

Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras



NPJV
5320
009
LV-PP-2010.00077

Obtenção de material ...

2009

LV-PP-2010.00077



AI-SEDE- 47402-1



ISSN 1516-8107
Outubro, 2009

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 69

Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras

Osmar Nickel
Thor Vinícius Martins Fajardo

Embrapa Uva e Vinho
Bento Gonçalves, RS
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515
95700-000 Bento Gonçalves, RS, Brasil
Caixa Postal 130
Fone: (0xx)54 3455-8000
Fax: (0xx)54 3451-2792
<http://www.cnpuv.embrapa.br>
sac@cnpuv.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Mauro Celso Zanus*
Secretária-Executiva: *Sandra de Souza Sebben*
Membros: *Alexandre Hoffmann, Flávio Bello Fialho, Kátia Midori Hiwatashi, Marcos Botton e Viviane Zanella Bello Fialho*

Normalização bibliográfica: *Kátia Midori Hiwatashi*
Elaboração da capa: *Luciana Elena Mendonça Prado*

1ª edição

1ª impressão 2009: 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Embrapa Uva e Vinho

Nickel, Osmar.

Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras / por Osmar Nickel e Thor Vinícius Martins Fajardo. -- Bento Gonçalves : Embrapa Uva e Vinho, 2009.

55 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Uva e Vinho, ISSN 1516-8107 ; 69).

1. Maçã. 2. Pera. 3. Propagação. 4. Vírus. 5. Limpeza clonal. 6. Cultura de tecido. I. Nickel, Osmar. II. Fajardo, Thor Vinícius Martins. III. Título. IV. Série

CDD 634.1 (21. ed.)

Embrapa 2009

Embrapa

Unidade: At - Sede

Valor aquisição: _____

Data aquisição: _____

N.º N. Fiscal/Fatura: _____

Fornecedor: _____

N.º OCS: _____

Origem: Docu

N.º Registro: 00037/2010

Autores

Osmar Nickel

Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho. E-mail: nickel@cnpuv.embrapa.br

Thor Vinícius Martins Fajardo

Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho. E-mail: thor@cnpuv.embrapa.br

Apresentação

O sucesso de qualquer sistema de cultivo agrícola passa inicialmente pela utilização de material de plantio livre de agentes fitopatogênicos. O plantio de mudas ou a utilização de estacas ou gemas contaminadas por viroses acarreta problemas ao desenvolvimento das plantas, na predisposição a outras doenças, na redução da absorção de nutrientes, na produção e qualidade final do produto.

Não há controle eficiente de vírus de plantas após a utilização de materiais vegetativos contaminados na implantação de pomares. As medidas são preventivas, ou seja, devem ocorrer antes do plantio no local definitivo. Estas medidas compreendem a seleção de plantas vigorosas e assintomáticas; os materiais vegetativos selecionados para propagação devem passar pela limpeza clonal e em seguida ser submetidos a análises para certificação da sanidade. Uma vez cumpridas estas etapas, as plantas básicas estão aptas a fornecerem material propagativo (borbulhas, estacas) a viveiristas e pomicultores para a produção de mudas sadias.

Torna-se extremamente importante a divulgação dessas informações para todos os técnicos e produtores, a fim de evitar a multiplicação e disseminação de viroses de macieiras e pereiras, tanto na região como no país. Só assim poderemos caminhar para um novo patamar tecnológico de qualidade na produção de pomáceas.

Lucas da Ressurreição Garrido
Chefe-Geral da Embrapa Uva e Vinho

Sumário

Introdução	9
Principais vírus da macieira e da pereira	13
Danos causados por vírus	15
Limpeza clonal: produção de macieiras e pereiras livres de vírus	19
1. Quimioterapia in vitro	20
2. Termoterapia in vivo e in vitro	21
3. Cultura de tecidos in vitro	23
Análises e testes de avaliação de sanidade	27
1. Diagnóstico biológico de vírus de macieiras e pereiras em indicadoras lenhosas	27
1.1. Diagnóstico biológico de <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	28
1.2. Diagnóstico biológico do <i>Apple stem grooving virus</i>	34
1.3. Diagnóstico biológico do <i>Apple stem pitting virus</i>	36
1.4. Diagnóstico biológico do <i>Apple mosaic virus</i> e outros vírus menos comuns	39
2. Indexagem biológica por inoculação mecânica de plantas herbáceas	41
3. Avaliação de sanidade por diagnóstico molecular, sorológico e imunomolecular de vírus de macieiras e pereiras	43
Referências bibliográficas	49
Agradecimentos	55

Introdução

A Região Sul do Brasil, com uma área plantada de cerca de 35.000 ha, é responsável por 98 % da produção nacional de maçãs, que, em 2007 atingiu 963.000 toneladas (BALANÇO..., 2007), das quais 55 % e 40 %, respectivamente, constituem-se de cultivares dos grupos Fuji e Gala e suas mutações clonais (MELLO, 2006). A ocorrência de viroses latentes de macieiras e pereiras, na Região Sul do Brasil, foi relatada anteriormente (LESSA et al., 1998; NICKEL et al., 2001; RADAELLI et al., 2004, 2006). Apesar da posição modesta do cultivo da pereira nesta região, em termos de área plantada, ela contrasta com importações de cerca de US\$ 100 milhões por ano. A despeito da falta de material propagativo sadio, há forte tendência ao incremento da área plantada. A pereira se depara aqui com problemas relativos à adaptação, à frutificação, à definição de manejo nas várias regiões de cultivo e seleção de cultivares de copas e porta-enxertos para os diferentes micro- e macroclimas, parâmetros que interagem com infecções virais. Estes patógenos são responsáveis por uma série de doenças em maçãs, peras, ameixas, pêssegos, marmelos, cerejas e damascos, afetando a produção e a qualidade dos frutos, o desenvolvimento de mudas e a longevidade do pomar (LEMOINE, 1990), podendo ainda induzir deformações, acelerar a maturação, e provocar alterações fisiológicas em frutos (GUERRA et al., 2007). Os primeiros cultivos comerciais da macieira iniciaram-se no Brasil ao final dos anos 1960, quando os programas de limpeza clonal nos países com tradição na produção de maçã, europeus e norte-americanos, começavam a produzir os primeiros resultados, acompanhados de legislação específica (LANKES, 1999). O fato de que, ainda nos anos 1990, a contaminação com vírus e similares em pomares e viveiros de maçã europeus atingia

cerca de 60% dos clones amostrados, dá uma idéia do caráter de longa duração de tal empreendimento (LEMOINE, 1990; CANDRESSE et al. 1995).

Assim, não surpreende que o material propagativo utilizado na implantação dos primeiros pomares brasileiros estivesse contaminado e que inclusive introduções recentes ainda apresentem graus consideráveis de contaminação.

Durante décadas, os programas IR-2 nos EUA e Canadá, e as rigorosas diretrizes para produção de material propagativo de alguns países europeus garantiram alto grau de sanidade dos principais clones comerciais em uso naqueles países. Recentemente, na UE, as regras foram alteradas, aparentemente para permitir a comercialização de materiais oriundos de países com padrões tecnológicos mais baixos e sistemas de controle de sanidade menos rigorosos.

A partir da "portaria européia sobre a comercialização de material propagativo e plantas para a produção de frutas", de 1993, criou-se uma terceira categoria de material propagativo ao lado de "livre de vírus" ("vf") e "testado" ("vt"), denominada "CAC" (*Conformitas Agraria Communitatis*). Nesta categoria garante-se que o material está livre de sintomas visíveis de doenças; vírus latentes e aqueles que não se expressam no viveiro são desconsiderados. Inspeção visual, entretanto, é método geralmente inadequado para seleção de plantas livres de vírus. Para se adequar a esta norma, os países membros adaptaram suas legislações. A Alemanha, por exemplo, por meio da Portaria Ministerial de julho/1998, AGOZ, sobre ornamentais, hortícolas e fruteiras, criou duas classes de material propagativo: 1) material certificado que preenche requisitos de sanidade viral, conforme fluxograma de tratamentos estabelecido pela mesma

portaria e 2) material “padrão” que corresponde à categoria “CAC” da UE com requisitos mínimos para comercialização na UE e para exportação.

No Brasil a publicação da Lei 10.711 (2003) e do Decreto 5.153 (2004) que a regulamenta, assim como as normas específicas para produção de mudas de fruteiras, em processo de elaboração, definiram parâmetros de qualidade para estes produtos. Embora o conceito “livre de vírus” não tenha sido absorvido por estes marcos regulatórios, normas subsequentes mencionam os agentes virais cuja ausência deve ser garantida por produtores e comerciantes de mudas.

Principais vírus da macieira e pereira

Os vírus de plantas são agentes patogênicos, cuja natureza intracelular obrigatória cria numerosas situações em que eles interagem de forma parasítica com proteínas e ácidos nucléicos do metabolismo vegetal.

Segundo a virulência do isolado viral e a suscetibilidade do tecido afetado, eles podem manifestar-se em folhas, flores, frutos, na casca e na madeira de troncos e galhos estruturais, ramos e em raízes. A invasão dos tecidos da macieira e pereira por estes agentes é sistêmica, porém, geralmente, desuniforme.

Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis na maioria das cultivares comerciais de macieiras, os vírus "latentes" podem passar despercebidos e serem propagados indefinidamente. Incluem-se neste grupo: o "vírus do acanalamento do tronco da macieira" (*Apple stem grooving virus*, ASGV), "vírus das caneluras do tronco da macieira" (*Apple stem pitting virus*, ASPV), "vírus da mancha clorótica da folha da macieira" (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) e o "descascamento de *Malus platycarpa*" (inglês: "platycarpa scaly bark") e o "nanismo de platycarpa" (inglês: "platycarpa dwarf"), ainda não caracterizados, o primeiro detectado por indexagem biológica em clones de macieiras oriundas de SC (CRESTANI, 2000; ZAHN, 1996). Várias disfunções de relevância econômica em pereiras e marmeleiros e a "epinastia e declínio do Spy 227" são causados por ASPV (PAUNOVIC et al., 1999; PAUNOVIC; RANKOVIC, 1998).

Os vírus latentes ASGV (gênero *Capillovirus*), ASPV (gênero *Foveavirus*) e ACLSV (gênero *Trichovirus*), todos da família *Flexiviridae*, têm genomas

de RNA de fita simples, senso positivo, partículas alongadas e flexuosas, caudas adeniladas na extremidade 3', não têm vetores naturais conhecidos e sua transmissão ocorre somente pela enxertia. As subunidades da capa protéica dos três vírus latentes têm massa molecular de, respectivamente, 27, 44 e 22 kDa (GERMAN et al., 1990; JELKMANN, 1997; NICKEL et al., 2004a).

Incluem-se no segundo grupo o "vírus do mosaico da macieira" (*Apple mosaic virus*, ApMV) e outros agentes transmissíveis pela enxertia, responsáveis por danos aos troncos, galhos e ramos, a exemplo da "depressão do lenho" (inglês: "flat limb"), "casca áspera" (inglês: "apple rough skin") e "ruga verde" (inglês: "green crinkle"), "rachadura-estrela" (inglês: "star crack") de natureza desconhecida ou causados por viróides e, geralmente, removíveis por termoterapia (HOWELL et al., 1998).

O ApMV (gênero *Ilarvirus*, família *Bromoviridae*) é um patógeno cosmopolita cujos hospedeiros naturais incluem um amplo espectro de espécies vegetais. O vírus é transmissível por pólen, possui genoma composto por três RNAs (triparticulado) de fita simples de senso positivo, subunidades da capa protéica com massa molecular de 27 a 28,8 kDa e partículas isométricas (SHIEL et al., 1995).

Com a eliminação destes vírus por termoterapia, o material recebe a denominação "v", que implica em que o mesmo está livre dos vírus para os quais se conhecem métodos diagnósticos.

O diagnóstico de vírus em fruteiras por indexagem enxertar num porta-enxerto de cerca de 0,8 cm de espessura, oriundo de semente, 2 borbulhas da espécie-candidata e acima destas, uma borbulha ou estaca da espécie indicadora em casa de vegetação, telados ou estufas.

Danos causados por vírus

Entre os danos mais comumente causados por infecções virais em macieiras e pereiras, destacam-se:

Redução de produção e da qualidade dos frutos. Pode variar tanto em maçãs (LEMOINE, 1990) (Tabela 1) como peras (ENGEL, 1987) (Tabela 2) e ser superior a 50 % segundo a variedade, o(s) isolado(s) de vírus ou a mistura dos vírus. Os frutos de macieiras virosadas acumulam-se nas classes de menor calibre (NICKEL et al., 2008).

Tabela 1: Efeito de vírus latentes e diferentes isolados de *Apple mosaic virus* na produção de macieiras sobre M26.

Vírus	Produção (média de 6 anos)			
	Golden Delicious		Granny Smith	
	kg/planta	%	kg/planta	%
Testemunha livre de vírus	128,5	100	115,6	100
ACLSV	108,6	84,5	95,9	82,9
ASPV	102,7	80,0	96,5	83,5
ASGV	112,1	87,2	101,2	87,5
ACLSV + ASPV + ASGV	101,8	79,2	75,5	65,3
Vírus	Produção (média de 8 anos)			
Testemunha livre de vírus	188,6	100	205,8	100
Mosaico I	156,7	83,1	186,2	90,5
Mosaico II	96,1	50,9	104,9	51,0

Fonte: Lemoine (1990).

Tabela 2: Efeito do porta-enxerto sobre vigor e produção de pera cv. Conference sobre marmeleiros infectada com *Apple stem pitting virus* e "lenho mole" (média/planta).

Porta-enxerto	Pereiras infectadas			Pereiras livres de vírus		
	Diâmetro do tronco (cm)	Produção (kg)	Produção % da referência sadia	Diâmetro do tronco (cm)	Produção (kg)	Produção referência livre de vírus
Marmelo C	4,4	25,2	37	5,9	68	100
Marmelo Adams	4,1	23,0	36,3	5,7	63,4	100
Marmelo A	4,8	27,4	39,8	6,5	68,8	100
Marmelo Provence	5,5	32,0	51,3	7,1	62,4	100

Fonte: Engel (1987).

Redução do vigor de mudas e plantas. As plantas têm pouco vigor, são desuniformes (Fig. 1A), as mudas morrem no viveiro (Fig. 1B) ou declinam nos primeiros anos após a implantação do pomar; diâmetro de troncos, calibre de frutos, do comprimento dos ramos laterais e da brotação são afetados (LEMOINE, 1990; GILLES; VERHOYEN, 1992; NICKEL et al., 1999; NICKEL et al., 2001) (Fig. 1A).

Na comparação da influência do porta-enxerto e da sanidade, estudos com peras européias revelam que a sanidade das plantas tem uma relevância muito maior na produção e vigor do que o porta-enxerto. Enquanto a influência dos porta-enxertos atingiu 40 % a 100 %, as diferenças positivas da ausência de vírus, em quase todos casos, atingiu valores de produção duas a três vezes superior às plantas infectadas por vírus (Engel, 1987). Observação semelhante foi feita com outras cultivares de pera (Cropley; Posnette, 1973) enxertadas em marmelo A.

Foto: Osmar Nickel

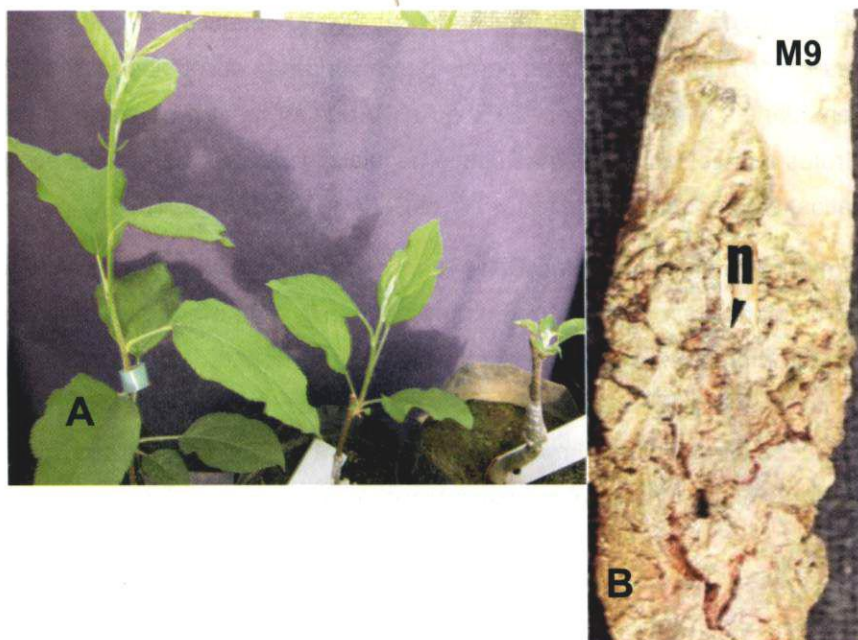


Fig. 1: **A.** Brotação desuniforme de enxertos, um mês após a enxertia de estacas virosadas. **B.** Planta de viveiro sobre Maruba, filtro M9, um ano de idade, necrose da casca do porta-enxerto com infecção de ASGV (n).

Aumento da predisposição a infecções fúngicas. Destacam-se cancrios do lenho, podridões radiculares, de frutos e do colo (AGRIOS, 1966; CAMPBELL, 1969; BAUMANN; LOUIS, 1980), e manchas foliares (GUERRA et al., 2007).

Redução de aproveitamento de fertilizantes e da absorção de nutrientes e favorecimento de desequilíbrios fisiológicos e colapso de células da polpa (CAMPBELL; BOLD, 1974; HELM; LÜDDERS, 1982; ENGEL, 1996). Incluem-se aqui a redução da armazenabilidade, qualidade pós-colheita e vida de prateleira (BAUMANN; LOUIS, 1980). A firmeza dos frutos virosados é negativamente afetada (GUERRA et al., 2007).

Redução da floração e da fertilidade das flores. Relativamente a plantas sadias, o número de botões florais de várias peras europeias foi reduzido em plantas infectadas por ASPV e ApMV que também produziram menos frutos que as sadias. Gemas florais de plantas sadias são, conclui-se, mais eficazes na produção de frutos (CROPLEY; POSNETTE, 1973).

Embora os efeitos de infecções virais dependam da cultivar e do isolado viral, plantas viroçadas são, geralmente, garantia de menor rentabilidade dos pomares. Infecções virais inviabilizam a exploração completa do potencial genético da cultivar e de sistemas de produção que visam a redução do uso de insumos sintéticos como a produção integrada, produção orgânica e/ou de base agroecológica.

Limpeza clonal: produção de macieiras e pereiras livres de vírus

O controle de vírus é sempre profilático. Não há métodos curativos ou princípios ativos aplicáveis em pomares, exceto aqueles dirigidos à limpeza do material propagativo e procedimentos laboratoriais. Planta infectada, uma vez no pomar, permanece infectada e é irrecuperável. O único controle eficiente de vírus de fruteiras, que se transmitem pela enxertia, consiste no uso de plantas livres de vírus na formação do pomar.

Considerando-se o espectro de temperaturas em que plantas são cultivadas, aumento de temperatura acima de certos níveis reduz a replicação e o movimento dos vírus em plantas. Entre 35 °C e 40 °C, geralmente, pouco vírus é produzido e a mobilidade das partículas é substancialmente reduzida (HULL, 2004), dando margem à formação de tecidos que escapam à invasão por partículas virais.

A obtenção de plantas livres de vírus se dá por:

- a) prospecção de “escapes” naturais (procura de plantas que permaneceram sadias em pomares e bancos de germoplasma) via indexagem massal. Segregação negativa espontânea é, entretanto, um evento muito raro;
- b) indução desses “escapes” por:
 - b1) quimioterapia;
 - b2) termoterapia;

b3) cultura de meristemas, também chamada “terapia regenerativa”.

Os procedimentos para eliminar vírus de plantas caracterizam ações de duração longa, pois envolvem além da sua execução física, uma série de etapas adicionais, como a aclimação, indexagem biológica, análises sorológicas e moleculares, controle de autenticidade varietal e monitoramento periódico de matrizes fornecedoras de material propagativo para detecção de eventuais reinfecções.

1. Quimioterapia in vitro

A quimioterapia com substâncias que interferem na replicação dos ácidos nucléicos virais, somente em casos isolados demonstrou eficácia curativa em campo e somente em plantas herbáceas (WHITE; ANTONIW, 1983). Mais promissor é seu uso como tratamento individual ou associado à termoterapia in vitro (PANATTONI et al., 2007), à cultura de meristemas ou como alternativa a estas. Na prática, é comum a associação de métodos, visando ao aumento da eficácia do processo de remoção de vírus. Entre as substâncias mais utilizadas e pesquisadas como agentes anti-virais destacam-se flavonóides, substâncias naturais muito disseminadas no reino vegetal como glicirizina, quercetina, morina (JAMES et al., 1997). Outras substâncias com atividade contra uma série de vírus de plantas são os análogos de bases como ribavirina, dioxihexahidrotiazina (DHT) e deshdroxipropiladenina (DHPA) (PANATTONI et al. 2007). Interferindo em caminhos metabólicos, estas substância estão envolvidas num complexo mecanismo de interrupção da síntese dos vírus em animais e plantas. Para o tratamento quimioterápico de plantas, internós da cultivar-candidata são colocados em meio de proliferação (MS), (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e as brotações deles originadas são transferidas para meio de

cultivo MS contendo os agentes anti-virais por cerca de 3 meses. Na sequência, as plantas voltam para meios MS básicos sem os agentes anti-virais para desintoxicação, proliferação e enraizamento *in vitro*. Seguem-se a aclimação e as análises de sanidade em laboratório e casa de vegetação.

2. Termoterapia *in vivo* e *in vitro*

A remoção de infecções virais de clones de macieiras e pereiras, a chamada limpeza clonal, utiliza-se, basicamente, da termoterapia, em conexão com a minienxertia *in vivo* de brotações apicais e laterais ou com a excisão e cultivo de meristemas *in vitro* (KNAPP et al., 1995). A termoterapia é feita geralmente a temperaturas de 37 °C a 38 °C por 4 a 5 semanas, durante as quais ocorre a indução de brotações, geralmente, livres de vírus por escape, com termo-fotoperíodo automatizado de 16 h de dia/8 h de noite, com molhação regular e alta umidade mantida por umidificador em câmaras (Fig. 2), que devem preencher três requisitos básicos: que sejam controláveis, confiáveis e permitam exposição a temperaturas constantes.

Nestas condições de temperatura, o crescimento vegetativo da planta é mais rápido que a replicação e o movimento do vírus na planta. Como consequência as brotações apicais e laterais têm alta probabilidade de estarem livres de vírus. Estas brotações (cerca de 2,0-2,5 cm) são cortadas e enxertadas em cunha em porta-enxertos de sementes semi-herbáceos (caule com ~3,0 a 4,0 mm de espessura) e aclimatadas por cerca de 15-20 dias em câmaras úmidas formadas por copos ou sacos plásticos (Fig. 3A, B e C).

Foto: Osmar Nickel



Fig. 2: Câmara de termoterapia, lâmpadas de vapor de mercúrio (topo); placas de irradiação de calor (interior) com sistema de exaustão de ar.

Foto: Osmar Nickel



Fig. 3: **A.** Procedimento de remoção de vírus: Corte da brotação do porta-enxerto M9 emitida sob termoterapia. **B.** Enxertia do broto em plântula de semente. **C.** Acclimação em câmara úmida.

É previsível que a termoterapia in vivo seja completamente substituída pela termoterapia in vitro para remoção de vírus de plantas. Esta variante é realizada em câmaras tipo BOD que permitem melhor controle da temperatura, luz e umidade, e maior eficiência na obtenção de tecidos livres de vírus, ou ainda a execução conjunta, ou em sequência, com a quimioterapia. Adicionalmente, a termoterapia in vitro permite trabalhar-se com grande número de amostras em pequeno espaço o que implica em substancial redução do consumo de energia.

A termossensibilidade varia de vírus para vírus. A remoção do *Citrus tatter leaf virus* (CTLV) em citros, um isolado de ASGV, por exemplo, só é atingida após termoterapia de 3-4 meses. De maneira geral, ACLSV e ApMV são mais termossensíveis e ASGV é bastante termo-estável e, geralmente, não é eliminado somente pela termoterapia, que pode ser um pré-tratamento do material a ser submetido à cultura de meristemas que aumenta a eficácia do processo de remoção de vírus. Interessantemente, a porcentagem de eliminação de ASGV de macieiras in vitro foi maior quando feita de tecido duplamente infectado por ASGV e ACLSV (KNAPP et al., 1995).

3. Cultura de tecidos in vitro

Paralelamente à enxertia in vivo de brotações, procede-se à excisão e cultivo de meristemas in vitro. O meristema é um tecido ainda não diferenciado de cerca de 0,15 a 0,20 mm de comprimento, que é extraído sob lupa em condições assépticas, de tecidos submetidos previamente à termoterapia ou não, e cultivado em meios de cultivo de iniciação, proliferação e enraizamento (Fig. 4A), conforme procedimentos e protocolos já descritos (HUTH, 1978; MURASHIGE; SKOOG, 1962). As

plântulas regeneradas são aclimatadas em casa de vegetação em condições similares às da câmara de crescimento (baixa luminosidade e alta umidade) por cerca de 45 a 60 dias, reduzindo-se gradativamente a umidade por meio do aumento do número de orifícios dos copos plásticos (Fig. 4B) até que as plântulas tornem-se resistentes a condições naturais de luz e umidade.

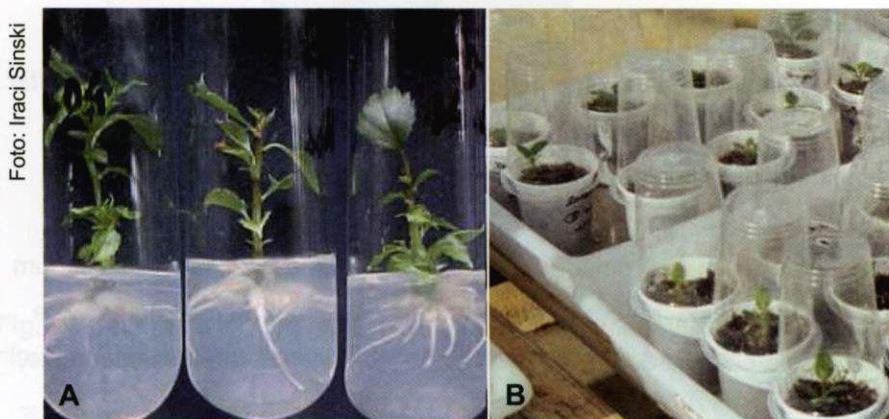


Fig. 4: A. Enraizamento in vitro de plântulas regeneradas de meristemas. B. Aclimação em casa de vegetação.

Por meio destes procedimentos foram obtidos numa primeira fase, plantas livres de vírus das cvs. Imperial Gala, Royal Gala, Gala Standard, Fuji Standard, Fuji Irradiada, Belgolden e de clones dos porta-enxertos de macieiras Maruba, M9, M7 e M26. Mais recentemente foram submetidas à limpeza e obtidas plantas livres de vírus das cvs. Fuji Suprema, Willy Sharp, Cripps Pink, outros clones de Maruba. Termonúmeros (plantas resultantes de termoterapia) das cultivares Maxi Gala, Fuji More, Mishima e os porta-enxertos M9 encontram-se atualmente em fase de avaliação de sanidade. Em peras livres de vírus obtidas pelos mesmos procedimentos

destacam-se a cv. William's e Carrick e a cv. asiática Yali além do porta-enxerto semi-anão Pyrodwarf (Old Home x Bonne Louise D'Avranches), alternativa para a cv. William's devido à incompatibilidade desta com o marmelo Adams, que produz necrose na região da enxertia, levando as plantas ao declínio na ausência de um filtro.

Análises e testes de avaliação de sanidade

Todas plantas obtidas por qualquer método de remoção de vírus de tecidos vegetais têm que ser submetidas a uma avaliação do êxito destes procedimentos, devido às características biológicas destes agentes, à desuniformidade da distribuição de partículas virais nos tecidos vegetais e ao caráter aleatório do processo de limpeza. A execução do processo de remoção em si, geralmente, não é garantia de sanidade. Os testes mais utilizados são análises moleculares, sorológicas e testes biológicos de sanidade (JELKMANN, 2004).

1. Diagnóstico biológico de vírus de macieiras e pereiras em indicadoras lenhosas

A indexagem biológica, embora de simples execução física, requer uma boa infra-estrutura e familiaridade considerável com as indicadoras.

A manutenção de temperaturas amenas para otimizar a expressão de sintomas da maioria das indicadoras é fundamental (FRIDLUND, 1970).

A ausência de sintomas de ACLSV em *P. veitchii* (espectro ótimo de reação 18 °C a 22 °C), por exemplo, mantidas a 22 °C-26 °C, cuja infecção por ACLSV foi comprovada por ELISA, demonstra a relevância das condições ambientais para a expressão de sintomas virais e a boa sensibilidade deste teste biológico (SIEBERT; ENGELBRECHT, 1981).

A indexagem biológica inicia-se no final da primeira enfolhagem, uma vez que o tratamento pode ter promovido nas plantas oriundas de termoterapia

e cultura de tecidos simplesmente uma redução da concentração de vírus, inferior ao nível de detecção. Análises muito precoces contêm o risco de falsos-negativos. Em decorrência, os testes se estendem por 2-3 anos quando a concentração de vírus, porventura não eliminado, atingiu novamente níveis detectáveis. O mesmo fato determina a necessidade do monitoramento periódico de matrizes já indexadas (GILLES; VERHOYEN, 1992). A indexagem é feita por enxertia de borbulhas da espécie-candidata e acima destas, uma borbulha ou estaca da espécie indicadora em cada porta-enxerto (JELKMANN, 2004), ou por inoculação mecânica de extratos (suco) de tecidos doentes (preferencialmente botões florais e pétalas, casca de frutos, frutos amassados ou folhas bem jovens) em indicadoras herbáceas. São métodos facilmente assimiláveis por produtores e viveiristas e utilizáveis em pomares e viveiros. A indexagem em indicadoras lenhosas requer um longo período de avaliação, é trabalhosa e influenciada pela suscetibilidade das indicadoras, pelas características biológicas dos isolados virais e condições ambientais em que é executada.

1.1. Diagnóstico biológico do *Apple chlorotic leaf spot virus*

O vírus da mancha clorótica foliar da macieira (ACLSV) infecta, além da macieira, também pereira, ameixeira, cerejeira, marmeleiro, damasqueiro e outras espécies de rosáceas frutíferas e ornamentais, além de espécies de outros gêneros. Tem grande relevância econômica, devido ao seu potencial de dano e à diversidade de isolados e de doenças que induz. Os isolados chamados ACLSV "biótipo Maruba" são latentes em Marubakaido (*Malus prunifolia* var. *ringo*) (MINK, 1989). Ao contrário, os isolados "típicos" podem causar declínio e morte de plantas enxertadas em Maruba-

kaido (YANASE, 1974; MINK, 1989), geralmente ainda no viveiro ou após o transplante para o pomar, devido aos cancrios causados no floema (casca) e às caneluras do xilema (madeira) que destroem o sistema vascular dos porta-enxertos sensíveis. Na região de São Joaquim, SC, observou-se declínio e morte de macieiras com infecção de ACLSV em diversas combinações de copas (Gala, Fuji) e filtros (M9, M106) e a perda de pomares em declínio de cerca de 3-9 anos com fortes caneluras, depósitos necróticos de floema degradado nas depressões da madeira e protuberâncias correspondentes da casca no porta-enxerto Maruba-kaido (Fig. 5). Observe-se que os sintomas atingem somente o porta-enxerto sensível, mas é latente nas copas, aparentemente sadias. Análises por ELISA de pétalas dessas plantas de Fuji/Maruba revelaram a presença de ACLSV em todas amostras. Os sintomas observados são semelhantes ao declínio descrito no Japão em Maruba-kaido infectados com a “doença da sobre-enxertia”, que aparecia cerca de 5 anos após a sobre-enxertia das copas – prática comum para a troca de copas (YANASE, 1974), levando as plantas à morte; nas plantas observadas aqui o declínio se expressa de forma mais lenta.

Várias cultivares/espécies de *Malus* spp. reagem à infecção de ACLSV com uma gama de sintomas e são usadas como indicadoras. Estes sintomas incluem caneluras no xilema (madeira) (Fig. 5), manchas foliares translúcidas ou cloróticas, linhas e anéis cloróticos, clorose de nervuras, necrose e distorção assimétrica foliar (Fig. 6A e B), necrose do floema (casca), declínio e morte da planta.

As plantas indicadoras mais utilizadas para detecção de ACLSV em macieiras são *Malus domestica* cv. LL-S5 (seleção da cv. Lord Lambourne, Juarez Betti, IAC, Campinas, SP), cv. Spy 227, *M. adstringens*, cv. Hopa e

M. platycarpa. Essas indicadores destacam-se pela alta sensibilidade e reação rápida.

Os sintomas em LL-S5 são necrose foliar, mosaico e deformação do limbo foliar na primeira brotação p.i. (pós-inoculação) (Fig. 7A), clareamento e bandeamento clorótico de nervuras e manchas necróticas (Fig. 7B).

ACLSV induz cerca de 6-8 semanas p.i. na cv. Hopa retardamento da brotação, deformação das folhas, manchas cor vermelho-vinho (Fig. 8A), crescimento assimétrico das folhas (Fig. 8B) e manchas vermelhas que se tornam necróticas (Fig. 8C). No segundo ano pode-se observar caneluras na madeira após remoção da casca (Fig. 9A e B).

Foto: Osmar Nickel

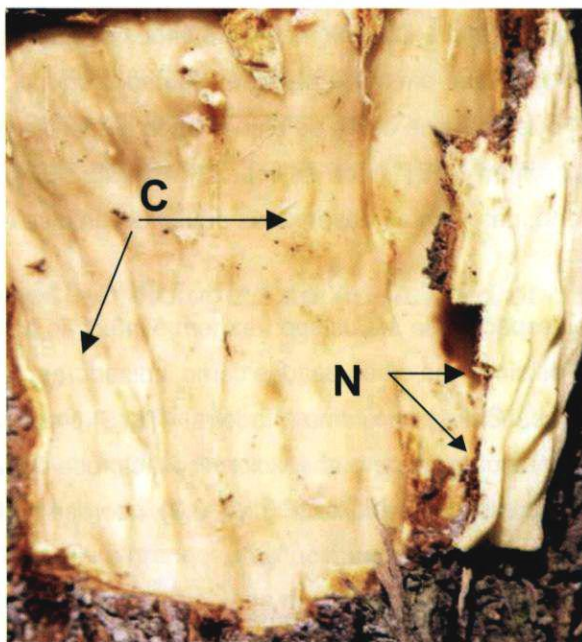


Fig. 5: Cultivar Fuji, 9 anos, sobre Maruba-kaido. Caneluras (c) e necrose da casca (n) do porta-enxerto causadas por ACLSV.

Foto: Osmar Nickel

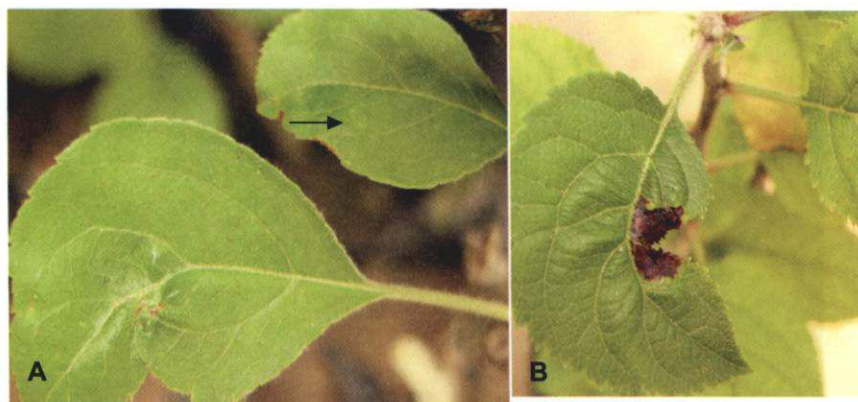


Fig. 6: A e B. Necroses e distorção foliar assimétrica e manchamento clorótico (seta) causados por ACLSV em cultivares comerciais.

Foto: Osmar Nickel

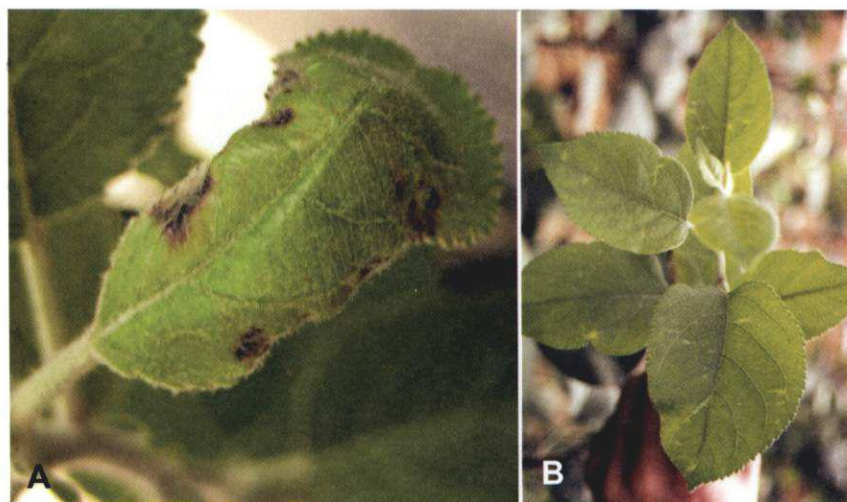


Fig. 7: A. Forte necrose e deformação foliar. B. Manchamento clorótico em *M. domestica*, cv. LL-S5 causados por ACLSV.

Foto: Osmar Nickel

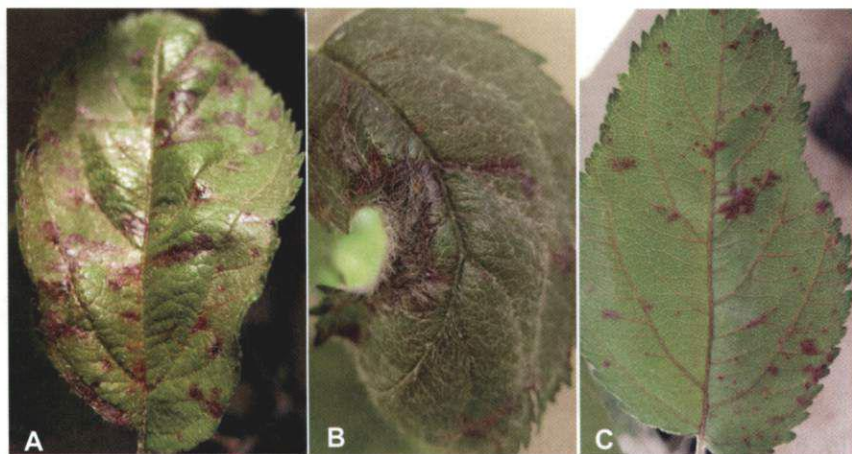


Fig. 8: A e C. Manchas foliares cor vermelho-vinho. B. Necrose e deformação de folhas, causadas por ACLSV em *M. adstringens* cv. Hopa.

Foto: Osmar Nickel

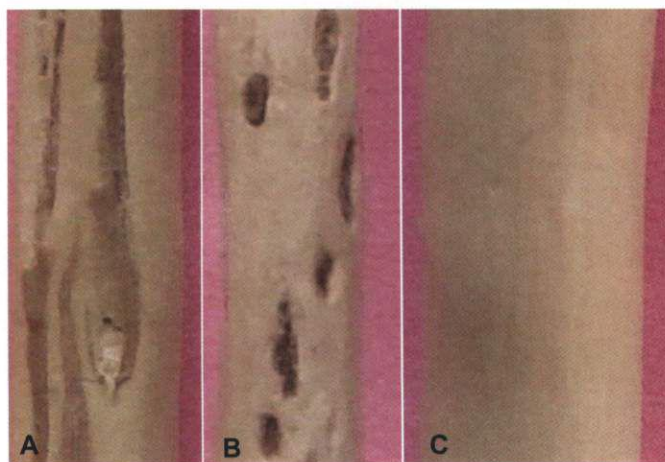


Fig. 9: A e B. Caneluras e depósitos de tecidos necrosados nas ranhuras provocados por ACLSV no caule da cv. Hopa. C. Caule sadio.

A cv. Hopa expressa melhor os sintomas a temperaturas de 18 °C a 22 °C, tornando-se quase assintomática acima de 25 °C-26 °C (FRIDLUND, 1970). Os clones de *M. platycarpa* aqui utilizados desenvolveram manchas, linhas e anéis cloróticos, persistentes nos meses de verão, quando infectados com ACLSV (Fig. 10). A disfunção conhecida por “descascamento de platycarpa” é transmissível pela enxertia. Já constatada nas regiões produtoras de maçãs (RS e SC), induz folhas pequenas e cloróticas na base dos ramos e necrose de nervuras na face inferior das folhas de *M. platycarpa*.

Foto: Osmar Nickel

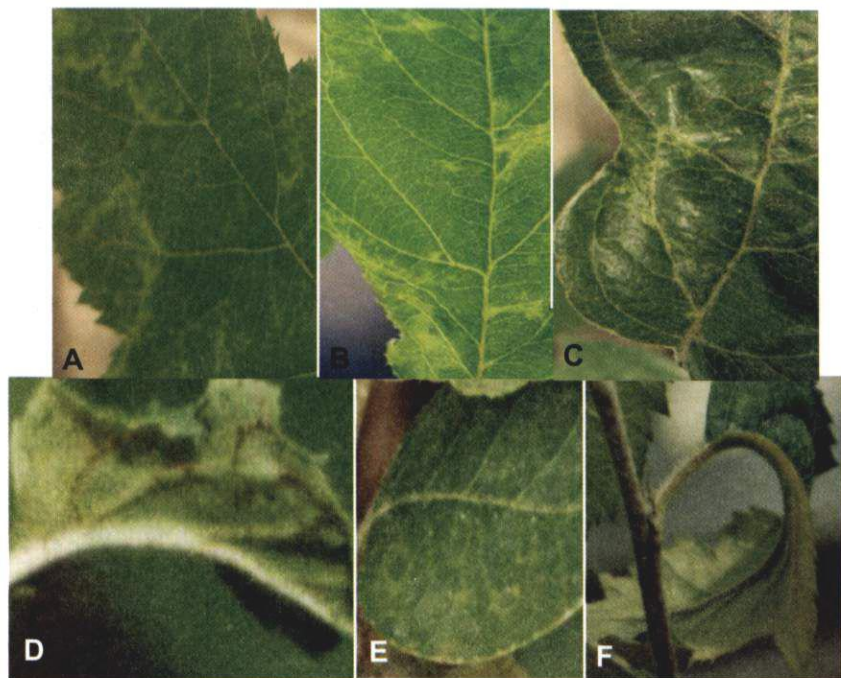


Fig. 10. Sintomas provocados por ACLSV em *Malus platycarpa*: **A e B.** Linhas e manchas cloróticas. **C.** Deformação de folhas. **D.** Necrose de nervuras. **E.** Anéis amarelos em folhas da base dos ramos causadas pelo “descascamento de Platycarpa”. **F.** Epinastia foliar causada pelo “nanismo de Platycarpa”.

A disfunção “mancha anelar da pera” (inglês: “pear ring pattern mosaic”) causada por ACLSV em folhas e frutos é indexada nas cvs. Nouveau Poiteau e Beurré Hardy; as enfermidades de natureza desconhecida “necrose da casca”, “queda de botão floral”, “rachadura da casca” e “casca áspera” (inglês: respectivamente, “bark necrosis”, “bud drop”, “bark split” e “rough bark”) são indexadas em Beurré Hardy.

1.2. Diagnóstico biológico do *Apple stem grooving virus*

O vírus do acanalamento do tronco da macieira (ASGV) infecta um espectro considerável de hospedeiros, incluindo variedades comerciais de maçãs (*Malus domestica*), *Citrus* spp., lírios e espécies de quivi (*Actinidia* spp.). Em plantas jovens, formadas sobre clones de Maruba-kaido (*M. prunifolia* var. *ringo*), um porta-enxerto cuja utilização tem se expandido fortemente no Brasil com o intuito de compensar o fraco enraizamento do porta-enxerto M9, ASGV provoca cancrios que destroem completamente a casca do tecido sensível (Fig. 1B) e têm efeitos devastadores nos viveiros. Várias ocorrências massais de cancrios causados por ASGV levando à morte milhares de plantas das cultivares Gala, Fuji, Pink Lady, Belgolden, Imperatriz, Fred Hough, Braeburn e outras, todas sobre Maruba-kaido, foram observadas em viveiros (SC e RS) (NICKEL et al, 1999; 2001).

As espécies *M. domestica* cv. Virginia Crab, *Malus yunnanensis* e *Malus micromalus* clone GMAL 273 são as mais usadas como indicadoras de ASGV. As folhas de ‘Virginia Crab’ infectada com ASGV tornam-se cloróticas ou apresentam necrose foliar, crescimento assimétrico da folha e manchas cloróticas somente na primeira brotação p.i. No tronco aparecem, a partir de um ano p.i., caneluras sob a casca e necrose na união de

enxertia formando uma linha marrom-escura (Fig. 11A) e ausência de soldadura à qual se segue o declínio e/ou morte da planta (Fig. 11B).

Foto: Osmar Nickel

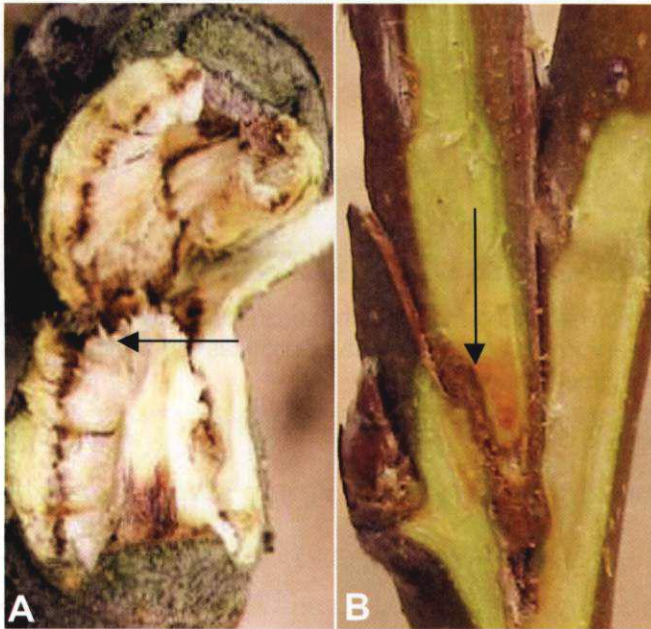


Fig. 11: **A.** Necrose na união da enxertia (seta) entre Virginia Crab (VC) e porta-enxerto. **B.** Ausência de soldadura e necrose (seta), induzidas por ASGV, respectivamente 24 (campo) e 12 (estufa) meses pós-enxertia.

M. micromalus (GMAL 273) é uma indicadora de reação rápida, desenvolve sintomas diagnósticos pronunciados a partir de 4-6 semanas p.i, consistindo de manchas cloróticas, necrose foliar, avermelhamento e deformação de folhas (Fig. 12A). *M. yunnanensis* (GMAL 2342) reage à infecção de ASGV em 6 a 12 semanas p.i. com distorção, deformação, necrose foliar e manchas cloróticas foliares (Fig. 12B). A enxertia interespecífica induz desenvolvimento fraco e lento de ambas espécies em *M. domestica* e dificulta sua propagação.

Foto: Osmar Nickel

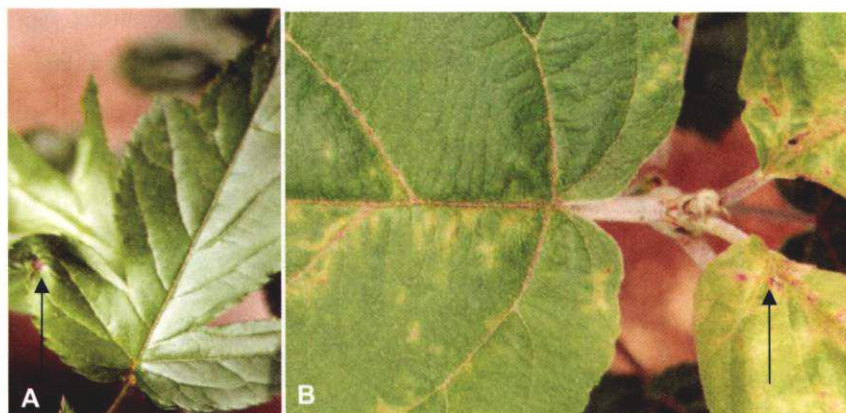


Fig. 12: **A.** Necrose foliar em *M. micromalus* clone GMAL 273 (seta). **B.** Necrose de nervuras (seta) e manchas cloróticas em *M. yunnanensis*, induzidas por infecção de ASGV.

1.3. Diagnóstico biológico do *Apple stem pitting virus*

O vírus das caneluras da macieira (ASPV) ocorre, frequentemente, em combinação com ACLSV e/ou ASGV, causando fortes reduções de produção e vigor e de qualidade dos frutos (RICH, 1967). O mesmo ASPV que induz caneluras em Virginia Crab, causa epinastia e declínio na cv. Spy 227 e uma extensa gama de patologias em macieiras, pereiras europeias e asiáticas e em marmelos (LEMOINE, 1979; PAUNOVIC; RANKOVIC, 1998; PAUNOVIC et al., 1999; JELKMANN, 1997). Entre estas últimas se destacam o “amarelamento de nervuras” da pereira (inglês: “pear vein yellows”) e o “empedramento da pera” (inglês: “pear stony pit”); ambas doenças, juntamente com a “mancha anelar ferruginosa do marmelo” (inglês: “quince sooty ringspot”) são indexadas na pera cv. Nouveau Poiteau. Esta última pode ainda, juntamente com a “deformação de frutos do marmelo” (inglês: “quince fruit deformation”), ser indexada nas

peras cvs. Beurré Hardy e Jules D'Airolles ou em marmelo cvs. Pigwa 1 ou C7/1 (JELKMANN, 2004).

Embora geralmente assintomático em cultivares comerciais de maçãs, ASPV induz sintomas em espécies indicadoras de *Malus*, algumas delas ornamentais. As indicadoras mais amplamente utilizadas são as cvs. Virginia Crab, Spy 227 e Radiant Crab. Virginia Crab inoculada com ASPV desenvolve caneluras no xilema de severidade variável em, no mínimo, cerca de um ano p.i. Em Spy 227 observa-se em cerca de 6 a 8 semanas p.i. epinastia severa (enrolamento da folha para a face inferior) (Fig. 13A) e um ano p.i. necrose do floema (casca), caneluras e exsudato marrom no xilema (madeira) (Fig. 13B).

Foto: Osmar Nickel

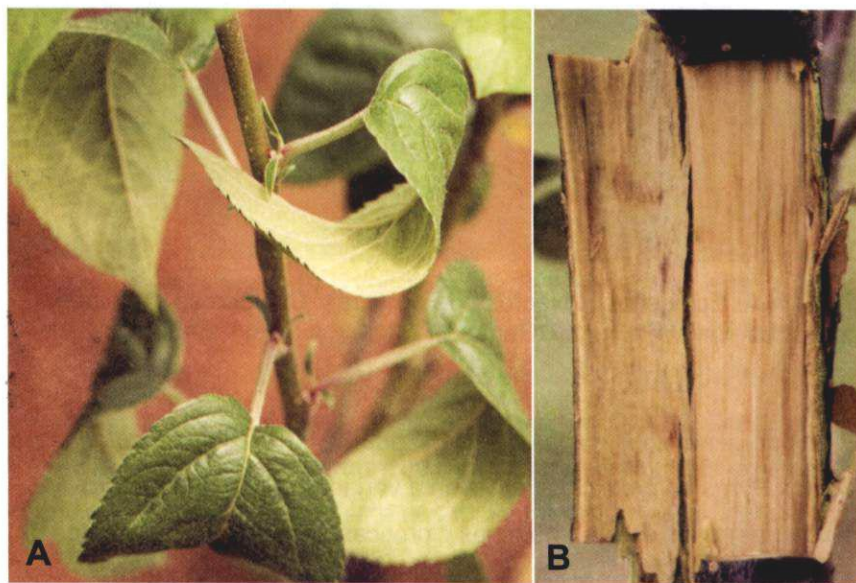


Fig. 13: A. Epinastia foliar. B. Necrose na casca e caneluras, exsudação e depósitos de goma na madeira na cv. Spy 227, causadas por ASPV.

Em consequência da destruição do sistema vascular ocorre a morte de ponteiros e finalmente o declínio. Manchas, linhas e anéis cloróticos sem epinastia foliar em Spy 227, geralmente, são causados pela presença de ACLSV. A cv. Radiant Crab, mais sensível que Spy 227, apresenta na primeira brotação p.i. epinastia foliar, manchas cloróticas e necróticas (Fig. 14A), necrose de nervuras (face inferior) (Fig. 14B) e deformação e necrose foliar (Fig. 14C).

Foto: Osmar Nickel

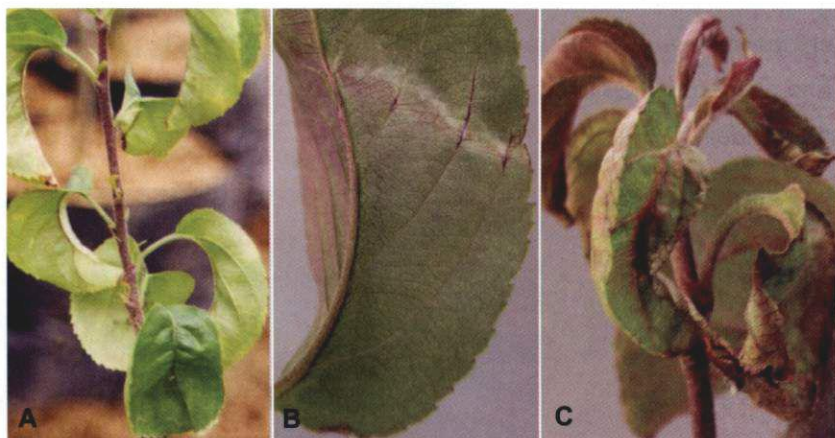


Fig. 14: A. Epinastia. B. Necrose de nervuras. C. Necrose de folhas, causadas por ASPV na cv. Radiant Crab.

O híbrido genérico *Pyronia veitchii* ((Trabut) Guill.) (*Cydonia oblongua* Miller x *Pyrus communis* L.) apresenta variada reação na madeira (caneluras) e em folhas (manchas cloróticas), aos três vírus latentes da macieira e da pereira, ASPV, ASGV e ACLSV (VAN DER MEER, 1973: SIEBERT; ENGELBRECHT, 1981), incluindo disfunções da maçã, assim como da pera e do marmelo já mencionadas, pelo que pode ser um versátil substituto ou complemento das outras indicadoras, significando grande redução de custos e tempo de indexagem. Sua melhor reação

biológica situa-se entre 18 °C e 22 °C, similar à c. v. Hopa. A enxertia de *P. veitchii* é feita em *Pyrus* spp. devido à incompatibilidade interespecífica com *Malus* spp. que provoca uma necrose na união de enxertia, imitando um sintoma de infecção viral.

1.4. Diagnóstico biológico do *Apple mosaic virus* e outros vírus menos comuns

O vírus do mosaico da macieira (ApMV) ocorre naturalmente num grupo grande de espécies vegetais, incluindo maçã, pera, pêssego, ameixa, lúpulo, avelã, morango, essências florestais (*Betula* sp.), *Rubus* sp. e rosas. A evidência dos sintomas que causa, permite, geralmente, ao viveirista e ao pomicultor eliminar plantas infectadas. Como os sintomas foliares variam, entretanto, segundo a virulência do isolado e a sensibilidade da cultivar e as condições ambientais e podem ser muito tênues, podem passar despercebidos. É comum as cvs. Gala e Granny Smith conterem o vírus de forma latente. Após períodos de forte expressão de sintomas podem ocorrer flores anormais, atrofiadas e queda de frutos jovens. O efeito de ApMV é especialmente danoso em infecções mistas (LEMOINE, 1990), podendo ser indexado nas cvs. Golden Delicious, Jonathan, Granny Smith, Gala (e os respectivos mutantes), Braeburn, Melrose e Lord Lambourne, nas quais se observa uma gama de áreas irregulares de cor amarelo-creme nas folhas (mosaico) (Fig. 15A), além de necrose foliar na cv. Fuji (Fig. 15B), podendo reduzir-se a diminutas manchas e bandeamento de nervuras.

Durante o levantamento de doenças virais de macieiras e pereiras no sul do Brasil, observou-se a ocorrência de doenças menos disseminadas, que merecem menção, a título de informação. Os sintomas que causam são

tão evidentes que levam geralmente à eliminação das plantas afetadas e, assim, a sua gradativa erradicação. Um exemplo são os sintomas de mosaico, com manchas amarelas bem nítidas, ou necrose foliar causadas pelo ApMV. Estas doenças se transmitem pela enxertia e se expressam, geralmente na fase adulta das plantas e não são reconhecíveis no viveiro. Embora de natureza desconhecida, são consideradas termossensíveis e passíveis de remoção pelo tratamento térmico dispensado às viroses (NICKEL, 2004b).

Foto: Osmar Nickel

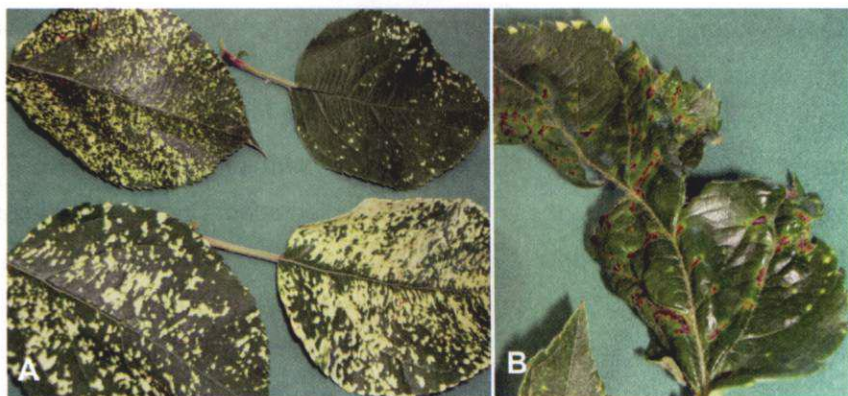


Fig. 15: A. Mosaico. **B.** Necrose foliar causado por ApMV na cv. Fuji.

A “depressão do lenho” inicia-se com depressões locais, curtas, em ramos jovens. Desenvolvem-se ranhuras longitudinais que se alargam, formando depressões da madeira. A exclusão de plantas afetadas exige análise criteriosa, pois com o aumento da idade da planta os sintomas tendem a desaparecer. A doença é indexada na macieira cv. Gravenstein. O tempo de incubação varia de cerca de 1 a 3 anos.

Em pomares de cerca de 20 anos nos Campos de Cima da Serra (RS) foram observados frutos com sintomas de “ruga verde”. Os sintomas se desenvolvem em frutinhas de 2-3 cm de diâmetro, ou 3-4 semanas pós-

floração, na forma de pequenas depressões verde-escuras na casca dos frutinhas. O tecido abaixo das depressões é verde, mais escuro que o tecido que o circunda. Primaveras com temperaturas acima de 12 °C mascaram os sintomas. O patógeno, um viróide (ITO et al., 1993), é latente em algumas variedades comerciais e pode reduzir substancialmente a produção, o teor de suco, a qualidade e a armazenabilidade dos frutos (FRIDLUND, 1987). A doença é indexada nas cvs. Golden Delicious e Granny Smith ou por enxertia de ramos destas cultivares em plantas doentes ou suspeitas.

Embora ocorra raramente, a "rachadura-estrela" foi constatada em pomares mais antigos na região de Vacaria, RS. Os isolados mais virulentos causam além da rachadura típica em frutos, necrose da casca de ramos e morte de ponteiros no primeiro ano, distorção e redução do tamanho dos frutos, redução do vigor, cancrios nas gemas e declínio das plantas. A indexagem por dupla borbulhia na cv. Golden Delicious produz sintomas precoces em um ano; rachaduras em frutos requerem maior tempo de incubação. A cv. Golden Delicious é interessante como indicadora pela sua sensibilidade a uma série de doenças dos frutos da macieira.

2. Indexagem biológica por inoculação mecânica de plantas herbáceas

Os vírus ASGV, ASPV, ACLSV e ApMV são transmissíveis, com relativa facilidade, pela via mecânica para várias espécies de plantas herbáceas, característica que é utilizada como teste adicional de rápida e fácil execução para detecção desses vírus. O extrato é preparado macerando-

se pétalas, botões florais e folhas bem jovens em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, com 2,5 % sulfato de nicotina para neutralizar o efeito de taninos e outros inibidores na proporção 1:10 (1 g de folhas : 10 mL de tampão) e esfregado nas folhas. As indicadoras mais utilizadas são *Chenopodium quinoa*, fumos (*Nicotiana* spp.), cultivares de pepino, feijão, abobrinhas e outras. O ASGV produz em *C. quinoa* sintomas sistêmicos cerca de 6 a 10 dias p.i., constituídos por manchas, anéis e mosqueado cloróticos, epinastia verde-escura, distorção foliar, folhas pequenas e nanismo (Fig. 16A) e em feijão necrose foliar sistêmica (Fig. 16B); em pepino caipira os sintomas constituem-se de forte clorose de nervuras.

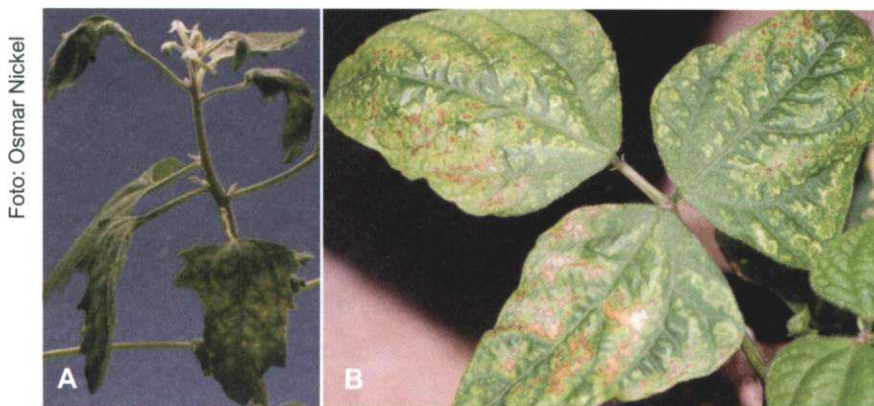


Fig. 16: A. Epinastia verde em *C. quinoa*. B. Necrose foliar em feijão, provocadas por infecção de ASGV.

O ACLSV induz em *C. quinoa* a formação de lesões locais 4-5 dias p.i. e sintomas sistêmicos a partir de uma semana p.i. com manchas cloróticas que se tornam necróticas (Fig. 17A). O ASPV causa reação diversa em fumos, desde lesões locais, amarelamento sistêmico, epinastia foliar e enfezamento em *Nicotiana occidentalis* 37 B (Fig. 17B), lesões locais necróticas, necrose sistêmica e declínio e morte de *N. occidentalis* ssp.

obliqua (RADAELLI et al., 2006) (Fig. 17); em pepino caipira o ASGV provoca forte clorose de nervuras uma semana p.i.

Foto: Osmar Nickel



Fig. 17: A. Lesões locais e manchas cloróticas sistêmicas induzidas por ACLSV em *C. quinoa*. **B.** Necrose de nervuras induzida por ASPV em *N. occidentalis* cv. 37B.

3. Avaliação de sanidade por diagnóstico molecular, sorológico e imunomolecular de vírus de macieiras e pereiras

Os métodos mais usados são a RT-PCR e ELISA e suas variantes. O advento da RT-PCR trouxe um aumento da sensibilidade do diagnóstico e expandiu-o para os tecidos dormentes. Entretanto, o custo dos equipamentos e dos reagentes e a necessidade de extração de RNA viral ou total com agentes desproteinizantes, enquanto ELISA e suas variantes

usam seiva bruta ou clarificada extraída com tampões muito simples, reduz a versatilidade da RT-PCR para análises massais. Ambos métodos, entretanto, têm seu lugar no instrumentário de diagnóstico, e especialmente na limpeza clonal, formando um tripé com a indexagem biológica.

A análise sorológica para o diagnóstico de vírus de plantas mais amplamente utilizada em todo o mundo, devido a sua simplicidade, é o teste imunoenzimático **ELISA** (CLARK; ADAMS, 1977) e suas variantes (ADAMS et al., 1982) em placas de poliestireno (FUCHS, 1980). Apesar de algumas peculiaridades dos vírus em plantas lenhosas (baixa concentração durante períodos quentes; restrição a certos tecidos; distribuição desuniforme no tecido vegetal) que podem dificultar o diagnóstico em certas estações do ano, o diagnóstico sorológico é um instrumento diagnóstico que possui inegáveis virtudes: simplicidade, possibilidade de execução em larga escala, baixo custo e alta sensibilidade, desde que consideradas as características mencionadas acima.

O **Western blot** permite a identificação de um vírus após separação de um simples extrato bruto de proteínas totais em géis de poliacrilamida, e eletrotransferência das proteínas para membranas de nitrocelulose. Na Fig. 18A observa-se a detecção da proteína capsidial de ASPV de cerca de 44 kilodalton. Pelo **dot-ELISA** pode-se diagnosticar um vírus em extratos brutos, ou minimamente clarificados, aplicados diretamente em membranas de nitrocelulose (Fig. 18B). Em ambos métodos ocorre detecção do vírus com anticorpos específicos (primários) e a visualização por reação com anti-anticorpos universais ligados a uma enzima (NICKEL et al., 2004b; RADAELLI et al., 2006).

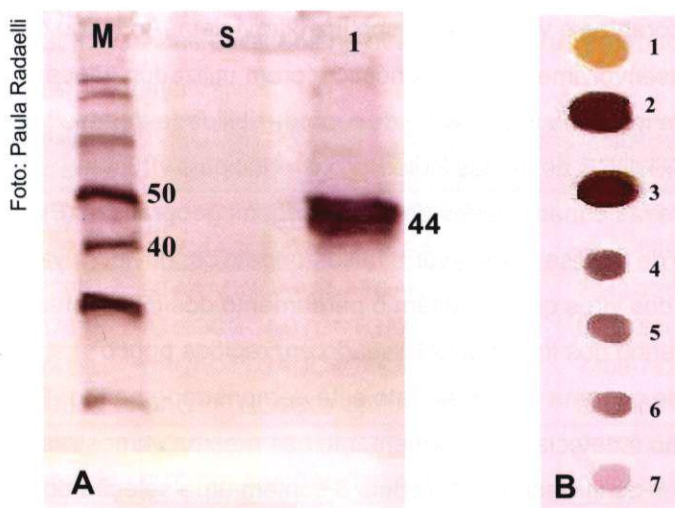
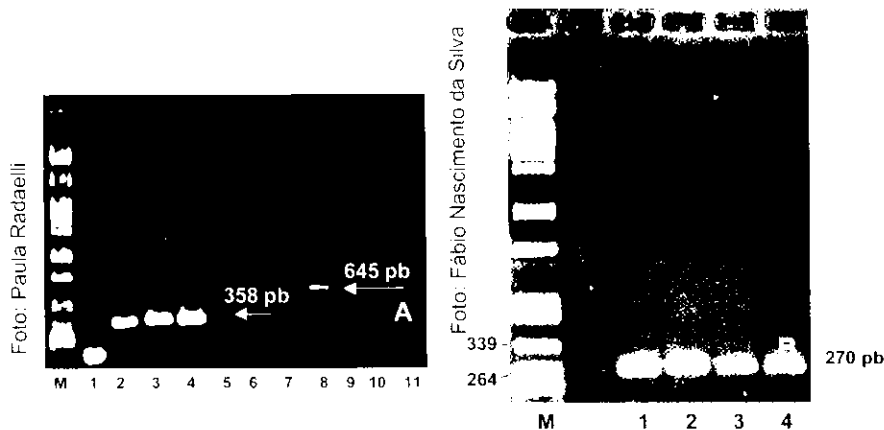


Fig. 18: Diagnóstico de ASPV em pereiras asiáticas e européias. **A.** Western blot. (M) Marcador molecular, em kilodalton. S, folhas da cv. Pyrodwarf sadia; 1, extrato de casca de ramos da cv Starkrimson infectada. **B.** Dot-ELISA. 1, controle sadio (folha); 2 e 3, *Pyronia veitchii*; 4 e 5, cv. Abate Fetel; 6 e 7, cv. Kousui; Extratos infectados: 2, 4 e 6, casca de ramos; 3, 5 e 7, folhas.

A **PCR** ou **reação da polimerase em cadeia** e suas variações, p. ex. IC-PCR, amplificação precedida de imunocaptura das partículas virais por anticorpos específicos (RADAELLI et al., 2004), é um método que permite o diagnóstico de agentes virais com base na sequência de nucleotídeos do genoma viral. Utilizam-se pequenos fragmentos de DNA chamados oligonucleotídeos ou “iniciadores” que flanqueiam a região amplificada, gerando cópias de regiões específicas do DNA e produzindo quantidades facilmente detectáveis de fragmentos de DNA. Com respeito à detecção de patógenos, a (RT-)PCR, geralmente, é mais sensível que o método ELISA. Por esta razão ela é especialmente adequada à detecção de infecções em fases iniciais, quando a concentração do patógeno na planta ainda é baixo. Os produtos dessa reação de amplificação são geralmente analisados por eletroforese (campo elétrico) em géis de agarose (suporte gelatinoso),

tíngidos com corantes e visualizados sob luz ultravioleta. Ao longo deste trabalho de desenvolvimento do diagnóstico foram utilizados vários protocolos com maior ou menor grau de reproduzibilidade de resultados na detecção por RT-PCR de muitos isolados dos principais vírus de macieiras, pereiras e marmeleiros de várias origens geográficas (Fig. 19A e B). Este tipo de análise pode levar a falsos-negativos, devido a variações dos genomas dos vírus que dificultam o pareamento dos iniciadores ou devido ao desenho dos iniciadores baseado em regiões pouco conservadas do genoma viral. Este fato está demonstrado na Fig. 19A em que ACLSV não é detectado uniformemente nas mesmas amostras com pares diferentes de iniciadores. A Tabela 3 contém uma seleção dos iniciadores utilizados neste trabalho (NICKEL et al., 1999; RADAELLI et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Fig. 19: A. Análise de produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de



agarose. M. Marcador molecular Lambda DNA/PstI; 1 e 5, água; 2, 6 e 9, controle positivo, ACLSV cv. Braeburn; 3, 7 e 10 cv. Delicious, acesso M176; 4, 8 e 11, cv. desconhecida, MR1789; 1-4, iniciadores 6875-7233 (358 pb); 5-8, iniciadores 6784-7429 (645 pb); 9-11, iniciadores 6751-7429 (678 pb). **B.** ASPV em pereiras, iniciadores 9262-8993. M. Marcador lambda DNA/PstI; pb, pares de bases. 1, cv. Starkrimson; 2, cv. Abate Fetel; 3, cv. Kousui; 4, cv. Housui.

Tabela 3: Iniciadores utilizados na detecção de vírus em macieiras, pereiras e marmeleiros.

Denominação do iniciador	Seqüências (5' —3')	Posição no genoma	Tamanho fragmentos
ACLSV 7233r	CAGACCCTTATTGAAGTCGAA	7213-7233	358 pb ⁽¹⁾
ACLSV 6875s	GGCAACCCTGGAACAGA	6875-6891	
ACLSV 7365r	CTAAACGCAAAGATCAGTTGTA	7343-7365	581 bp ⁽²⁾
ACLSV 6784s	ATGGCGCAGTGCTGAACCTCC	6784-6805	
ACLSV 7429r	CACACTTGAGCACACAACACA	7409-7429	678 pb ⁽²⁾
ACLSV 6751s	CAGTTTGCTCGACAGAACCA	6751-6770	
ASPV 9262r	ATAGCCGCCCGGTTAGGTT	9243-9262	270 pb ⁽³⁾
ASPV 8993s	CTCTTGAACCAGCTGATGGC	8993-9012	
ASGV 6396r	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	6373-6396	755pb ⁽⁴⁾
ASGV 5641s	ATGAGTTTGGAAAGACGTGCTTC	5641-5663	
ASGV 6396r	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	6373-6396	523 pb ⁽⁵⁾
ASGV 5873s	CCCGCTGTTGGATTGATACACCTC	5873-5898	
ApMVcp 1776r	TCATAATTCTAACAAATCTT	1776-1795	669 pb ⁽⁶⁾
ApMVcp 1126s	ATGGTCTGCAAGTACTGTAA	1126-1145	

1) Candresse et al. (1995); 2) Silva et al. (2008), com base no acesso M58152/NC001409 do Genbank do NCBI; 3) Radaelli et al. (2006); 4, Nickel et al. (2001); 5, MacKenzie et al. (1996); 6, ncbi.nlm.nih.gov, NC 003480.

Referências bibliográficas

- ADAMS, A. N.; BARBARA, D. J.; CLARK, M. F. An indirect ELISA using a single antiserum and a general purpose conjugate. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 130, p. 179-182, 1982.
- AGRIOS, G. N. Effect of extracts from healthy and virus-infected apple and pear tissues on the growth of certain pathogenic fungi. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, n. 2, p. 176-179, 1966.
- BALANÇO das exportações brasileiras de maçãs em 2007: volume exportado representou 11,28 % da produção total. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 15, n. 193, p. 10, 2007.
- BAUMANN, G.; LOUIS, F. Untersuchungen an virusfreien und virusgetesteten M9-Klonen. **Obstbau**, Bonn, v. 338, p. 599-600, 1980.
- CAMPBELL, A. I. The effect of some apple viruses on the susceptibility of two clonal rootstocks to collar rot caused by *Phytophthora cactorum*. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 44, p. 69-73, 1969.
- CAMPBELL, A. I.; BOULD, C. **Effects of latent viruses on growth of apples and pears under different nutritional regimes**. [Bristol]: Long Ashton Research Station Report, 1974. 40 p.
- CANDRESSE, T.; LANNEAU, M.; REVERS, F.; GRASSEAU, N.; MACQUAIRE, G.; GERMAN, S.; MALINOWSKI, T.; DUNEZ, J. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 386, p. 136-147, 1995.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 34, p. 475-483, 1977.
- CRESTANI, O. A. **Fomento à capacitação tecnológica para a produção de mudas frutíferas via métodos biotecnológicos: desenvolvimento de tecnologias de indexação de vírus, viróides e fitoplasmas em mudas de macieiras através de métodos biológicos, sorológicos e moleculares: relatório de Projeto**. Canoinhas, SC: Embrapa-SPSB, 2000. 49 p.
- CROPLEY, R.; POSNETTE, A. F. The effect of viruses on growth and cropping of pear trees. **Annals of Applied Biology**, v. 73, p. 39-43, 1973.

- ENGEL, G. Die Bedeutung der Virusfreiheit bei Kernobst (The importance of virus free status in pome fruit production). **Erwebsobstbau**, Munique, v. 38, p. 162-165, 1996.
- ENGEL, G. Einfluss der Quittenunterlagenherkunft und der Virusfreiheit auf die Leistung von Birnen bis zum 7. Standjahr. **Rheinische Monatsschrift**, v. 7, p. 444-445, 1987.
- FRIDLUND, P. R. **Temperature effects on virus disease symptoms in some *Prunus*, *Malus* and *Pyrus* cultivars**. Washington Agricultural Experiment Station Bulletin, Pullmann, v. 726. 6 p. 1970.
- FRIDLUND, P. R. Influence of apple green crinkle disease on the quality of Granny Smith apples. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 71, n. 7, p. 585-587, 1987.
- FUCHS, E. Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 94, p. 69-73, 1980.
- GERMAN, S., CANDRESSE, T.; LANNEAU, M.; HUET, J. C.; PERNOLLET, J. C.; DUNEZ, J. Nucleotide sequence and genomic organization of Apple chlorotic leaf spot Closterovirus. **Virology**, New York, v. 179, n. 1, p. 104-112, 1990.
- GILLES, G. L.; VERHOYEN, M. **Viroses et maladies apparentées des arbres fruitiers et ornementaux: assainissement et selection**. Bruxelles: Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, 1992. 166 p.
- GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MARODIN, G. A. B.; FAJARDO, T. V. M. *Apple stem grooving virus* afeta infecções de manchas foliares causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em macieiras cv. Maxi Gala. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. 318, 2007. Resumo 1053.
- HELM, H. H.; LÜDDERS, P. Einfluß der Nitraternährung auf das vegetative Wachstum von Apfelbäumen mit unterschiedlichem Virusbefall. **Gartenbauwissenschaft**, v. 47, n. 3, p. 124-131, 1982.
- HOWELL, W. E.; BURGESS, J.; MINK, G. I.; SKRZECZKOWSKI, L. J.; ZHANG, Y. P. Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 472, p. 641-646, 1998.
- HULL, R. **Matthew's Plant Virology**. 4th ed. London: Academic Press, 2004. 1001 p.

- HUTH, W. Kultur von Apfelpflanzen aus apikalen Meristemen. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v. 43, n. 4, p. 163-166, 1978.
- ITO, T.; KANEMATSU, S.; KOGANEZAWA, H.; TSUSHIZAKI, T.; YOSHIDA, K. Detection of a viroid associated with apple fruit crinkle disease. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 59, n. 5, p. 520-527, 1993.
- JAMES, D.; TRYTTEN, P.A.; MACKENZIE, D.J.; TOWERS, G.H.N.; FRENCH, C.J. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. **Annals of applied Biology**, Hoboken, v. 131, p. 459-470, 1997.
- JELKMANN, W. International Working Group on Fruit Tree Viruses. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 657, p. 575-596. 2004.
- JELKMANN, W. Apple stem pitting virus. In: VESELY, D. ; MONETTE, P. **Recent research development in plant pathology: filamentous viruses of woody plants**. [S.l.: s. n.], 1997. p. 133-142.
- KNAPP, E.; HANZER, V.; WEISS H. H.; MACHADO, A. da C.; WEISS, B.; WANG, Q.; KATINGER, H.; MACHADO, M. L. da C. New aspects of virus elimination in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 386, 409-417, 1995.
- LANKES, C. Anbaumaterialverordnung löst Obstvirus-Verordnung ab. **Obstbau**, Bonn, v. 7, p. 387-391, 1999.
- LEMOINE, J. Manifestation de symptômes de Stony pit sur les fruits d'indicateurs d'espèces différentes à partir de certaines sources de Vein yellows du Poirier. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, n. 4, p. 519-523, 1979.
- LEMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. **L'Arboriculture fruitière**, v. 434, p. 38-48, 1990.
- LESSA, A. O.; CASTRO, L. A. S. de; DANIELS, J. Incidência do vírus da mancha clorótica das folhas da macieira em pomares de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 23, p. 314, 1998.
- MACKENZIE, D. J.; MACLEAN, M. A.; MUKERJI, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 222-226, 1996.

MELLO, L. M. R. de. **Produção e mercado da maçã brasileira**: panorama 2005. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 5 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 64).

MINK, G. I. Apple chlorotic leafspot. In: FRIDLUND, P. R. **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. Pullman: Washington State University, 1989. p. 8-19.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NICKEL, O.; JELKMANN, W.; G. B. KUHN. Occurrence of *Apple stem grooving virus* in Santa Catarina Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 3, p. 444-446, 1999.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the coat protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus* and its survey in Southern Brazil. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 3, p. 655-659, 2001.

NICKEL, O.; TARGON, M. L. N. P.; FAJARDO, V. M.; MACHADO, M. A.; TRIVILIN, A. P. Production and use of polyclonal antibodies to the coat protein gene of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 657, p. 35-40, 2004a.

NICKEL, O. *Vírus*. In: KOVALESKI, A. (Ed.). **Maçã: fitossanidade**. Brasília, DF: Embrapa/SPI, 2004b. p. 61-79. (Frutas do Brasil, 38).

NICKEL, O.; GUERRA, D. S.; BERNARDI, J.; FAJARDO, T. V. M. Infecções virais em macieiras 'Maxi Gala' provocam redução de produção e da qualidade dos frutos. In: COSTA, A. N. da; COSTA, A. F. S. da (Org.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Incaper, 2008. 4 p. 1 CD-ROM.

PANATTONI, A.; D'ANNA, F.; CRISTANI, C.; TRIOLO, E. *Grapevine vitivirus A* eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p. 129-135, 2007.

PAUNOVIC, S.; RANKOVIC, M. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 472, p. 125-133, 1998.

PAUNOVIC, S.; MAKSIMOVIC, V.; RANKOVIC, M.; RADOVIC, S. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv.

Württemberg. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 695-700, 1999.

RADAELLI, P.; RIZZON, D. F.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; FAJARDO, T. V. M. Detecção do Apple stem grooving virus em macieiras por RT-PCR, IC-RT-PCR e ELISA. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p. S 251, 2004. Resumo 844.

RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F. J. L.; FAJARDO, T. V. M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da sequência de nucleotídios do gene da proteína capsidial de um isolado do Apple stem pitting virus. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 51-56, 2006.

RICH, A. E. Influence of dapple and stem pitting viruses on tree growth and fruit yield over a fourteen year period. **Plant Disease Reporter**, v. 51, n. 4, p. 293-296, 1967.

SHIEL, P. J.; ALREFAI, R. H.; DOMIR, L. L.; KORBAN, S. S.; BERGER, P.H. The complete nucleotide sequence of *Apple mosaic virus* RNA 3. **Archives of Virology**, New York, v. 140, p. 1247-1256, 1995.

SIEBERT, V. Z.; ENGELBRECHT, D. J. Field and glasshouse evaluation of *Pyronia veitchii* as an indicator of some apple latent viruses. **Phytophylactica**, Pretoria, v. 13, p. 199-201, 1981.

SILVA, F. N. da; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 157-161, 2008.

VAN DER MEER, F. A. Plant species outside the genus *Malus* as indicators for latent viruses of apple. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 44, p. 213-220, 1973.

YANASE, H. Studies on apple latent viruses in Japan: the association of apple topworking disease with apple latent viruses. **Bulletin of Fruit Tree Research Station - Series C**, Morioka, v. 1, p. 47-109, 1974.

WHITE, R. F.; ANTONIW, J. F. Direct control of virus diseases. **Crop Protection**, Surrey, v. 2, n. 3, p. 259-271, 1983.

ZAHN, V. *Malus adstringens* cv. 'Hopa' – ein guter Indikator zum Nachweis des *Apple chlorotic leafspot virus* am Apfel. **Erwerbsobstbau**, Munique, v. 38, p. 107-110, 1996.

Agradecimentos

Aos assistentes da Embrapa Uva e Vinho Marcos F. Vanni (laboratório de virologia), Iraci Sinski e Daniela Dal Bosco (laboratório de cultura de tecidos) e Heitor Corbelini (enxertias); a Paula Radaelli e Fabio Nascimento da Silva, estudantes de mestrado, respectivamente, da Universidade de Passo Fundo (UPF, Passo Fundo, RS) e Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC, Lages, SC), pelo trabalho no estabelecimento de protocolos de diagnóstico molecular de vírus de maçãs e peras; ao pesquisador João Bernardi (Embrapa Uva e Vinho, Estação Experimental de Fruticultura Temperada, Vacaria, RS) pelo suporte na produção e manejo de indicadoras.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo financiamento de projetos que permitiram a execução de distintas fases deste trabalho.



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Rua Livramento, 515 95700-000 Bento Gonçalves, RS
Telefone (54) 3455-8000 Fax (54) 3451-2792
<http://www.cnpqv.embrapa.br> sac@cnpqv.embrapa.br

CGPE 8074

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

