isolado coletado foi feita pelo número do pomar visitado seguido do número do isolado (Ex: isolado 6/3 representa o terceiro isolado coletado na visita de número 6). O estabelecimento dos isolados coletados, em plantas de mamoeiro crescendo em condições de casa de vegetação, foi feito por meio de inoculação mecânica. Para cada grupo de isolados supostamente fracos inoculados, inocularam-se algumas plantas com um isolado do complexo normal do vírus, coletado na região de origem dos diferentes isolados, para servir de controle nas avaliações comparativas de sintomas. Também foram deixadas algumas plantas sadias para controle. Todas as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação para posteriores avaliações.

As plantas que, após diferentes leituras apresentaram sintomas fortes de mosaico e deformações foliares intensas (graus 3, 4 ou 5) e não mostraram tendência de recuperação dos sintomas, foram

eliminadas. Por outro lado, plantas com sintomas entre graus 1 e 2 da escala, foram transferidas para vasos maiores, de 24 cm de altura por 20 cm de diâmetro de boca, para que pudessem efetuar novo crescimento e permitir a continuidade das observações sobre o isolado do vírus nelas inoculado.

Uma vez que o desenvolvimento destacado de uma planta no campo poderia não estar associado com a infecção por um isolado fraco de valor protetivo, e sim representar uma característica genética da mesma, que poderia ser do tipo resistência ou tolerância ao patógeno, foram coletados também, quando existentes, frutos de todas as plantas de elite, para posterior avaliação das respectivas progênes^a.

5.5.2. Procura de isolados fracos a partir de inóculo selecionado

Fig.1 e 2)

Tentativas de obtenção de isolados fracos do vírus a partir de "bolhas" das folhas com mosaico (Figura 1.), de "lesões locais" em folhas de mamoeiro Solo (Figura 2) e de discos de folhas com mosaico, foram feitas através do isolamento do vírus presente nessas áreas selecionadas. No caso das "bolhas" e das "lesões locais", inicialmente foram retirados discos, com o auxílio de vazadores, cujo diâmetro era ligeiramente menor ou igual ao daquelas. No terceiro caso, o isolamento do vírus presente em diferentes regiões das folhas invadidas sistemicamente, especialmente daquelas áreas que apresentavam coloração verde próxima do normal, foi feito utilizando-se discos de folhas, de 0,5cm de diâmetro, também retirados com vazadores. Em seguida, os discos obtidos foram colocados individualmente em almofariz, em presença de uma gota de tampão fosfato e macerados para extração do vírus. A inoculação foi feita através do método mecânico, sendo cada inóculo utilizado em apenas uma planta-teste da variedade Solo, por ser esta altamente sensível ao VMM. Como controle, no caso das "bolhas", foram inoculadas algumas plantas com inóculo extraído de regiões ao redor das mesmas. Nos

^a

Poderia se tratar de planta com resistência verdadeira, de campo ou tolerância.



Figura 1. "Bolhas em folha de mamoeiro com mosaico.



Figura 2. "Lesões locais" do VMM em folha de mamoeiro Solo.

outros dois casos, o controle foi representado por plantas inoculadas com isolados do complexo normal..

As plantas inoculadas foram levadas para casa de vegetação, onde foram feitas avaliações periódicas de sintomas.

5.6. Tentativas de controle do mosaico por premunização com outros potyvirus

Foram feitas tentativas no sentido de se encontrar outros vírus capazes de infetar plantas de mamoeiro, especialmente entre aqueles pertencentes ao grupo dos potyvirus; causar sintomas fracos e ter efeito protetivo contra a posterior infecção destas plantas pelo VMM, de sorte que pudessem vir a ser utilizados no controle por premunização.

5.6.1. Escolha dos potyvirus

Foram testados os potyvirus existentes na coleção de vírus que normalmente é mantida na Seção de Virologia, IAC, e que se encontram listados na tabela 11, juntamente com as respectivas plantas hospedeiras de onde retiraram-se os inóculos.

5.6.2. Tentativas de estabelecimento dos potyvirus

Cada um dos potyvirus foi inoculado individualmente ou em mistura com o VMM, em plantas-teste das variedades Comum e Solo, em experimentos realizados em condições de casa de vegetação. A mistura dos potyvirus com o VMM foi feita após a extração do inóculo separado de cada um e na proporção de 1:1. Decorrido tempo suficiente para permitir uma possível invasão sistêmica de qualquer um dos potyvirus, individualmente ou em mistura com o VMM, foram feitos testes de recuperação dos mamoeiros inoculados, para hospedeiras dos diferentes potyvirus.

Todas as plantas inoculadas com os potyvirus individualmente, foram superinoculadas com um isolado normal do VMM.

5.7. Teste do valor protetivo dos isolados fracos

5.7.1. Em casa de vegetação

Uma vez obtido um isolado fraco do VMM, foi feita determinação do seu efeito protetivo, por superinoculações com isolados do complexo normal.

Inicialmente, o isolado fraco selecionado foi inoculado mecanicamente em plantas-teste das variedades Comum, IAC-98 e Solo. Depois de algum tempo, quando todas as plantas mostraram sintomas fracos de mosaico, foi realizado o teste para verificar o seu valor protetivo. Compararam-se os seguintes tratamentos: (a) plantas premunizadas com o isolado fraco (controle não desafiado); (b) plantas premunizadas e superinoculadas mecanicamente; (c) plantas premunizadas e superinoculadas com afídeos virulíferos; (d) plantas sadias inoculadas mecanicamente com o inóculo usado na superinoculação (simultaneamente); (e) plantas sadias inoculadas com afídeos virulíferos usados na superinoculação (os itens d e e serviram de controle do inóculo da superinoculação e para posteriores comparações de sintomas); (f) plantas sadias.

Todas as plantas do teste foram mantidas em condições de casa de vegetação, onde foram feitas leituras periódicas de sintomas, para avaliação do valor protetivo do isolado fraco. Este foi considerado positivo quando as plantas premunizadas e superinoculadas não apresentaram nenhuma alteração dos sintomas iniciais fracos.

5.7.2. Em plantas expostas no campo

5.7.2.1. Escolha do local

Para a realização dos testes de exposição de plantas de mamoeiro premunizadas em campo foi escolhida a região de Monte Alto, representada pelos municípios de Taiacú e Monte Alto, por ter sido essa a principal produtora de mamão do Estado de São Paulo, antes do aparecimento do mosaico.

5.7.2.2. Ensaio no município de Taiapu

As plantas desse ensaio pertenciam à variedade Baiano (escolhida pelo agricultor) e foram preparadas diretamente no campo (semeadura em 16/02/82).

O campo experimental foi constituído por 600 covas, com duas plantas cada uma, distribuídas em 6 fileiras de 100 covas. O espaçamento foi de 3 X 2 metros.

Para os testes de proteção foram utilizados os isolados fracos Aparecida D'Oeste, Aparecida D'Oeste 5A, Macaubal, Monções e IAC-1. O isolado Aparecida D'Oeste 5A representava 5 multiplicações sucessivas do isolado original através de plantas de abóbora.

A premunização das plantas foi feita aos 3 meses de idade (06/05/82), mecanicamente.

Antes da inoculação dos diferentes isolados fracos, o campo foi dividido em 10 blocos, contendo 60 covas cada um (6 fileiras de 10 covas). Cada isolado fraco foi inoculado em um bloco de plantas, sendo que, entre cada bloco de plantas premunizadas, deixou-se um bloco de plantas sadias que serviu de controle. Um mês após a inoculação, quando as plantas premunizadas apresentavam sintomas de invasão sistêmica, foi feito um desbaste, deixando-se apenas uma planta por cova. As plantas premunizadas com os 5 isolados fracos, bem como as sadias, ficaram sujeitas à infecção natural com isolados normais da região.

Avaliações dos isolados fracos foram feitas mensalmente através de leitura de sintomas. Oito meses depois da premunização, quando 100% das plantas inicialmente sadias já estavam infetadas (5/1/83) foram tomadas medidas da altura das plantas e diâmetro da haste a 20 cm de altura do solo, para avaliação do efeito dos isolados no desenvolvimento das plantas.

O ensaio foi terminado em 26/05/83.

5.7.2.3. Ensaio no município de Monte Alto

O ensaio de Monte Alto foi formado com a variedade Formosa (escolhida pelo agricultor) preparada em condições de viveiro. A semeadura foi em 4/11/82 e o transplante no campo em 20/12/82.

O campo experimental foi constituído por 300 covas, com duas plantas de mamoeiro cada uma, distribuídas em 5 fileiras. O espaçamento igual ao ensaio anterior.

No estudo da proteção foram utilizadas 23 amostras feitas dentro dos isolados fracos inicialmente selecionados, ou sejam, Aparecida D'Oeste, Monções, Macaubal e IAC-1 e de dois outros obtidos posteriormente a partir de "bolhas" das folhas, designados IAC-2 e IAC-3.

O campo foi dividido em 6 blocos contendo 50 covas cada um (5 fileiras de 10 covas cada). Em cada bloco foram premunizadas 4 fileiras de plantas, sendo que, cada uma com um isolado fraco. Uma fileira, disposta ao acaso em cada bloco, permaneceu sadia para servir de controle. Um mês após a inoculação foi feito um desbaste, deixando-se apenas uma planta por cova.

Avaliações dos isolados fracos foram feitas mensalmente até o termino do ensaio em 11/10/83.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção de isolados fracos em pomares severamente afetados pelo mosaico

6.1.1. Relação de pomares visitados

Durante o período de junho de 1980 até agosto de 1981 foram inspecionados mamoeiros em diferentes municípios, localizados principalmente na região Noroeste do Estado de São Paulo. Quase todos já se encontravam abandonados, com 100% de plantas infetadas pelo mosaico.

Tab. 1

Foram visitados 55 pomares de mamoeiro e inspecionados 41 (Tabela 1), onde foram observadas aproximadamente 334.500 plantas. A maioria desses pomares constituía-se de plantas da variedade "Comum", tendo sido visitados 3 da variedade Baiano e 1 de Solo. Coletaram-se 71 isolados do vírus, supostamente fracos e 9 normais.

6.1.2. Estudo da reação dos isolados coletados

Tab. 2

Na tabela 2 estão relacionadas as plantas inoculadas e infetadas com os diferentes isolados do VMM coletados em condições de campo e o grau médio de sintomas, 60 dias após a inoculação.

Dos 71 isolados supostamente fracos coletados, observa-se que 54 causaram sintomas fortes de mosaico, acompanhado de deformações foliares, nas plantas inoculadas. Esses sintomas foram semelhantes àqueles causados pelos isolados do complexo normal coletados

Tabela 1. Número de isolados do VMM coletados em pomares de mamoeiro visitados e inspecionados em diferentes localidades do Estado de São Paulo

Nº da visita	Localidade	Data	Nº de plantas no pomar	Variedade	Nº de isolados coletados
1	Nhandeara	25/06/80	1000	Solo	3
2	"	25/06/80	8000	Comum	0
3	Alvares Machado	02/07/80	300	Baiano	0
4	"	02/07/80	1000	Baiano	4
6	Santa Fé do Sul	12/08/80	20000	Comum	8
7	Meridiano	16/09/80	5000	Comum	5
8	Meridiano	17/09/80	20000	Comum	4
11	Marinópolis	08/10/80	200	Comum	1
12	"	08/10/80	100	Comum	2
14	"	08/10/80	3000	Comum	1
15	Aparecida D'Oeste	08/10/80	8000	Comum	0
22	Nhandeara	11/11/80	10000	Comum	6
23	"	11/11/80	16000	Comum	3
24	Macaubal	12/11/80	8000	Comum	0
26	Aparecida D'Oeste	25/11/80	12000	Comum	6
27	"	25/11/80	4500	Comum	5
29	"	26/11/80	6000	Comum	2
30	Nhandeara	10/12/80	4000	Comum	2
31	"	10/12/80	8000	Comum	5
32	Macaubal	11/12/80	4000	Comum	2
33	"	06/01/81	20000	Comum	1
34	"	07/01/81	8000	Comum	0
35	"	07/01/81	4000	Comum	3
36	"	08/01/81	10000	Comum	1
37	Macaubal	08/01/81	4000	Comum	3
38	Vista Alegre do Alto	17/02/81	15000	Baiano	1
39	"	18/02/81	3000	Comum	1

- continua -

(Continuação tabela 1)

Nº da visita	Localidade	Data	Nº de plantas no pomar	Variedade	Nº de isótopos coletados
41	Vista Alegre do Alto	19/02/81	3000	Comum	1
42	Fernandópolis	29/07/81	40000	Comum	0
44	Macaubal	30/07/81	2000	Comum	0
45	"	30/07/81	13000	Comum	2
46	"	30/07/81	11000	Comum	3
47	"	30/07/81	2000	Comum	0
48	Nhandeara	31/07/81	4800	Comum	1
49	Monções	10/08/81	5000	Comum	2
50	"	10/08/81	3000	Comum	0
51	Aparecida D'Oeste	11/08/81	1600	Comum	0
52	Marinópolis	11/08/81	20000	Comum	1
53	Palmeira D'Oeste	11/08/81	16000	Comum	0
54	"	12/08/81	6000	Comum	1
55	"	12/08/81	4000	Comum	0
Total			334500		80

Tabela 2. Reação de mamoeiros Comum e Solo inoculados com isolados coletados em campo

Nº do isolado	Data da inoculação	INO/INF ^a		Grau médio de sintomas 60 dias após inoculação	
		Comum	Solo	Comum	Solo
1/1	25/06/80	4/4	4/0	2,5	- ^d
1/2	"	4/0	4/0	-	-
1/3	"	4/0	4/0	-	-
4/1	03/07/80	m ^c	m		
4/7	"		8/0		-
4/8	"		8/0		-
4/9	"		8/0		-
6/1	19/08/80	4/0	4/0	-	-
6/2	"	4/0	4/0	-	-
6/3	"	4/0	4/0	-	-
6/4 ^b	"	4/4	m	3,5	
6/5	"	4/4	4/4	4,0	2,5
6/6	"	4/0	4/0	-	-
6/7	"	4/4	4/4	3,5	2,5
6/8	"	4/0	4/0	-	-
7/1	23/09/80	4/4	m	4,0	
7/2	"	6/6	m	3,5	
7/4	"	4/4	m	3,0	
7/5 ^b	"	m	m		
7/6	"	6/6		2,5	
8/1	23/09/80	6/6		3,0	
8/2	"	6/6		2,5	
8/3 ^b	"	4/4	2/2	2,5	3,0
8/4 ^b	"	6/6	m	4,0	
11/1	14/10/80	4/4	4/0	2,5	-
12/1	"	4/4	4/4	3,0	3,0
12/2 ^b	"	4/4	4/4	3,5	4,0
14/2	"	4/4	2/2	4,0	4,0
22/1	17/11/80	4/4	m	5,0	
22/2	"	4/4	4/2	2,5	3,5
22/3	"	3/3	4/0	5,0	-
22/4	"	4/4	4/1	5,0	5,0
22/5	"	4/4	4/4	4,0	4,5
22/6	"	4/2	4/3	2,5	4,0
23/1	"	4/4	4/1	4,0	3,0
23/2	"	4/1	4/2	4,0	4,5
23/3 ^b	"	4/4	4/1	5,0	4,0
26/1	28/11/80	4/1	4/4	2,0	2,0
26/2	"	4/4	4/3	5,0	4,0
26/3	"	3/3	3/3	4,0	3,5

- continua -

(Continuação tabela 2)

Nº do isolado	Data da inoculação	INO/INF ^a		Grau médio de sin- tomas 60 dias após inoculação	
		Comum	Solo	Comum	Solo
26/4	28/11/80	4/1	4/1	3,0	4,0
26/5	"	3/3	4/4	5,0	4,5
26/6 ^b	"	4/4	4/4	5,0	4,0
27/1	"	4/0	4/0	-	-
27/2	"	4/4	4/4	4,0	3,5
27/3	"	2/2	4/4	4,5	3,5
27/4	"	4/0	4/0	-	-
27/5	"	4/0	4/0	-	-
29/1	"	3/3	4/3	2,5	3,5
29/2	"	3/3	4/4	4,5	4,0
30/1	15/12/80	4/4	4/4	5,0	5,0
30/2	"	4/4	4/4	5,0	5,0
31/1	"	4/4	4/4	4,5	5,0
31/2	"	4/4	4/4	4,5	5,0
31/3	"	4/4	4/4	4,5	4,0
31/4	"	4/4	4/4	3,5	3,0
31/5	"	4/4	3/3	3,5	3,0
32/1 ₁	"	4/2	4/4	3,0	4,0
32/2 ^b	"	4/4	4/4	4,5	5,0
33/1	12/01/81	4/0	4/0	-	-
35/1	"	4/4	4/4	5,0	5,0
35/2	"	4/0	4/4	-	3,0
35/3	"	4/4	4/4	2,5	3,5
36/1	"	4/4	4/4	3,5	5,0
37/1 ₁	"	4/4	4/4	4,5	5,0
37/2 ^b	"	4/4	4/4	5,0	5,0
37/3 ₁	"	4/4	4/4	3,5	5,0
38/1 ^b	20/02/81	4/4	4/4	4,5	5,0
39/1	"	4/1	4/0	3,0	-
41/1	"	4/2	4/3	4,0	4,5
45/1	03/08/81	4/2	4/1	3,5	4,0
45/2	"	3/3	m	3,5	
46/1	"	5/5	m	1,0	
46/2	"	m	m		
46/3	"	m	6/2		5,0

- continua -

(Continuação tabela 2)

Nº do isolado	Data da inoculação	INO/INF ^a		Grau médio de sin- tomias 60 dias após inoculação	
		Comum	Solo	Comum	Solo
48/1	03/08/81	6/2	m	4,0	
49/1	13/08/81	6/3	m	1,0	
49/2	"	m	m		
52/1	"	6/3	m	5,0	
54/1	"	6/2	m	4,0	

^a Número de plantas inoculadas (INO) e número de plantas infetadas (INF)

^b Isolados do complexo normal do vírus, de diferentes regiões

^c m indica plantas que morreram devido a infecção pelo vírus ou outras causas desconhecidas

^d Plantas não infetadas pelo vírus inoculado

em diferentes regiões e que serviram de controle. Os isolados 26/1, 46/1 e 49/1 induziram sintomas fracos nas plantas de mamoeiro e foram considerados isolados fracos do VMM. Estes foram denominados de isolados fracos Aparecida D'Oeste, Macaubal e Monções, respectivamente, por terem sido coletados em pomares localizados nesses municípios.

Catorze não causaram sintomas em nenhuma das plantas-teste de mamoeiro inoculadas. Estas foram submetidas a um teste de recuperação e posterior superinoculação com isolados do complexo normal do vírus. Os resultados mostraram que em nenhum caso foi possível a recuperação do vírus e todas as plantas foram infetadas após a superinoculação.

6.2. Obtenção de isolados fracos a partir de inóculo selecionado

6.2.1. De "bolhas" das folhas com mosaico

De 132 plantas, inoculadas com isolados de "bolhas", 57 (43%) foram infetadas pelo vírus, enquanto 75 (57%) não mostraram nenhum tipo de sintoma visível de infecção, 60 dias após a inoculação (Tabela 3). Entre as plantas que mostraram sintomas de mosaico, 3 receberam grau 1 e foram selecionadas como isolados fracos. As demais (54 plantas) receberam grau médio de sintomas que variou de 3 a 5 e por isso foram consideradas como estando infetadas por isolados do complexo normal do vírus. Os isolados fracos foram designados IAC-1, IAC-2 e IAC-3.

No caso dos controles, das 132 plantas inoculadas com os isolados de discos retirados ao redor das "bolhas", 79 (60%) foram infetadas e 53 (40%) não mostraram nenhum sintoma de infecção (Tabela 3). Todos os controles positivos foram infetados por isolados que induziram sintomas semelhantes aos causados pelo complexo normal (graus 3, 4 e 5).

Tabela 3. Inoculações com preparações de discos retirados de "bolhas" e de áreas ao redor das mesmas. (controle) em mamoeiros Solo

Data da inoculação	Origem do inóculo	INO/INF ^a	Distribuição das plantas de acordo com os sintomas 60 dias após a inoculação				
			1	2	3	4	5
14/09/81	Bolha	8/4	1		1	2	
	Controle	8/2				1	1
25/09/81	Bolha	7/1			1		
	Controle	7/0					
13/10/81	Bolha	5/0					
	Controle	5/1				1	
23/12/81	Bolha	17/8					8
	Controle	17/15					15
05/01/82	Bolha	31/14			1		13
	Controle	31/23			1		22
04/02/82	Bolha	19/12	2		2		8
	Controle	19/14			3		11
16/02/82	Bolha	15/2					2
	Controle	15/5			2		3
17/03/82	Bolha	30/16					16
	Controle	30/19					19
Total	Bolhas	132/57	3	0	5	2	47
Total	Controles	132/79	0	0	6	2	71
Total		264/136	3	0	11	4	118

^a Número de plantas inoculadas (INO) e número de plantas infetadas (INF)

As plantas que não mostraram sintomas de mosaico (75+53) foram inoculadas por meio de afídeos virulíferos. Todas foram infetadas após a inoculação.

6.2.2. De "lesões locais" em folhas de mamoeiro Solo

ab. 4.

Nas tentativas de obtenção de isolados fracos do VMM a partir de "lesões locais" que apareceram ocasionalmente em folhas de mamoeiro Solo, foram inoculadas 129 "lesões", conforme resultados apresentados na tabela 4. Desse total de "lesões" inoculadas em plantas de mamoeiro da variedade Solo, 102 causaram infecção, enquanto que 27 não induziram nenhum sintoma nas plantas. Entre as plantas infetadas, 60 dias após a inoculação, 8 receberam grau 1 de sintomas, 5 grau 2, 19 grau 3, 9 grau 4 e 61 grau 5. As 13 plantas que receberam graus 1 e 2 foram consideradas infetadas por isolados fracos do VMM, sendo as demais descartadas.

A continuidade das observações, todavia, mostrou que 150 dias após a inoculação, as 13 plantas inicialmente selecionadas como portadoras de isolados fracos, alcançaram grau 5 de sintomas.

As 27 plantas que não mostraram sintomas foram superinoculadas com o VMM, da mesma forma que nos dois casos anteriores (itens 6.1.2. e 6.2.1.) e apresentaram mosaico.

o. 5.

6.2.3. De discos das folhas com mosaico

Na tabela 5 estão os resultados obtidos nas diferentes tentativas de obtenção de isolados fracos do VMM, a partir de discos de folhas retirados de áreas selecionadas sem sintomas evidentes de mosaico (verde normal) e inoculados em plantas de mamoeiro IAC-98 e Solo. Algumas plantas das quais foram retirados discos estavam infetadas pelos isolados fracos Aparecida D'Oeste, Monções, IAC-2 e IAC-3. Outros discos foram coletados de folhas de plantas do campo que tinham sido naturalmente infetadas.

Tabela 4. Inoculações com preparações de "lesões locais" de folhas de mamoeiro Solo em plantas da mesma variedade

Data da inoculação	INO/INF ^a	Distribuição das plantas de acordo com os sintomas 60 dias após a inoculação				
		1	2	3	4	5
07/03/83	9/9			1		8
03/06/83	7/1			1		
15/07/83	3/0					
10/10/83	27/18			11	6	1
20/12/83	19/15	7	5	1	2	
05/01/84	1/0					
19/01/84	7/3			3		
04/04/84	56/56	1		2	1	52
Total	129/102	8	5	19	9	61

^a Número de plantas inoculadas (INO) e número de plantas infetadas (INF)

Tabela 5. Inoculação de mamoeiros com isolados de discos de folhas retirados de regiões de sintomas mas evidentes de mosaico (área verde normal).

Plantas fontes de inoculo	Isolados do vírus	Planta-teste	INO/INF ^a	Distribuição das plantas de acordo com os sintomas 60 dias após a inoculação					Grau médio de sintomas
				1	2	3	4	5	
2318/2530	Fraco Ap. D'Oeste	IAC-98	22/18	12	5	1			1,4
		Solo	22/18	2	8	5	3		2,5
2318/1890	Fraco IAC-2	IAC-98	26/21	6	8	4		3	2,3
		Solo	26/26	2	6	6	12		3,1
2318/1892	Fraco IAC-3	IAC-98	23/14	6	2	5	1		2,1
		Solo	21/17	1	9	2	5		2,6
2327/461	Fraco Monções	Solo	145/145	9	90	38	4	4	2,3
464									
Campo	Normal	Solo	69/69	13	13	13	7	36	4,0

^a Número de plantas inoculadas (INO) e número de plantas infetadas (INF).

Pelos resultados da distribuição das plantas de acordo com os sintomas, 60 dias após a inoculação, observa-se que os inóculos obtidos de discos de diferentes regiões de uma mesma planta causaram nas plantas-teste de mamoeiro sintomas bastante heterogêneos. Estes variaram desde o mais fraco (grau 1) até o mais severo (grau 5).

Quando as plantas fornecedoras de discos foram as infetadas pelos isolados fracos, a porcentagem de plantas-testes nos graus 1 e 2 de sintomas foi de 64%, enquanto nos demais (graus 3, 4 e 5) foi de 36%. Por outro lado, quando os discos foram retirados de plantas infetadas naturalmente no campo, essas porcentagens foram de 19 e 81%, respectivamente.

Em 15/08/84 todas as plantas inoculadas com discos retirados das fontes de inóculo 2327/461, 464 e de plantas do campo foram transplantadas para o campo no Centro Experimental do IAC em Campinas, com o fim de permitir a continuidade das observações dos sintomas.

b. 6

Os resultados da leitura realizada em 18/03/85, encontram-se apresentados na tabela 6.

Embora tenham morrido 74 plantas, das 214 transplantadas, observa-se que houve uma tendência de as plantas mostrarem uma intensificação nos sintomas de mosaico. Mesmo assim, nos casos onde os discos foram retirados de plantas infetadas pelo isolado fraco Monções, nota-se que ainda foi possível encontrar plantas que estavam mantendo sintomas fracos. Nos casos onde os discos foram retirados de plantas infetadas no campo, o grau médio de sintomas permaneceu praticamente inalterado. Neste caso, apenas uma planta continuou apresentando sintomas relativamente fracos de mosaico e sem deformações foliares intensas (grau 2).

Tabela 6. Reação de mamoeiros Solo inoculados com discos de folhas e que foram transplantados para o campo

Plantas fontes de inóculo	Isolados do vírus	Nº de plantas transplantadas	Distribuição das plantas de acordo com os sintomas 7 meses após o transplante					Grau médio de sintomas
			1	2	3	4	5	
2327/461 e 464	Fraco Monções	115	2	39	55	12	7	2,8
Campo	Normal	35	0	1	17	7	10	3,7

6.3. Teste do valor protetivo de isolados fracos em condições de casa de vegetação

A avaliação do efeito protetivo de isolados fracos selecionados, em testes realizados em condições de casa de vegetação, foi feita com os isolados fracos Aparecida D'Oeste e um derivado do Monções. Os resultados obtidos estão nas tabelas 7 e 8.

O efeito protetivo foi positivo nas diferentes variedades premunizadas com os dois isolados fracos, tanto para o desafio feito através da superinoculação mecânica, como por meio de afídeos virulíferos, visto que não houve alterações nos sintomas dessas plantas, quando comparados com o das plantas apenas premunizadas. Por outro lado, todas as plantas inicialmente sadias e inoculadas mecanicamente e com afídeos virulíferos foram infetadas e mostraram sintomas bastante severos de mosaico (Figura 3). Esse último resultado mostra também que o desafio feito foi eficiente, porém não capaz de quebrar o efeito protetivo promovido pelos isolados fracos nas plantas de mamoeiro.

As plantas de mamoeiro IAC-98 e Comum premunizadas com o isolado Aparecida D'Oeste e as de Formosa com o derivado do Monções apresentaram sintomas mais fracos do que as de Solo inoculadas com os dois isolados (Tabelas 7 e 8). As plantas desta variedade por sua vez, apresentaram sintomas mais fracos quando premunizadas com o isolado derivado do Monções do que com o Aparecida D'Oeste. Provavelmente os sintomas mais intensos em plantas da variedade Solo estavam associados à sua maior sensibilidade ao vírus.

6.4. Avaliação do comportamento de plantas premunizadas em testes de exposição no campo

Uma vez que os testes do valor protetivo dos isolados fracos, realizados em condições de casa de vegetação, foram bastante satisfatórios e considerando-se que o teste definitivo é o de campo, por ser o vírus disseminado naturalmente pelos afídeos, optou-se por estudar o efeito protetivo dos demais isolados fracos apenas em plantas premunizadas expostas no campo.

Tabela 7. Reação de mamoeiros Comum, IAC-98 e Solo no teste de proteção com o isolado fraco Aparecida D'Oeste

Tratamentos	Comum		IAC-98		Solo	
	Nº de plantas	GMS ^a	Nº de plantas	GMS	Nº de plantas	GMS
Premunizadas	19	1,9	3	1,0	7	3,6
Premunizadas + superinoculadas mecanicamente	15	1,7	4	1,0	12	3,6
Premunizadas + superinoculadas com afídeos	14	1,6	7	0,8	13	3,3
Sadias com isolado normal ^b	11	5,0	1	5,0	12 ^c	5,0

a

Grau médio de sintomas (GMS)

b

As plantas inoculadas mecanicamente e com afídeos foram computadas juntas

^cTodas as plantas morreram devido a infecção pelo vírus

Tabela 8. Reação de mamoeiros Formosa e Solo no teste de proteção com o derivado do isolado fraco Monções

Tratamentos	Formosa		Solo	
	Nº de plantas	GMS ^a	Nº de plantas	GMS
Premunizadas	4	1,0	3	1,5
Premunizadas + superinoculadas mecanicamente	8	1,0	6	1,5
Premunizadas + superinoculadas com afídeos	6	1,0	4	1,7
Sadias com isolado normal ^b	8	5,0	6	5,0

^a Grau médio de sintomas (GMS)

^b As plantas inoculadas mecanicamente e com afídeos foram computadas juntas

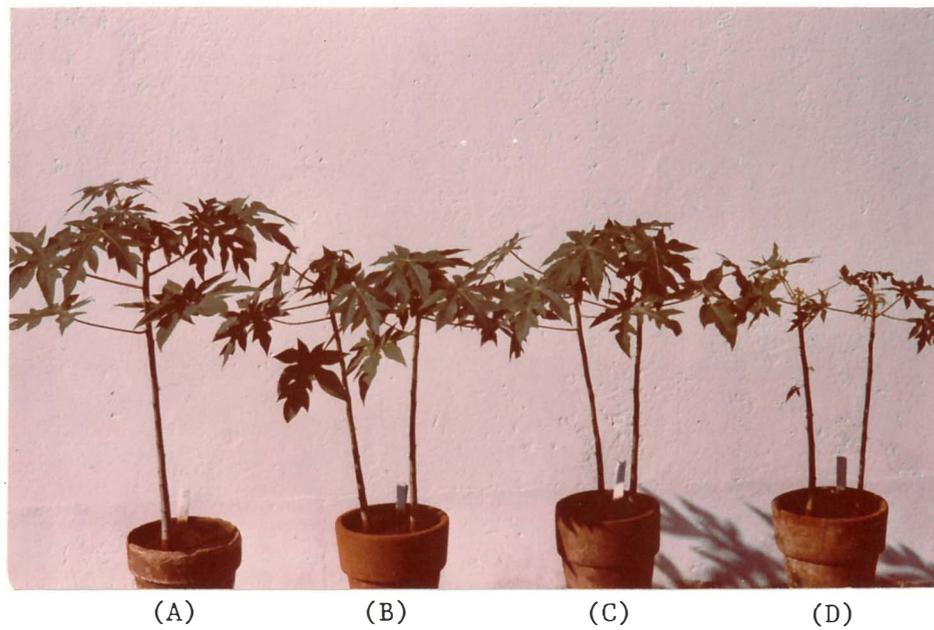


Figura 3. Planta sadia de mamoeiro Formosa (A), premunizadas com um derivado do isolado fraco Monções (B), premunizadas e superinoculadas com afídeos virulíferos (C) e sadias inoculadas com afídeos usados na superinoculação (D).

6.4.1. Ensaio no município de Taiacu

b. 9 Na tabela 9 estão relacionados os graus médios de sintomas de mosaico das plantas de mamoeiro da variedade Baiano, premunizadas com 5 isolados fracos e não premunizadas (controle) em 5 diferentes leituras escolhidas entre 10 realizadas no período de 12 meses (maio/82 a maio/83).

g. 4 Por esses resultados observa-se que inicialmente os isolados fracos, de forma geral, estavam causando sintomas fracos de mosaico nas plantas premunizadas. No entanto, a partir da leitura de 23/02/83 houve uma intensificação nos sintomas das plantas premunizadas, colocando-as numa posição semelhante àquela das plantas não premunizadas e que foram naturalmente infetadas. Na figura 4 observa-se uma das poucas plantas de mamoeiro Baiano premunizadas com o isolado fraco Aparecida D'Oeste 5A (A), que ainda estavam mostrando sintomas fracos depois de 8 meses da premunização, ao lado de outra infectada naturalmente pelo complexo normal (B). A planta (A) posteriormente teve os sintomas intensificados.

No decorrer das observações procurou-se tomar medidas da altura das plantas e diâmetro da haste a 20 cm do solo, para avaliar o efeito dos isolados fracos e normal no desenvolvimento das mesmas. Essas medidas foram tomadas em 05/01/83, quando as plantas estavam com 14 meses de idade. A altura média das plantas premunizadas foi de 1,20 m e o diâmetro médio da haste foi de 80 cm, enquanto das não premunizadas (controle) foi de 1,30 m e 80 cm, respectivamente. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre o desenvolvimento das plantas premunizadas e não premunizadas, no ensaio.

6.4.2. Ensaio no município de Monte Alto

b. 10 Os resultados do grau médio de sintomas de mosaico das plantas de mamoeiro da variedade Formosa, em 3 épocas diferentes de leitura, escolhidas entre 6 realizadas no período de 9 meses de observações encontram-se apresentados na tabela 10.

Da mesma forma que no ensaio anterior, observou-se que os sintomas induzidos pelos diferentes isolados utilizados na premunização foram inicialmente fracos, porém com o tempo estes se alteraram

Tabela 9. Testes de exposição em campo de mamoeiros Baiano premunizados e não premunizados (controles) realizado em Taiaçu

Tratamentos	Épocas de leitura	Isolados fracos				
		Ap. D' Oeste	Ap. D' Oeste 5A	Macaubal	Monções	IAC-1
Premunizadas	17/06/82	1,3	1,3	1,5	1,5	1,7
	26/10/82	2,0	1,8	2,7	1,6	2,3
	22/12/82	2,7	2,5	2,6	2,6	2,0
	23/02/83	3,2	3,1	3,5	3,8	3,5
	26/05/83	4,7	4,6	4,6	4,9	4,4
Não premunizadas	17/06/82	0	0	0	0	0
	26/10/82	2,0	1,7	2,2	2,2	1,9
	22/12/82	2,4	2,4	2,2	2,3	2,4
	23/02/83	3,3	3,4	3,0	3,4	3,0
	26/05/83	4,7	4,7	4,8	4,8	4,7



Figura 4. Mamoeiro Baiano premunizado com o isolado fraco Aparecida D'Oeste 5A (A) e infetado naturalmente pelo complexo normal (B), após 8 meses de exposição no campo em Taiacu, SP.

Tabela 10. Teste de exposição em campo de mamoeiros Formosa premunizados e não premunizados (controles) realizado em Monte Alto

Origem dos isolados	Fontes de inóculo	Grau médio de sintomas em 3 épocas de leitura		
		23/2/83	6/7/83	11/10/83
Ap. D' Oeste	2318/1813	1,5	2,7	3,9
"	2318/2828	1,1	3,1	3,3
Macaubal	2318/2993	1,9	2,0	- ^a
Monções	2318/2482	1,1	3,1	2,7
"	2318/2488	1,4	3,5	3,8
IAC-1	2318/2457	1,2	4,5	3,5
"	2318/2758	1,5	4,1	3,6
IAC-2	2318/1890	1,5	2,8	3,1
"	2318/2212	1,2	2,4	2,9
"	2318/2587	1,1	2,7	3,0
"	2318/2214	1,3	2,5	3,5
"	2318/2215	1,3	3,0	3,0
"	2318/2271	1,8	3,5	3,5
"	2318/2855	1,4	3,2	3,5
"	2318/2772	1,0	2,7	3,3
IAC-3	2318/1892-1	1,4	2,1	4,0
"	2318/1892-2	1,0	3,0	3,0
"	2318/2223	1,1	3,4	3,4
"	2318/2653	1,1	3,0	2,8
"	2318/2784	1,3	3,6	3,7
"	2318/2933	1,3	2,2	2,7
"	2318/2947	1,3	3,7	3,7
"	2318/2942	1,0	2,7	2,5
Não premunizadas		1,2	4,1	4,5

^a Morreram todas as plantas da linha

e passaram a ser fortes, semelhantes aos causados pelo complexo normal do vírus.

6.5. Teste de premunização com outros potyvirus

Tab. 11

Nos dois testes realizados com o objetivo de se encontrar outros potyvirus que fossem capazes de infetar plantas de mamoeiro, verificou-se que dos 13 potyvirus inoculados (Tabela 11), apenas o do amarelo do broto da soja (Deslandes *et al.*, 1984) causou infecção, induzindo lesões locais necróticas, de 1 mm de diâmetro, nas folhas inoculadas. Em média, manifestaram-se 5 lesões locais por folha inoculada. Plantas de mamoeiro das variedades Baiano, IAC-98 e Solo, quando inoculadas com esse vírus não mostraram nenhum sintoma visível de infecção sistêmica.

Os testes de recuperação desses potyvirus, a partir de folhas de mamoeiro inoculadas e folhas novas, para hospedeiras adequadas, foram todos negativos, exceção apenas para o vírus do amarelo do broto da soja que foi recuperado a partir das lesões locais e causou sintomas típicos em plantas de soja da variedade Santa Rosa.

Todas as plantas de mamoeiro inoculadas com esses potyvirus e posteriormente superinoculadas com o VMM, mecanicamente e por meio de afídeos virulíferos, foram infetadas por este último.

Nas tentativas de estabelecimento desses mesmos potyvirus, quando inoculados em mistura com o VMM, verificou-se que todas as plantas mostraram sintomas idênticos aos causados por este último, 15 dias após a inoculação. Exceção ocorreu quando a mistura foi com o potyvirus do amarelo do broto da soja, onde as folhas inoculadas mostraram lesões locais.

Nos testes de recuperação feitos da mesma forma que os anteriores, pode-se constatar apenas a presença do VMM. No caso da mistura com o vírus do amarelo do broto da soja, mais uma vez o teste de recuperação foi positivo, quando feito a partir das lesões locais. Na recuperação feita a partir das folhas novas, as plantas inoculadas mostraram sintomas do VMM.

Tabela 11. Reação induzida pelos diferentes potyvirus testados em mamoeiros

Potyvirus	Nº de isolados testados	Hospedeiras doadoras do vírus	Reação dos mamoeiros testados	
			Comum	Solo
Amarelo do broto da soja ^a	1	Soja	+ ^b	+
Mosaico da Alfaca ("Lettuce mosaic virus")	1	Alface	-	-
Mosaico comum do feijoeiro ("Bean common mosaic virus")	1	Feijoeiro	-	-
Mosaico comum da soja ("Soybean mosaic virus")	11	Soja	-	-
Mosaico da couve ("Turnip mosaic virus")	1	Couve	-	-
Mosaico da melancia ("Watermelon mosaic virus")	1	Abóbora	-	-
Mosaico do milho ("Sugarcane mosaic virus")	2	Milho	-	-
Mosaico do picão ("Bidens mottle virus")	1	Girassol	-	-
Mosaico do pimentão ("Pepper mottle virus")	1	Tomateiro	-	-
Y da batata ("Potato Y virus")	1	Batata e Fumo	-	-
Y da berinjela ^a	1	Fumo	-	-
Y do <i>Digitalis</i> sp. ^a	1	<i>Digitalis</i> sp.	-	-
Y ^f do tomateiro ("Pepper mottle virus")	1	Tomateiro	-	-

^aVírus que ainda não foram perfeitamente identificados

^bLesões locais necróticas sem invasão sistêmica

7. DISCUSSÃO

A procura de plantas de elite para seleção de isolados fracos de valor protetivo foi usada com sucesso por outros investigadores (Posnette e Todd, 1955; Simmonds, 1959; Müller e Costa, 1968, 1977). Está apoiada no fato de que, a presença de isolados fracos em plantas destacadas no campo, ocorreu através de um processo de seleção natural. Além disso, por estar a planta localizada no meio de milhares de outras infetadas pelo complexo normal do vírus, o isolado fraco já teria sofrido pressão de inóculo suficiente para permitir mostrar o seu valor protetivo e estabilidade.

Apesar de ser um método de seleção com bastante chance de sucesso e que deve preceder qualquer outro tipo de abordagem com o mesmo objetivo, a sua execução no caso do mosaico do mamoeiro encontrou algumas barreiras. A maioria dos pomares de mamoeiro visitados tinha 100% de plantas infetadas, o que fornecia condições ideais para a procura de plantas de elite. No entanto, por ser o mosaico uma moléstia bastante prejudicial para a cultura, tão logo os pomares ficavam com todas as plantas infetadas, os agricultores os abandonavam. Consequentemente as plantas começavam a ficar desnutridas e principalmente, tinham seus ponteiros atacados pelo ácaro branco, deixando-as praticamente sem copa. Assim sendo, procurou-se selecionar, nos diferentes pomares visitados, algumas que apresentavam melhor desenvolvimento e principalmente, que mostravam sintomas mais fracos de mosaico.

Os resultados dessa seleção mostraram que, dos 71 isolados supostamente fracos coletados, 3 induziram sintomas fracos nas plantas-teste de mamoeiro inoculadas. A utilização desse método em Hawaii, por outro lado, não apresentou resultados satisfatórios, depois de terem sido testados 116 isolados coletados no campo (Yeh e Gonsalves, 1984).

A obtenção de isolados fracos a partir de inóculo selecionado oferece chances de sucesso. O método de seleção a partir de "bolhas" que aparecem nas folhas das plantas infetadas pelo complexo normal apresentou resultados positivos (Tabela 3). Aproximadamente 5% das plantas de Solo que foram infetadas pelos inóculos obtidos das "bolhas" mostraram sintomas fracos de mosaico, sem deformações foliares, além de um bom desenvolvimento. Esse método permitiu a seleção dos isolados fracos IAC-1, IAC-2 e IAC-3.

A não infecção das plantas-teste em 56% das tentativas de isolamento do vírus presente nas "bolhas", pode ser interpretada através de duas hipóteses: (a) algumas "bolhas", apesar de estarem infetadas por um isolado do vírus, este ocorre em concentração muito baixa, insuficiente para permitir a sua recuperação e (b) as "bolhas" representavam tecidos sadios. No caso dessas hipóteses pode-se pensar que essas condições poderiam estar associadas com o aparecimento de mutações somáticas resistentes ou tolerantes ao vírus. Dessa maneira, sugere-se que estudos sejam feitos utilizando-se da técnica da cultura de tecidos ou de células individuais de "bolhas", com o objetivo de verificar se as plantas posteriormente regeneradas representam infecção por isolados fracos ou mutantes resistentes ou tolerantes ao vírus.

As tentativas de obtenção de isolados fracos do VMM a partir de lesões locais que aparecem ocasionalmente em folhas de mamoeiro Solo, inoculadas pelo complexo normal, não deram resultados finais satisfatórios. Alguns isolados obtidos, apesar de causarem sintomas fracos durante alguns meses após a inoculação, mais tarde passaram a se comportar de forma semelhante aos do complexo normal. De qualquer forma, ficou evidenciado que, como todo modelo de lesões locais, ele permitiu um desdobramento dos isolados do complexo, embora não se tenha encontrado um isolado fraco estável.

Nas tentativas feitas para obter isolados fracos a partir de discos de folhas de mamoeiro com mosaico, verificou-se que os inóculos retirados de diferentes regiões de uma mesma folha causaram nas plantas-teste sintomas bastante variáveis, independente de a planta fornecedora de discos estar infetada com isolados fracos ou do complexo normal. Mas os discos retirados de plantas infetadas por isolados fracos (Tabela 5) deram porcentagem de plantas-teste que mostraram sintomas fracos (graus 1 e 2), 60 dias após a inoculação, superior (64%) ao daquelas inoculadas com discos obtidos de plantas representando o complexo normal (19%). Quando as plantas inoculadas com os discos retirados do isolado fraco Monções e do complexo normal foram transplantadas para o campo (Tabela 6), verificou-se que 10 meses depois da inoculação, as porcentagens de plantas que ainda mostravam sintomas fracos foram de 35 e 3%, respectivamente. Esses resultados mostram que numa mesma planta existe uma variação bastante grande no complexo do vírus presente, estando a planta infetada por um isolado fraco ou normal. Embora a porcentagem de plantas-teste que mostraram uma possibilidade de estarem infetadas por isolados fracos, tenha sido maior quando os discos foram retirados de folhas de plantas já infetadas por isolados fracos, esse método pode perfeitamente ser usado na seleção de isolados fracos do VMM a partir do complexo normal. Esse método funciona de forma semelhante ao modelo de lesões locais, podendo substituí-lo para essa finalidade.

Por outro lado, os resultados alcançados, mostraram também que alguns discos retirados de plantas infetadas por isolados inicialmente fracos, deram origem a isolados que causaram sintomas severos nas plantas-teste inoculadas. Esse fato mostra que os isolados fracos presentes nas plantas fornecedoras de discos encontravam-se com uma constituição bastante heterogênea. Não se sabe todavia, se a ocorrência de componentes que induziram sintomas fortes é resultado de uma mistura inicial ou se é originário de mutações que ocorreram posteriormente, durante a replicação do vírus na planta.

Os resultados obtidos mostram a possibilidade de seleção de isolados fracos do VMM através de diferentes métodos. Estão de acordo com aqueles obtidos por Lin (1980) e Yeh e Gonsalves (1984), sugerindo não ser essa uma tarefa difícil, embora estes dois últimos autores somente tenham obtido sucesso após o tratamento do complexo normal com um mutagênico químico. No caso presente, a seleção de isolados fracos obteve resultados satisfatórios quando foi feita a partir de qualquer um dos 4 métodos já discutidos. Embora não tenha sido possível avaliar diferenças do ponto de vista de eficiência dos métodos empregados, pode-se considerar que a seleção de isolados fracos a partir de inóculo selecionado ("bolhas", "lesões locais" e discos de folhas) foi bem menos trabalhosa do que a feita a partir da procura de plantas de elite no campo. Por outro lado, esses métodos não oferecem a vantagem que tem a localização de uma planta de elite, onde o efeito protetivo do isolado fraco já vem sendo testado no campo. No caso de isolados fracos obtidos a partir de inóculos selecionados há necessidade de se testar posteriormente o seu valor de proteção, podendo este ser negativo em alguns casos, obrigando a novas seleções.

Quanto ao efeito protetivo dos isolados fracos, nos testes conduzidos em condições de casa de vegetação, com os isolados fracos Aparecida D'Oeste e um derivado do Monções, verificou-se que foi altamente positivo, funcionando tanto nos casos em que a superinoculação foi feita por meio de afídeos virulíferos, como também através de inoculação mecânica. O fato de a superinoculação mecânica não ter sido suficiente para quebrar o efeito protetivo, pode ser considerado de bastante valor, pois trata-se de um método de inoculação muito mais drástico do que ocorre no campo, onde a disseminação é por meio de afídeos vetores. Resultado semelhante tinha sido obtido por Yeh e Gonsalves (1984).

O efeito protetivo dos isolados fracos Aparecida D'Oeste, Aparecida D'Oeste 5A, Macaubal, Monções, IAC-1, IAC-2 e IAC-3, também foi positivo quando as plantas com eles premunizadas foram expostas no campo, em ensaios nos municípios de Taiapu e Monte Alto, onde ficaram sujeitas à infecção natural pelos afídeos virulíferos. Embora esse

resultado tenha sido inicialmente animador, verificou-se mais tarde (6-8 meses após a premunização), que as plantas premunizadas que estavam mostrando sintomas fracos, passaram a apresentar sintomas fortes de mosaico, acompanhado de deformações foliares, semelhantes àqueles causados pelos isolados do complexo normal do vírus (Tabelas 9 e 10). Alterações semelhantes de sintomas em plantas de mamoeiro premunizadas e expostas no campo também foram observadas em Taiwan por C.C. Lin (carta de 12/10/83) e interpretadas como sendo devido a quebra do efeito protetivo dos isolados fracos. Há ainda notícias (informação pessoal de visitantes estrangeiros que trabalham com essa moléstia) de que essas alterações também têm sido observadas em plantas premunizadas com os isolados fracos obtidos por Yeh e Gonsalves (1984), cujos testes de campo estão sendo feitos em Taiwan e Hawaii.

Embora o fenômeno pareça ser o mesmo nos casos estudados em São Paulo, não foi interpretado como sendo devido a quebra do efeito protetivo, em função das seguintes evidências: (a) as alterações dos sintomas das plantas premunizadas ocorreu de forma sincronizada, ou seja, em um grande número de plantas ao mesmo tempo, a cada intervalo de leitura, não seguindo portanto, o modelo de disseminação natural do vírus dentro de uma plantação, que é um processo gradativo e (b) esse fenômeno ocorreu também em plantas premunizadas mantidas em casa de vegetação e que não tinham sido superinoculadas com isolados do complexo normal.

Procurando explicar esse fenômeno de alterações de sintomas que ocorreram no presente caso, pensou-se que poderia estar associado a uma mistura de componentes fortes com os fracos dos isolados inicialmente selecionados ou com o posterior aparecimento daqueles através do processo de mutação. Com o tempo, esses componentes fortes atingiriam a ponta de crescimento das plantas e, por serem mais competitivos, dominariam os fracos inicialmente estabelecidos, resultando numa intensificação dos sintomas. Pode-se pensar também que a ocorrência de temperaturas mais baixas pode auxiliar o processo de alteração de sintomas. O efeito de temperatura baixa na intensificação dos sintomas de moléstia causada por vírus já é fato conhecido para o mosaico da

melancia causado por um potyvirus (Foster e Webb, 1965). A severidade de sintomas foi paralela à concentração do vírus nos tecidos jovens das plantas infetadas.

Estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de procurar elucidar melhor o efeito de temperaturas mais baixas na intensificação dos sintomas de plantas de mamoeiro premunizadas com isolados fracos, bem como na procura de isolados que induzem sintomas fracos estáveis em plantas mantidas nessas condições de temperaturas.

Os resultados obtidos evidenciaram que há possibilidade de se obter isolados fracos do VMM e que estes protegem de forma satisfatória as plantas com eles premunizadas. Entretanto, para que possam vir a ser usados no controle dessa moléstia em campo, há necessidade de se encontrar solução para o problema relacionado com a instabilidade dos mesmos e que resulta em alterações de sintomas nas plantas. É bem provável que, tão logo se encontrem isolados que induzam sintomas fracos estáveis nas plantas de mamoeiro, por um período que corresponde à vida útil econômica da cultura (3 anos), a premunização terá bastante chance de vir a ser usada com sucesso pelos agricultores, como medida de controle do mosaico.

8. CONCLUSÕES

1. Isolados fracos do vírus do mosaico do mamoeiro podem ser obtidos de plantas com sintomas fracos no campo, de "bolhas" das folhas com mosaico, de "lesões locais" em folhas de mamoeiro Solo e de discos de folhas de plantas infetadas pelo complexo normal.
2. A proteção oferecida por isolados fracos é igualmente eficiente quando as plantas são desafiadas por superinoculação mecânica, inoculadas com afídeos virulíferos ou expostas em campo.
3. Os isolados fracos do VMM não são estáveis, pois as plantas com eles inoculadas desenvolvem sintomas mais severos após alguns meses da inoculação, acompanhados por alterações no complexo viral.
4. Para que a premunização possa ser utilizada no controle do mosaico do mamoeiro é necessário encontrar isolados fracos estáveis e competitivos, durante o período de vida útil econômica da cultura.

9. LITERATURA CITADA

- ACUÑA, J. e F. DE ZAYAS. 1940. Fruta bomba o papaya. *Rev. agr.* (Cuba) 23:49-80.
- ADSUAR, J. 1947a. Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico. I. Transmission of papaya mosaic. *J. agr. Univ. P. Rico* 3:248-256.
- ADSUAR, J. 1947b. Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico. III. Property studies of papaya mosaic virus. *J. agr. Univ. P. Rico* 3:260-264.
- ADSUAR, J. 1950. Studies on virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Puerto Rico. IV. Preliminary studies on the host range of papaya mosaic. P. Rico agr. Exp. Sta., Univ. P. Rico. *Tech. Paper Nº 5*. 5p.
- ALMEIDA, A.M.R. e S.L.C. DE CARVALHO. 1978. Ocorrência do vírus do mosaico do mamoeiro no Estado do Paraná. *Fitopatol. brasil.* 3:65-68.
- BAKER, R.E.D. 1938. Papaw mosaic diseases. *Trop. agr.* (Trinidad) 16:159-163.
- BHARGAVA, K.S. e S.M.P. KHURANA. 1970. Insect transmission of papaya viruses with special reference to papaya mosaic virus. *Zentralb. Bakter. Parasit. Infektionsk. Hygiene* 124:688-696.
- BARBOSA, F.R. e O.R. PAGUIO. 1982a. Identificação do vírus da mancha anelar do mamoeiro no Estado de Pernambuco. *Fitopatol. brasil.* 7:37-45.

- BARBOSA, F.R. e O.R. PAGUIO. 1982b. Vírus da mancha anelar do mamoeiro: Incidência e efeito na produção do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Fito patol. brasil.* 7:365-373.
- BAWDEN, F.C. 1943. *Plant viruses and virus diseases*. 2a. ed. Mass. Chronica Botanica Co. 294p.
- BENNETT, C.W. 1953. Interactions between viruses and virus strains. *Advanc. Virus Res.* 1:39-67.
- BITANCOURT, A.A. 1935. Mosaico do mamoeiro. *O Biológico* 1:41.
- BOKX, J.A. DE. 1965. Host and electron microscopy of two papaya viruses. *Plant Dis. Reprtr.* 49:742-746.
- CAPOOR, S.P. e P.M. VARMA. 1948. A mosaic disease of *Carica papaya* L. in the Bombay province. *Curr. Sci.* 17:265-266.
- CAPOOR, S.P. e P.M. VARMA. 1958. A mosaic disease of papaya in Bombay. *Indian J. agr. Sci.* 27:225-233.
- CHANG, C.A. 1979. Isolation and comparison of two isolates of papaya ringspot virus in Taiwan. *J. agr. Res. China* 28:207-216.
- CIFERRI, R. 1930. Phytopathological survey of Santo Domingo. *J. Dept. agr. P. Rico* 14:5-44.
- CONOVER, R.A. 1964a. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. *Proc. Fla. State hort. Soc.* 77:440-444.
- CONOVER, R.A. 1964b. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. *Proc. Fla. State hort. Soc.* 77:444-448.
- CONOVER, R.A. 1976. A program for development of papaya tolerant to the distortion ringspot virus. *Proc. Fla. State hort. Soc.* 89: 229-231.
- COOK, A.A. 1972. Virus diseases of papaya. Florida agr. Exp. Sta., Univ. Florida. *Bull. Tech.* Nº 750. 19p.
- COOK, A.A. e G.M. MILBRATH. 1971. Virus diseases of papaya on Oahu (Hawaii) and identification of additional diagnostic host plants. *Plant Dis. Reprtr.* 55:785-788.
- COSTA, A.S. 1941. Uma anomalia das folhas do mamoeiro. (*Carica papaya* L.). *O Biológico* 7:285-286.

- COSTA, A.S.: 1972. Curso de pós-graduação de virologia vegetal. Piracicaba, ESALQ/USP, (mimeografado).
- COSTA, A.S. e ANA MARIA B. CARVALHO. 1961. Studies on brazilian tobacco streak. *Phytopathol. Z.* 42:113-138.
- COSTA, A.S. e A.M. DE CARVALHO. 1971. O problema da resistência ao mosaico do mamoeiro. *Rev. Soc. brasil. Fitopatol.* 4:37-38.
- COSTA, A.S., A.M. DE CARVALHO e S. KAMADA. 1969. Constatado o mosaico do mamoeiro em São Paulo. *O Agrônomo* 21:38-43.
- COSTA, A.S., J.A.C. DE SOUZA DIAS, G.W. MÜLLER e A.M. DE CARVALHO. 1978. Problemas de controle do mosaico do mamoeiro. *I Congr. paulista de Fitopatol.* Botucatu, 18-20 de janeiro de 1978. (resumo).
- DESLANDES, J.A., A.S. COSTA, ANTONIA DOS R. FIGUEIRA e J.VEGA. 1984. Amarelo do broto da soja causado por potyvirus diferente do mosaico comum, registrado em Minas Gerais. *Summa Phytopathol.* 10:25-27. (resumo).
- FLETCHER, J.T. e J.M. ROWE. 1975. Observations and experiments of the use of an avirulent mutant strain of tobacco mosaic virus as a means of controlling tomato mosaic. *Ann. appl. Biol.* 81:171-179.
- FOSTER, R.E. e R.E. WEBB. 1965. Temperature effects on symptom expression and concentration of six muskmelon viruses. *Phytopathology* 55:981-985.
- FULTON, R.W. 1982. The protective effects of systemic virus infection. In: Wood, R.K.S. ed. *Active defense mechanisms in plants*. New York, Plenum Press. p-231-245.
- GONÇALVES-SILVA, S. 1941. Doenças do mamoeiro. *O Biológico* 7:220-225.
- GRANT, T.J. e A.S. COSTA. 1951. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* 41:114-122.
- HAMILTON, R.J. 1979. Perspectives on the use of mild strains of viruses as crop protectants. *XI intern. Congr. Pl. Protec.* Washington, August 8.
- HARKNESS, R.W. 1967. Papaya growing in Florida. Florida agr. Exp. Sta., Univ. *Circ.* S-180. 15 p.

- HARRISON, B.D., J.T. FINCH, A.J. GIBBS, M. HOLLINGS, R.J. SHEPHERD, V. VALENTE e C. WETTER. 1971. Sixteen group of plant viruses. *Virology* 4:356-363.
- HENDRIX, J.W. 1948. The influence of papaya ringspot on the growth and yield of papaya trees. *Reptr. Hawaii agric. Exp. Sta., Univ. Hawaii. 1946-1948.* p.119.
- HEROLD, F. e J. WEIBEL. 1962. Electron microscopic demonstration of papaya ringspot virus. *Virology* 18:302-311.
- HOROVITZ, S. e H. JIMÉNES. 1967. Cruzamientos interspecificos e intergenericos en Caricaceas y sus implicaciones fitotecnicas. *Agr. trop. (Venezuela)* 17:323-343.
- ISHII, M. e O.V. HOLTZMAN. 1963. Papaya mosaic disease in Hawaii. *Plant Dis. Reptr.* 47:947-951.
- JENSEN, D.D. 1949a. Papaya virus disease with special reference to papaya ringspot. *Phytopathology* 39:191-211.
- JENSEN, D.D. 1949b. Papaya ringspot virus and its insect vector relationships. *Phytopathology* 39:212-220.
- JOHNSON, J. 1937. An acquired partial immunity to the tobacco streak disease. *Trans. Wisconsin Acad. Sci. Arts Letters* 30:27.
- KAVANAU, J.L. 1949. On correlation of the phenomena associated with chromosomes, foreign proteins and viruses. *Am. Nat.* 83 :111-138.
- KUNKEL, L.O. 1934. Studies on acquired immunity with tobacco and aucuba viruses. *Phytopathology* 24:437-466.
- LANA, A.F. 1980. Transmission and properties of viruses isolated from *Carica papaya* in Nigeria. *J. hort. Sci.* 55:191-197.
- LIMA, J.A.A. e M.N.S. GOMES. 1975. Identificação de "papaya ring-spot virus" em Fortaleza, Ceará. *Fitossanidade* 1: 56-59.
- LIN, C.C. 1980. *Strains of papaya ringspot virus and their cross protection.* Nat. Taiwan Univ. 115p. (PhD. Thesis). (Texto em chinês. Lido o "summary").
- LOPES P., O.L. 1972. Identificación de las virosis de la lechosa (*Carica papaya* L.) en Venezuela. *Rev.Fac. Agr.* 6:5-36.

- LUQUE, CONCEPCIÓN S. DE e G. MARTÍNEZ L. 1976. Reconocimiento del virus de la mancha anular de la papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia. *Rev. I.C.A.* 11:205-220.
- LUQUE, CONCEPCIÓN S. e G. MARTÍNEZ L. 1977. Identificación de plantas hospedantes del virus de la mancha anular de la papaya. *Fitopatol. colombiana* 6:112-121.
- MARENAUD, C., J. DUNEZ e R. BERNHARD. 1976. Identification and comparison of different strains of apple chlorotic leaf spot virus and possibilities of cross protection. *Acta Hort.* 67:219-226.
- MARTINEZ, J.A. 1980. Estudo da viabilidade prática e econômica do controle das viroses do mamoeiro pela erradicação sistemática das plantas afetadas. In: *Anais 1º simpósio brasileiro sobre a cultura do mamoeiro*. Jaboticabal. FCAV. p.211-217.
- MATTHEWS, R.E.F. 1981. *Plant Virology*. 2a. ed. New York, Academic Press, 897p.
- McKINNEY, H.H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *J. agr. Res.* 39:557-578.
- MÜLLER, G.W. 1972. *Estudos sobre a interação entre isolados do vírus da tristeza dos citros, e controle da moléstia em limão galego por premunização*. Piracicaba, ESALQ/USP. 68p. (Tese de Doutorado).
- MÜLLER, G.W. e A.S. COSTA. 1968. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. In: Childs, J.F.L. ed. *Proc. 4th Conf. intern. Organ. Citrus Virol.* Univ. Florida Press. p. 71-82.
- MÜLLER, G.W. e A.S. COSTA. 1977. Tristeza control in Brazil by pre-immunization with mild strains. *Proc. int.Soc. Citriculture* 3:868-872.
- MÜLLER, G.W. e A.S. COSTA. 1981. Uso da premunização com estirpes fracas do vírus da tristeza reergue a produção comercial de laranja Pêra no Estado de São Paulo. *Fitopat. brasil.* 6:301-302.
- NAMBA, R. e S.Y. HIGA. 1975. Papaya mosaic virus transmission as affected by the duration of the preliminary fasting and virus acquisition feeding of *Myzus persicae*. *Proc. hawaiian Entomol. Soc.* 22: 113-117.

- NAMBA, R. e S.Y. HIGA. 1977. Retention of the inoculativity of the papaya mosaic virus by the green peach aphid. *Proc. hawaiian Entomol. Soc.* 22:491-494.
- PAGUIO, O.R. e F.R. BARBOSA. 1979. Constatação do "papaya ringspot virus" no Estado de Pernambuco. *Fitopatol. brasil.* 4:133. (resumo).
- PARRIS, G.K. 1938. A new disease of papaya in Hawaii. *Am. Soc. hort. Sci.* 36:263-265.
- PONTIS V., R.E. 1953. Las virosis de la lechoza (*Carica papaya* L.) en Venezuela. I. Transmission del "mosaico". *Agr. trop. (Venezuela)* 2: 241-251.
- POSNETTE, A.F. e J. McA TODD. 1955. Virus diseases of cacao in West Africa. IX. Strain variation and interference in virus 1A. *Ann. appl. Biol.* 43:433-453.
- RAST, A. TH. B. 1972. MII-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *Neth. J. Pl. Pathol.* 78:110-112.
- RAST, A. TH. B. 1975. Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistance breeding and cross protection. *Agr. Res. Repr. n° 834.* Centre Agr. Publ. Document., Wageningen, Netherlands. 76p.
- REZENDE, J.A.M. 1984. Mosaico ou mancha anular do mamoeiro: qual a melhor designação no Brasil? *Fitopatol. bras.* 9:455-565.
- REZENDE, J.A.M., A.S. COSTA, A.L.M. MARTINS, A. TULMAN NETO e N.B. SOARES. 1985. Segregação de tolerância ao vírus do mosaico do mamoeiro na variedade IAC-98 observada em ensaio de progênies. *Summa Phytopathol.* 11:42-45. (resumo).
- SALAMAN, R.N. 1933. Protective inoculations against a plant virus. *Nature* 131:468.
- SALAMAN, R.N. 1937. Acquired immunity against the "Y" potato virus. *Nature* 139:924.925.
- SHALLA, T.A. e L.J. PETERSEN. 1978. Studies on the mechanism of cross protection. *Phytopathology* 68:1681-1683.

- SIMMONDS, J.H. 1959. Mild strain protection as a mean of reducing losses from the Queensland woodness virus in the Passion vine. *Queensland J. agr. Sci.* 16:371-380.
- SMITH, F.E.V. 1929. Plant disease in Jamaica in 1928. *Ann.Reptr.Dept. agr. Jamaica.* p.17-20. (Consultado Abstract no R.A.M. 8:631-632).
- STORY, G.E., R.S. HALLIWELL e L.R. SMITH. 1968. Investigacion de los virus de papaya (*Carica papaya* L.) en la Republic Dominicana, con apuntes especiales sobre la asociacion de un organismo del tipo my coplasma con la enfermedad "bunchy top". Division de Investigaciones Agricolas, Instituto Superior de Agricultura. *Bol. N° 14.* 12p.
- SUREKA, S.K., K. MATHUR e D.D. SHUKLA. 1977. Virus diseases of papaya (*Carica papaya*) in Udaipur. *Indian J. Micol. Pl. Pathol.* 7:115-121.
- THUNG, T.H. 1931. Smetstof en plantencel bij enkele viruzziekten van de tabaksplant. *Handel. Neder. Ind. Naturawetenschap. Congr.* 6:450-463.
- TOMLINSON, J.A. e R.J. SHEPHERD. 1978. Studies on mutagenesis and cross protection of cauliflower mosaic virus. *Ann. appl. Biol.* 90: 223-231.
- TORRES M.R. e D.C. GIACOMETTI. 1966. Virosis de la papaya (*Carica papaya* L.) en el valle del Cauca. *Agr. trop. (Colombia)* 22:27-38.
- WANG, H.L., C.C. WANG, R.J. CHIU e M.H. SUN. 1978. A preliminary study of papaya ringspot virus in Taiwan. *Plant Protec. Bull.* 20:133-140.
- WINGARD, S.A. 1928. Host and symptoms of ringspot, a virus disease of plants. *J. agr. Res.* 37:127-153.
- YEH, S.D. e D. GONSALVES. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74:1086-1091.
- ZETTLER, F.W., J.R. EDWARDSON e D.E. PURCIFULL. 1968. Ultramicroscopic differences in inclusions of papaya mosaic virus and papaya ringspot virus correlated with differential aphid transmission. *Phytopathology* 58:332-335.