

OSMAR ALBERTO CRESTANI

**DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE VIROSES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *APPLE STEM GROOVING VIRUS* EM MATRIZES DE
MACIEIRAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE MUDAS NO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Dra. Aike Anneliese Kretschmar

**LAGES
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Crestani, Osmar Alberto

Determinação da incidência de viroses e caracterização
molecular de *Apple stem grooving virus* em matrizes de
macieiras utilizadas na produção de mudas no Sul do Brasil. /
Osmar Alberto Crestani. - Lages, 2018
78 p.

Orientadora: Aike Anneliese Kretzschmar

Co-orientador: Leo Rufato

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa
de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2018.

1. *Malus domestica* Borkh. 2. viroses. 3. indexagem
biológica. 4. RT-PCR. I. Kretzschmar, Aike Anneliese . II.
Rufato, Leo., .III. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-
Graduação em Produção Vegetal. IV. Título.

OSMAR ALBERTO CRESTANI

**DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE VIROSES E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *APPLE STEM GROOVING VIRUS* EM MATRIZES DE
MACIEIRAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE MUDAS NO SUL DO BRASIL**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Dra. Aike Anneliese Kretzschmar
UDESC – Lages - SC

Membro: _____
Dra. Mayra Juline Gonçalves
UDESC – Lages - SC

Membro: _____
Dr. Fabio Nascimento da Silva
UDESC – Lages - SC

Membro: _____
Dr. Aparecido Lima da Silva
UFSC – CCA, Florianópolis, SC

Membro: _____
Dr. André Luiz Kulkamp Souza
EPAGRI – Estação Experimental de Videira, SC

Lages, 31 de julho de 2018

À minha amada esposa Terezinha pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza;

Aos meus queridos filhos Paulo e Giovanni pelo incentivo, companheirismo, apoio, compreensão e ajuda;

À minha querida nora Michelle e minha amada neta Isabella que vieram fazer parte da minha vida e me deixar uma pessoa melhor;

A todos quero dizer que não sou capaz de colocar em palavras o que sinto, mas quero dizer que minha vida só faz sentido com vocês.

Aos meus pais Alberto e Rita (*in memoriam*) que me deram a vida e mostraram o caminho da honestidade, persistência e valor da família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Instituto Federal Catarinense pelo apoio e liberação para esse tempo de formação.

À Embrapa Uva e Vinho pelo apoio à realização dos trabalhos envolvidos nesta pesquisa.

À Professora Dr^a Aike Kretzschmar minha amiga e orientadora pelos ensinamentos recebidos.

Aos Coorientadores Prof. Dr. Leo Rufatto; Prof. Dr. Fabio Nascimento Silva; Prof. Dr. Amauri Bogo e Pesquisador Dr. Osmar Nickel pela atenção, confiança, disposição, orientação, ensinamentos e amizade.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal que nos passaram conhecimentos fundamentais para o trabalho e pesquisa nessa área tão importante para nosso país.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal pelo incentivo e amizade, especialmente à Mayra Juline Gonçalves e Eduardo Silva Gorayeb pela grande ajuda nesse momento de minha vida.

Ao Prof. Aparecido Lima da Silva e ao Pesquisador André Souza, pelas sugestões e correções;

Aos colegas Professores e Administrativos do Instituto Federal Catarinense pelo companheirismo e apoio.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

E ao Deus universal que me permitiu conhecer e conviver com tantas pessoas especiais.

Agradeço!

“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista”.

Aldo Novak

RESUMO

CRESTANI, Osmar Alberto. **Determinação da incidência de viroses e caracterização molecular de *Apple stem grooving virus* em matrizes de macieiras utilizadas na produção de mudas no Sul do Brasil.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC. 78 p, Lages, SC, 2018.

O cultivo de maçã no Brasil envolve atualmente 33.822 hectares, com uma produtividade média de 38,8 t/ha, muito abaixo da capacidade de produção confirmada em outros países. A baixa produtividade se deve a fatores abióticos (manejo de solo, nutrição, condução, poda, etc) e bióticos como as doenças sistêmicas. Dentre as sistêmicas, as doenças de origem viral são potencialmente destrutivas interferindo negativamente na manutenção dos níveis produtivos bem como na vida útil dos pomares. Visando avaliar o quadro atual do material propagativo, foi realizado o presente trabalho, dividido em duas vertentes: a primeira teve como objetivo determinar a incidência dos quatro principais vírus latentes da macieira (ACLSV, ASGV, ASPV e ApMV) em matrizes de macieiras utilizadas por dois viveiros do Rio Grande do Sul e três de Santa Catarina, para a produção de mudas fazendo sua caracterização biológica e molecular; a segunda teve como objetivo analisar a variabilidade genética do gene da proteína capsidial de isolados brasileiros de ASGV. Foram avaliadas quatro matrizes de Maxygala; quatro matrizes de Galaxy, cinco matrizes de Fuji Suprema e três matrizes de Mishima. Os porta-enxertos avaliados foram três matrizes de M-9 e três de Marubakaido. A metodologia utilizada no capítulo 1 foi a indexagem biológica e RT-PCR. Os resultados mostraram que a maioria das matrizes utilizadas na produção de mudas estão contaminadas pelos vírus latentes da macieira. Dos seis (6) porta-enxertos testados, dois (2) M-9 e dois (2) marubakaidos estão contaminados por pelo menos um vírus. Das dezesseis (16) copas testadas, treze (13) foram positivas para pelo menos um vírus na indexagem biológica e dez (10) foram positivas no RT-PCR para pelo menos um vírus. Nos testes moleculares nenhuma matriz foi positiva para ACLSV. Para o ApMV nenhuma amostra foi positiva nos dois testes. Para o segundo capítulo, foram analisadas a variabilidade genética da capa proteica de isolados de ASGV advindos das matrizes positivas no RT-PCR e comparados filogeneticamente entre eles e com outras sequências disponíveis no Genbank. Os isolados brasileiros apresentaram uma variabilidade de nucleotídeos intermediária quando comparados com os outros conjuntos de dados. Em todos os isolados observados, o gene da CP encontra-se sob forte seleção negativa, apresentando baixas taxas de dN/dS. Na análise filogenética, todos os isolados se agruparam em um único grupo, indicando que as variações entre isolados não estão correlacionadas com o tipo de hospedeiro ou localização geográfica, mostrando que a região da CP consiste em uma boa opção para o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a diagnose de ASGV.

Palavras-chave: *Malus domestica* Borkh. Viroses. Indexagem biológica. RT-PCR.

ABSTRACT

CRESTANI, Osmar Alberto. **Incidence determination of viruses and molecular characterization of *Apple stem grooving viruses* in mother plants used in the production of nursery stock in the South of Brazil.** Thesis (Doctorate in Plant Production) - Santa Catarina State University, UDESC. 78 p. Lages, SC, 2018.

In Brazil, apple trees are grown in 33,822 hectares, with an average productivity of 38.872 t/ha, well below the production capacity reported in other countries. Low productivity is due to abiotic factors (soil management, nutrition, training system, pruning, etc.) and biotic factors, such as cryptogamic and systemic diseases. Among systemic diseases, viral ones can affect production levels and the useful life of orchards. This study is divided into two chapters: the aim of the first chapter was to determine the incidence of four major apple latent viruses (ACLSV, ASGV, ASPV and ApMV) in mother apple trees used for production of nursery stock in two nurseries in Rio Grande do Sul and three nurseries in Santa Catarina. The second chapter presents an analysis of genetic variability of the coat protein gene of Brazilian isolates of ASGV. Analyses were made of four mother trees of Maxy gala; four mother trees of Galaxy, five mother trees of Fuji Suprema and 3 mother trees of Mishima. Three mother trees of M-9 and three mother trees of Marubakaido were used as rootstocks. The methodology used in Chapter 1 consisted of biological indexing and RT-PCR. The results showed that the most mother trees used in the production of nursery stock, were contaminated by the apple latent viruses. Of the six (6) rootstocks tested, two (2) M-9 and two (2) Marubakaido were contaminated by at least one virus. Of the sixteen (16) tested scions, thirteen (13) were positive for at least one virus by biological indexing and ten (10) were positive by RT-PCR for at least one virus. Surprisingly, no mother tree was positive for ACLSV in the molecular tests. For ApMV, no sample was positive in either test. In the second chapter, an analysis was made of the variability of protein coat of ASGV isolates originated from mother apple trees. They were analyzed for genetic variability and compared phylogenetically among themselves and to other sequences available in the Genbank database. The Brazilian isolates showed average nucleotide variability when compared to the other data sets; however, in all isolates, the CP gene was under strong negative selection and presented low rates of dN/dS. In the phylogenetic analysis, all isolates were grouped into a single group, indicating that variations among isolates were not correlated with type of host or geographic location. Therefore, the region of the CP is a good option for development of molecular tools for diagnosis of ASGV.

Keywords: *Malus domestica* Borkh. Viral diseases. Biological indexing. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1 - Mean pairwise number of nucleotide differences per site (nucleotide diversity, π) calculated on a sliding window across the coat protein gene of *Apple stem grooving virus* isolates. 58
- Figure 2 - Mean pairwise number of nucleotide differences per site (nucleotide diversity, π) at synonymous (A) and non-synonymous (B) sites calculated for three regions (5'-terminal, central and 3' terminal) of the coat protein gene of *Apple stem grooving virus* isolates from Brazil, China, Czech Republic, India, Japan, South Korea and the "World" 59
- Figure 3 - Phylogenetic tree based on the alignment of coat protein protein genes of *Apple stem grooving virus* isolates from Brazil (Isolates 5, 6, 10, 11 and 21). The tree was constructed by the neighbor joining method implemented in mega 6.0 program using Kimura 2-parameter nucleotide substitution model with discrete gamma distribution (G) and bootstrap support of 2000 replications. *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) was used as outgroup. Bar indicates number of substitutions per site. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de plantas lenhosas comumente utilizadas na indexagem biológica de matrizes de macieiras para os vírus: <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV); <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV); <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV) e <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV).	30
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a detecção das espécies virais associadas às amostras de macieira.	43
Tabela 3 - Análises de indexagem biológica e RT-PCR realizadas em 3 matrizes do porta-enxerto Maruba e 3 matrizes do porta-enxerto M-9 para quatro vírus latentes da macieira: <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV); <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV); <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV) e <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV).	46
Tabela 4 - Análises de indexagem biológica e RT-PCR realizadas em 4 matrizes de Galaxy; 3 matrizes de Mishima; 5 matrizes de Fuji Suprema e 4 de Maxigala para quatro vírus latentes da macieira: <i>Apple mosaic vírus</i> (ApMV); <i>Apple stem grooving vírus</i> (ASGV); <i>Apple stem pitting vírus</i> (ASPV) e <i>Apple chlorotic leaf spot vírus</i> (ACLSV).	50
Tabela 5 - Incidência de ASGV, ASPV e ACLSV em mudas de macieiras produzidas com os materiais testados neste trabalho.	52
Table 6 - Genetic variability descriptors of <i>Apple stem grooving virus</i> coat protein genes from Brazil, China, Czech Republic, India, Japan, South Korea and “World”.	61
Table 7 - Selection analysis of coat protein genes of Brazilian and foreign isolates of <i>Apple stem grooving virus</i>	62

SUMÁRIO

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio do programa de geração automática da BU.....	3
1 INTRODUÇÃO GERAL	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 A CULTURA DA MACIEIRA.....	23
2.2 VIROSES EM MACIEIRA	25
2.2.1. <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV)	26
2.2.2 <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV)	27
2.2.3 <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	28
2.2.4 <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV)	29
2.3 TECNICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES	29
2.4 REFERÊNCIAS	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.2.1 Indexagem biológica	40
3.2.1.1 Obtenção dos <i>seedlings</i> para formação dos porta-enxertos.....	40
3.2.1.2 Introdução das matrizes para teste	40
3.2.1.3 Introdução das indicadoras	41
3.2.1.4 Processo de indexagem.....	41
3.2.2 Testes moleculares	42
3.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos e síntese de DNA	42
3.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.3.1 Porta-enxertos	44
3.3.1.1 Marubakaido	44
3.3.1.2 EM - 9.....	45
3.3.2 Copas	47
3.3.2.1 Cultivar Galaxi.....	47
3.3.2.2 Cultivar Mishima	47
3.3.2.3 Cultivar Fuji Suprema	48
3.3.2.4 Cultivar Maxigala.....	49
3.4 CONCLUSÃO	52
3.5 REFERENCIAS	53

4 MOLECULAR CHARACTERIZATION AND VARIABILITY OF COAT PROTEIN GENE OF SOUTHERN BRAZILIAN *Apple stem grooving virus* ISOLATES

.....	55
4.1 INTRODUCTION	55
4.2 MATERIAL AND METHODS	56
4.2.1 Plant material, virus isolates, nucleic acid extraction, RT-PCR, cloning and sequencing	56
4.2.2 Nucleotide alignments and phylogenetic relationships	56
4.2.3 Description of the coat protein genetic variability, recombination and selection analyses.....	57
4.3 RESULTS AND DISCUSSION	57
4.4 REFERENCES	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
APÊNDICES.....	68
Apêndice A - Radiant Crab enxertada sobre seedling de Gala standard. O crescimento é normal sem nanismo ou sintomas foliares; Radiant Crab enxertada com a matriz Fuji suprema do viveiro 5 mostrando nanismo severo, manchas necróticas e quase morte; Indicadora SPY – 227 enxertada em seedling de Gala standard apresentando crescimento bom sem sintomas foliares; Indicadora Spy 227 inoculada com a matriz 1 do viveiro 5 mostrando epinastia, pontuações cloróticas e deformação foliar; Indicadora Virginia Crab enxertada sobre seedling de Gala standard mostrando perfeita união dos tecidos; Indicadora Virginia Crab inoculada com a matriz 2 do viveiro 5 mostrando o sintoma de “brown line” onde não ocorre união perfeita dos tecidos. Esse sintoma é típico na presença de ASGV; Indicadora Pyronia Weitchii inoculada com a matriz 1 do viveiro 5 apresentando nanismo, manchas cloróticas e necróticas; Indicadora Russian 12.740-7A enxertado sobre seedling de Gala standard apresentando crescimento normal sem deformação ou sintomas foliares; Indicadora <i>Russian</i> 12.740-7 ^a inoculada com a matriz 1 do viveiro 5. Apresenta nanismo, epinastia, manchas cloróticas e encarquilhamento.....	68
Apêndice B - Folhas de <i>Malu Platycarpa</i> com sintomas	69
Apêndice C - Epinastia em <i>Pyronia veitchii</i>	70
VITA	71

1 INTRODUÇÃO GERAL

O cultivo de pomáceas está distribuído em diversas regiões frutícolas do mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2018), a maçã é a segunda fruta mais produzida no mundo. Os principais países produtores são China, EUA e Índia com produções de 40,9; 5,1 e 2,5 milhões de toneladas, respectivamente. Na América do Sul a produção de maçãs é liderada pelo Chile, Brasil e Argentina com 1,7, 1,3 e 1,0 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2018). Segundo as projeções do MAPA (2017) para os anos de 2026/27 a produção de maçãs vai aumentar 20,4 %, em relação à 2016/17.

O cultivo de maçã no Brasil envolve 33 mil hectares, com uma produtividade média de 38,800 t/ha (IBGE, 2017). A produção e comercialização de maçãs encontram-se distribuídas principalmente no Sul do país, sendo que Santa Catarina e Rio Grande do Sul juntos contribuem com 96,9 % da produção nacional (IBGE, 2017). A região de Fraiburgo e São Joaquim são as principais zonas produtoras em Santa Catarina. No Rio Grande do Sul a principal região está no município de Vacaria e no seu entorno.

Apesar do sucesso econômico do cultivo da maçã no Brasil, a cultura enfrenta o desafio de conviver com problemas ocasionados por fatores bióticos. Fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viroides são os principais patógenos que afetam a cultura (KUMAR et al., 2011). Dentre as principais doenças, as que ocasionam as maiores perdas são: a sarna da macieira, a mancha foliar de *Glomerella*, podridões pós-colheita e as viroses (ARAÚJO et al., 2016).

Os vírus são agentes patogênicos, que se encontram, segundo definição amplamente aceita, além da fronteira que delimita e agrupa os seres vivos e afetam o desenvolvimento das plantas, interferindo de forma parasítica no metabolismo vegetal (NICKEL, 2004).

O cultivo da macieira no Brasil é relativamente jovem, comparado com as regiões pomicultoras do hemisfério norte, mas se depara com questões de sanidade do material propagativo muito similares àquelas enfrentadas por aqueles países. Enquanto no Brasil eram implantados os primeiros pomares, por volta de 1970, nos países com tradição na produção de maçã, europeus e norteamericanos, começavam, desde meados dos anos 50, a produzir os primeiros resultados dos programas de limpeza clonal. Desta forma, não é de surpreender que o material propagativo utilizado na implantação dos primeiros pomares brasileiros estivesse altamente contaminado (NICKEL, 2004).

Os vírus causam danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira. Algumas variedades diminuem a produção, outras reduzem o crescimento e existem aquelas em que o

efeito é pequeno e pouco visível; entretanto, para todas, reduzem a qualidade dos frutos (HANDA; THAKUR, 1999). Na literatura existem inúmeros relatos que demonstram o efeito nocivo dos vírus latentes em fruteiras. De acordo com o trabalho de Cembali et al. (2003), em Golden Delicious, o vírus ApMV (*Apple mosaic virus*), pode causar até 46% de danos na produção e quando está associado com *Rubbery wood disease*, os danos chegam a 67%.

Ao longo dos anos, com o advento de técnicas mais sensíveis de diagnose, tem-se verificado um aumento de plantas infectadas por um ou mais vírus (ZHAO et al., 2012). Relatos feitos por Nickel et al. (2001) evidenciam que viroses latentes são de presença generalizada nos cultivos comerciais de macieiras do sul do Brasil, as quais podem reduzir de 20 a 80% a produtividade.

Embora a partir da década de 90 tenham sido realizados esforços em importar ou “gerar” material propagativo de macieira sadio a fim de incrementar a produtividade, percebe-se que, atualmente, essa preocupação tem sido relegada a um segundo plano. O que reforça esta ideia é que introduções recentes de materiais propagativos provenientes dos Estados Unidos, Europa e Japão, mostraram-se parcialmente infectadas por vírus latentes, conforme análises do Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho (NICKEL, 2004).

Diante do exposto acima e visando avaliar o quadro atual do material propagativo, o presente trabalho foi avaliado, dividido em duas vertentes: a primeira teve como objetivo determinar a incidência dos quatro principais vírus latentes da macieira (ACLSV, ASGV, ASPV e ApMV) em matrizes de macieiras utilizadas por dois viveiros do Rio Grande do Sul e três de Santa Catarina, para a produção de mudas fazendo sua caracterização biológica e molecular; a segunda teve como objetivo analisar a variabilidade genética do gene da proteína capsidial de isolados brasileiros de ASGV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira é uma espécie frutífera, caducifólia, que perde suas folhas no outono, retornando à brotação na primavera. Relatos indicam que a macieira surgiu há 25 mil anos, tendo como centro de origem a região do Cáucaso, uma cadeia de montanhas da Ásia entre o mar Negro e Cáspio, a oeste da China. Acredita-se que o surgimento das espécies cultivadas tenha acontecido após o final da última era glacial (BLEICHER, 2002).

Pertencente à família Rosacea compreende mais de 100 gêneros de ampla distribuição em regiões de clima temperado (JOLY, 1993). Na flora brasileira, os membros desta família estão representados por cinco gêneros, tendo como principal local de distribuição geográfica o sul do país. Nessa família, os fatores de distinção entre as subfamílias são a forma do receptáculo floral, o número, a posição relativa dos carpelos e o caráter dos frutos (EPAGRI, 2006).

A macieira pertence à subfamília *Pomoideae* e esta denominação deriva do fato de produzir um pomo, pseudo-fruto caracterizado por formar um profundo receptáculo em forma de taça, onde as paredes inferiores e os carpelos se unem, contendo geralmente dois óvulos. Taxonomicamente a macieira já foi denominada de *Pyrus malus* Lineu, *Malus pumila* Miller, *Malus sylvestri* Miller, *Malus malus* Britton, *Malus communis* Poiret e *Malus domestica* Borkhausen. No entanto, em 1803, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, *M. domestica* Borkhausen é a primeira denominação válida publicada para macieira cultivada, anulando todas as denominações a partir daquela data (EPAGRI, 2006).

O cultivo de pomáceas está distribuído em diversas regiões frutícolas do mundo. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO (2018), a maçã é a segunda fruta mais produzida no mundo, logo após a banana. Os principais países produtores de maçãs são China, EUA e Índia com produções de 40,9; 5,1 e 2,5 milhões de toneladas, respectivamente.

Na América do Sul a produção de maçãs é liderada pelo Chile, Brasil e Argentina com 1,7, 1,3 e 1,0 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2018). Segundo as projeções do MAPA (2017) para os anos de 2026/27 a produção de maçãs vai aumentar 20,4 %, em relação à 2016/17.

O cultivo de maçã no Brasil envolve 33.822 hectares, com uma produtividade média de 38,9 t/ha (IBGE, 2017). A produção e comercialização de maçãs encontram-se distribuídas

principalmente no Sul do país, sendo que Santa Catarina e Rio Grande do Sul juntos contribuem com 95,7% da produção nacional (IBGE, 2017). A região de Fraiburgo e São Joaquim são as principais zonas produtoras em Santa Catarina. No Rio Grande do Sul a principal região está no município de Vacaria e seu entorno.

A região Sul do Brasil é reconhecida internacionalmente como uma área com características únicas e privilegiadas para o cultivo da macieira no país. Embora existam relatos de plantas de macieiras crescendo em quintais de vários municípios catarinenses, como por exemplo, o município de Brusque – SC desde 1903, em Santa Catarina, o primeiro pomar comercial de maçãs foi implantado pela empresa Reflorestamento Fraiburgo, no município de Fraiburgo – SC no ano de 1969. Na década de 70 o Brasil produzia 13.000 t e dispndia cerca de 100 milhões de dólares em importações. Na década de 80 o país passou a produzir 183.299 t e em 1990 a produção saltou para 857.000 t. A produtividade média nos anos 70 e 80 eram de 15 t/ha (PETRI et al., 2011).

A maçã constitui uma importante fonte de alimento para a população brasileira, sendo a terceira fruta mais consumida e a oitava produzida no país (KIST, 2016). Somente o agronegócio da macieira movimenta seis bilhões de reais anualmente empregando aproximadamente 195 mil trabalhadores (KIST, 2016).

De acordo com o mesmo autor, a fruta, com graduais avanços alcançados em organização, pesquisa e tecnologia, passou a ser produzida em larga escala nas regiões altas do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina e também no Sul do Paraná.

Atualmente são conhecidas aproximadamente 7.000 cultivares de maçãs. No entanto, somente algumas são de interesse comercial. As cultivares ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Granny Smith’, ‘Braeburn’, ‘Fuji’, ‘Gala’, ‘Pink Lady’, ‘Elstar’ e ‘Jonagold’ são as mais plantadas mundialmente. Os grupos ‘Gala’ e ‘Fuji’ representam 60% e 30%, respectivamente, do total da produção nacional (PETRI et al., 2011). Essas cultivares possuem propriedades organolépticas agradáveis ao paladar dos consumidores brasileiros, sendo por isso, as principais opções de cultivo (FIORAVANÇO, 2010).

Nas últimas décadas a produção de maçãs no Brasil teve um importante aumento. Caiu no gosto dos brasileiros e, ao mesmo tempo, dos consumidores de outros países. De importador, o país passou não apenas a abastecer todo o mercado interno, como também a exportar parte de sua produção. O investimento em pesquisas teve papel fundamental nesse resultado (KIST et al., 2016).

Apesar do sucesso econômico do cultivo da maçã no Brasil, a produção é drasticamente afetada pelo ataque de pragas e doenças (BONFIM, 2017). Entre as principais doenças, as que

ocasionam as maiores perdas são: sarna, mancha-foliar-de-*Glomerella*, podridões de frutos e as viroses (ARAÚJO et al., 2016).

2.2 VIROSES EM MACIEIRA

Os vírus de plantas são agentes patogênicos, cuja natureza intracelular obrigatória cria numerosas situações em que estes interagem de forma parasítica, utilizando do metabolismo vegetal (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Conforme a virulência do isolado viral e a suscetibilidade do tecido afetado, os sintomas podem manifestar-se em folhas, flores, frutos, casca e madeira de troncos e galhos estruturais, ramos e raízes, podendo apresentar sistemicidade, geralmente desuniforme (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Relatos feitos por Nickel et al. (2001) confirmam que viroses latentes são de presença generalizada nos cultivos comerciais de macieiras do sul do Brasil. Na literatura existem inúmeros relatos que demonstram o efeito nocivo dos vírus latentes em fruteiras. Cembali et al. (2003), mostra que, em Golden Delicious, o vírus *Apple mosaic virus* (ApMV) pode causar até 46% de perdas na produção e que quando está associado com *Rubbery wood disease*, as perdas chegam a 67%.

Em geral, doenças de vírus em culturas perenes, como maçãs, são potencialmente mais prejudiciais do que nas culturas anuais. Dentre os danos causados por infecções virais, destacam-se: redução do pegamento de enxertias de material infectado - as plantas no viveiro têm pouco vigor, ou podem desenvolver sintomas e definhar nos primeiros anos após a implantação do pomar; redução de produção - podendo variar de cerca de 16% a 84% dependendo da cultivar de maçã e do isolado viral ou da mistura dos vírus; redução do crescimento - redução do calibre dos frutos, do vigor das plantas, do diâmetro do tronco, do comprimento dos ramos laterais e da brotação; aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas como podridões radiculares e cancos, o que provoca aumento do uso de agrotóxicos; redução da capacidade de aproveitamento de fertilizantes - crescimento e produção satisfatórios de plantas livres de vírus podem ser garantidos com doses menores de fertilizantes, reduzindo o custo de produção e o impacto ambiental da cultura sobre lençóis freáticos e mananciais; redução da armazenabilidade dos frutos; aumento da sensibilidade a geadas tardias, pela indução de floração precoce de plantas infectadas por vírus (NICKEL, 2004; GUERRA, 2012).

Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis, na maioria das cultivares comerciais de macieiras, os vírus "latentes" podem passar despercebidos e serem propagados

indefinidamente. São reconhecidos dois grupos de vírus em macieiras: aqueles que produzem sintomas reconhecíveis visualmente nas variedades comerciais e os chamados vírus latentes que exigem a indexagem (enxertia em plantas indicadoras lenhosas e inoculação mecânica em plantas herbáceas, com testes sorológicos e moleculares) para sua detecção (NICKEL; FAJARDO, 2009; KUMAR et al., 2011; DAR; 2013).

O ApMV (família *Bromoviridae*), é conhecido por causar sintomas aparentes em muitas cultivares de maçãs, mas não em todas; enquanto que *Apple stem grooving virus* – ASGV; *Apple stem pitting virus* – ASPV e *Apple chlorotic leafspot virus* - ACLSV; (família *Betaflexiviridae*), causam infecções latentes na maioria das cultivares comerciais, geralmente não causando sintomas visíveis em infecções latentes (NEMETH et al., 1986; LIU et al., 2013).

No que se refere à epidemiologia, os vírus citados caracterizam-se por não possuir vetores conhecidos, sendo que sua disseminação se baseia na propagação vegetativa de material infectado. Esta propagação favorece o acúmulo de patógenos sistêmicos, tais como vírus, viroides e fitoplasmas, favorecendo a manutenção, multiplicação e disseminação desses patógenos. Infecções mistas (por mais de um vírus) são frequentes no campo, o que consequentemente conduz a efeitos sinérgicos e à maior redução na produção (SILVA et al., 2008; FAJARDO; NICKEL, 2014).

A co-infecção de ASGV; ASPV e ACLSV é comum (DESVIGNES; BOYE, 1989; WANG et al., 1994), acarretando considerável redução no crescimento e na produtividade das plantas infectadas (YANASE 1983; DESVIGNES; BOYE, 1989).

A seguir serão apresentadas características específicas para as principais espécies virais na cultura da macieira.

2.2.1. *Apple mosaic virus* (ApMV)

Família: *Bromoviridae*

Pertencente ao gênero *Ilarvirus*, o ApMV é o agente causal do mosaico em macieira. Possui partículas isométricas de 25 a 26 nm, um genoma triparticulado e quatro tipos de RNA (3544 nucleotídeos (nt), 2493 nt, 1.753 nt e 877 nt) e subunidades da capa protéica com massa molecular de cerca de 27 a 28,8 kDa (NICKEL, 2004).

O ApMV causa uma das mais conhecidas doenças virais da cultura. De acordo com Pallás et al. (1995) infecta cerca de 65 espécies vegetais em 19 famílias. Segundo Cembali et

al. (2003), plantas de Golden Delicious infectadas com o ApMV pode apresentar danos na produção de até 46%.

A evidência dos sintomas nas folhas permite o viveirista e/ou pomicultor eliminar plantas infectadas. Este vírus causa manchas irregulares de cor amarelo-creme nas folhas, reduzindo o potencial fotossintético da planta, podendo reduzir a produção variando de 30 a 40% (LÉMOINE, 1990). Os sintomas foliares variam segundo a virulência do isolado e a sensibilidade da cultivar, podendo ser muito tênues, passando despercebidos. Geralmente, são mais fortes em primaveras frias (NICKEL, 2004).

Recentemente, NODA et al. (2017) utilizando a técnica NGS (*Next-generation sequencing*) mostrou que existe um novo Ilarvirus que recebeu o nome de “*Apple necrotic mosaic virus*” que está intimamente relacionado com o vírus “*Prunus necrotic ringspot virus*” (PNRSV) e ApMV. O genoma do ApNMV consiste de RNA1 (3378 nt), RNA2 (2767 nt) e RNA3 (1956 nt). Uma análise filogenética baseada nas sequências de aminoácidos da proteína de capa indicou que o novo vírus pertence ao mesmo subgrupo 3 do gênero Ilarvirus como PNRSV e ApMV. A presença de folhas com sintoma de mosaico, que tendem a ser desigualmente distribuídas em macieiras doentes, foi correlacionada com a distribuição interna do ApNMV. A detecção por RT-PCR de macieiras apresentando sintomas de mosaico no Japão indicou que o ApNMV foi detectado em macieiras introduzidas da China, enquanto o ApMV foi detectado em macieiras cultivadas em pomares domésticos. Consistente com esses resultados, um levantamento de macieiras com mosaico nas principais províncias produtoras de maçã da China revelou que a maioria das macieiras que apresentam sintomas de mosaico estão infectadas com o ApNMV. Não seria surpresa se essa técnica (NGS), quando empregada em maior escala, no Brasil, revelasse novos vírus, já que muitos materiais propagativos são introduzidos da Ásia. Esse novo sistema de diagnose, devido a sua alta sensibilidade, pode substituir com grande vantagem outros métodos empregados até então; especialmente para a seleção de matrizes que servirão para a produção de milhares de mudas.

2.2.2 *Apple stem grooving virus* (ASGV)

Família: *Betaflexiviridae*

Pertencente ao gênero *Capillovirus*, *Apple stem grooving virus* é um importante membro do grupo de vírus latentes que infectam a macieira (YANASE et al., 1990). O gênero possui duas espécies reconhecidas: ASGV (YOSHIKAWA et al.; 1992) e *Cherry virus A* (CVA) (JELKMANN; 1995). O ASGV é a espécie-tipo do gênero e apesar de ter sido descrita

inicialmente infectando plantas de maçã (JONES; ALDWINCKLE, 1990; MAGOME et al., 1997; NICKEL et al., 1999, NICKEL et al., 2001), já foi relatada também em damasco (*Prunus armeniaca*) (NEMETH, 1986; TAKAHASHI et al., 1990), pera (*Pyrus sp.*) (YOSHIKAWA et al., 1996), cereja (*Prunus avium L.*) (KINARD et al., 1996), quivi (*Actinidia spp.*) (CLOVER et al., 2003), citrus (*Citrus spp.*) (MAGOME et al., 1997), normalmente denominado *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), lírio (*Lilium spp.*) (INOUE et al., 1979) e em bambu (*Nandina domestica*) (TANG et al., 2010; BHARDWAJ et al., 2017).

O ASGV causa infecção latente, no entanto, em plantas suscetíveis, está associado a sintomas como necrose na união da enxertia e do floema, acanelamento do lenho, declínio das plantas e cancrios associados a morte de plantas em viveiros (NICKEL et al., 1999; 2001; MARTELLI et al., 2007).

De acordo com Souza (2016) o ASGV causa ou está envolvido em declínio, necrose do floema e caneluras no xilema em alguns genótipos de porta-enxertos Maruba-kaido (*Malus prunifolia* cv. Ringo) e Mitsuba-kaido (*Malus sieboldii* cv. Rehder). O mesmo autor ainda relata que a associação recorrente dessa espécie ao ACLSV dificulta a identificação do ASGV como agente etiológico do declínio do porta-enxerto Maruba no Brasil.

O genoma do ASGV tem partículas filamentosas/flexuosas, com 600 a 700 x 12 nm de tamanho e é composto por uma fita de RNA simples e positiva, com 6.495 nt de comprimento. Possui duas ORFs, sendo a primeira de 6,3 mil nt e a segunda com mil nt. A primeira ORF (ORF1) é a replicase, contendo vários domínios como metiltransferase, papain-like protease, NTP-binding helicase e RNA polimerase RNA-dependente, características de proteínas de replicação pertencentes à família de vírus com fita de RNA positiva, similares aos Alphavirus. A segunda ORF (ORF2) é responsável pela proteína com motivos conservados tanto para proteínas de movimento, quanto para proteases virais (ZHAO, 2012)

2.2.3 Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

Família: *Betaflexiviridae*

Segundo German (1990), o ACLSV infecta a maior parte das árvores frutíferas e encontra-se classificado como membro do gênero *Trichovirus*. Nas frutas de caroço, causa doenças graves como *Peach dark green sunken mottle*. Em outras plantas, incluindo macieira, é praticamente assintomático. Seu maior impacto está atrelado ao fato de que ele causa várias incompatibilidades de enxertia em *Prunus sp.* não há nenhum vetor aparente para este vírus.

O vírus é flexuoso e alongado, com uma partícula de 720 x 12 nm. Possui RNA de fita simples positiva, pesando $2,5 \times 10^6$ Da, possuindo ORFs menores que 100 nt (GERMAN, 1990). Possui três ORFs que se sobrepõem brevemente: a primeira (ORF1), de 180-220 kDa, é responsável por produzir proteínas relacionadas à replicação (polimerase, helicase e metiltransferase), comuns em vírus de RNA que infectam plantas; a segunda (ORF2) produz um polipeptídeo de 40-50 kDa com homologias à proteínas de movimento de alguns vírus de planta; e a terceira (ORF3), localizada na terminação 3', produz proteínas de capa (MARTELLI et al., 1994).

2.2.4 *Apple stem pitting virus* (ASPV)

Família: *Betaflexiviridae*

É um membro-tipo do gênero *Foveavirus* (MARTELLI et al., 2007; MARTELLI; JELKMANN, 1998), e ocorre em todas as regiões produtoras de pera e maçã no mundo (KUNDU, 2003) e frequentemente em combinação com ACLSV (NICKEL, 2004). O ASPV causa doenças associadas com caneluras no tronco, amarelamento dos vasos e incompatibilidade do enxerto (JELKMANN, 1997).

Segundo Martelli; Jelkmann (1998), o ASPV é um vírus com partículas filamentosas helicoidais com 800 nm de comprimento. Apresenta uma fita simples e positiva de RNA poliadenilada na terminação 3', de 8,4 a 9,3 mil nt, junto de um capsídeo de 44 kDa. Apresentam de cinco ORFs, sendo a região 5' iniciando com 59 nucleotídeos não codificantes – a primeira (ORF1) é responsável pelas proteínas de replicação; da segunda (ORF2) até a quarta (ORF4) formam o bloco de genes que se acredita ser responsável pela transmissão do vírus entre células; a quinta (ORF5), por sua vez, gera a capa proteica. Por fim, há uma sequência de 159 nt e a cauda poli (A).

Segundo Martelli; Jelkmann (1998), a replicação destes vírus acontece no citoplasma, com uma estratégia similar a dos *Potexvirus*. Além disso, o vírus não apresenta vetor aparente, sendo propagado somente pela enxertia e dispersado pelo material propagativo.

2.3 TÉCNICAS BIOLÓGICAS E MOLECULARES

No que se refere aos métodos de detecção de vírus, estes consistem basicamente na indexação biológica, sorológica e/ou molecular (KINARD et al., 1996; SILVA, 2007).

De acordo com Jelkmann, 2004, a indexagem biológica é considerada ainda hoje como uma boa técnica de detecção de vírus em fruteiras, de simples execução, mas que requer familiaridade para manutenção das plantas indicadoras (Tabela 1). Consiste em enxertar num porta-enxerto de aproximadamente 0,8 cm de espessura (oriundo de semente), duas borbulhas da espécie candidata e acima delas e no mesmo lado, uma borbulha da espécie indicadora. Se a espécie candidata estiver infectada, o agente migra para toda a planta e mostra alterações perceptíveis, seja nas folhas e/ou lenho da indicadora. Pode-se substituir a borbulha pela garfagem de uma indicadora (garfo) na combinação porta-enxerto/espécie-candidata em casa de vegetação ou em campo.

Em campo o tempo requerido é de 2 a 3 anos e praticamente não é mais utilizado. Quando possível, a indexagem conduzida em casa de vegetação facilita o aparecimento de sintomas que surgem em cerca de 2 a 3 meses (FRIDLUND, 1980). O controle de pragas como pulgões e ácaros além de manchas foliares e oídio deve ser executado com presteza visto que muito facilmente podem induzir sintomas que se confundem com os provocados pelos vírus como a epinastia e deformação foliar. A utilização, para a indexagem, de seedlings resistentes à mancha de *Glomerella* facilita muito o trabalho. (Crestani, informação pessoal; NICKEL et al., 2001, NICKEL et al., 2009).

Tabela 1 - Espécies de plantas lenhosas comumente utilizadas na indexagem biológica de matrizes de macieiras para os vírus: *Apple mosaic virus* (ApMV); *Apple stem pitting virus* (ASPV); *Apple stem grooving virus* (ASGV) e *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV).

Vírus	Indicadoras	Fonte
ApMV	<i>Malus sylvestris</i> cv. Lord Lambourne <i>Malus domestica</i> cv. Golden Delicious	Howell et. al.(1997)
ASPV	<i>Malus spp.</i> Cv Spy 227 e Radiant crab <i>Pyronia veitchii</i> , Virginia crab	Jelkmann (2004)
ASGV	<i>Malus sylvestris</i> cv. <i>Virginia crab</i> <i>Malus micromalus</i> cv. GMAL 273	Kirby et al. (2001) Lister (2004)
ACLSV	<i>Malus sylvestris</i> cv. Russian R12.740-7A LLS5 seedling 5 de Lord Lambourn <i>Malus platycarpa</i> , Spy 227 <i>Pyronia veitchii</i>	Juarez Betti, IAC, Campinas, SP Jelkmann (2004)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Diversos autores relatam que os sintomas observados nas indicadoras tem ampla variação. São muitos os fatores que influenciam na expressão dos sintomas como: estirpe do vírus, infecções múltiplas, temperatura na estufa, luminosidade, nutrição da planta, manutenção do substrato em níveis adequados de umidade, manutenção da sanidade das folhas.

Condições ótimas de crescimento da indicadora favorece o aparecimento e intensidade dos sintomas. É comum observar epinastia que, varia de leve a severa em *Spy*, *Radiant crab* e *Pyronia veitchii*; sintoma típico de ASPV.

Crescimento reduzido pode ser observado em *Spy*, *Radiant crab*, LLS-5, R12.740-7A, *Virginia crab*, *Malus platycarpa* e *Pyronia veitchii*. Nessa situação as plantas apresentam crescimento de 2 cm até no máximo 20 cm após o que a gema apical amadurece e na maioria das vezes não volta a crescer durante todo o ciclo vegetativo fazendo-o apenas na primavera seguinte. Os internós são curtos, folhas coriáceas e as vezes deformadas.

Pontuações cloróticas podem ser observadas em todas as indicadoras ressaltando o sintoma de ApMV em Lord lambourne que é muito específico e que dificilmente se confunde com sintoma de outro vírus. Morte de nervuras e deformação da folha é comum em *Virginia crab* formando um sintoma específico para o ASGV. Também é comum observar, para o ASGV, o sintoma conhecido como “brown line” na região da enxertia em *Virginia crab*. Basta raspar toda a casca nessa região expondo o lenho. Em presença de oxigênio, rapidamente se forma uma linha marrom mostrando uma imperfeita união dos tecidos.

Em *Malus platycarpa* é comum observar mosaico sistêmico leve e mosqueado, sintoma típico de ACLSV. É comum observar vários sintomas ocorrendo concomitantemente como o nanismo, pontuações cloróticas e epinastia. Plantas contaminadas por dois ou mais vírus podem induzir sintoma completamente diferente daquele provocado por um único vírus. É comum observar morte do enxerto da indicadora. Muitas vezes nem ocorre brotação e em outras ocasiões o enxerto brota mas morre logo em seguida. É muito difícil para o técnico definir se a morte foi provocada pela presença de vírus ou por outro motivo. Devemos lembrar ainda que os porta-enxertos utilizados devem ser oriundos de sementes e que existe grande variabilidade nessas sementes, podendo provocar diferentes níveis de incompatibilidade e desenvolvimento variável da planta.

Portanto, nem sempre sintomas de crescimento reduzido, encurtamento dos internódios e amadurecimento precoce da gema apical está necessariamente associado à presença de vírus mesmo que este seja detectado por métodos sorológicos ou moleculares na planta em questão.

A sorologia apresenta diversos métodos para detecção viral que se caracterizam pelo emprego de anticorpos específicos capazes de reconhecer proteínas capsidiais. Um dos métodos sorológicos mais comuns para detecção de vírus em material vegetal é o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), (CLARK; ADAMS, 1977). São utilizados anticorpos produzidos contra a proteína capsidial de um vírus na sua detecção. Nesta reação, extratos preparados pela maceração de tecido vegetal infectado são utilizados como antígeno. Os vírus apresentam distribuição irregular dentro da planta e variam segundo o tipo de tecido a ser coletado e o período do ano (NICKEL; FAJARDO, 2009). Katwal et al. (2016) realizaram um grande levantamento utilizando DAS-ELISA como técnica de detecção para os quatro vírus latentes da macieira com resultados satisfatórios. Kundu et al. (2003) mostra que o teste ELISA não é o mais adequado para seleção de matrizes por apresentar grandes variações de acordo com o tipo de tecido coletado e a época do ano.

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma importante ferramenta molecular para detecção de vírus em plantas. Suas variações tais como: RT (*Reverse Transcriptase*)-PCR, de amplo espectro; PDO (*polyvalent degenerate oligonucleotides*) (FOISSAC et al., 2005); IC (*immunocapture*)-RT-PCR; nested PCR, multiplex RT-PCR, PCRq (*Real Time*) (MACKAY et al., 2002) têm sido descritas para detecção e estudo de variabilidade genética de vírus. A versatilidade da técnica é reduzida em decorrência do custo dos equipamentos e reagentes, e a necessidade de processamento do RNA viral, mas seu desenvolvimento permitiu um diagnóstico mais sensível (NICKEL, 2004), por isso é adequada para infecções em fases iniciais, quando a concentração viral ainda é baixa na planta (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Países importantes que produzem pomáceas como os Estados Unidos da América, Canadá, Alemanha, Espanha, França, Hungria, Holanda, África do Sul, Suíça e Inglaterra entre outros, possuem um sistema oficial de controle nos materiais propagativos de fruteiras. Na Itália o sistema oficial tornou-se voluntário recentemente.

No Brasil ainda não existe um sistema para a manutenção e propagação de material livre de vírus, muito embora a Embrapa Uva e Vinho venha executando trabalhos nessa área (NICKEL, 2002). Na prática o que se observa é que mesmo adquirindo matrizes livres de vírus de órgãos oficiais, com o decorrer do tempo esses materiais são recontaminados através da enxertia com material de origem não controlada.

Considerando que os vírus causam danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira (HANDA; THAKUR, 1999).; que na literatura existem inúmeros relatos demonstrando o efeito nocivo dos vírus latentes em fruteiras (CEMBALI et al., 2003), que ao longo dos anos, com o advento de técnicas mais sensíveis de diagnose, tem-se verificado um

aumento de plantas infectadas por um ou mais vírus (ZHAO et al., 2012); e que relatos feitos por Nickel et al. (2001) evidenciam que viroses latentes são de presença generalizada nos cultivos comerciais de macieiras do sul do Brasil, as quais podem reduzir de 20 a 80% a produtividade, fica mais que evidente a necessidade do estabelecimento de um sistema de controle dos materiais propagativos de macieiras.

Existe, no Brasil, em diversos locais públicos e privados, capacidade técnica e laboratorial para o estabelecimento de um sistema de controle sanitário para a produção de mudas sadias ou isentas de patógenos sistemicamente transmissíveis nos moldes da América do Norte ou Europa. Como já foi demonstrado por Silva et al. (2008), a indexagem biológica, quando utilizada junto de RT-PCR, caracteriza uma forma eficaz de redução de erros na detecção dos vírus. Essa técnica é eficiente e pode ser utilizada para a seleção de material sadio. A cadeia produtiva da maçã é quem tem força suficiente para o estabelecimento de um “Centro de detecção, seleção e propagação de materiais sadios de macieiras”. Com certeza o entrave é político e não técnico.

2.4 REFERÊNCIAS

ADAMS, M.J.; CANDRESSE, T.; HAMMOND, J.; KREUZE, J.F.; MARTELLI, G.P.; NAMBA, S.; PEARSON, M.N.; RYU, K.H.; VAIRA, A.M. Alphaflexviridae. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. **Virus Taxonomy**: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, UK: Elsevier Academic Press; 2012, p. 904 – 919.

ARAÚJO, L. MEDEIROS, H.A., PASA, M.S., SILVA, N.N. Manejo de doenças de fruteiras de clima temperado, subtropical e tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.37, n.291, p.61-74, 2016.

BLEICHER, J. Historia da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. p. 29-36.

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. Doenças da macieira. In: EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2006. cap.16, p. 527-608.

BONFIM, B. S. A. **Etiologia da podridão olho de boi da maçã no Brasil**. 2017. v, 48 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) —Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CEMBALI, T.; FOLWELL, R. J.; WANDSCHNEIDER, P.; EASTWELL, C.; WOWELL, W. E. **Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US.** *Crop Protection*, 22. p. 1149-1156. 2003.

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*, [Spencers Wood], v. 34, p. 475- 483, 1977.

CLOVER, G.R.G.; PEARSON, M.N.; ELLIOTT, D.R.; TANG, Z.; SMALES, T.E.; ALEXANDER, B.J.R. Characterization of a strain of Apple stem grooving virus in *Actinidia chinensis* from China. *Plant Pathology*, v. 52, p. 371-378, 2003.

DAR N. A. Apple Stem Grooving Virus – A Review Article. *International Journal of Modern Plant e Animal Sciences*, v.1, n.1, p. 28-42, 2013.

DESVIGNES, J. C. ; BOYÉ, R. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. *Acta Horticulturae*, v.235, p. 1-38. 1989.

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. *Ciência Rural*, v.44, n.10, p.1711-1714, 2014.

FIORAVANÇO, J. C. F. **Cultura da macieira no Rio Grande do Sul: análise situacional e descrição varietal.** Embrapa Uva e Vinho, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION – FAO, 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 02/02/2018.

FRIDLUND, P.R. 1980. The IR2 program for obtaining virus free fruit trees. *Plant Disease* v.64, p.825-830

FOISSAC X.; et al. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcriptionpolymerase chain reaction. A polyvalent detection and characterization tool fortrichoviruses, capilloviruses and foveaviruses. *Phytopathology*, v.95, n.6, p.617- 625, 2005.

GERMAN, S. et al. Nucleotide Sequence and Genomic Organization of Apple Chlorotic Leaf Spot Closterovirus. *Virology*, n. 179, p.104-112, nov. 1990. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/004268229090279Z/1-s2.0-004268229090279Z-main.pdf?_tid=76663687-6312-4f18-a8ed-bb31f3354fd&acdnat=1527108557_50cd49cc58051a4cd10a011acbe204e4>. Acesso em: 23 maio 2018.

HANDA, A.; THAKUR, P. D. **Virus and vírus-like diseases of Apple**. In: Diseases of Horticultural Crops – Fruit, Indus Publishing Co. New Delhi, p. 120-121. 1999.

HIRATA H.; YAMAJI H.; KOMATSU H.; KAGIWADA S.; OSHIMA K.; OKANO Y.; TAKAHASHI S.; UGAKI M.; NAMBA S. Pseudo-polyprotein translated from the full-length ORF1 of capillovirus is important for pathogenicity, but a truncated ORF1 protein without variable and CP regions is sufficient for replication. **Virus Res.** v.152, p.1–9, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística . 2017. Produção Agrícola. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 12 dez. 2017.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

INOUE, N., MAEDA, T., MITSUHATA, K. Citrus tatter leaf virus isolated from Lily. **Ann. Phytopathology** v.45, p.712-720, 1979.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON FRUIT TREE VIRUSES. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. **Acta Horticulturae**, v. 657, p.575-596, 2004.

JELKMANN W, KUNZE L. Plum pseudopox in German prune after infection with an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* causing plum line pattern. **Acta Horticulturae** v.386, p.122–125, 1995.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional.1993.745p

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. (Ed.). Compendium of apple and pear diseases.St. Paul: **American Phytopathological Society**,1990. 100p.

KATWAL, V.S., HANDA, A., THAKUR, P.D. and TOMAR, M. 2016. Prevalence and Serological Detection of Apple Viruses in Himachal Pradesh. **Plant Pathology**, 15: 40-48.

KINARD, G. R., SCOTT, S. W., BARNETT, O. W. Detection of *Apple chlorotic leaf spot viruses* and *apple stem grooving viruses* using RT-PCR. **Plant Disease**. v.80, p.616-621, 1996.

KIST, B B. Anuário Brasileiro de maçã 2017. 1ªEd. Santa Cruz do Sul. Gazeta, 2017.

KIST, B.B.; Anuário Brasileiro da Maçã 2016. ed. Gazeta, Santa Cruz do Sul 2016. 64 p.

KUMAR S.; BINK M.C.A.M.; VOLZ R.K.; BUS V.G. M.; CHAGNÉ D. Towards genomic selection in apple (*Malus domestica* Borkh.) breeding programmes: **Prospects, challenges and strategies**. *Tree G. Genomes*. v,8, p.1–14, 2011.

KUNDU, J.K.; SVOBODA, J.; POLÁK, J. Detection of *Apple stem grooving virus* in different tissues of apple trees throughout the year. **Plant Protect Science**, v. 39, n. 3, p. 93-96, 2003.

LEMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. L'Arboriculture fruitière, Paris, n. 434, p. 38-48, 1990.

LIU, P.; ZHANG, L.; ZHANG, H.; JIAO, H.; WU, Y. Detection and molecular variability of *Apple Stem Grooving Virus* in Shaanxi, China. **Phytopathology**, v.161, p.445–449, 2013.

MACKAY, I.M. et al. **Real-time PCR in virology**. In: *Nucleic Acids Research* 30(6) 1292-1305, 2002.

MAGOME, H. YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; ITO, T.; MIYAKAWA, T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear and citrus trees. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, p. 389-396. 1997.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2016/2017 a 2026/2027 / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2017. 79 p. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versao-preliminar-25-07-17.pdf> . Acesso em: 25 de novembro de 2017.

MARTELLI, G.P.;et al. **Family Closteroviridae** In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press; 2012, p. 991–996.

MARTELLI GP, CANDRESSE T, NAMBA S. *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. **Arch Virol**. 1994; 134: 451–455. doi: 10.1007/BF01310583 PMID: 8129629

MARTELLI G.P.; ADAMS M.J.; KREUZE J.F.; DOLJA V.V. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Rev Phytopathology**, v.45, p.73–100, 2007

MARTELLI, G.P.; JELKMANN, W. **ARCH. Virol.** (1998) 143: 1245.
<https://doi.org/10.1007/s007050050372>

NEMETH M. Virus, mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees. Akademiai Kiado. Budapest. 1986. 841p.

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

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

NICKEL, O. **Virus em Macieira. Cultivar Hortaliças e Frutas**. v. 2, n. 13, p. 31-34. 2002.

NICKEL, O. **Doenças causadas por vírus**. In: Frutas do Brasil. Maçã: fitossanidade. Bento Gonçalves. p.61-80, 2004.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Obtenção** de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves (RS), Documentos/ Emprapa Uva e Vinho. 2009.

NODA, H.; YAMAGISHI, N.; YAEGASHI, H.; XING, F.; XIE, J.; LI, S.; ZHOU, T.; ITO, T. YOSHIKAWA, N. *Apple necrotic mosaic virus*, a novel Ilarvirus from mosaic-diseased apple trees in Japan and China. **Journal of General Plant Pathology**, v.83, 2, p. 83–90. 2017.

PALLÁS, V., SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A., DÍEZ, J., ROWHANI, A., DESVIGNES, J.C.; SÁNCHEZ-PINA, M.A. Characterization and genomic organization of Apple mosaic *Ilarvirus*. **Acta Horticulturae** v.386, p.100-108. 1995.

PETRI, J. L.; LEITE, G. B.; COUTO, M.; FRANCESCATTO, P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 48-56, 2011.

SANHUEZA, R.M.V.; BETTI, J.A. **Doenças da macieira**. In: KIMATI, H. et al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap.48, p.421-433.

SILVA, F.N. et al. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.2, p.157-161, 2008.

SOUZA, E.B. 2016. Caracterização biológica e molecular de isolados de *Apple stem grooving virus* e construção de um clone infeccioso. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas.

TANG J.; OLSON J.D.; OCHOA-CORONA F.M.; CLOVER G.R.G.; *Nandina domestica*, a new host of *Apple stem grooving virus* and *Alternanthera mosaic virus*. **Australasian Plant Disease Notes**, v.5, p.25-27, 2010.

TAKAHASHI, T., SAITO, N., GOTO, M., KAWAI, A., NAMBA, S., YAMASHITA, S. *Apple stem grooving virus* isolated from Japanese apricot (*Prunus mume*) imported from China. Res. Bull. **Plant Prot. Ser. Jpn.** v.26, p.15-21, 1990.

ZHAO L.; HAO X.; LIU P.; WU Y. Complete sequence of an *Apple stem grooving virus* (ASGV) isolate from China. **Virus Genes**, v.45, p.596–599, 2012.

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

YANASE, H. Studies on apple latent viruses in Japan. **Bulletin Fruit Tree Research Station**, Tokyo, n. 1, p. 47-109, 1974.

YANASE, H. Back-transmission of *Apple stem grooving virus* to apple seedlings and induction of symptoms of apple topworking disease in Mitsuba Kaido (*Malus sieboldii*) and Kobano zumi (*Malus sieboldii* var. *arborescens*) rootstocks. **Acta Horticulturae** v.130, p. 117-122. 1983.

YOSHIKAWA, N.; SASAKI, E.; KATO, M.; TAKAHASHI, T. The nucleotide sequence of *apple stem grooving virus* capillovirus genome. **Virology**, v. 191, n. 1, p. 98 – 105, 1992.

YOSHIKAWA, N., SASAMOTO, K., SAKURADA, M., TAKAHASHI, T., YANASE, H. *Apple stem grooving* and *citrus tatter leaf capilloviruses* obtained from a single shoot of Japanese Pear (*Pyrus serotina*). **Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.** v.62, p.119-124, 1996.

3 DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE QUATRO VIRUS LATENTES NAS MATRIZES DE MACIEIRAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE MUDAS NO RIO GRANDE DO SUL E SANTA CATARINA

3.1 INTRODUÇÃO

O cultivo de pomaceas está distribuído em diversas regiões frutícolas do mundo. O cultivo de maçã no Brasil envolve 33.822 hectares, com uma produtividade média de 38,000 t/ha (IBGE, 2017). A produção e comercialização de maçãs encontram-se distribuídas principalmente no Sul do país, sendo que Santa Catarina e Rio Grande do Sul juntos contribuem com 96,9 % da produção nacional (IBGE, 2017). A região de Fraiburgo e São Joaquim são as principais zonas produtoras em Santa Catarina. No Rio Grande do Sul a principal região está no município de Vacaria e seu entorno.

Apesar do sucesso econômico do cultivo da maçã no Brasil, a cultura enfrenta o desafio de conviver com problemas ocasionados por fatores bióticos. Fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e viroides são os principais patógenos que afetam a cultura (KUMAR et al., 2011). Os vírus são agentes patogênicos, que se encontram, segundo definição amplamente aceita, além da fronteira que delimita e agrupa os seres vivos e afetam o desenvolvimento das plantas, interferindo de forma parasítica no metabolismo vegetal (NICKEL, 2004).

Os vírus causam danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira. Alguns diminuem a produção, outros reduzem o crescimento e existem aqueles em que o efeito é pequeno e pouco visível; entretanto, todos reduzem a qualidade dos frutos (HANDA; THAKUR, 1999). Na literatura existem inúmeros relatos que demonstram o efeito nocivo dos vírus latentes em fruteiras.

Diante do exposto, verificar a qualidade das matrizes utilizadas para a produção de mudas que formarão os futuros pomares, os quais devem ser produtivos por cerca de 20 anos, é uma necessidade premente. Visando avaliar o quadro atual do material propagativo, foi realizado o presente trabalho, dividido em duas vertentes: a primeira teve como objetivo determinar a incidência dos quatro principais vírus latentes da macieira (ACLSV, ASGV, ASPV e ApMV) em matrizes de macieiras utilizadas por dois viveiros do Rio Grande do Sul e três de Santa Catarina, para a produção de mudas fazendo sua caracterização biológica e molecular; a segunda teve como objetivo analisar a variabilidade genética do gene da proteína capsidial de isolados brasileiros de ASGV.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Indexagem biológica

3.2.1.1 Obtenção dos *seedlings* para formação dos porta-enxertos

As sementes da cultivar Gala foram utilizadas para formação dos porta-enxertos. Essas sementes foram semeadas individualmente em tubetes cônicos de seção circular com 130 cc de capacidade volumétrica, com quatro estrias longitudinais para direcionamento das raízes.

O substrato utilizado foi a base de turfa de Sphagnum canadense, vermiculita e casca de arroz carbonizada (Carolina[®]). A cada 200 litros de substrato, foi acrescentado 500 gr de adubo de liberação controlada, fórmula 04-14-08 (Osmocote[®]), misturados em betoneira por 3 minutos. Os tubetes semeados ficaram sob irrigação aérea por microaspersão com três ciclos diários de 6 minutos e vazão dos microaspersores de 240 L/h. Após 70 dias, as mudas com aproximadamente 15 cm de altura foram transplantadas para vasos pretos com capacidade para 2 litros. O substrato utilizado foi o mesmo descrito para a semeadura.

Foi realizada uma classificação para separar as plantas que apresentaram resistência à doença mancha da gala causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Essa doença é agressiva e, mesmo utilizando fungicidas protetores, provoca a queda das folhas e reduz o crescimento das mudas. Plantas com diâmetro do caule de 08-1,2 cm foram utilizadas para enxertia das indicadoras e das matrizes.

3.2.1.2 Introdução das matrizes para teste

Os materiais testados foram obtidos de matrizes das cultivares de porta-enxertos Marubakaido e EM.9 e das cultivares de copa Galaxi e Maxigala, do grupo “Gala”; Fuji suprema e Mishima, do grupo “Fuji”. Esses materiais foram obtidos em cinco viveiros comerciais inscritos no RENASEM: dois viveiros do Rio Grande do Sul, estabelecidos no município de Vacaria e Esmeralda e três em Santa Catarina, sendo um do município de Urubici, um do município de Lages e outro do município de Fraiburgo.

Foram coletadas 10 estacas dormentes de 20 cm de comprimento com média de 10 gemas de cada uma das matrizes. As estacas foram lavadas com água destilada e escovadas (com escova-de-dentes) para retirar o excesso de sujeira. Foram então etiquetadas, envoltas em

jornal úmido, colocadas em um saco plástico e mantidas na parte inferior de uma geladeira por 15 dias, para auxiliar na quebra de dormência. Em seguida, essas estacas foram enxertadas, pelo método de dupla garfagem, em seedlings de macieiras “Gala” (com diâmetro variando entre 0,8 a 1,2 cm) previamente cultivados por um ciclo como descrito anteriormente. O enxerto foi amarrado com fita de enxertia (Agilis), de origem Japonesa, que é biodegradável e se rompe naturalmente com o crescimento do enxerto. O topo dos enxertos foi lacrado com tinta plástica branca.

3.2.1.3 Introdução das indicadoras

Para o estabelecimento das plantas matrizes de indicadoras, as estacas foram fornecidas pela Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves – RS e tratadas da mesma forma descrita para a introdução das matrizes. Foram enxertadas 30 plantas para cada indicadora, capazes de fornecer 300 gemas de boa qualidade para a indexagem.

As indicadoras usadas foram as recomendadas pelo comitê internacional para estudos de viroses em macieiras, sendo a indicadora “Virginia crab” utilizada para detecção do ASGV e ASPV; a indicadora “Spy – 227” para detecção do ASPV e ACLSV; a indicadora “Radiant Crab” para detecção do ASPV; a indicadora *Pyronia veitchii* para detecção do ACLSV e ASPV; a indicadora “Lord Lambourne” seedling 5 (LLS-5) para detecção do ApMV e estirpes fracas do ACLSV; e as indicadoras *Malus platycarpa* e “Russian 12.740-7A” (R 12.740-7A) para detecção do ACLSV.

Os trabalhos foram conduzidos de acordo com a metodologia descrita inicialmente por Fridlund (1980) e suas atualizações descritas por Jelkmann (2004). A técnica consiste na utilização de espécies de plantas indicadoras lenhosas sensíveis aos vírus latentes e que, quando inoculadas, mostram sintomas visíveis nas folhas e/ou no caule.

3.2.1.4 Processo de indexagem

No mês de julho de 2016 foram podadas as plantas matrizes e as indicadoras que foram enxertadas no ano anterior. As estacas obtidas foram selecionadas e tratadas como já descrito anteriormente. Durante o mês de agosto de 2016 uma gema de cada indicadora foi enxertada a 20 cm da base do porta-enxerto pelo processo de “chip budding”. Abaixo dessa gema e do

mesmo lado foram enxertadas, pelo mesmo processo, duas gemas da planta a ser testada. Cada matriz compõe um bloco de 7 indicadoras x 5 repetições (35 plantas).

Na sequência, com a brotação da gema da indicadora, se a matriz em teste estiver infectada, mostrará nas folhas e/ou no lenho os sintomas visíveis da presença do vírus. A observação da presença ou ausência dos sintomas foi feita a cada duas semanas em todo o ciclo de crescimento. Para alguns vírus é necessário que a indicadora cresça por um ciclo e as observações sejam feitas no lenho junto a região da enxertia, no inverno seguinte.

As indexagens foram conduzidas em casa de vegetação coberta com filme plástico e telas nas laterais. O controle positivo consiste em enxertar 5 *seedlings* com cada uma das 7 indicadoras compondo um bloco 7 indicadoras x 5 *seedlings* (35 plantas). Cada uma dessas 35 plantas foi enxertada com duas gemas abaixo e do mesmo lado onde foi enxertada a gema da indicadora, da planta que sabidamente está infectada por vírus. Para o controle negativo somente foi enxertada a gema da indicadora. Os controles positivos foram a cv. ‘Baronesa’ de Caçador/SC infectada com ASGV; ‘Braeburn’ de Vacaria/RS infectada com ACLSV e ASPV; ‘Gala’ de Fraiburgo infectada com ApMV. Os controles serviram para comparação de sintomas entre os diferentes materiais avaliados.

3.2.2 Testes moleculares

3.2.2.1 Extração de ácidos nucleicos e síntese de DNA

Os testes moleculares foram realizados no Laboratório de Genética, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Para a caracterização dos vírus, aproximadamente 100 mg de folhas das plantas coletadas foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e submetidas à extração de RNA total utilizando o reagente TRI (Sigma Aldrich), de acordo com as especificações do fabricante. A integridade e a quantidade dos ácidos nucleicos extraídos foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% e em quantificador de ácidos nucleicos Nanodrop 2000 (Thermo Fisher).

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foram adicionados em microtubos de 1,5ml: 2µg de RNA, 0,1µM do oligonucleotídeo Oligo (dt) 15 (Promega), 1µl de dNTP’s (10µM) e água livre de RNase suficiente para completar o volume de 13µl. Os tubos foram incubados a 65°C por 5 min e a 2°C por 1 minuto. Após isso foram adicionados em cada tubo, 4µl de tampão 5x, 1µl de DTT e 1µl da enzima Superscript III RT (200u/µL) (Invitrogen).

Finalmente, os tubos foram incubados a 55°C por 1h seguido de 70°C por 15 minutos.

3.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada utilizando a enzima Taq DNA polymerase (500 u/μL) (Ludwig Biotec) de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 1 μl de cDNA. Os oligonucleotídeos utilizados para cada espécie viral estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a detecção das espécies virais associadas às amostras de macieira..

Oligonucleotídeos	Sequência	Fragmento esperado (pb)
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>		
CL6784F	5' ATGGCAGCAGTTCTGATTTTG 3'	358
CL7365R	5' CTAAATGCAAAGATCAGTCGAC 3'	
<i>Apple mosaic virus</i>		
MV1474F	5' ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA 3'	262
MV1711R	5' GTAACCTACTCGTTATCACGTACAA 3'	
<i>Apple stem grooving virus</i>		
SG5641F	5' ATGAGTTTGGGAAGACGTGCTTC 3'	755
SG6396R	5' CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT 3'	
<i>Apple stem pitting virus</i>		
SP9012F	5' CTCTTGAACCAGCTGATGGC 3'	269
SP9256R	5' ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT 3'	

Fonte: Candresse et al., 1995; Jelkmann, 1994; Menzel et al., 2002; Nickel et al., 2001.

Para todas as amplificações a programação do termociclador (Applied Biosystems) consistiu em um pré-aquecimento até 94 °C por dois minutos, seguido de 34 ciclos de 45 segundos a 94 °C (desnaturação), 60 segundos a 48 – 55°C (anelamento) e 90 segundos a 72 °C (extensão), finalizando com 10 minutos a 72 °C para a extensão final dos fragmentos amplificados.

Para o anelamento a temperatura variou de acordo com o vírus testado: Para ApMV, usou-se a temperatura de 55,5°C; e para ACLSV, ASGV e ASPV, foi usada a temperatura de 50°C. Os resultados da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% e para

as amostras utilizou-se 1 µL de Azul de Bromofenol (Vetec), 1 µL de Gel Red (Diluído em 1:499) (Biotium) e 5 µL do produto de PCR. O marcador molecular utilizado foi o 1kb *DNA Ladder* (Promega).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Porta-enxertos

3.3.1.1 Marubakaido

A amostra enviada pelo viveiro um apresentou nanismo e epinastia na indicadora Spy; nanismo, epinastia com deformação foliar em *Pyronia veitchii*, sintomas típicos de ASPV que foi confirmado por RT-PCR. Foi ainda observada morte dos enxertos de Radiant Crab que não podem ser categoricamente atribuídos ao ASPV embora seja possível. Fridlund (1980) ao descrever a metodologia de indexagem biológica comenta que em alguns casos o isolado viral ou a combinação destes é tão forte que não deixa o enxerto brotar e este morre. Nesses casos recomenda enxertar a indicadora e somente enxertar a matriz para teste no ciclo seguinte.

Os sintomas que se espera do ASPV é o crescimento reduzido com evidente epinastia em Spy, Radiant Crab e *Pyronia veitchii*. Spy e *Pyronia veitchii* podem ainda indicar o ACLSV (JELKMANN, 2004). Na literatura não está descrito que tipo de sintoma ocorre quando ACLSV e ASPV estão juntos em Spy ou *Pyronia veitchii*.

Na indicadora Virginia Crab foi observado nanismo moderado sem os sintomas típicos de ASGV que são a morte de nervuras provocando a deformação foliar com pontos cloróticos e a formação de “brown line” na região da enxertia ao se retirar a casca. Numa atitude conservadora foi anotado como positiva para ASGV; entretanto, foi negativa no RT-PCR. Provavelmente esse sintoma foi provocado por ASPV. Isso também não está descrito na literatura. Sabemos que condições adversas de clima e certos isolados virais podem afetar a ocorrência e intensidade dos sintomas (LEONE et al., 1998). RT-PCR pode expressar falso negativo seja pela inadequação dos iniciadores ou problemas na extração do RNA (JELKMANN, 2004). Entretanto, quando os dois testes são aplicados concomitantemente se complementam facilitando muito a compreensão dos resultados e reduzindo a possibilidade de escapes (SILVA, 2008).

A amostra enviada pelo viveiro três foi negativa para todos os vírus em ambos testes. Esse resultado é interessante. Entre os anos de 1986 a 2000 foi desenvolvido um projeto na Embrapa – SPSB em Canoinhas – SC em que foi selecionada uma matriz de Maruba e uma de EM - 9 que por três anos consecutivos não apresentaram sintomas nas indicadoras. Esse material foi propagado e comercializado pela Embrapa e Epagri para as empresas e viveiros (CRESTANI, 2000). Esse viveiro deve ter mantido o material sadio.

A amostra do viveiro cinco apresentou nanismo, lesões locais cloróticas e deformação foliar em Virginia Crab, sintomas típicos de ASGV sendo negativa no RT-PCR. Nenhuma outra indicadora apresentou qualquer sintoma, entretanto foi positiva para ASPV no RT-PCR.

Esse resultado mostra que ocorre escapes nos dois testes, já que os sintomas foram evidentes para ASGV e, por outro lado, deveria ter apresentado sintomas em Spy, Radiant Crab e *Pyronia veitchii* já que no RT-PCR foi positivo para ASPV.

Resultados mostrando diferenças na sintomatologia das indicadoras biológicas foram descritos por Leone (1998). As indicadoras biológicas não foram capazes de detectar o ASPV e, por outro lado o teste molecular não detectou ASGV indicado por Virginia Crab. Contudo, essa planta seria eliminada de qualquer forma por apresentar resultado positivo em cada teste mesmo que um não confirme o outro. Somente plantas que não apresentem positivos nos dois testes seriam candidatas à seleção como matriz. Mesmo assim seriam submetidas a um novo ensaio de confirmação. Isso mostra confiabilidade no sistema de seleção.

3.3.1.2 EM - 9

A amostra enviada pelo viveiro um apresentou nanismo e deformação foliar na indicadora R-12.740-7A, típico de ACLSV não confirmado no teste molecular. Nanismo e deformação foliar em *Pyronia veitchii* indicando presença de ASPV e/ou ACLSV, não confirmado no RT-PCR. Esperava-se que para o ASPV também fosse observado sintomas em Spy e Radiant Crab e para o ACLSV também fosse observado sintomas em *Malus platycarpa* o que não ocorreu. Não foi observado sintoma em Virginia Crab, entretanto, foi positivo para ASGV no RT-PCR. Os sintomas encontrados em R-12.740-7A e *Pyronia veitchii* não estão descritos para o ASGV. Considera-se que houve escape em ambos testes. Também nesse caso a planta seria descartada por apresentar sintomas em duas indicadoras.

A amostra do viveiro três foi negativa para todos os vírus em ambos testes. Assim como o Maruba já discutido acima, essa matriz de EM – 9 se encontra sadia.

A amostra do viveiro cinco apresentou sintomas de nanismo e deformação foliar em *Pyronia veitchii*, sem o sintoma de epinastia que é mais típico de ASPV embora não foi observado sintoma em Spy e Radiant Crab. Foi confirmado para ASPV no RT-PCR. Na indicadora *Malus platycarpa* foi observado mosqueado típico de ACLSV. Nenhuma amostra foi positiva para ACLSV no teste RT-PCR. Os resultados apresentados acima estão na tabela 3.

Os viveiros 2 e 4 não enviaram Marubakaido e M-9. Provavelmente utilizam outros porta-enxertos na produção de mudas.

Não houve caso positivo para ACLSV, nos testes moleculares, mesmo sendo esse considerado, um dos mais amplamente distribuídos nos pomares de todo o mundo (RANA et al., 2010). Provavelmente os iniciadores utilizados para o ACLSV não estejam adequados para os isolados presentes nos materiais testados.

A ausência, em todas as amostras do ApMV, é compreensível já que muitas cultivares comerciais mostram o sintoma nas folhas e são facilmente eliminadas (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Os resultados encontrados nos porta-enxertos são frustrantes já que todos os viveiros tiveram acesso aos materiais selecionados no projeto executado na Embrapa de Canoinhas (SC) nos anos 1986-2000 (CRESTANI, 2000). Essa constatação reforça a necessidade de treinamento para os viveiristas para que adotem medidas técnicas que mantenham os materiais de propagação saudáveis.

Tabela 3 - Análises de indexagem biológica e RT-PCR realizadas em 3 matrizes do porta-enxerto Maruba e 3 matrizes do porta-enxerto M-9 para quatro vírus latentes da macieira: *Apple mosaic virus (ApMV)*; *Apple stem grooving virus (ASGV)*; *Apple stem pitting virus (ASPV)* e *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)*.

Matriz	Viveiro	Indexagem biológica				RT-PCR			
		ASGV	ASPV	ACLSV	ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV	ApMV
Maruba	1	+	+	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	-	-	-	+	-	-
M-9	1	-	+	+	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+	-	+	-	-	+	-	-

- = negativo, + = positivo.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

3.3.2 Copas

3.3.2.1 Cultivar Galaxi

A amostra enviada pelo viveiro um não apresentou sintomas na indexagem biológica e foi negativo no RT-PCR. Esse resultado, a princípio, animador é anulado quando essa matriz é enxertada sobre o Maruba e EM-9, do mesmo viveiro, que estão contaminados (Tabela 2). A muda produzida sobre Maruba estará com ASGV e ASPV; com filtro de EM-9 ou só no EM-9 estará com ASGV, ASPV e ACLSV.

A amostra do viveiro dois apresentou deformação foliar e morte de nervuras em Virginia Crab, típico de ASGV; nanismo forte e epinastia em Radiant Crab, nanismo, epinastia e lesões cloróticas em *Pyronia veitchii* típico de ASPV; mosqueado em *Malus platycarpa* típico de ACLSV. No RT-PCR foi negativo para todos os vírus. Os sintomas nas indicadoras biológicas foram evidentes sugerindo escape no teste molecular. Esse viveiro não enviou porta-enxerto não sendo possível cruzar dados. Entretanto, as mudas produzidas com essa cultivar estariam contamiadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

A amostra do viveiro três apresentou nanismo forte e deformação foliar em Virginia Crab, típico de ASGV confirmado no teste molecular. Esse teste ainda foi positivo para ASPV; entretanto, nenhum sintoma foi observado nas indicadoras específicas. Esse resultado nos leva a crer que, por algum motivo, as indicadoras não foram capazes de detectar o ASPV. Independente do estado sanitário dos porta-enxertos utilizados, com relação às viroses estudadas, as mudas dessa cultivar estarão contaminadas por ASGV e ASPV.

A amostra do viveiro quatro apresentou mosqueado em *Malus platycarpa*; nanismo com epinastia em R-12.740-7A. Esses sintomas são típicos de ACLSV e, que por motivos já discutidos, não foi positivo no RT-PCR. Esse viveiro não enviou porta-enxertos. Se os porta-enxertos forem saudáveis, as mudas dessa cultivar, estarão contaminadas por ACLSV.

3.3.2.2 Cultivar Mishima

A amostra enviada pelo viveiro um apresentou morte de nervuras e deformação foliar em Virginia Crab indicando o ASGV; epinastia e nanismo forte em Radiant Crab indicando o ASPV, ambos confirmados no teste molecular. *Spy* e *Pyronia veitchii* deveriam ter apresentado epinastia o que não foi observado. O trabalho de Leone et al. (1998) mostra que existem

diiferenças entre os sintomas observados em anos diferentes e relacionados com o isolado viral que pode ter diferenças na agressividade ou na combinação de diferentes vírus em infecções multiplas. Apresentou ainda mosqueado e nanismo em *Malus platycarpa* sugerindo a presença de ACLSV que não foi confirmado no teste molecular. As mudas produzidas com esta cultivar estarão contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

Os viveiros dois e três não enviaram Mishima.

A amostra do viveiro quatro apresentou nanismo e deformação foliar em *Pyronia veitchii* indicando ASPV que foi confirmado por RT-PCR. Esse mesmo teste foi positivo para ASGV embora nenhum sintoma tenha sido observado na indicadora específica Virginia Crab. Ocorreu ainda a morte dos enxertos de R - 12.740-7A e foi interpretado como positivo para ACLSV que não foi confirmado no RT-PCR. Essas mudas estariam contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV. Infecções múltiplas são comuns nos cultivos de macieiras como mostra os dados de Kundu (2002) onde das vinte amostras de macieira cultivar “Spartan” testadas por RT-PCR, onze foram positivas para ASPV, dezesseis positivas para ASGV e nove continham os dois vírus.

Na amostra do viveiro cinco foi observado morte dos enxertos de Spy; nanismo e epinastia em Radiant Crab; epinastia e lesões locais cloróticas em *Pyronia veitchii* indicando ASPV que foi confirmado pelo teste molecular. Em Virginia Crab foi observado nanismo, morte de nervuras e lesões locais cloróticas indicando ASGV e confirmado por RT-PCR. Mosqueado em *Malus platycarpa*, nanismo e epinastia em R-12.740-7A indicam ACLSV não confirmado por RT-PCR. As mudas produzidas por este viveiro, com esta cultivar, estariam contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

3.3.2.3 Cultivar Fuji Suprema

A amostra enviada pelo viveiro um apresentou nanismo em Spy; epinastia, nanismo e lesões locais cloróticas em *Pyronia veitchii* indicando ASPV confirmado pelo teste molecular. Nanismo e epinastia esperados em Radiant Crab não foram observados. Quando essa cultivar for enxertada sobre os porta-enxertos desse viveiro as mudas passarão a ter ASGV, ASPV e ACLSV.

Amostra do viveiro dois apresentou nanismo, morte de nervuras e deformação foliar em Virginia Crab indicando ASGV; nanismo e epinastia em Radiant Crab e lesões locais cloróticas em *Pyronia veitchii* indicando ASPV; morte do enxerto em LLS-5, nanismo forte e mosqueado em *Malus platycarpa* indicando ACLSV. Apesar dos sintomas contundentes nas indicadoras

biológicas, foi negativo, para todos os vírus, no teste molecular. Claramente trata-se de escape no teste molecular. Esse viveiro não enviou porta-enxertos. Independente de qual usem para produzir as mudas, estariam contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

Amostra do viveiro três apresentou nanismo forte e deformação foliar em Virginia Crab indicando ASGV e/ou ASPV. Embora Virginia Crab seja indicadora também de ASPV esperava-se que apresentasse sintomas em Radiant Crab, Spy e *Pyronia veitchii* o que não aconteceu e por isso, na indexagem biológica foi anotado como negativo para ASPV. O teste RT-PCR confirmou ASGV e negativo para ASPV. Mosqueado em *Malus platycarpa*; nanismo e lesões locais cloróticas em R-12.740-7A indicam ACLSV não confirmado no teste molecular. As mudas produzidas para essa cultivar, no viveiro três estariam contaminadas com ASGV e ACLSV.

Na amostra do viveiro quatro foram observados sintomas de epinastia e nanismo forte em Radiant Crab; nanismo, epinastia e deformação foliar em *Pyronia veitchii* indicando ASPV confirmado no teste molecular. Mostrou ainda mosaico em *Malus platycarpa* sugerindo ACLSV que, como já sabemos, não amplificou no RT-PCR. Adicionalmente, no teste molecular, a amostra foi positiva para ASGV, entretanto, nenhum sintoma foi observado em Virginia Crab. As mudas produzidas no viveiro quatro com essa cultivar estariam contaminadas por ACLSV, ASPV e ASGV, independentemente do porta-enxerto utilizado.

A amostra do viveiro cinco mostrou sintomas de deformação foliar, nanismo e lesões locais cloróticas em Virginia Crab sugerindo ASGV, não confirmado por RT-PCR. Nanismo forte e epinastia em Radiant Crab e *Pyronia veitchii* sugerindo ASPV, confirmado no RT-PCR. Ainda mostrou mosaico em *Malus platycarpa*, nanismo e epinastia em R-12.740-7A sugerindo ACLSV sem confirmação no RT-PCR. As mudas produzidas com essa cultivar estariam contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

3.3.2.4 Cultivar Maxigala

A amostra do viveiro um não apresentou sintomas nas indicadoras biológicas e foi negativa para os quatro vírus nos testes moleculares. Independente desse resultado, como os porta-enxertos estão contaminados, as mudas produzidas com Maruba e filtro de EM-9 também estariam contaminadas por ASGV, ASPV e ACLSV.

A amostra do viveiro três apresentou resultados negativos na indexagem biológica e o teste molecular não foi feito porque a amostra foi perdida. Somente após a execução do RT-PCR é que se pode inferir sobre a qualidade das mudas dessa matriz.

Na amostra do viveiro quatro foi observado nanismo, deformação foliar e lesões locais cloróticas em Virginia Crab sugerindo ASGV confirmado por RT-PCR. Na indicadora R-12.740-7A foi observado nanismo com epinastia sugerindo ACLSV não amplificado no RT-PCR. O viveiro quatro não enviou porta-enxerto. Independente do estado sanitário dos porta-enxertos utilizados as mudas produzidas dessa cultivar estariam contaminadas por ASGV e ACLSV.

Na amostra do viveiro cinco foi observado mosqueado em *Malus platycarpa* com nanismo em R-12.740-7A sugerindo ACLSV não amplificado no RT-PCR; além de nanismo forte em *Pyronia veitchii* sugerindo ASPV, confirmado no teste molecular mesmo sem apresentar sintomas em Spy e Radiant Crab que seriam esperados para ASPV. Considerando os resultados para os porta-enxertos esse viveiro produz mudas de Maxigala com ASGV, ASPV e ACLSV. Dados apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Análises de indexagem biológica e RT-PCR realizadas em 4 matrizes de Galaxy; 3 matrizes de Mishima; 5 matrizes de Fuji Suprema e 4 de Maxigala para quatro vírus latentes da macieira: *Apple mosaic vírus* (ApMV); *Apple stem grooving vírus* (ASGV); *Apple stem pitting vírus* (ASPV) e *Apple chlorotic leaf spot vírus* (ACLSV).

Matriz	Viveiro	Indexagem biológica				RT-PCR			
		ASGV	ASPV	ACLSV	ApMV	ASGV	ASPV	ACLSV	ApMV
Galaxi	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	+	+	-	-
	4	-	-	+	-	-	-	-	-
Mishima	1	+	+	+	-	+	+	-	-
	4	-	+	+	-	+	+	-	-
	5	+	+	+	-	+	+	-	-
Fuji Suprema	1	-	+	-	-	-	+	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	-	+	-	+	-	-	-
	4	-	+	+	-	+	+	-	-
	5	+	+	+	-	-	+	-	-
Maxigala	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	na	na	na	na
	4	+	-	+	-	+	-	-	-
	5	-	+	+	-	-	+	-	-

- = negativo, + = positivo, na = amostra perdida.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que existem “escapes” tanto na indexagem biológica em que se utilizam espécies de macieiras não comerciais que são sensíveis e chamadas de “indicadoras lenhosas”.

Quanto no teste molecular de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) (NICKEL; FAJARDO, 2009) ao se diagnosticar os quatro vírus latentes da macieira - *Apple mosaic virus* - ApMV (família Bromoviridae; *Apple stem grooving virus* – ASGV; *Apple stem pitting virus* – ASPV e *Apple chlorotic leafspot virus* - ACLSV; (família Betaflexiviridae). Entretanto, quando os dois testes são aplicados concomitantemente, a possibilidade de haver escape é muito baixa e se mostraram como uma importante ferramenta na seleção de matrizes (SILVA, 2008).

Para o ACLSV, 13 de 22 amostras foram positivas no teste biológico, entretanto, nenhuma amostra foi positiva no teste molecular nem mesmo o controle positivo.

Considerando os sintomas evidentes nas indicadoras *Malus platycarpa* e R – 12.740-7A sugere-se que os primers utilizados não foram adequados para amplificar os isolados presentes nas amostras. O erro poderia estar na extração do RNA seja, pela época do ano que foi feita a coleta, tipo de tecido ou contaminação por RNAses. Entretanto, como todos foram negativos, é mais provável erro nos iniciadores.

Para o ApMV apenas o controle positivo mostrou sintomas na indicadora biológica.

Para o ASPV 13 de 22 foram positivas na indexagem biológica; 11 de 22 foram positivas no RT-PCR e 9 positivas nos dois testes.

Para o ASGV, 10 de 22 foram positivas na indexagem biológica, 8 foram positivas no RT-PCR e 5 em ambos testes.

No geral, 14 de 22 amostras foram positivas para pelo menos um vírus em RT-PCR e 17 de 22 foram positivas na indexagem biológica.

As 5 amostras que foram negativas para todos os vírus na indexagem biológica também foram negativas no RT-PCR.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam que, apesar do esforço dispensado para a seleção de matrizes de macieiras livres de vírus, os materiais propagativos se encontram fortemente contaminados. Estes dados estão consolidados na tabela 4. Das dezesseis matrizes testadas, doze produziram mudas com três vírus; duas com dois vírus, uma com um vírus. Com os resultados obtidos nesse trabalho, nenhum viveiro produz mudas saudáveis.

Tabela 5 - Incidência de ASGV, ASPV e ACLSV em mudas de macieiras produzidas com os materiais testados neste trabalho.

Matriz	Viveiro	ASGV	ASPV	ACLSV	ApMV
Galaxi	1	+	+	+	-
	2	+	+	+	-
	3	+	+	-	-
	4	-	-	+	-
Mishima	1	+	+	+	-
	4	+	+	+	-
	5	+	+	+	-
Fuji Suprema	1	+	+	+	-
	2	+	+	+	-
	3	+	+	+	-
	4	+	+	+	-
	5	+	+	+	-
Maxigala	1	+	+	+	-
	3	?	?	?	?
	4	+	-	+	-
	5	+	+	+	-

- = negativo, + = positivo, ? = não executado PCR na copa.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018

Considerando dados da literatura referente à perda de produtividade associada à presença de vírus, podemos perceber quanto estas enfermidades atrapalham o pomicultor.

É premente a necessidade de organização do setor no sentido de adotar medidas que resolvam definitivamente essa dificuldade. Existem pesquisadores competentes nessa área; os testes se mostraram confiáveis e o conhecimento para a manutenção de materiais sadios está disponível.

Sugerimos a criação de um “Centro de diagnose, seleção, manutenção, propagação e distribuição” ou comercialização de materiais sadios de macieiras. Sem isso, provavelmente não seremos competitivos frente aos desafios que o mercado impõe.

3.4 CONCLUSÃO

Os materiais utilizados para propagação de mudas de macieira pelos viveiros testados estão fortemente contaminados com viroses

Dos seis porta-enxertos testados, quatro estão contaminados com viroses, resultado confirmado em ambos testes, tanto via indexação, quanto molecular.

Das desesseis copas testadas, treze foram positivas na indexagem biológica e dez confirmadas por RT-PCR.

As mudas produzidas pelos viveiros de SC e RS testados neste trabalho, estão contaminadas por viroses.

3.5 REFERENCIAS

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**. 386: 136-147. 1995.

CEMBALI, T.; FOLWELL, R. J.; WANDSCHNEIDER, P.; EASTWELL, C.; WOWELL, W. E. Economic implications of a vírus prevention program in deciduous tree fruits in the US. **Crop Protection**, 22, p. 1149-1156. 2003.

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.

FRIDLUND, P.R. 1980. The IR2 program for obtaining virus free fruit trees. **Plant Disease**, V.64, p.825-830

HANDA, A.; THAKUR, P. D. **Virus and vírus-like diseases of Apple**. In: Diseases of Horticultural Crops – Fruit, Indus Publishing Co. New Delhi, p. 120-121. 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **IBGE Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

JELKMANN, W. Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlavirus. **Journal of General Virology**, v.75, p.1535-1542. 1994.

KUMAR S.; BINK M.C.A.M.; VOLZ R.K.; BUS V.G. M.; CHAGNÉ D. Towards genomic selection in apple (*Malus domestica* Borkh.) breeding programmes: **Prospects, challenges and strategies**. **Tree G. Genomes**. v,8, p.1–14, 2011

KUNDU, J. K. The application of RT-PCR assay for the detection of Apple stem pitting virus and Apple stem grooving virus in four apple cultivars. **Plant Protect. Sci.**, v.38, p. 13 – 17.2002.

LEONE, G., LINDNER, J.L., VAN DER MEER, F.A., SCHOEN, C.D. Symptoms on apple and pear indicators after back-transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of apple stem pitting virus with pear vein yellows virus. **Acta Hort.**, v. 472, p.61-65.1998.

MENZEL, W., JELKMANN, W.; MAISS, E. Detection of four apple viruses by multiplex RT- PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. **Journal Virology Methods**, v.99, p.81-92. 2002.

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

NICKEL, O. Doenças causadas por vírus. In: Frutas do Brasil. Maçã: fitossanidade. Bento Gonçalves. p.61-80, 2004.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves (RS), Documentos/ Emprapa Uva e Vinho. 2009.

RANA T, CHANDEL V, KUMAR Y, RAM R, HALLAN V, ZAIDI A.A. Molecular variability analyses of *Apple chlorotic leaf spot virus* capsid protein. **J Biosci.** V.35, p.605–15. 2010.

SILVA, F.N. et al. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.2, p.157-161, 2008.

4 MOLECULAR CHARACTERIZATION AND VARIABILITY OF COAT PROTEIN GENE OF SOUTHERN BRAZILIAN *Apple stem grooving virus* ISOLATES

4.1 INTRODUCTION

ASGV is a world wide distributed plant virus, with a great variety of hosts, but is known for infections principally in pomaecous trees. In apple, is described as a latent virus, for not producing symptoms on most commonly used commercial rootstocks and varieties (NEMETH, 1986). Even so, ASGV infection can reduce fruit production in 15%, cause apple top working disease and change the pattern of host's defense associated genes in some apple varieties and species (YANASE, 1983; LÉMOINE, 1990; CHEN et al., 2014). In susceptible *Malus* species, it causes severe xylem pitting and grooving, phloem necrosis, reduced vigor of the canopy and decline of the plant (NICKEL et al., 2001).

ASGV is a flexuous filamentous virus, measuring 640 to 700 nm in length and 12 nm of diameter. It is the type species of *Capillovirus* genus (*Betaflexiviridae* family), and have linear, positive sense ssRNA genome, with 6.5 to 7.4 in kb size, with two overlapping open reading frames (ORF's) and a Poly-A tail in 3' extremity. ORF 1 encodes a 241 – 242 kDa polyprotein that is cleaved in several proteins related to replication on its N-terminal region and the coat protein on its C-terminal region. ORF 2 is nested in ORF 1 and codes a 36-52 in kDa movement protein, by a subgenomic RNA (ADAMS et al., 2012). ASGV doesn't have any vectors, being propagated principally by grafting, which has been a major aggravating factor for viral spread in many rosaceous orchards, since viral infection is asymptomatic (NEMETH, 1986). Because of this, periodic diagnostic tests have to be done to prevent new introductions of ASGV-infected plants on production areas.

Studies on the characterization of genomic regions and genetic variability helps to understand viral evolution, recommend control measures and the development of tools for viral diagnosis, and in Brazil, there are few studies like that. This work aimed to make an analysis of genetic variability of the CP genes of Brazilian ASGV isolates from apple matrices from Rio Grande do Sul and Santa Catarina States, to increase the knowledge on their variability and qualify the support for diagnosis, molecular characterization and disease control.

4.2 MATERIAL AND METHODS

4.2.1 Plant material, virus isolates, nucleic acid extraction, RT-PCR, cloning and sequencing

Leaf samples were collected in apple tree matrices in two commercial nurseries (three samples in each) from Vacaria (Rio Grande do Sul) and Bom Retiro (Santa Catarina) (n° de acesso genBank). Molecular characterization was conducted in Centro de Ciências Agroveterinárias of Santa Catarina State University (UDESC). Approximately 100mg of leaf tissue were homogenized in liquid nitrogen and submitted to total RNA extraction using Tri Reagent (Sigma Aldrich), following manufacturer's instructions.

Nucleic acid quality and integrity were verified by 1% agarose gel electrophoresis and in nanodrop 2000 nucleic acid quantifier (Thermo Fisher). Superscript III Reverse Transcriptase (200u/μL) (Invitrogen) were used for complementary cDNA synthesis, following manufacturer instructions, using 2μL of extracted nucleic acids as a template. Polymerase chain reaction (PCR) were made with Taq DNA polymerase (500 u/μL) (Ludwig Biotec) following manufacturer's instructions, using SG5641F (5'ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C3') and SG6396R (5' CTG CAA GAC CGC GAC CAA GTT T3') primer pair, with a temperature of 50°C for one minute to annealing (NICKEL et al., 2001).

PCR amplifications were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis using 5 μL of PCR product. Positive samples were purified using Axyprep purification kit (Axygen), and sended for sequencing (Helixxa serviços genômicos).

4.2.2 Nucleotide alignments and phylogenetic relationships

Multiple nucleotide sequence alignments were performed using algorithms muscle in MEGA 6.0 program (TAMURA et al., 2013). Phylogenetic relationships were determined using Neighbor Joining method implemented in MEGA 6.0 program using Kimura 2-parameter with discrete gamma distribution (G) and bootstrap support from 2,000 replications.

4.2.3 Description of the coat protein genetic variability, recombination and selection analyses

Datasets for analyses of genetic variability were constructed with at least 6 isolates (Brazil, China, Czech Republic, India, Japan and South Korea). An additional, “world” dataset comprising isolates from Brazil (6), China (32), Czech Republic (9) Germany (1), India (71), Japan (8), South Korea (19) and Taiwan (3) was included in the analyses. Molecular variability descriptors [total number of segregating sites (S), number of nucleotide differences between sequences (K), nucleotide diversity (π), haplotype number (H), haplotype diversity (Hd) and Watterson’s estimator for the population-scaled mutation rate] were estimated using DnaSP software v. 5.10 (ROZAS et al. 2003). The mean pairwise number of nucleotide differences per site (π) was calculated using a sliding window of 100 bases, with a step size of 25 bases across the ASGV CP coding region.

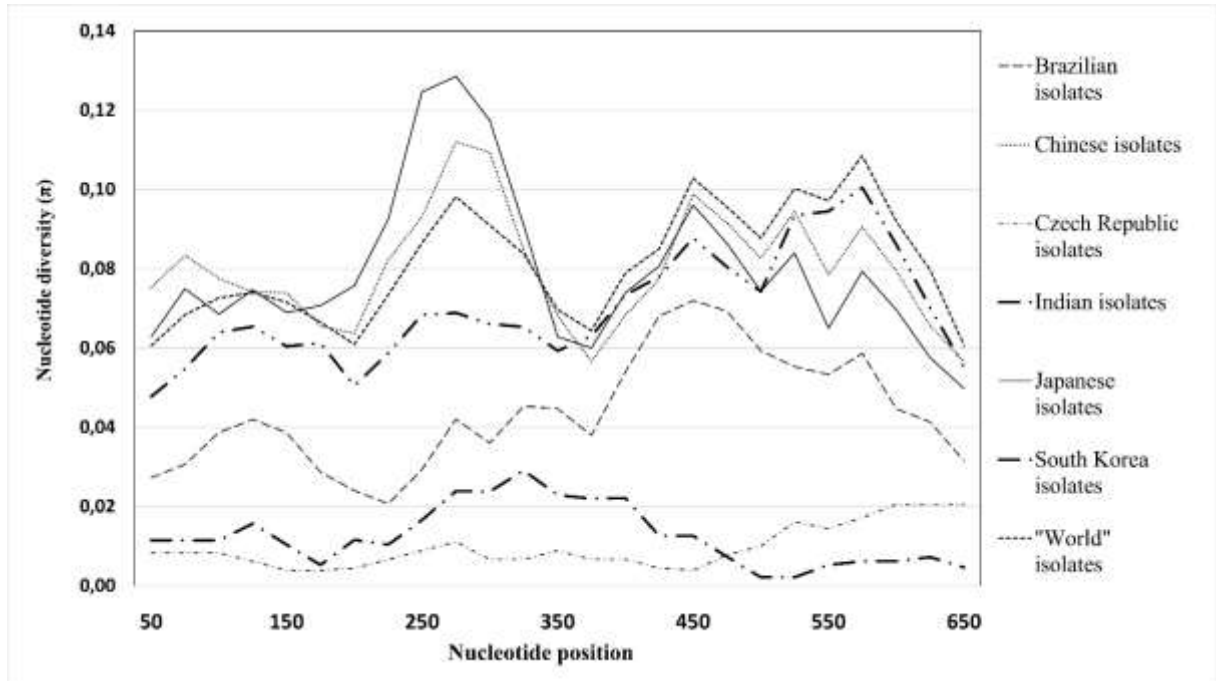
Site-specific selection pressures were analyzed using four algorithms, Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC), Fixed Effects Likelihood (FEL), Random Effects Likelihood (REL) and Partitioning for Robust Inference of Selection (PARRIS), within the HyPhy software implemented in the Datamonkey server (www.datamonkey.org) with default conditions. The nucleotide substitution model of Hasegawa Kishino-Yano (HKY) was used for all datasets, except the Chinese dataset (Tamura-Nei model).

To avoid the effect of recombination events on selection analysis, recombination analysis was performed using the program RDP v.4.77 (MARTIN et al., 2015) and the GARD method (available at the Datamonkey server). In recombination analysis using the program RDP, only recombination events detected by at least three of the methods available in the program were considered reliable.

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

The genetic variability of ASGV were studied by sequencing and aligning nt CP sequences of six Brazilian isolates. All CP sequences contained 714 nucleotides (nt) and 238 deduced amino acids. Highest and lower nucleotide diversity were seen in central portion of CP, at 275 and 375 positions respectively. Similar lower π values were observed also in 200 position. This tendency of π values occurred in all datasets except for South Korean isolates, that showed highest diversity between 550 and 650 positions, near 3’-terminal regions (Figure 1).

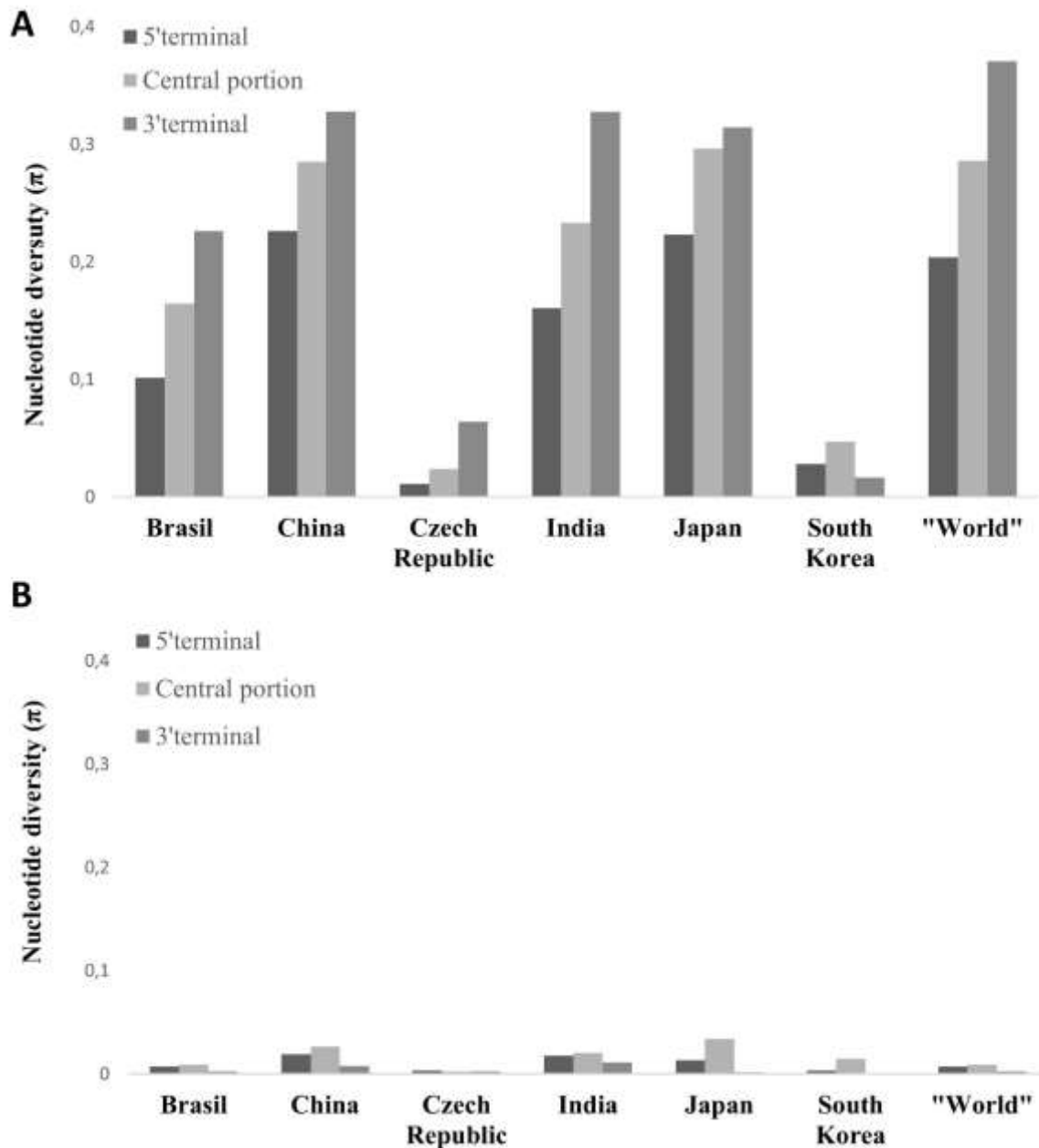
Figure 1 - Mean pairwise number of nucleotide differences per site (nucleotide diversity, π) calculated on a sliding window across the coat protein gene of *Apple stem grooving virus* isolates.



Analyzing the amino acid variability (non-synonymous substitutions), the same pattern is observed in all different countries datasets. Greater variabilities were concentrated in middle and N-terminal regions of the CP, while the C-terminal portion were less variable. Similar results were observed by MAGOME et al. (1997) and NICKEL et al. (2017) analyzing Japanese ASGV isolates and ACLSV variability respectively.

Dividing nucleotide differences in three regions (5' terminal, Central portion and 3' terminal), higher nucleotide diversities relative to synonymous sites were observed in 3' terminal region (C-terminal region of the protein) (Figure 2a), while those related to non-synonymous sites are concentrated in the 5' terminal region (N-terminal region of the protein) and in the central portion of CP gene, (Figure 2b). This data shows that, even a greater diversity is observed in 3'-terminal portion, it doesn't result in amino acid changes, suggesting that a strong negative selection is acting on this region of CP.

Figure 2 - Mean pairwise number of nucleotide differences per site (nucleotide diversity, π) at synonymous (A) and non-synonymous (B) sites calculated for three regions (5'-terminal, central and 3' terminal) of the coat protein gene of *Apple stem grooving virus* isolates from Brazil, China, Czech Republic, India, Japan, South Korea and the "World".



For phylogenetic analysis (Figure 3), we used six Brazilian isolates [five from this study and one previously reported (NICKEL et al., 2001)] and 26 representative foreign isolates, using an ACLSV sequence as outgroup. All isolates clustered in the same group, excepting the

outgroup. This data shows that ASGV coat proteins are low variable, regardless the host and geographic location. These results fortify those found by MAGOME et al. (1997), LIU et al. (2013) and SOUZA et al. (2017), in which any relations between phylogenetic tree and hosts or geographic location were found, meaning that primers based on CP sequences can be used for detection of ASGV populations in different regions of the world.

Figure 3 - Phylogenetic tree based on the alignment of coat protein protein genes of *Apple stem grooving virus* isolates from Brazil (Isolates 5, 6, 10, 11 and 21). The tree was constructed by the neighbor joining method implemented in mega 6.0 program using Kimura 2-parameter nucleotide substitution model with discrete gamma distribution (G) and bootstrap support of 2000 replications. *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) was used as outgroup. Bar indicates number of substitutions per site.



Descriptors of variability were determined to characterize genetic variability between all datasets evaluated. Chinese, Japanese and Indian descriptors indicated higher genetic variability than Brazilian, South Korea and Czech Republican datasets, showing a higher number of segregating sites (S), nucleotide diversity (π), haplotype number (H), and haplotype diversity (Hd) (Table 1). Chinese dataset was the most variable, showing highest values of nucleotide diversity (π) (0.07581 ± 0.00552), compared to other datasets.

The dataset comprising Brazilian ASGV isolates had a π value of 0.04155 ± 0.00835 , showing higher variability in comparison to South Korean and Czech republican datasets. The π values found on this study, are in accordance with π values found in other studies, with different viruses by several authors (ZANARDO et al., 2014; FAJARDO et al., 2017; NICKEL et al., 2017). The Watterson's estimator for the population-scaled mutation rate (θ -W) stayed in the order of 10^{-2} for all datasets analyzed, meaning that all of them have similar mutation rates. The θ -W values of 10^{-2} are lower when compared with other coding regions and other viral species described in the literature (ZANARDO et al., 2014; FAJARDO et al., 2017; NICKEL et al., 2017).

Table 6 - Genetic variability descriptors of *Apple stem grooving virus* coat protein genes from Brazil, China, Czech Republic, India, Japan, South Korea and "World".

ASGV isolates ^a	N ^o de Isolates	CP length (nt)	S ^b	K ^c	π ^d	H ^e	Hd ^f	Θ -W ^g
Brazil	6	714	67	29,667	0.04155 ± 0.00835	6	1,000	0,04110
China	32	714	227	54,127	0.07581 ± 0.00552	26	0,968	0,07894
Czech Republic	9	714	24	6,667	0.00934 ± 0.00128	9	1,000	0,01237
India	71	714	193	47,160	0.06605 ± 0.00475	48	0,087	0,05593
Japan	8	714	131	52,893	0.07408 ± 0.00958	7	0,964	0,07076
South Korea	19	714	32	8,339	0.01168 ± 0.00111	16	0,977	0,01282
"World"	149	714	328	54,584	0.07645 ± 0.00224	116	0,9951	0,08236

^a Seven datasets for ASGV were analyzed: The datasets comprise isolates of Brazil, China, Czech Republic, India, Japan, South Korea and "World". ^b Total number of segregating sites. ^c Mean number of nucleotide differences between sequences. ^d Nucleotide diversity. ^e Haplotype number. ^f Haplotype diversity. ^g Watterson's estimate of the population mutation rate based on the total number of segregating sites

Recombination events were detected in two Brazilian isolates by at least four methods available in the RDP4 software (isolates 10 and 21, data not shown) (Supplementary Table S2). It was found that isolate 5 contributed as major parent of both Brazilian recombinants, with the previously reported Brazilian apple isolate UV01 (NICKEL et al., 2001) as minor parent for isolate 10, and isolate 11 as minor parent to recombinant isolate 21. Other recombination events were found by SOUZA et al. (2017) in two Brazilian isolates. In this study, we also found recombination events in the CP genes of Indian and Chinese isolates (Supplementary Table S2). No recombination events were found in the datasets comprising Czech Republic, Japanese and South Korean isolates.

Supplementary Table S2. Recombination events detected in the coat protein gene of Brazilian¹, Indian² and Chinese³ ASGV isolates.

Virus	Genome region	Recombinant (Access number - isolate)	Recombinant breakpoints		Parents		Methods*	P-value**
			Initial	Final	Major	Minor		
ASGV	CP	ASGV_isolate10 ¹	632	269	ASGV_isolate5	AF438409.1	MCS3	1.915 x 10 ⁻⁰³
ASGV	CP	ASGV_isolate21 ¹	675	291	ASGV_isolate5	ASGV_isolate11	GBMC3	1.190 x 10 ⁻⁰⁵
ASGV	CP	LN901428.1 - HPDF10 ²	640	706	LM651244.1	Unknown	RGBMC3	1.515 x 10 ⁻¹³
ASGV	CP	KU500890.1 – FUJI ³	230	510	KF434636.1	JN871590.1	GBMCS3	6.155 x 10 ⁻¹²

*R, RDP; G, GeneConv; B, Bootscan; M, MaxChi; C, Chimaera; S, SisScan; 3, 3Seq.

**The reported P-value is for the method in bold/underlined and is the lowest P-value calculated for the respective event.

For selection analysis all datasets previously mentioned were used. Since recombination events can affect the selection analysis, the Brazilian, Indian and Chinese isolates (Supplementary Table S2) found to be recombinants were excluded from site-specific selection analysis. The CP gene of ASGV Brazilian Isolates showed dN/dS ratios (non-synonymous/synonymous ratios) of 0,048937 (lower than 1.0), indicating negative selection (Table 2).

Tabela 7 - Selection analysis of coat protein genes of Brazilian and foreign isolates of *Apple stem grooving virus*

ASGV isolates ^a	Number de isolates	dN/dS	SLAC ^b		FEL ^c		REL ^d		PARRIS ^e
			PS ^f	NS	PS	NS	PS	NS	PS
Brazil	4	0,048937	-	-	-	27	1	195	-
China	26	0,089834	-	77	1	101	0	146	-
Czech Republic	9	0,144495	-	-	-	5	0	18	-
India	48	0,159459	-	24	-	63	1	121	-
Japan	7	0,080493	-	18	1	69	3	101	-
South Korea	16	0,352055	-	-	-	5	-	17	-

^a Recombinant ASGV isolates 10, 21 (from this study), HPDF10 (India - LN901428) and FUJI (China - KU500890) were excluded from the selection analysis. dN/dS – non-synonymous to synonymous substitution ratios. ^b Single Likelihood ancestor counting. ^c Fixed effects likelihood. ^d Random effects likelihood. ^e Partitioning for robust inference of selection

^f PS/NS number of positive (PS) and negative (NS) selection sites; -, no site under selection

Isolates from the other evaluated countries also presented dN/dS ratios below 1.0, with the CP of South Korean isolates presenting the highest value of dN/dS, featuring them less restrictive to changes. In Brazilian isolates, only one site of positive selection, at codon 10, was found, in which five isolates (Isolates UV01, 21, 11, 5 and 6) possessed Ala, while one isolate

(isolate 10) possessed Lys. This change was not observed in any other sequences of other datasets.

ASGV genome variations can be principally due to differences in two characteristic variable regions in ASGV genome (V1 and V2). Region V1 is located inside ORF1 (between 532 and 570 nt), while V2 is located between RDRP coding region and CP coding region (1583 – 1868nt) (MAGOME et al., 1997; LINDENBERG et al., 2012). In this study, negative selection was predominant in the CP of all datasets evaluated, agreeing with MAGOME et al. (1997) and LINDENBERG et al. (2012) reports, that found similar dN/dS ratios in ASGV CP gene, evidencing that this region is the most conserved in the genome. These results are in accordance with the fact that viral structural genes are under negative selection and are constrained regions (CHARE e HOLMES, 2004; ZANARDO et al., 2014).

4.4 REFERENCES

ADAMS, M.J. et al. **Family *Betaflexiviridae*** In: KING et al. *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Londres, UK: Elsevier Academic Press, p. 1185 – 1189, 2012.

CHARE, E.R. et al. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 3149 – 3157, 2004. disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448378>. Access on May 21, 2018. doi: 10.1099/vir.0.80134-0.

CHEN, S. et al. Infection of Apple by Apple Stem Grooving Virus Leads to Extensive Alterations in Gene Expression Patterns but No Disease Symptoms. *Plos One*, v. 9, p. 1-9, 2014. Disponível in: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0095239>>. Access in may,17, 2018. doi: doi:10.1371/journal.pone.0095239.t001.

FAJARDO et al. High-throughput sequencing applied for the identification of viruses infecting grapevines in Brazil and genetic variability analysis. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 250-260, 2017. Disponível in: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00705-013-1879-0.pdf>. Access on May 21, 2018. doi: 10.1007/s00705-013-1879-0.

FRIDLUND, P.R. 1980. The IR2 program for obtaining virus free fruit trees. **Plant Disease** v.64, p.825-830

LÉMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. L' Arboriculture fruitière, v. 434, p. 38-47, 1990.

LINDENBERG et al. Molecular Evolution of the Genomic RNA of *Apple Stem Grooving Capillovirus*. *Journal of Molecular Evolution*, v. 75, p. 92 – 101, 2012. Disponible in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00239-012-9518-z>. Access on May 21, 2018. doi: 10.1007/s00239-012-9518-z.

LIU et al. Detection and Molecular Variability of *Apple stem grooving virus* in Shaanxi, China. *Journal of Phytopathology*, v. 161, p. 445-449, 2013. doi: 10.1111/jph.12083.

MAGOME et al. Molecular Variability of the Genomes of Capilloviruses from Apple, Japanese Pear, European Pear, and Citrus Trees. *Phytopathology*, v. 87, p.389-396, 1997. Disponible in: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO.1997.87.4.389>. Access on may 20, 2018. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.389>.

MARTIN, D.P. et al. RDP4: Detection analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, v. 1, vev003, 2015. Disponible in: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5014473/pdf/vev003.pdf>> Access in: May 19, 2018. doi: 10.1093/ve/vev003.

NÉMETH, M. V. Virus, mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Dordrecht: Martin Nijhoff Publishers, 1986. 1v.

NICKEL, O. et al. Characterization and genetic variability of coat protein genes of *Apple chlorotic leaf spot virus* isolates from Southern Brazil. *Tropical Plant Pathology*, v.43, p. 109-116, 2017. doi: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0197-6>.

NICKEL, O. et al. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 655-659, 2001. Disponible in: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v26n3/a14v26n3.pdf>> Access on May 20, 2018.

SOUZA et al. Biological and molecular characterization of two Brazilian isolates of *Apple stem grooving virus*. *Tropical Plant Pathology*, v. 42, p. 391-396, 2017. Disponible in: < <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs40858-017-0163-3.pdf>>. Access on may 20, 2018. doi: 10.1007/s40858-017-0163-3.

TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013. Disponible in:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/pdf/mst197.pdf>. Access in may 19, 2018. doi: 10.1093/molbev/mst197.

ZANARDO et al. Molecular variability of *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean in Brazil. **Archives of Virology**, v.159, p. 727-737, 2014. Disponible in: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-013-1879-0>>. Access on may 20, 2018. doi: 10.1007/s00705-013-1879-0.

YANASE, H. Back-transmission of Apple stem grooving virus to apple seedlings and symptoms of apple topworking disease in Mitsuba kaido (*Malus sieboldii*) and (*Malus sieboldii* var. *arborescens*) rootstocks. **Acta Horticulturae**, v. 130, 83. Disponible in: < https://www.actahort.org/books/130/130_20.htm>. Access 018. doi: 10.17660/ActaHortic.1983.130.20.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo da macieira no sul do Brasil tem obtido significativos avanços desde os anos 1970 quando foram feitos os primeiros plantios comerciais. Podem ser citados como importantes os trabalhos que englobam o manejo do solo, seleção de novas cultivares, novos porta-enxertos, adensamento dos cultivos, condução e poda, controle mais eficiente de doenças criptogâmicas, entre outros.

Até os anos 1980, em relação às doenças sistêmicas transmissíveis, era possível encontrar viveiros perdendo mudas para o *Rubbery wood* (lenho mole) e sintomas evidentes de *Apple mosaic virus* – ApMV em algumas cultivares do grupo Gala. Por serem visíveis, essas doenças foram sendo eliminadas pelos próprios viveiristas. Contudo, as doenças provocadas por vírus latentes, aqueles que não mostram sintomas evidentes nas cvs comerciais, não podiam ser eliminados pela simples seleção. Estes vírus necessitam de técnicas especiais de detecção para selecionar materiais isentos.

Assim, em 1987 a Bioplanta – tecnologia de plantas S/A, empresa do grupo Souza Cruz, fez a primeira tentativa, em larga escala, de seleção, limpeza clonal por termoterapia e cultura de meristemas objetivando a produção de mudas de macieiras sadias. Esse trabalho foi encerrado com o fechamento da empresa em 1991.

Mudas da cv. Gala produzidas nesse período que foram comercializadas para a empresa Schio, de Vacaria – RS, atingiram, posteriormente, produtividades de 80 t/ha (comunicação pessoal do Sr. Schio, dono da empresa). Em 2000 foi executado o primeiro grande levantamento de viroses em macieiras, por indexagem biológica e RT-PCR, na Embrapa – SPSB em Canoinhas –SC; onde foram introduzidas amostras de porta-enxertos e copas oriundas de todas as regiões produtoras do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Esse trabalho teve o apoio institucional da Associação Brasileira dos Produtores de Maçãs – ABPM e financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa científica e tecnológica – CNPq.

Dos ensaios executados apenas um porta-enxerto M-9 e um Maruba não mostraram sintomas nas indicadoras; além de três seleções da Epagri que ainda eram seedlings. Nessa época ainda apareceram ApMV e Lenho Mole, nas indicadoras. Após esse período, muitos trabalhos têm sido feitos pela Embrapa, Epagri e empresas privadas, mas até o momento não existe um local central onde se receba, cultive, propague e distribua materiais sadios aos viveiristas.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que após quase 30 anos dos primeiros ensaios de limpeza clonal, os viveiros ainda estão multiplicando materiais altamente

contaminados. As amostras coletadas representam acima de 90% das mudas anualmente plantadas. Existe, no Brasil, em diversos locais públicos e privados, capacidade técnica e laboratorial para o estabelecimento de um sistema de controle sanitário para a produção de mudas sadias ou isentas de patógenos sistemicamente transmissíveis nos moldes da América do Norte ou Europa. Por pelo menos duas vezes já houve financiamento público a fundo perdido com valores significativos e suficientes para o estabelecimento desse programa, mas que ao final acabaram não atingindo o objetivo final, visto que, em relação aos viveiros comerciais, quase nada mudou.

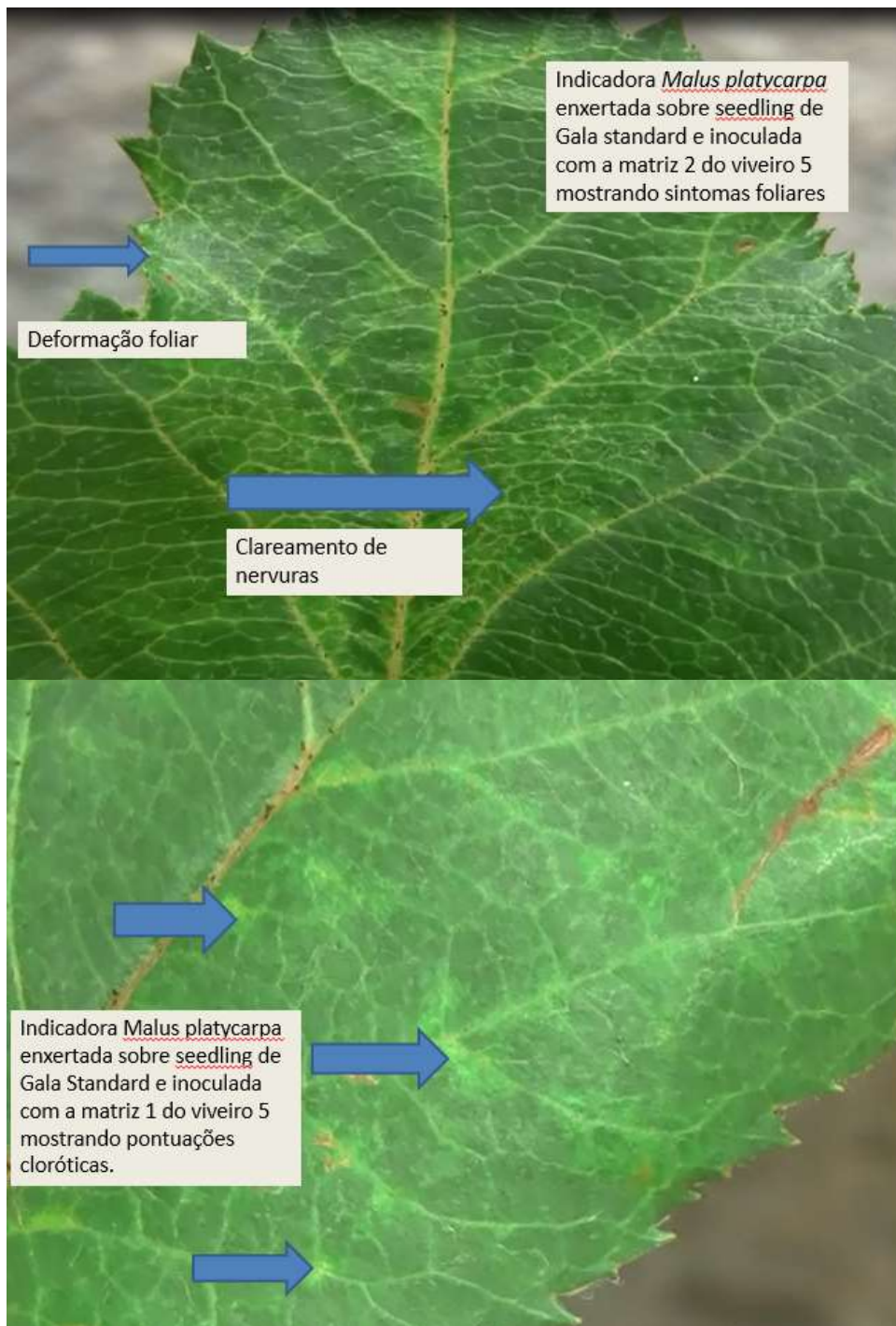
Os resultados desse trabalho foram apresentados para representante do Ministério da Agricultura, Cidasc, empresas e viveiristas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina em reunião efetuada no Centro de Agronomia e Veterinária – CAV, da UDESC – Lages – SC. Nessa ocasião foi mostrado que a falta de ações, mesmo que compulsórias, do Governo Estadual, Federal e de interesse do setor produtivo, incluindo os viveiros, seja pela desorganização ou por outros motivos que ainda desconhecemos, impede o estabelecimento de um sistema de controle efetivo. Os próximos ganhos de produtividade desta cultura devem incluir, necessariamente, o controle das doenças sistêmicas transmissíveis.

APÊNDICES

Apêndice A - Radiant Crab enxertada sobre seedling de Gala standard. O crescimento é normal sem nanismo ou sintomas foliares; Radiant Crab enxertada com a matriz Fuji suprema do viveiro 5 mostrando nanismo severo, manchas necróticas e quase morte; Indicadora SPY – 227 enxertada em seedling de Gala standard apresentando crescimento bom sem sintomas foliares; Indicadora Spy 227 inoculada com a matriz 1 do viveiro 5 mostrando epinastia, pontuações cloróticas e deformação foliar; Indicadora Virginia Crab enxertada sobre seedling de Gala standard mostrando perfeita união dos tecidos; Indicadora Virginia Crab inoculada com a matriz 2 do viveiro 5 mostrando o sintoma de “brown line” onde não ocorre união perfeita dos tecidos. Esse sintoma é típico na presença de ASGV; Indicadora Pyronia Weitchii inoculada com a matriz 1 do viveiro 5 apresentando nanismo, manchas cloróticas e necróticas; Indicadora Russian 12.740-7A enxertado sobre seedling de Gala standard apresentando crescimento normal sem deformação ou sintomas foliares; Indicadora *Russian* 12.740-7^a inoculada com a matriz 1 do viveiro 5. Apresenta nanismo, epinastia, manchas cloróticas e encarquilhamento.



Fonte: Crestani (2018)

Apêndice B - Folhas de *Malus platycarpa* com sintomas

Fonte: Crestani (2018)

Apêndice C - Epinastia em *Pyronia veitchii*

Epínastia em *Pyronia veitchii* inoculada com a matriz Fuji suprema do viveiro 3.

Fonte: Crestani (2018)

VITA

Osmar Alberto Crestani nasceu no dia oito de março de 1958 em Videira –SC, filho de Alberto Crestani e Rita Boscatto, segunda geração de imigrantes italianos. Seu avô e bisavô, com a família, vieram para Videira em 1912, logo após a inauguração da ferrovia São Paulo – Rio Grande em 1910. Os pais cuidavam de um parreiral de uvas Isabel, bordô e seibel tinta, depois de uma tentativa frustrada de plantar café em Maringá – PR, cuja geada de 1955 destruiu completamente a plantação.

Em 1965 seus avós precisaram de ajuda para cuidar dos parreirais em Videira e a família se mudou para Videira/SC. Realizou seus estudos na Escola Básica Professora Adelina Regis. Concluindo a 8ª série, foi para o Colégio Agrícola de Camboriú. No final de 1975 participou do Projeto Rondon e ficou 30 dias em Santarém no Pará, no Campus Avançado da UFSC, estagiando no INCRA. O trabalho era: “Levantamento de propriedades rurais para concessão de título provisório”. Concluiu o curso técnico em 1976. Voltou para Videira e em janeiro de 1977 foi contratado pela Cooperativa Agropecuária Videirense – Coopervil, para trabalhar como extensionista em fruticultura. Sua experiência anterior foi com o Projeto de Fruticultura de Clima Temperado- Profit - um dos grandes programas lançado pelo governo estadual na área de Fruticultura de Clima Temperado que alavancou o início do desenvolvimento da fruticultura em SC nos anos 70 especialmente pêssego, ameixa, nectarina, maçã (a uva já era antiga). Nessa época seu pai plantou pêssegos cvs. Coral, Princesa, Marengo, Maracotão, Earlygold e nectarinas Silverlord e Panamint. Apenas a cv. Coral teve sucesso, de polpa branca, graúdo e doce, as demais não eram adaptadas e/ou não tiveram aceitação do mercado.

Como Técnico da Coopervil, morou em Lebon Regis para atender produtores de maçã. Recebia treinamentos com o Dr. Edmundo Jorge Meyer Riveros Eng. Agr. formado pela Universidade Católica de Valparaíso – Chile. O cultivo da macieira era uma atividade nova e os pomares dos associados da cooperativa constituídos basicamente por Golden Delicious sobre MM – 106. As tentativas de plantio das cvs Starkrimson, Blackjon, Granny Smith, Red Delicious, Mutsu, Melrose, Willie Sharp foram frustradas. Contudo, Golden Delicious e mais tarde a Belgolden produziam bem. Visitava os cooperados de Videira, Rio das Antas, Tangara, Pinheiro Preto, Iomerê e parte de Fraiburgo. Em outubro, estava trabalhando quando chegou um ônibus branco da UFSC, com o Prof. Murilo Pundek acompanhando uma turma de Agronomia em visita à Coopervil. Osmar ficou maravilhado com a cena e pensou que poderia ser um daqueles alunos. Passou a estudar muito, fez o vestibular e foi aprovado. Durante o curso se inscreveu na Fundação Catarinense do Trabalho – FUCAT, e passou a dar cursos de 20 a 40

hs, sob a coordenação do Prof. Zeferino Pedroso, desta forma conseguiu manter-se na faculdade. Em janeiro e fevereiro de 1982 e 1983, fez estágio na Perdigão S/A que havia adquirido os pomares de maçãs da Nodarisa (hoje central da Fischer-Fraiburgo), sob a direção do Dr. Edmundo Jorge Meyer Riveros. Fez dois trabalhos interessantes. Um foi acompanhar o crescimento dos frutos e medir teor de açúcar para determinar ponto de colheita. Usava calibrômetro e refratômetro. Montou um gráfico que ficou como base por muitos anos no laboratório de qualidade. O segundo foi avaliar a influência da irrigação sobre o crescimento dos frutos de macieira, irrigando todos os dias e medindo crescimento dos frutos comparando com plantas não irrigadas. Foi um ano seco. Os frutos irrigados cresciam normalmente em detrimento dos não irrigados. Porém, quando choveu, cerca de 40 dias depois, os frutos não irrigados cresceram muito rápido e não houve diferença entre eles. ‘Concluimos, de forma não tão científica que a irrigação, nas nossas condições, pode ser viável se os frutos estiverem muito próximos da maturação onde não há tempo de recuperação’, diz o autor. Outro trabalho era toda noite, por mais ou menos duas horas, regular as balancinhas da antiga classificadora. Soltava na máquina meio bin de Golden. Nas mesas separadoras as maçãs eram pesadas, fazia a média e verificava se estava dentro do calibre. No dia seguinte a máquina estava regulada para o dia de trabalho. Veio a formatura. Naquela época a Empasc – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina (hoje EPAGRI); contratava os dois melhores colocados de cada turma. Foi o 4º colocado, dois desistiram e foi chamado. A Empasc precisava de fitopatologistas e lhe disseram que se aceitasse o emprego teria que fazer mestrado nessa área. Foi para a UnB – Universidade de Brasília – DF que tinha um bom curso de fitopatologia. Antes de ir, de agosto a dezembro de 1983 ficou na Estação Experimental de Caçador no laboratório de Fitopatologia treinando com o Dr. Jorge Bleicher e Dr. Reinhard Melzer da GTZ – (Agência Alemã de Cooperação Internacional). Presenciou quando o Dr. Melzer, observando ao microscópio, levantou-se pôs as mãos na cabeça e disse: “*Oh mein Gott*”! Olhou para Osmar e disse: Você sabe o que é isso? Ele havia encontrado a fase perfeita da sarna da macieira: *Venturia inaequalis*. Esse conhecimento permitiu propor novas estratégias de controle. O Dr. Bleicher recomendou que, na UnB procurasse o Dr. Elliot Kitajima para que fosse seu orientador. Com ele aprendeu muito sobre ultraestrutura celular, microscopia eletrônica de transmissão, imunomicroscopia e outros métodos de detecção de vírus em vegetais. O Dr. Ming Tien Lin, natural de Hong Kong foi seu coorientador, especialista em purificação de vírus e produção de antissoro. Terminou o mestrado em um ano e oito meses. Publicou nove trabalhos incluindo a descrição de um novo Tymovirus em maracujazeiro que foi assunto da sua dissertação. Passou a trabalhar na Empasc na Estação Experimental de Videira com uva e frutas de caroço. Sem

estrutura laboratorial, passou a testar fungicidas no controle de doenças de plantas e introduziu uma coleção de indicadoras biológicas para viroses de videiras. Frustrado e irritado com as dificuldades do serviço público, e a falta de verbas para desenvolver os projetos, passava os dias numa rotina improdutiva, até que em novembro de 1987 recebeu um convite feito pelo Dr. Ming Tien Lin para visitar uma empresa de Biotecnologia em Paulínia – SP, chamada Bioplanta, que pertencia ao grupo Souza Cruz, onde recebeu uma proposta de trabalho do Diretor Geral Dr. Peter Seelig. Em 1986 mudou para a cidade de Campinas – SP onde realizou trabalhos com virologia, purificar e produzir antissoro para vírus de hortaliças, sorologia ELISA para vírus de batata, indexagem biológica para vírus de morango, indexagem biológica para viroses de videira e mais tarde, indexagem biológica para viroses de macieiras. Em 1989 houve uma mudança na direção geral da British American Tobacco – BAT, na Inglaterra, dona da Souza Cruz e, por conseguinte, da Bioplanta - SP; da Suvalan – RS; da Maguari – PE; e veio uma ordem para desativar todas essas empresas. Nessa época já havia sido feita termoterapia e cultura de meristemas em porta-enxertos e algumas variedades de macieiras. Um viveiro foi instalado em Ponta Grossa – PR e iniciou a produção de mudas “livres de vírus”. No Brasil foi a primeira iniciativa privada de grande porte nessa área. Com ordem de parar os trabalhos, o “Projeto Maçã”, como era conhecido, foi vendido para o Sr. Raul Randon, dono da RASIP em Vacaria – RS. Junto com o projeto deveriam ser treinados os técnicos para o controle de viroses via indexagem biológica e a produção final de mudas de macieiras, já em andamento e iniciar a instalação de matrizes para produção de mudas de videiras. Um ano depois, com tudo encaminhado, encerrou seu contrato com a Bioplanta, e voltou para Videira.

Em 1990 comprou 40 ha de terras, plantou ameixas, nectarinas e iniciou um viveiro para produção de mudas de frutas de caroço; Maruba e EM - 9 para macieira. Montou uma estrutura adequada e passou a fazer mudas de pêssegos e nectarinas clonais. Ameixas como a Santa Rosa e Letícia não produziam bem sobre as próprias raízes e eram enxertadas, porém, os porta-enxertos eram clonais. Teve sucesso nessa atividade pois as mudas entravam em produção antes, não tinham variabilidade devida ao porta-enxerto que nos outros viveiros eram todos de sementes, adquiridas nas indústrias de conserva, não tinham rebrote do porta-enxerto e as mudas tinham alta uniformidade e sanidade.

Em 1996 a ABPM - Associação Brasileira dos Produtores de Maçãs, representada pelo Dr. Borges solicitou ao Ministério da Agricultura, auxílio financeiro para um projeto para obtenção, introdução e seleção de materiais de macieiras livre de viroses. Com a verba recebida, foi desenvolvido o “Projeto Canoinhas”. A Embrapa tinha em Canoinhas – SC, o SPSB – Serviço de produção de sementes básicas. Trabalhavam com sementes de batata, mas devido à

migração da bataticultura para o Centro Oeste e Triângulo Mineiro, muitas estufas estavam sem uso. Esse foi o local escolhido para desenvolver um projeto cujo objetivo foi introduzir material de macieiras dos dois estados do Sul e através da indexagem biológica avaliar a presença de viroses e a possibilidade de encontrar material sadio. As indicadoras foram introduzidas do NAKB da Holanda e de Cornell, EUA. Foram colhidas estacas de 150 plantas das variedades comerciais, copas e porta-enxertos, plantados em pequenos e grandes pomares. Foi selecionado um EM – 9 e um Maruba que por três ciclos de crescimento não mostraram sintomas nas indicadoras. Pertenciam a empresas diferentes. Algumas seleções da Epagri (ainda seedlings) também não mostraram nenhum sintoma. Testes PCR foram executados com resultados inconclusivos e não considerados para resultados finais. Esse foi o maior ensaio nessa área até o momento. Com bolsa do CNPq, por cinco anos foi consultor desse órgão para avaliação pré e pós-financiamento de projetos na área de fruticultura em diferentes estados brasileiros. Alguns exemplos são: Melão e Manga em Mossoró – RN; Maracujá em Souza – PB; Produção de inimigos naturais (microvespas) na Embrapa Tropical de Fortaleza – CE; Uva, Coco anão, e Irrigação em Petrolina –PE; Mandioca/Manga na Embrapa Cruz das Almas – BA; Avaliação da necessidade de aquisição de espectrofotômetro de plasma - Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas – SP; Melhoramento de uva em Jales – SP; Produção de material propagativo de macieiras na Embrapa – SPSB de Ponta Grossa – PR; Maçã Embrapa Vacaria – RS; Maçã e Uva Embrapa Bento Gonçalves – RS; Pêssego e Ameixa na UFPEL , Pelotas – RS; Pós-colheita de Maçã na USM, Santa Maria – RS. Teve grandes e enriquecedoras experiências nesse período.

Animado com as possibilidades que novas tecnologias podiam alavancar o crescimento de seu viveiro, montou a Vitroplanta, um laboratório de biotecnologia vegetal capaz de fazer termoterapia, propagação “in vitro”, sorologia para viroses de alho e videira, indexagem biológica para macieiras, propagação massal, por estaquia herbácea, de porta-enxerto para ameixeiras, e Maruba e EM – 9 para macieiras. Logo percebeu que a viabilidade da Vitroplanta, assim como de qualquer outra empresa produtora de mudas de qualidade dependia do Ministério da Agricultura exigir a certificação de mudas. Isso não aconteceu até hoje. “Começamos cedo demais, com as culturas erradas, região errada e pagamos caro pelo erro. A vitroplanta foi fechada em 2010”, relembra o autor. Em 2006, num movimento das lideranças locais, foi aberto um curso Técnico em Agropecuária como uma extensão do então Colégio Agrícola de Concórdia. O poder municipal forneceu salas de aula no CAIC – Centro de Apoio Integral à Criança e pagou os professores como horistas. Foi professor, por dois anos,

nessas condições. Concomitante, o governo federal estava criando, em todo o país, os Institutos Federais de Educação, e numa área da Embrapa, foi criado e construído o “Campus Videira” do Instituto Federal Catarinense. A extensão Concórdia passou para a administração do IF – Videira. Entrou por concurso em 2010 para ministrar as disciplinas da Engenharia Rural, Topografia, Mecanização, Irrigação e Construções rurais, que passaram a fazer parte do seu dia-a-dia. Dois anos depois, com a entrada de um professor especialista em agrimensura, passou a lecionar Defesa Sanitária Vegetal, Jardinagem e Paisagismo Rural. Orientou alunos no laboratório identificando doenças de plantas e podridões de frutos além de manter um grupo fazendo experimentos com enraizamento herbáceo de plantas. Após quatro anos de atividades foi selecionado através de edital com afastamento integral para cursar o Doutorado, no CAV – UDESC- Lages (SC), no programa de Produção Vegetal em 2014 -2. O trabalho desenvolvido neste período está descrito nesta publicação. Osmar considera que foi uma experiência extremamente gratificante voltar a estudar com 56 anos e participar das aulas com filhos de ex-colegas da Agronomia. Atualmente, em setembro de 2018, está afastado do trabalho para tratamento de um mal denominado “Doença do neurônio motor” do qual espera dar conta como fez com todos os trabalhos da sua vida.