

**FABIO NASCIMENTO DA SILVA**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
VÍRUS EM ACESSOS ANTIGOS DE MACIEIRA E *Strawberry mild  
yellow edge virus* EM MORANGUEIRO**

**LAGES – SC**

**2007**

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CURSO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

**FABIO NASCIMENTO DA SILVA**

**Engenheiro Agrônomo**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
VÍRUS EM ACESSOS ANTIGOS DE MACIEIRA E *Strawberry mild  
yellow edge virus* EM MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre no Curso de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Amauri Bogo, Ph.D.  
Co-orientador: Osmar Nickel, Dr.

**LAGES – SC**

**2007**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Silva, Fabio Nascimento da  
Detecção e caracterização biológica e molecular de  
vírus em acessos antigos de macieira e *Strawberry mild*  
*yellow edge virus* em morangueiro. / Fabio Nascimento da  
Silva – Lages, 2007.  
82 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências  
Agroveterinárias / UDESC.

1. Maçã - Genética. 2. Morango - Genética.
3. RT-PCR. 4. Clonagem. I. Título.

CDD – 634

**FABIO NASCIMENTO DA SILVA**  
Engenheiro Agrônomo-UDESC/LAGES-CAV

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR  
DE VÍRUS EM ACESSOS ANTIGOS DE MACIEIRA E *Strawberry  
mild yellow edge virus* EM MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre Produção Vegetal.

Aprovado em:  
Pela banca examinadora:

Homologado em:  
Por

---

PhD. Amauri Bogo  
Orientador – UDESC/Lages-SC

---

Dr. Ricardo Trezi Casa  
Coordenador Técnico do Curso de  
Mestrado em Produção Vegetal

---

Dr. Osmar Nickel  
Co-orientador  
Embrapa Uva e Vinho-RS

---

Dr. Osmar Klauberg Filho  
Coordenador do Programa de  
Mestrado em Agronomia

---

Dr. Thor V. M. Fajardo  
Embrapa Uva e Vinho –RS

---

Dr. Adil Knackfuss Vaz  
Diretor Geral do Centro de  
Ciências Agroveterinárias  
UDESC/Lages-SC

---

Dr. Ricardo Trezi Casa  
UDESC/Lages-SC

**Lages, Santa Catarina**

**27 de fevereiro de 2007**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela força nos momentos difíceis.

A minha mãe, ao meu pai e a minha irmã pelo amor, incentivo e dedicação.

Aos meus amigos do Mestrado e da Pousada da Embrapa Uva e Vinho por todos os momentos de alegria que passamos juntos.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia da Embrapa Uva e Vinho pela dedicação, aprendizado e amizade.

Aos pesquisadores da Embrapa Uva e Vinho Dr. Osmar Nickel e Dr. Thor Fajardo, pelo apoio, disponibilidade, crescimento profissional e orientação.

Ao Professor Amauri Bogo pelo incentivo, dedicação e orientação.

Aos técnicos de laboratório da Embrapa Uva e Vinho, Marcos e Iraci, por toda a ajuda e amizade.

Ao pesquisador Marcelo Eiras pela hospitalidade e ensinamentos durante estágio realizado no Instituto Biológico de São Paulo.

Ao pesquisador Francisco Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) pelo seqüenciamento de amostras.

À Embrapa Uva e Vinho pela possibilidade de realização do trabalho no Laboratório de Virologia e pela vaga disponibilizada na pousada dos estagiários.

À USDA (EUA), ao SAG (Chile) e à BBA (Alemanha) pela doação, respectivamente, de indicadoras e controles positivos dos vírus de morango.

À FAPERGS pelo apoio financeiro concedido para realização do trabalho com morangueiros.

À Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Produção Vegetal.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

## DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE VÍRUS EM ACESSOS ANTIGOS DE MACIEIRA E *Strawberry mild yellow edge virus* EM MORANGUEIRO<sup>1/</sup>

Autor: Fabio Nascimento da Silva

Orientador: Amauri Bogo, Ph.D

Co-orientador: Osmar Nickel, Dr

### RESUMO

Os primeiros cultivos de macieira no Brasil iniciaram-se no final da década de 60 e início da década de 70 do século passado. A qualidade do material disponível para o plantio naquela época era baixa, visto que os principais produtores desta fruta, como a Europa e os Estados Unidos apenas iniciavam programas de limpeza clonal, e com isso ocorreram introduções de materiais infectados por vírus e similares. Nos últimos anos a cultura da macieira assumiu grande importância sócio-econômica no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Entretanto a qualidade das mudas importadas e produzidas no país ainda não é satisfatória. 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. A cultura do morango também se destaca no cenário nacional de produção de frutos de clima temperado, assumindo grande relevância devido a sua exploração em propriedades de base familiar. As mudas utilizadas pelos produtores são oriundas principalmente do Chile, Argentina e dos Estados Unidos, que entram no país sem controle quanto a presença de vírus. Os Vírus são responsáveis por danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira e do morangueiro, pois interferem nos processos fisiológicos necessários para o metabolismo e crescimento normal da planta. A detecção e eliminação de vírus são componentes fundamentais em programas de limpeza clonal. Por isso, o desenvolvimento e a utilização de novas técnicas de detecção são relevantes na busca de maior sensibilidade, segurança e menor custo na obtenção e produção de materiais propagativos livres de vírus. Os objetivos deste trabalho foram: a) desenvolver um método de indexação biológica múltipla como alternativa a indexação biológica individual na detecção de vírus latentes em macieira; b) a caracterização molecular pela análise da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos do gene da proteína capsidial do isolado BR1 de *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV); e c) detecção e caracterização parcial do gene da proteína capsidial de *Strawberry mild yellow edge virus* – SMYEV em morangueiro cultivar Camarosa. A indexação biológica múltipla, na qual todas as indicadoras são enxertadas sobre o mesmo porta-enxerto, permitiu substancial economia de espaço e custos, devido à redução do número de plantas em cerca de 60 a 80%. Este método conferiu resultados confiáveis, como uma brotação satisfatória e a expressão de sintomas clássicos, na detecção e caracterização biológica de ACLSV, *Apple stem grooving virus* (ASGV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV). A caracterização molecular do isolado BR1, demonstrou a maior homologia deste isolado com o isolado japonês MO-31, o qual causa infecção latente em *Malus prunifolia* Borkh var. *ringo* (=Maruba-Kaido), e o ACLSV não sendo visível, pode ser

propagado em plantas infectadas. SMYEV foi detectado por indexação biológica e molecular e a análise da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do isolado brasileiro (BR1) de SMYEV, demonstrou comparativamente com outros isolados, homologia de 88 a 92% entre nucleotídeos e 98,5 a 100% entre aminoácidos deduzidos.

**Termos de indexação:** *Malus domestica* Borkh, *Fragaria X ananassa* Duch, caracterização biológica, caracterização molecular, RT-PCR, clonagem, seqüenciamento, indexação.

<sup>1/</sup> Dissertação de Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, Fevereiro, 2007.

**DETECTION AND PARCIAL CHARACTERIZATION OF VIRUS IN OLD  
ACCESSIONS OF APPLE AND THE *Strawberry mild yellow edge virus* IN  
STRAWBERRY**

Author: Fabio Nascimento Da Silva

Adviser: Amauri Bogo, Ph.D

Co-Adviser: Osmar Nickel, Dr

The first cultivations of apple in Brazil was initiated in the end of the sixty's and beginning of the seventy decade and the quality of the available propagative materials used to be very low for plantation. Europe and United State were the main producers of this fruit and were the first ones to work with clonal cleaning, but allowing many infected propagative materials with virus and similars were introduced in Brazil. In the last years the Brazilian apple culture increased its social-economic importance, especially in the Rio Grande do Sul and Santa Catarina State. However the quality of the imported and produced seedling in Brazil still is not satisfactory. Recent introductions of propagative materials from United States, Europe and Japan, revealed partially infected with latent viruses, according with the Virology Laboratory of the EMBRAPA GRAPE and WINE. The culture of the strawberry also is distinguished in the national scene of production of fruits of tempered climate, assuming great relevance due its exploration in properties of familiar base. The plants used for the producers are deriving mainly of Chile, Argentina and of the United States. that after enter in the country controls of little severity Viruses are responsible for injuries in all stages of apple development by interference in physiological processes which are necessary for the metabolism and normal growth of the plant. The detention and elimination of these pathogens is fundamental for clonal cleaning programs. Therefore, the characterization and utilization of new techniques in detection of these pathogens are very important in search higher sensitivity, security and less costs for obtainment and production of free virus and viroid propagative materials. The objectives of this work was: a) develop a method of multiple biological indexing in substitution of individual biological indexing in detection of apple latent virus; b) molecular characterization by analysis of nucleotides and amino acids sequence of the capsidial protein of the isolate BR1 of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV); and c) detection and partial characterization of the coat protein gene of *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV) in strawberry cv 'camarosa'. The multiple biological indexing in which all indicator plant are grafting over the same root-stock, showed a substantial economy of space and costs due to reduction of the plant numbers in approximately 60 to 80%. This method showed to be reliable with a satisfactory sprouting and a good exteriorization of classic symptoms in the biological detection and characterization of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple virus stem pitting* (ASPV). The molecular characterization of the ACLSV isolate BR1 showed high homology when compared with the Japanese isolate MO-31 which cause latent infection in *Malus prunifolia* Malus Borkh var. ringo (= Maruba-Kaido). The Japanese isolate MO-31 is a latent virus in Maruba-Kaido and is the more important ACLSV biotype. In nursery and orchards with Maruba-Kaido root-stock, the symptoms of the ACLSV infection is not visible, allowing the maintenance of infected plants. The *Strawberry mild yellow edge virus* was detected by biological indexing and the analysis of nucleotides and aminoacids sequence of the Brasilian isolate (BR1)

showed, when compared with others isolates, a 88 to 92% between nucleotides and 98,5 to 100% between aminoacids.

**Index terms:** *Malus domestica*, *Fragaria X ananassa*, biological and molecular characterization., RT-PCR, cloning, sequence, indexing

<sup>1/</sup> M.Sc. Dissertation in Agronomy/Horticultural Science, Center of Agricultural and Veterinary Sciences, Santa Catarina State University, Lages, SC, February, 2007.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.** Indexação biológica múltipla. VC: 'Virginia crab'; RC: 'Radiant crab'; SPY: 'Spy227'; LLS-5: 'Lord Lambourne-S5'; MM: *M. micromalus* sobre porta enxerto de *M. domestica* cv. Gala com um ano de idade.....31

**Figura 2.** Sintomas observados nas indicadoras na indexação biologia múltipla. **A.** Necrose e deformação foliar em 'Radiant crab' inoculada com o acesso 11; **B.** Epinastia em 'Spy 227' inoculada com o acesso 11 (ASPV); **C.** Necrose e deformação foliar em 'Spy227' inoculada com o acesso 15; **D.** Manchas vermelhas e necrose na extremidade da folha em *M. micromalus* inoculada com o acesso 14 (ASGV); **E.** Enfezamento, deformação e manchas cloróticas em forma de banda em *M. platycarpa* inoculada com o acesso 'Golden Delicious' (ACLSV); **F.** Manchas cloróticas em 'Lord Lambourne-S5' inoculada com o acesso MR1789 (ACLSV).....37

**Figura 3.** Falta de brotação de algumas estacas de indicadoras. **A.** Dominância apical do porta-enxerto sobre as estacas das indicadoras; **B.** Dominância da estaca basal prejudicando a brotação e o crescimento das estacas superiores.....39

**Figura 4.** Análise de produtos da RT-PCR de ASGV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). **A.** M, Marcador molecular Lambda DNA/*PstI*; C+, Controle positivo (RNA total de 'Fuji Star'); C-, Controle negativo; 1-6: As amostras representam, respectivamente, os acessos do Rio Grande do Sul 5, 11, 10, 14, 18 e 15. **B.** 1-3. Representam, respectivamente, os acessos de Santa Catarina MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious'.....40

**Figura 5.** Análise de produtos da RT-PCR de ASPV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). M, Marcador molecular Lambda DNA/*PstI*; C-, Controle negativo; 1-9, acessos 5, 10, 14, 18, 11, 15, 'Delicious', 'Golden Delicious' e MR1789, respectivamente.....41

**Figura 6.** Análise de produtos da RT-PCR de ACLSV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). **A.** M, Marcador molecular Lambda DNA/PstI; C-, controle negativo; C+, controle positivo (RNA total de 'Gala' Vacaria); 1-6, cultivares antigas de macieira (5, 10, 11, 14, 15 e 18), respectivamente. **B.** 1-3, Acessos MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious', respectivamente (iniciadores: 6784-7518); 4-6. Acessos MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious', respectivamente (iniciadores A52 e A53).....41

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** (A). Crescimento de colônias de *Escherichia coli* (DH10B) em meio LB sólido com ampicilina e X-Gal. (B) Setas mostrando detalhes das colônias brancas, correspondentes aos clones recombinantes .....49

**Figura 2.** Análise de produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de agarose (1,2%) referente ao teste com três pares de iniciadores para amplificar ACLSV. M. marcador molecular Lambda DNA/PstI; C-. Controle negativo; C+. Controle positivo (Extrato de RNA total de 'Gala' Vacaria); 1. Cultivar antiga de macieira 'Delicious'; 2. Cultivar antiga de macieira MR1789.....51

**Figura 3.** Análise de produtos da digestão de preparações de DNA plasmidial com *Eco*RI por eletroforese em gel de agarose (1,2%). M. Marcador molecular Lambda DNA/PstI; 1-12. amostras de DNA plasmidial de diferentes clones obtidos na transformação.....52

**Figura 4.** Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial do isolado brasileiro BR1 de ACLSV. O asterisco no final da seqüência indica o códon de terminação.....52

**Figura 5.** Alinhamento, obtido pelo programa ClustalX, entre seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de diferentes isolados de ACLSV. ....55

**Figura 6.** Alinhamento, obtido pelo programa ClustalX, entre seqüências de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial de diferentes isolados de ACLSV.....56

**Figura 7.** Sintomas induzidos pelo isolado brasileiro BR1 de ACLSV, em: **A.** 'Lord Lambourne – S5' com manchas cloróticas irregulares; **B.** *Malus platycarpa* com necrose na lateral da base da folha provocando deformação foliar (seta indicando posição do sintoma).....57

**Figura 8.** Sintomas de nanismo, deformação foliar e manchas cloróticas dispersas em forma de banda observados em *M. platycarpa* inoculada com o acesso 'Delicious' infectado por ACLSV.....58

**Figura 9.** Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de 582 nucleotídeos do gene da proteína capsidial de 11 isolados de ACLSV. Barra: número de substituições por posição. O programa Treeview foi utilizado para a construção da árvore filogenética.....58

**Figura 10.** Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de 193 aminoácidos deduzidos que correspondentes ao gene da proteína capsidial de 11 isolados de ACLSV. Barra: número de substituições por posição. O programa Treeview foi utilizado para a construção da árvore filogenética.....59

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Indexação biológica em morangos. **A.** Indicadora UC-10 após retirada de algumas folhas; **B.** Corte do folíolo central da indicadora; **C.** Corte longitudinal no pecíolo da folha da indicadora; **D.** Retirada dos folíolos laterais da folha a ser analisada e corte do pecíolo em forma de cunha; **E.** Inserção do folíolo da planta suspeita de estar infectada na planta indicadora; **F.** Junção dos tecidos e colocação da fita de enxertia.....64

**Figura 2.** Sintomas observados na indexação biológica. **A.** Manchas cloróticas e manchas vermelhas e necróticas na extremidade da folha, característico de SMYEV na indicadora UC-10 inoculada com a cv. Camarosa; **B.** Mosaico em UC-5 inoculada com a cv. Camarosa.....68

**Figura 3.** Deformação foliar, manchas cloróticas e enfezamento observados na cultivar Camarosa, possivelmente ocasionado por infecção complexa.....68

**Figura 4.** Análise de produtos da RT-PCR de SMYEV por eletroforese em gel de agarose (1,2%) tingido com brometo de etídeo. M. Marcador molecular (1 Kb DNA Ladder, Fermentas); C+. Controle positivo; C-. Controle negativo; 1. amostra sadia; 2. amostra proveniente da cultivar Camarosa.....70

**Figura 5.** Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do terminal 3' (5639 nt ao 5910 nt) do gene da proteína capsidial e parte não traduzível de um isolado brasileiro BR1 de SMYEV. O asterisco no final da seqüência indica o códon de terminação.....70

**Figura 6.** Alinhamento entre seqüências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial e parte não traduzível na extremidade 3'de SMYEV, do isolado BR1 e outros 25 disponíveis no GenBank .....73

**Figura 7.** Alinhamento entre seqüências de aminoácidos deduzidos do terminal 3' do gene da proteína capsidial de SMYEV, do isolado Br1 e outros 25 disponíveis no GenBank.....74

**Figura 8.** Árvore filogenética (dendograma) obtida a partir do alinhamento de 264 nucleotídeos correspondentes ao terminal 3' do gene da proteína capsidial e parte da região 3' não traduzida de SMYEV. Barra: número de substituições por posição.....75

**Figura 9.** Árvore filogenética (dendograma) obtido a partir do alinhamento de aminoácidos deduzidos (66 aa) correspondentes ao terminal 3' do gene da proteína capsidial de SMYEV. Barra: número de substituições por posição.....76

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1**

<b>Tabela 1.</b> Seqüências de iniciadores utilizados, e tamanhos dos fragmentos obtidos para os vírus latentes de macieira.....	32
--	----

<b>Tabela 2.</b> Reação sintomática das indicadoras na indexação biológica múltipla e individual (primavera de 2005).....	35
---	----

<b>Tabela 3.</b> Reação sintomática das indicadoras na indexação biológica múltipla e individual (primavera 2006).....	36
--	----

<b>Tabela 4.</b> Indexação molecular (RT-PCR) das cultivares antigas de macieira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.....	36
---	----

### **CAPÍTULO 2**

<b>Tabela 1.</b> Isolados, origem e número de acesso de seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de ACLSV disponíveis na base de dados do Genbank no NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ) e utilizadas nos estudos de homologia.....	53
---	----

<b>Tabela 2.</b> Porcentagem (%) de homologia entre as seqüências de nucleotídeos (acima da diagonal) e aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) dos diferentes isolados de ACLSV.....	53
--	----

### **CAPÍTULO 3**

<b>Tabela 1.</b> Isolado, origem, código de acesso e porcentagem de homologia de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) entre o isolado brasileiro BR1 e os outros isolados de SMYEV disponíveis no Genbank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> ).....	71
---	----

## SUMÁRIO

<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
1. A CULTURA DA MACIEIRA.....	16
2. VÍRUS DE MACIEIRAS.....	17
2.1. <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> .....	19
2.2. <i>Apple stem grooving virus</i> .....	20
2.3. <i>Apple stem pitting virus</i> .....	21
3. A CULTURA DO MORANGO.....	22
4. VÍRUS DE MORANGUEIROS.....	24
 <b>CAPÍTULO 1.....</b>	 <b>26</b>
1.1. RESUMO.....	26
1.2. INTRODUÇÃO.....	27
1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1.3.1. Material testado.....	29
1.3.2. Indicadoras e métodos de enxertia .....	29
1.3.3. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR.....	31
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
1.5. CONCLUSÕES.....	42
 <b>CAPÍTULO 2.....</b>	 <b>43</b>
2.1. RESUMO.....	43
2.2. INTRODUÇÃO.....	44
2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.3.1. Fonte do vírus.....	45
2.3.2. Testes biológicos.....	46
2.3.3. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR.....	46
2.3.4. Clonagem e seqüenciamento.....	48
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.6. CONCLUSÃO.....	59

<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>60</b>
3.1. RESUMO.....	60
3.2. INTRODUÇÃO.....	61
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.3.1. Fonte de vírus e indexação biológica.....	62
3.3.2. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR.....	65
3.3.3. Clonagem e Sequenciamento.....	66
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.5. CONCLUSÕES.....	76
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira é uma espécie de fruteira lenhosa, decídua, temperada e pertence à família *Rosaceae*. O seu centro de origem localiza-se entre o Cáucaso, cadeia de montanhas da Ásia entre os mares Negro e Cáspio, e o leste da China. Com a evolução das civilizações, esta cultura acabou sendo utilizada e difundida por diversas partes do mundo, onde as condições climáticas eram favoráveis ao seu cultivo (Luchi, 2002; Bleicher, 2002).

A produção brasileira teve um aumento significativo nos últimos anos, evoluindo de 1.528 toneladas no ano de 1974 para 849 mil toneladas atualmente (safra 2005-2006) (Boneti et al., 2002; Instituto Cepa, 2007). Dentre os estados produtores desta cultura no Brasil, destacam-se Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que na safra de 2005-2006 aproximadamente 56% da produção nacional foi de Santa Catarina (Instituto Cepa, 2007).

Dentre os fatores que afetam negativamente o sistema produtivo destacam-se os vírus, especialmente os latentes. Os vírus latentes, geralmente, não expressam sintomas na maioria das cultivares comerciais. A utilização de material propagativo livre de vírus é um pré-requisito básico para instalação de novos pomares. Entretanto não tem sido dado o devido cuidado a este fator. Os produtores acabam fazendo seleção visual e propagação do material vegetativo infectado disponível nos pomares. Com isso, tem-se elevados níveis de infecções virais latentes em pomares comerciais no sul do Brasil (Nickel et al., 2001).

## 2. VÍRUS DE MACIEIRAS

É possível classificar os vírus que infectam macieiras e outras fruteiras de clima temperado em dois “grupos”, segundo a forma como se expressam. O primeiro “grupo” caracteriza-se por serem visíveis os sintomas na planta infectada e por isso podem ser reconhecidos e eliminados. Neste “grupo” destaca-se entre outros o vírus do mosaico da macieira – *Apple mosaic virus*, ApMV que natural e experimentalmente infecta cerca de 65 espécies vegetais em 19 famílias (Pallás et al., 1995). Este vírus causa manchas irregulares de cor amarelo-creme nas folhas, reduzindo o potencial fotossintético da planta, podendo reduzir a produção em até 30 a 40% (Lémoine, 1990).

Já no segundo “grupo”, encontram-se os vírus latentes, os quais não expressam sintomas perceptíveis na maioria das cultivares comerciais, o que pode resultar na implantação e/ou manutenção de pomares infectados. Neste “grupo” encontram-se o vírus da mancha clorótica foliar (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), o vírus do acanalamento do tronco (*Apple stem grooving virus*, ASGV) e o vírus das caneluras do tronco (*Apple stem pitting virus*, ASPV). Estes vírus caracterizam-se em termos epidemiológicos por não possuírem vetores conhecidos, sendo que a disseminação baseia-se na propagação vegetativa de material infectado (Adams et al., 2004).

Os métodos de detecção de vírus latentes consistem basicamente na indexação biológica, sorológica e/ou molecular. A enxertia em indicadoras lenhosas e o teste sorológico ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) são os métodos mais comumente utilizados na detecção. Ambos métodos de detecção apresentam limitações, especialmente devido à baixa concentração das partículas virais em certas épocas do ano e distribuição desuniforme nos tecidos vegetais (Kinard et al.,

1996). A técnica DAS (double antibody sandwich)-ELISA oferece resultados satisfatórios na detecção de ACLSV em tecidos de flores. Todavia o teste demonstra maior eficiência durante poucas semanas na primavera, devido as condições favoráveis (temperatura) para a replicação viral nos tecidos da planta hospedeira (Cieslinska et al., 1995).

A transcrição reversa com a posterior reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) é um método de detecção mais rápido e sensível de detecção viral. Algumas variações deste método oferecem resultados que podem superar a RT-PCR na detecção e caracterização viral, a exemplo, da IC (imunocaptura)-RT-PCR (Candresse et al., 1995) e a detecção viral múltipla na reação de PCR (Menzel et al., 2002).

O controle destes vírus faz-se pela utilização de material propagativo livre de vírus. Entretanto, alguns genótipos justificam, devido ao interesse comercial, a erradicação do patógeno por meio de termoterapia, cultura de tecidos, quimioterapia, ou ainda, a associação de mais de uma destas técnicas (Hollings, 1965). Com temperaturas de  $36 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , Cropley (1968) eliminou ACLSV e ASPV de gemas de macieiras, sendo que o período de exposição à termoterapia variou conforme a variedade tratada. Para ACLSV este período oscilou de 9 a 40 dias e de 21 a 77 dias para ASPV, sendo que o número de gemas livres de vírus aumentou à medida que aumentou o período de exposição. A retirada de meristemas destas plantas termo-tratadas e o seu cultivo *in vitro* consistem em práticas relevantes de produção de plântulas livres de vírus. O cultivo *in vitro* associado à quimioterapia podem ser uma alternativa na eliminação de ACLSV e ASGV (Hansen & Lane, 1985; James et al., 1997), pois o ASGV possui baixa termossensibilidade.

Com o avanço da biologia molecular, outras técnicas de controle baseadas na transgenia vem sendo utilizadas (Romano & Monte, 1999). Entretanto, a utilização em culturas perenes requer um período muito longo para avaliação de genótipos modificados com técnicas de DNA recombinante, o que pode inviabilizar a utilização destas técnicas. É provável que no caso dos vírus latentes e sem vetores a remoção do vírus seja mais prática e economicamente viável.

Os dois “grupos” de vírus citados anteriormente, os vírus latentes são os de maior interesse no processo de identificação, caracterização e limpeza e serão detalhados posteriormente.

## 2.1 *Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV (Vírus da mancha clorótica foliar da macieira)

O ACLSV é amplamente distribuído pelo mundo infectando maçã, pêra, pêssego, ameixa, cereja e damasco (Cieslinska et al., 1995). É membro-tipo do gênero *Trichovirus*, família *Flexiviridae*, com partículas filamentosas e flexíveis de 720 nm de comprimento x 12 nm de diâmetro. As subunidades da capa protéica encapsidam um RNA genômico de fita simples, senso positivo com 7555 nucleotídeos excluindo a cauda poli(A) na extremidade 3' O genoma apresenta três regiões ORFs (Open reading frames) codificando três proteínas, uma de 216 kDa que provavelmente é responsável pela replicação do genoma, uma de 50 kDa associada ao movimento do vírus na planta e a capa protéica de 22 kDa. (Lister & Bar Joseph, 1981; German et al., 1990, Candresse et al., 1995). Apesar de sua latência em muitas cultivares comerciais, ACLSV pode causar incompatibilidade de enxertia em certas combinações de copa e porta-enxerto, crescimento anormal de ramos e declínio das plantas (Nemchinov et al., 1995). Assim,

Yanase (1974) observou em *Malus prunifolia* Borkh var. *ringo* (=Maruba-Kaido) manchas necróticas em folhas jovens, manchas cloróticas e mosqueado em folhas jovens e também totalmente expandidas, erupções e áreas necróticas na superfície da casca e do lenho, necrose do xilema, murcha de regiões apicais e declínio das plantas. Alguns isolados de ACLSV que não induzem sintomas em *M. prunifolia* var. *ringo* foram detectados por meio de outras indicadoras lenhosas. Em *M. domestica* cv. R12740-7A e *M. platycarpa* Rehder, ACLSV induziu manchas cloróticas e manchas em forma de banda, respectivamente (Yanase, 1974).

Isolados de ACLSV também podem produzir sintomas em algumas plantas herbáceas, incluindo *Chenopodium quinoa* Willd. Em *C. quinoa* induz lesões cloróticas nos primeiros cinco dias após a inoculação mecânica, que progridem para manchas necróticas (Mink et al., 1971).

Este vírus pode reduzir a produção de frutos de maçã em torno de 10-20%, como observado por Lémoine (1990) nas cultivares Golden, Idared e Granny Smith.

## 2.2. *Apple stem grooving virus*, ASGV (Vírus do acanalamento do tronco da macieira)

O ASGV é membro-tipo do gênero *Capillovirus*, família *Flexiviridae*, sendo amplamente distribuído em rosáceas, especialmente em cultivares de *Malus*, *Pyrus*, *Prunus*, *Citrus* e *Actinidia* (Nickel et al., 2001; Clover et al., 2003). Apresenta partículas flexíveis e filamentosas de 600 a 700 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro, RNA genômico de fita simples, senso positivo com 6496 nucleotídeos excluindo a cauda poli (A) na extremidade 3' e subunidades da capa protéica com massa de 27 kDa (Magome et al., 1997; Yoshikawa & Takahashi, 1988). O seu genoma apresenta duas fases abertas de leitura (ORFs, open reading frames)

sobrepostas. A ORF1 codifica as proteínas relacionadas com a replicação e a proteína capsidial na sua região C-terminal. A ORF2 codifica a proteína do movimento (36 kDa) que pertence a super-família '30k' de proteínas (Magome et al., 1997; Adams et al., 2004).

Este vírus também foi detectado no levantamento conduzido por Yanase (1974 e 1983) no Japão, onde causa a "doença de sobreexcertia" e o declínio de Mitsuba-Kaido (*Malus sieboldi* Rehder) e Kobano Zumi (*M. sieboldi* Rehder var. *arborescens*). A importante reação sintomática observada na indicadora lenhosa *M. domestica* cv. Virginia Crab, comumente utilizada na detecção de ASGV em programas de limpeza clonal, é a necrose na união da enxertia. Entretanto, o tempo necessário para o desenvolvimento de sintomas é longo (2 anos). Howell et al. (1996) estudaram diferentes clones de *M. micromalus* Makino, *M. yunnanensis* (Franch) Schneid e *M. tschonoskii* (Maxim) Schneid e observaram expressão de sintomas de ASGV em poucas semanas. Como consequência da infecção, a produção de frutos pode ser reduzida em até 15% em infecção simples (Lémoine, 1990). *C. quinoa* quando inoculada com ASGV reage com manchas, anéis e mosqueado clorótico sistêmico, e, posteriormente, epinastia e distorção foliar (Nickel et al., 1999).

### 2.3. *Apple stem pitting virus*, ASPV (Vírus das caneluras do tronco da macieira)

O ASPV pertence ao gênero *Foveavivirus*, família *Flexiviridae*, sendo amplamente distribuído no mundo, especialmente em cultivares comerciais de macieiras, pereiras e marmeleiros (Radaelli et al., 2006). Apresenta partículas alongadas, filamentosas e flexíveis, com 800 nm de comprimento por 12 a 15 de diâmetro (Koganezawa & Yanase, 1990). Seu genoma é constituído de RNA de fita

simples, senso positivo com 9306 nucleotídeos excluindo a cauda poli (A) na extremidade 3', formado por 5 ORFs, sendo que as ORFs 1 e 5 codificam, respectivamente, a polimerase de RNA e a proteína capsidial. As ORFs 2, 3 e 4 codificam as proteínas do bloco triplo de genes, também encontrado em vírus dos gêneros *Potexvirus* e *Carlavirus*, envolvidas no movimento da partícula viral (Jelkmann, 1994).

A gama de sintomas, que o ASPV induz em cultivares sensíveis, inclui o nanismo em *M. platycarpa*, amarelecimento das nervuras nas pereiras 'Jules d' Airoles' e 'Le Curé', deformação de frutos, caneluras observadas em cultivares de macieiras sensíveis como 'Virginia Crab', epinastia e declínio na cv. Spy 227, lesões necróticas e manchas cloróticas nos espaços entre as nervuras secundárias em *Pyronia veitchii* (Trabut) Guill (Leone et al., 1995; Paunovic & Rankovic, 1998; Radaelli et al., 2006). Lémoine (1990) observou redução de 15-20% na produção acumulada de frutos em seis anos. O ASPV foi associado ao declínio dos portainxertos japoneses muito usados *M. sieboldii* e *M. sieboldii* var. *arborescens* (Yanase, 1974). A transmissão mecânica de ASPV é possível para *Nicotiana occidentalis* cv. 37B e *N. occidentalis* subsp. *obliqua* (Van der Meer, 1986; Koganezawa & Yanase, 1990; Paunovic et al., 1999; Radaelli et al., 2006).

Os três vírus descritos acima podem causar o declínio e a morte 'Maruba-Kaido', Mitsuba-Kaido e Kobano Zumi, pois existem clones destes três portainxertos suscetíveis a ACLSV, ASGV e ASPV (Yanase, 1983; Nickel et al., 1999).

### 3. A CULTURA DO MORANGO

A cultura do morango (*Fragaria X ananassa* Duch.) é originária do cruzamento de duas espécies octaplóides, a *Fragaria chiloensis* (originária do Chile) e a *F.*

*virginiana* (originária dos EUA) (Radin, 2006). A produção nacional de morango atende basicamente ao mercado interno. No entanto, em pequena escala têm ocorrido exportação do produto *in natura* e industrializado (Groppo & Tassarioli Neto, 1991; Groppo et al., 1997). A produção brasileira anual encontra-se em torno de 105.000 toneladas, com uma área de aproximadamente 3.500 ha (Antunes, 2006). Dentre os estados produtores, destacam-se São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. No Rio Grande do Sul, o Vale do Rio Caí é a principal região produtora de morangos de mesa, seguido de Caxias do Sul e Farroupilha, enquanto Pelotas, e municípios vizinhos, se destacam na produção de morango para a industrialização (Antunes & Duarte, 2005). Outra característica importante desta cultura no Sul do Brasil é sua exploração em propriedades de base familiar, constituindo-se em importante base para o estabelecimento e manutenção destas famílias no campo. Na implantação desta cultura, deve-se utilizar material propagativo sadio (livre de vírus), pois os vírus que infectam o morangueiro reduzem o vigor das plantas e a produção de frutos (Daniels & Assis, 1983; Converse et al., 1987). As mudas produzidas no Brasil não são certificadas nos termos da lei 10.711 (05/08/2003) e do decreto nº 5.153 (23/07/2004), que criaram o Sistema Nacional de Sementes e Mudas (SNSM) e o Registro Nacional de Sementes e Mudas (RENASEM). Recentemente, foi regulamentada a produção, a comercialização e a utilização de mudas, e a atividade de empresas certificadoras (IN 24 de 16 de dezembro de 2005). Os padrões “testado para vírus, vt” e “livre de vírus, vf” não se aplicam as mudas comercializadas no Brasil, uma vez que a indexagem é pré-requisito das duas categorias e geralmente não é praticada (Nickel et al., 2006). As mudas importadas são oriundas principalmente do Chile, Argentina e dos Estados Unidos, que entram no país após controles de pouco rigor. Este quadro demonstra a

fragilidade no sistema de obtenção de mudas sadias e a relevância de estabelecer-se o diagnóstico confiável e adequado à análise massal.

#### 4. VÍRUS DE MORANGUEIRO

*Strawberry mottle virus*, *Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV), *Strawberry crinkle virus* e *Strawberry vein banding virus* são os principais vírus de morangos devido não expressarem sintomas na maioria das cultivares comerciais e por serem transmitidos por afídios. O vírus da clorose marginal, gênero *Potexvirus* e família *Flexiviridae*, é constituído de RNA de fita simples, senso positivo com 5966 nucleotídeos (Martin & Tzanetakis, 2006). Este vírus caracteriza-se por geralmente não expressar sintomas perceptíveis em cultivares comerciais, e por ser disseminado por afídio do gênero *Chaetosiphon* (Martin & Tzanetakis, 2006). Infecções virais, em morangueiros, já foram constatadas no Brasil (Carvalho & Costa, 1961; Daniels & Assis, 1983; Silva et al., 2006).

A indexação biológica em UC-5 (híbrido complexo de *Fragaria vesca* L., *F. chiloensis* Mill. e *F. virginiana* Mill.) e em UC-10 (*F. virginiana*), é um dos métodos de detecção e caracterização mais utilizados. Em indicadoras sensíveis SMYEV induz epinastia, pequenas manchas cloróticas progredindo para necrose, salpicado clorótico e manchas vermelhas na borda da folha (Martin & Tzanetakis, 2006; Silva et al., 2006). Os sintomas induzidos por este vírus são influenciados pelo isolado viral, pela indicadora utilizada e pelas condições ambientais. A inoculação mecânica em indicadoras herbáceas com fins diagnósticos também pode ser utilizada na detecção deste vírus. Entretanto, a transmissão por este método é difícil e poucas são as espécies de plantas que expressam sintomas. Martin & Converse (1982) observaram, que além do tampão de inoculação outros aspectos devem ser levados em consideração, como o estádio de crescimento da planta que será fonte de vírus,

o estágio da indicadora a ser inoculada, a temperatura e o fotoperíodo em que as plantas serão mantidas. Outros dois métodos de detecção utilizados são a indexação sorológica e a molecular. O método sorológico baseia-se no reconhecimento do antígeno (Ag) pelo anticorpo (Ac), formando o complexo Ac-Ag. A detecção é feita por um anticorpo ligado a uma enzima que degrada um substrato, permitindo avaliação visual. A indexação molecular consiste, a partir do RNA (Ácido Ribonucléico) viral, em se obter o DNA (Ácido Desoxirribonucléico) complementar – cDNA- que, por sua vez, será utilizado em uma reação de polimerização em cadeia (PCR). Normalmente SMYEV é encontrado em infecções complexas com outros vírus, potencializando os danos à cultura do morango. (Thompson et al., 2003).

O controle de viroses é basicamente preventivo, ou seja, fundamenta-se na obtenção de material propagativo sadio através de termoterapia, cultura de meristema e quimioterapia, ou ainda a associação de mais de uma destas técnicas. A termoterapia consiste na redução da replicação dos vírus na planta, e isto provavelmente ocorra pela ação da temperatura elevada (aproximadamente 37°C) que interfere no processo de replicação e movimento viral na planta, permitindo que tecidos não diferenciados (meristemas) possam ser retirados e cultivados *in vitro*, dando origem a plantas livres de vírus. Na cultura de meristema, objetiva-se retirar regiões da planta onde o vírus ainda não tenha atingido, ou seja, as regiões meristemáticas. Diversos trabalhos na cultura do morango demonstraram êxito na obtenção de material propagativo livre de vírus com a associação da termoterapia com a cultura de meristemas (Miller & Belkengren, 1963; Vine, 1968; Mullin et al., 1974).

## CAPÍTULO 1

### INDEXAÇÃO BIOLÓGICA MÚLTIPLA PARA DETECÇÃO DE VÍRUS LATENTES EM MACIEIRAS

#### 1.1. RESUMO

A ocorrência de *Apple stem grooving virus*, *Apple stem pitting virus* e *Apple chlorotic leaf spot virus* é comum em pomares comerciais de macieira na região sul do Brasil. A termoterapia seguida da cultura de meristemas *in vitro* ou a microenxertia de ápices caulinares *in vivo* e indexação, constituem-se geralmente nas práticas usadas para obtenção de material propagativo livre de vírus. A indexação biológica individual é um procedimento caro e de longa duração, onde cada porta-enxerto é enxertado com uma estaca de uma única indicadora e observado por um período mínimo de 3 a 4 anos com 3 a 5 repetições. O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do modelo de indexação biológica múltipla na detecção de vírus em 9 acessos de cultivares抗as de macieira provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As plantas indicadoras *Malus domestica* Borkh cvs. Virginia Crab, Radiant Crab, Lord Lambourne-S5, Spy227 e *Malus micromalus* Makino, foram enxertadas sobre porta-enxertos livres de vírus provenientes de sementes de *M. domestica* cv. Gala de um ano de idade. Duas borbulhas de cada acesso avaliado foram enxertadas na base do porta-enxerto. Três meses após a enxertia, efetuaram-se as avaliações de sintomas semanalmente e do número de enxertos brotados. A média de brotação das estacas das indicadoras durante os experimentos foi de

69,5%, com média no primeiro ano de 89% e no segundo 50%. As reações das indicadoras na indexação biológica múltipla são idênticas às observadas em enxertia individual. O método é simples, eficaz e reproduzível, e permite reduzir em até 80% o número de plantas e o espaço necessário à indexação de uma candidata a planta-matriz em programas de limpeza clonal, reduzindo substancialmente os custos desse procedimento (água, fertilizantes, defensivos, vasos e etiquetas).

Termos de indexação: *Malus domestica*, vírus, indicadoras, indexação múltipla.

## 1.2. INTRODUÇÃO

A ocorrência generalizada de viroses latentes em macieiras causadas por *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV) na região sul do Brasil é conhecida (Lessa et al., 1998; Nickel et al., 2001). Estas infecções revestem-se de relevância econômica, visto que podem reduzir substancialmente a produção de frutos, especialmente em infecções complexas. Em infecções simples podem reduzir a produção de frutos em 10 a 20% (Lémoine, 1990).

Os sintomas não são perceptíveis na maioria das cultivares comerciais, e por isso, tais cultivares devem ser indexadas em espécies sensíveis que expressem os sintomas. O diagnóstico de vírus em tecidos lenhosos é complexo e requer estratégias e métodos específicos. Sua distribuição nos tecidos vegetais é desuniforme e flutua conforme a estação do ano, hospedeiro e isolado viral (Candresse et al., 1995; Nemchinov et al., 1995). O diagnóstico é uma etapa fundamental no processo de produção de material propagativo sadio, e é importante que haja a integração de mais de um método de detecção (biológico, sorológico e/ou

molecular). Uma vez diagnosticada a presença do vírus em um determinado material, e tratando-se de germoplasma que justifique o investimento, procede-se a limpeza clonal por meio de quimioterapia, termoterapia, cultura de meristemas ou ainda a associação de mais de uma destas técnicas (Hollings, 1965).

Geralmente o setor pomicultor brasileiro não dispõe de materiais propagativos comerciais na quantidade necessária e com sanidade certificada. Por esta razão, os produtores acabam fazendo seleção visual de “plantas elite” em pomares comerciais que servirão de plantas matrizes para novos plantios (Nickel et al., 2001). A avaliação do estado de sanidade das plantas matrizes é relevante, e os procedimentos de detecção e eliminação são obrigatórios em programas de limpeza clonal. A não indexação implica no risco de propagação de material infectado.

O aparecimento e o tipo dos sintomas podem variar dependendo do biótipo viral, da indicadora utilizada e das condições ambientais, especialmente a temperatura em condições de estufa (Ramel et al., 1998). A indexação biológica com indicadoras lenhosas, em estufa ou em casa de vegetação, permite detectar uma infecção viral em menor tempo, quando comparado a indexações feitas em campo (Stouffer & Fridlund, 1989). Entretanto, exige a manutenção de um grande número de plantas por um longo período de avaliação.

A caracterização do estado fitossanitário de uma coleção de cutivares antigas torna-se fundamental, uma vez que estas plantas são um banco genético importante para uso na busca de características de interesse dentro de programas de melhoramento.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da indexação biológica múltipla para a detecção de vírus latentes em macieira.

### 1.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 1.3.1. Material testado

Foram avaliados seis acessos (05, 10, 11, 14, 15 e 18) de cultivares antigas de macieira, com idades variando de 35 a 50 anos, provenientes dos municípios de Carazinho (acessos 5, 14), Não-Me-Toque (acesso 10), Colorado (acesso 11) e Muliterno (acessos 15 e 18) no estado do Rio Grande do Sul e de três acessos ('Delicious', 'Golden Delicious' e MR1789), com idade de 35 anos, da Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária Catarinense) de São Joaquim/SC.

Os acessos do estado do Rio Grande do Sul fazem parte do programa de melhoramento vegetal conduzido em casa de vegetação na Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves/RS, e em campo na Sub-Estação Experimental de Fruticultura Temperada de Vacaria/RS. A escolha de cultivares antigas deve-se a maior probabilidade de encontrar infecções virais simples e complexas, além da potencialidade de fontes de resistência a outras doenças. As cultivares antigas estão preservadas e estabelecidas em dois bancos de germoplasma, em Bento Gonçalves/RS e Vacaria/RS, para uso em melhoramento após sua caracterização genética.

#### 1.3.2. Indicadoras e métodos de enxertia

Nas indexações múltiplas, todas as indicadoras, *Malus domestica* Borkh cvs. Virginia Crab, Radiant Crab, Lord Lambourne-S5, Spy 227 e *Malus micromalus* Makino, foram enxertadas sobre o mesmo porta-enxerto livre de vírus, oriundo de sementes de *M. domestica* cv. Gala, de um ano de idade e aproximadamente 100 cm de altura. Nas três repetições foram utilizadas cinco indicadoras para três vírus, com o objetivo de aumentar a segurança na eventual deficiência de brotação de

indicadoras. As indicadoras 'Virginia Crab' e *M. micromalus* foram utilizadas para indicar infecção por ASGV, 'Radiant Crab' e 'Spy 227' para ASPV e 'Lord Lambourne-S5' para ACLSV. As estacas das indicadoras foram mantidas previamente em câmara fria (4 °C) durante 1 mês e foram enxertadas sobre o porta-enxerto livre de vírus (Figura 1), utilizando-se cinco estacas (uma de cada indicadora) de 5–7 cm de comprimento, por garfagem de dupla-fenda lateral. Na base do porta-enxerto foram enxertadas simultaneamente duas borbulhas (gemas), do tipo "escudo", de cada acesso avaliado. As enxertiais foram realizadas na primeira semana de agosto de 2005 (acessos do Rio Grande do Sul) e na primeira semana de 2006 para os acessos provenientes de Santa Catarina. Utilizaram-se controles positivos para os três vírus estudados. Os controles positivos utilizados foram: 'Baronesa' de Caçados/SC infectada com ASGV e 'Brae Burn' de Vacaria/RS infectada com ACLSV e ASPV; e o controle negativo (indexado com as indicadoras sem inóculo), os controles serviram para comparação de sintomas entre os diferentes materiais avaliados. Foi realizada também a indexação biológica individual, com três repetições para cada acesso nas seguintes indicadoras: *Malus platycarpa* Rehder (para ACLSV), *M. micromalus* (para ASGV) e 'Spy 227' (para ASPV). As plantas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente (temperatura média em novembro de 2005 e 2006, respectivamente, 18,5 °C e 19,7 °C). A partir do terceiro mês pós-enxertia (p.e.) foram avaliadas semanalmente, quanto ao aparecimento de sintomas e número de estacas brotadas. Os acessos foram mantidos em casa de vegetação sobre porta-enxerto livre de vírus como fonte de material para suprir necessidade eventual de reenxertia.

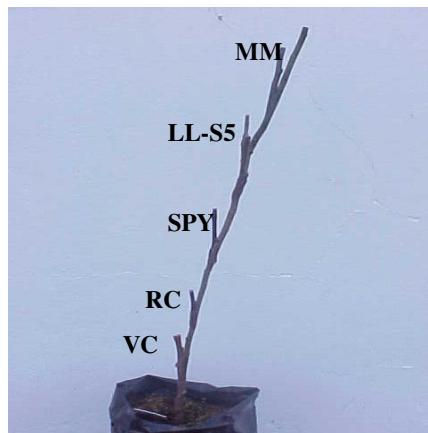


Figura 1. Indexação biológica múltipla. VC: 'Virginia crab'; RC: 'Radiant crab'; SPY: 'Spy227'; LLS-5: 'Lord Lambourne-S5'; MM: *M. micromalus* sobre porta enxerto de *M. domestica* cv. Gala com um ano de idade.

### 1.3.3. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR

As extrações de ácidos nucléicos foram efetuadas conforme Rott & Jelkmann (2001). Na síntese de DNA complementar (cDNA) utilizou-se 1 µL do iniciador oligo dT (10 µM), 0,7 µL de inibidor de RNase (40 U/µL), 1 µL de RNA total e 9,3 µL de água desionizada e autoclavada. A mistura destes componentes permaneceu por 10 minutos a 70 °C e por 5 minutos no gelo. Após, adicionaram-se 4 µL de tampão de MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 5X, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), permanecendo por mais 10 minutos a 25 °C. Então, adicionou-se 1 µL da enzima MMLV-RT, e a mistura foi incubada por 1 hora a 37 °C e por 15 minutos a 72° C. Posteriormente, a 5 µL do cDNA, foram acrescentados 5 µL de tampão de DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) 10X, 1,5 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5 U/ µL), 1 µL de iniciador complementar, 1 µL de iniciador homólogo (Tabela 1) e 32 µL de água desionizada e autoclavada, constituindo-se, assim, a reação de amplificação do DNA.

As amplificações foram efetuadas com programa específico para cada vírus, sendo: para ASPV a mistura foi desnaturada a 95 °C por 10 min, seguidos de 35 ciclos de amplificação (desnaturação por 1 min a 94 °C; pareamento por 1min a 50 °C; e extensão por 1 min a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 10 min.; para ASGV a mistura foi desnaturada a 95 °C por 2 min, seguidos de 34 ciclos de amplificação (desnaturação por 40 seg a 94 °C; pareamento por 40 seg a 50 °C; e extensão por 1 min a 72 °C) e uma extensão final a 72 °C por 5 min. e, para ACLSV a mistura foi desnaturada a 94 °C por 2 min, seguidos de 34 ciclos de amplificação (desnaturação por 40 seg a 94 °C; pareamento por 50 seg a 48 °C; e extensão por 40 seg a 72 °C ) e uma extensão final a 72 °C por 5 min. O DNA foi amplificado exponencialmente pela reação de polimerase em cadeia-PCR em termociclador (MJ Research, Inc. PTC-100), e o produto da RT-PCR foi submetido a análise por eletroforese em gel de agarose (1,2%) com tingimento em brometo de etídio. Nas reações de RT-PCR utilizaram-se controle negativo (água) e controles positivos (RNA total infectado por ASGV e ACLSV).

Tabela 1. Seqüências de iniciadores utilizados, e tamanhos dos fragmentos obtidos para os vírus latentes de macieira.

Iniciador	Seqüência do iniciador (orientação 5' – 3')	Fragmento
<b><i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (Candresse et al., 1995)</b>		
Complementar	CAGACCCTTATTGAAGTCGAA (A52)	358pb
Homólogo	GGCAACCCTGGAACAGA (A53)	6875 a 7233 nt
<b><i>Apple stem pitting virus</i> (Jelkmann, 1994)</b>		
Complementar	ATAGCCGCCCGGGTTAGGTT	269pb
Homólogo	CTCTTGAACCAGCTGATGGC	8993 a 9262 nt
<b><i>Apple stem grooving virus</i> (Nickel et al., 2001)</b>		
Complementar	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	755pb
Homólogo	CGGGATCCATGAGTTGGAAAGACGTGCTTC	5641 a 6396 nt

#### 1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra os resultados do primeiro ano de avaliação, na qual se observa que nenhum dos acessos provenientes do Rio Grande do Sul induziu reação sintomática nas indicadoras para o ACLSV, tanto na indexação múltipla quanto na individual. Entretanto, a Tabela 3 mostra os resultados do segundo ano de avaliação quando ACLSV foi detectado. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao aumento do título viral do primeiro para o segundo ano. Na mesma Tabela, observam-se os resultados da avaliação das reações sintomáticas em espécies de *Malus* utilizadas como indicadoras nas três cultivares antigas provenientes de Santa Catarina.

Na avaliação biológica múltipla, foi detectado ASGV em dois dos acessos de Santa Catarina (Tabela 3), sendo que na indexação biológica individual, não houve a expressão de sintomas em nenhum dos acessos, possivelmente devido ao não pegamento das enxertiais das borbulhas dos acessos avaliados.

A temperatura tem papel fundamental na expressão de sintomas nas indicadoras, pois está diretamente relacionada ao título viral, sendo que em temperaturas abaixo de 18º C e acima de 30º C, são limitantes para o bom crescimento de plantas em casa de vegetação, influenciando no acúmulo de partículas virais e expressão de sintomas (Fridlund, 1970). Este mesmo autor observou que temperaturas entre 18 e 22º C favorecem a expressão de sintomas na maioria das combinações hospedeiro-vírus testadas. Entretanto, algumas combinações de sintomas, tais como, epinastia e declínio em 'Spy227' e caneluras no tronco em 'Virginia Crab', foram favorecidas por temperatura mais elevada (26º C) (Fridlund, 1970). Outro fator relevante é a distribuição dos vírus dentro dos

hospedeiros lenhosos, pois diferentes partes da planta podem apresentar distinta concentração viral.

Sobrepondo as Tabelas 2, 3 e 4 observa-se que a associação de mais de um método de detecção é fundamental para a confiabilidade dos resultados, visando a produção de material propagativo livre de vírus, pois, quando um dos métodos não detecta determinada infecção o outro método pode detectar, seja o biológico ou o molecular. Os acessos de cultivares antigas 5 e 18 não apresentaram infecção, o acesso 14 estava infectado apenas com ASGV e todos os demais acessos apresentam infecção por pelo menos dois vírus latentes. A não expressão de sintomas em indexações individuais, comparativamente com a indexação múltipla, observada na tabela 3 deve-se possivelmente ao não pegamento das enxertiais das borbulhas, visto que as plantas foram mantidas sob as mesmas condições ambientais.

A observação dos resultados contidos nas Tabelas 2 e 3 ressalta a importância da avaliação das indicadoras por mais de um ciclo vegetativo, visto que infecções não visualizadas no primeiro ano tornaram-se evidentes no segundo. Os sintomas observados na indexação múltipla e individual foram do mesmo tipo daqueles observados nos controles positivos, com variação apenas na intensidade. Vários acessos apresentaram sintomas clássicos de infecção viral, entre eles: epinastia em Spy 227, indicando infecção por ASPV e manchas vermelhas e necrose foliar na extremidade da folha de *M. micromalus* cerca de 12 semanas pós - enxertia, indicando infecção por ASGV. O ASGV também induziu necrose na união da enxertia de 'Virginia Crab' com o porta-enxerto. Howell & MinK (1996) observaram reação mais rápida na indicadora *M. micromalus* (cerca de 14-21 dias

pós-enxertia), provavelmente devido a temperatura mais constante em casa de vegetação e também ao maior número de horas de frio acumulado pela indicadora.

Na indicadora Spy 227 inoculada com o acesso 11, observaram-se manchas cloróticas similares àquelas observadas por Cropley (1968). Os acessos 10, 11, 15, 'Delicious' e 'Golden Delicious' induziram a formação de manchas cloróticas irregulares e deformação foliar em 'Lord Lambourne-S5', indicando infecção por ACLSV. Em *Malus platycarpa* observaram-se manchas cloróticas em forma de banda, este sintoma também foi observado por Yanase (1974) utilizando diferentes isolados de ACLSV associados ao mal da sobre-enxertia no Japão. Os sintomas observados na indexação biológica múltipla sugerem a eficiência deste método, visto que as indicadoras expressaram os mesmos sintomas que são observados em indexações individuais. Os sintomas observados na indexação biológica múltipla estão apresentados na Figura 5.

Tabela 2. Reação sintomática das indicadoras na indexação biológica múltipla e individual (primavera de 2005).

Cultivar antiga	Indexação biológica					
	Múltipla			Individual		
	ASGV	ASPV	ACLSV	ASGV	ASPV	ACLSV
5	-	-	-	-	-	-
10	-	+	-	-	+	-
11	+	+	-	+	+	-
14	+	-	-	+	-	-
15	+	+	-	+	+	-
18	-	-	-	-	-	-
'Delicious'	NT	NT	NT	NT	NT	NT
'Golden Delicious'	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MR1789	NT	NT	NT	NT	NT	NT

NT: não testado

+: positivo

-: negativo

Tabela 3. Reação sintomática das indicadoras na indexação biológica múltipla e individual (primavera 2006).

Cultivar antiga	Indexação biológica					
	Múltipla			Individual		
	ASGV	ASPV	ACLSV	ASGV	ASPV	ACLSV
5	-	-	-	-	-	-
10	-	+	+	-	+	-
11	+	+	+	+	+	+
14	+	-	-	+	-	-
15	+	+	+	+	+	-
18	-	-	-	-	-	-
'Delicious'	-	+	+	-	+	+
'Golden Delicious'	+	+	+	-	+	+
MR1789	+	+	+	-	+	+

Tabela 4. Indexação molecular (RT-PCR) das cultivares antigas de macieira do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Cultivar antiga	Indexação molecular		
	ASGV	ASPV	ACLSV
5	-	-	-
10	-	+	-
11	+	+	-
14	+	-	-
15	+	+	-
18	-	-	-
'Delicious'	+	+	+
'Golden Delicious'	+	+	+
MR1789	+	+	+

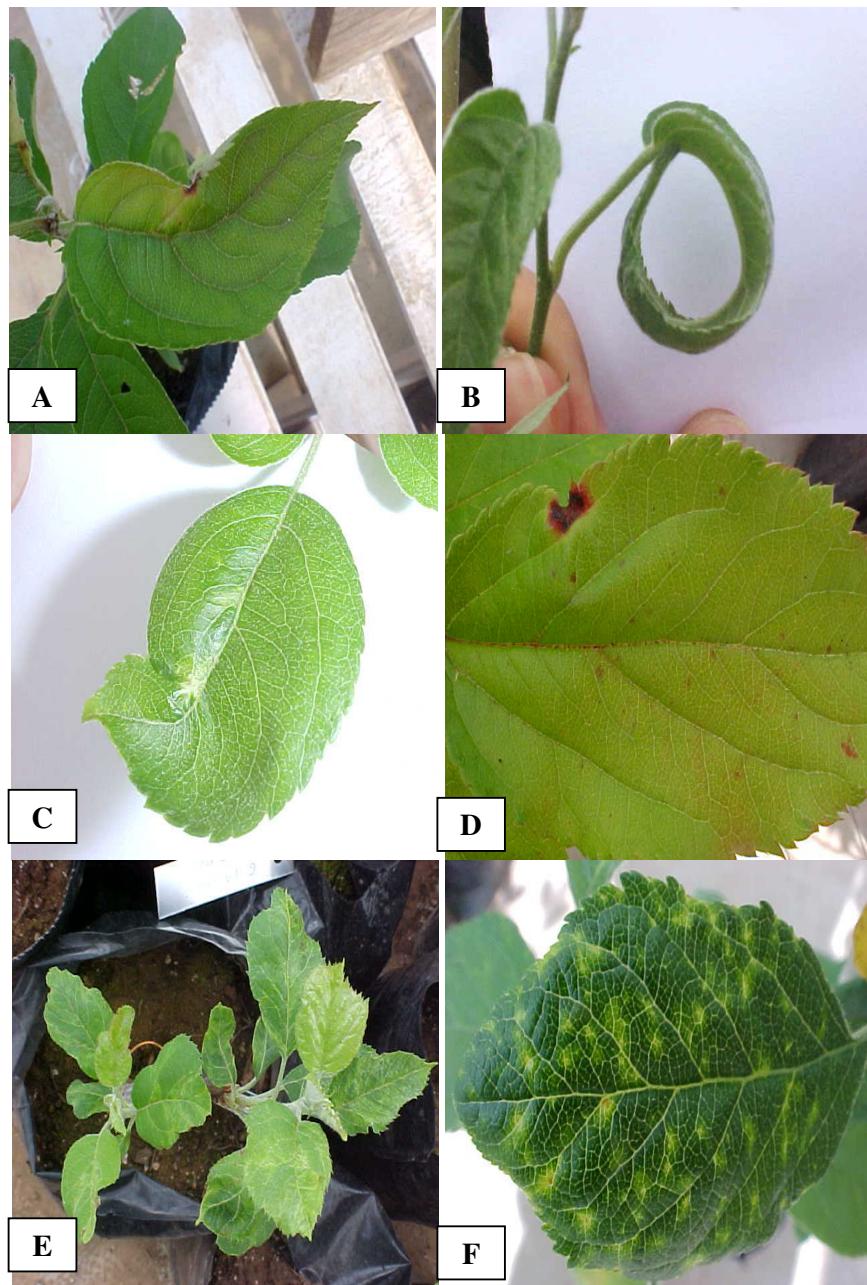


Figura 2. Sintomas observados nas indicadoras na indexação biologia múltipla. **A.** Necrose e deformação foliar em 'Radiant crab' inoculada com o acesso 11; **B.** Epinastia em 'Spy 227' inoculada com o acesso 11 (ASPV); **C.** Necrose e deformação foliar em 'Spy227' inoculada com o acesso 15; **D.** Manchas vermelhas e necrose na extremidade da folha em *M. micromalus* inoculada com o acesso 14 (ASGV); **E.** Enfezamento, deformação e manchas cloróticas em forma de banda em *M. platycarpa* inoculada com o acesso 'Golden Delicious' (ACLSV); **F.** Manchas cloróticas em 'Lord Lambourne-S5' inoculada com o acesso MR1789 (ACLSV).

No primeiro ano da indexação biológica múltipla obteve-se 89% de brotação das estacas das indicadoras. Isto demonstra que a utilização de enxertia de dupla fenda lateral propicia altos índices de pega e brotação. No segundo ano a porcentagem de brotação reduziu para 50%, provavelmente devido ao menor acúmulo de horas de frio pelas indicadoras, pois no segundo ano as plantas foram mantidas em temperatura ambiente e não em câmara fria com temperatura constante (4 °C) Observou-se nas enxertiais avaliadas no segundo ano, que a dominância exercida pela brotação de uma única estaca, prejudicou a brotação das outras (Figura 3). Para se evitar o efeito de dominância exercida pelas estacas enxertadas, deve-se, na indexação biológica múltipla, manter as estacas das indicadoras por pelo menos um mês em câmara fria para a enxertia de primeiro ano.

No segundo ano o tempo para brotação das estacas é maior (cerca de um mês a mais) e ainda se observa com maior freqüência a dominância de algumas estacas sobre outras. *M. micromalus* foi a espécie que apresentou os menores índices de brotação no segundo ano (22%). Isto se deve, provavelmente ao fato de estar localizada no ápice do porta-enxerto. As indicadoras da região mediana e basal tiveram um bom desenvolvimento, afetando negativamente a brotação e desenvolvimento da estaca apical. Estacas que estejam prejudicando o crescimento das outras devem ser podadas ou deve ser efetuada a quebra química de dormência para uniformizar a brotação. É necessário manter o porta-enxerto podado até acima da última indicadora para evitar a dominância apical (Figura 3).



Figura 3. Falta de brotação de algumas estacas de indicadoras. **A.** Dominância apical do porta-enxerto sobre as estacas das indicadoras; **B.** Dominância da estaca basal prejudicando a brotação e o crescimento das estacas superiores.

O método molecular, utilizando os iniciadores A52 e A53, não foi eficiente na detecção de ACLSV nos acessos do Rio Grande do Sul e no acesso 'Delicious' de Santa Catarina (Tabela 4). Isto se deve, provavelmente, ao não pareamento dos iniciadores utilizados, devido a diferenças na seqüência de nucleotídeos destes isolados, ou ainda devido a qualidade do extrato de RNA total condicionando a presença de falsos negativos no teste molecular. O não pareamento dos iniciadores A52 e A53 nestes acessos é conflitante com os resultados observados por Candresse et al. (1995) onde utilizaram 60 diferentes isolados de ACLSV de diferentes regiões geográficas e conseguiram amplificar o fragmento de 358 pb obtido com os iniciadores A52 e A53. A região do genoma, amplificada utilizando os iniciadores A52 e A53, apresenta sobreposição entre o gene da proteína de movimento 50 K e do gene da proteína capsidial. A proteína capsidial apresenta alta homologia entre a seqüência de nucleotídeos e a proteína do movimento apresenta variações na seqüência entre diferentes isolados (Candresse et al., 1995). Em virtude disso, pode-se esperar que alguns isolados não sejam amplificados com este par de iniciadores. Utilizando outro par de iniciadores (6784-7518) conseguiu-se

amplificar um fragmento de ACLSV no acesso 'Delicious' de Santa Catarina. Este par de iniciadores foi desenhado no site <http://froda.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>, com base na seqüência de nucleotídeos de um isolado (número de acesso NC 001409) obtido no Genbank no NCBI (National Center Biotechnology Information) – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este par de iniciadores também amplifica a região de sobreposição entre a proteína do movimento e a proteína capsidial, entretanto, possivelmente, em uma região conservada entre diferentes isolados,

Nas Figuras 4, 5 e 6 podem-se observar os fragmentos amplificados dos três vírus latentes de macieira.

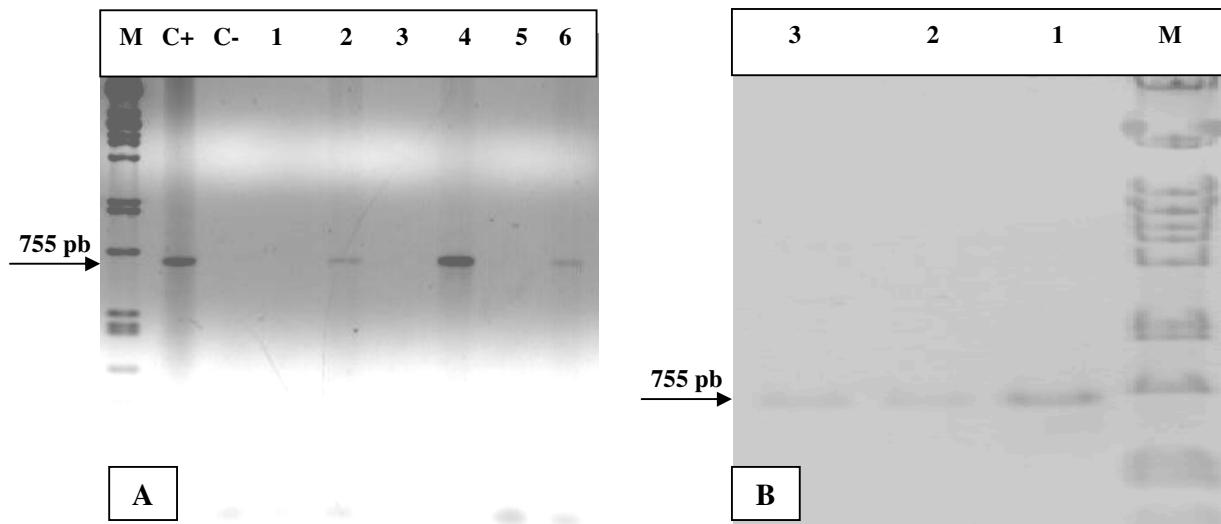


Figura 4. Análise de produtos da RT-PCR de ASGV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). **A.** M, Marcador molecular Lambda DNA/*Pst*I; C+, Controle positivo (RNA total de 'Fuji Star'); C-, Controle negativo; 1-6: As amostras representam, respectivamente, os acessos do Rio Grande do Sul 5, 11, 10, 14, 18 e 15. **B.** 1-3. Representam, respectivamente, os acessos de Santa Catarina MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious'.

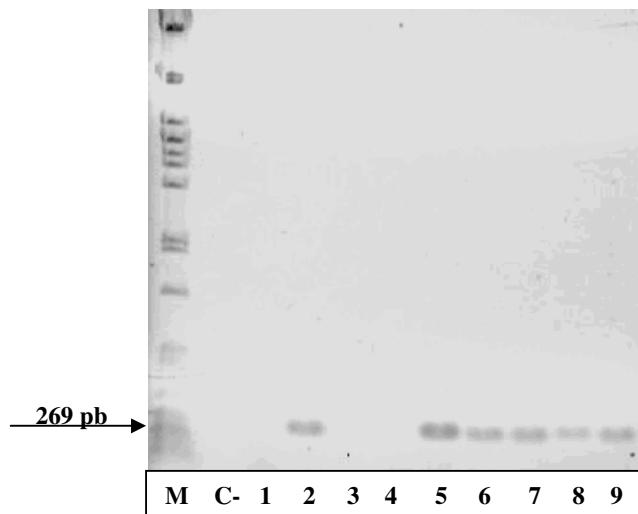


Figura 5. Análise de produtos da RT-PCR de ASPV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). M, Marcador molecular Lambda DNA/*Pst*I; C-, Controle negativo; 1-9, acessos 5, 10, 14, 18, 11, 15, 'Delicious', 'Golden Delicious' e MR1789, respectivamente.

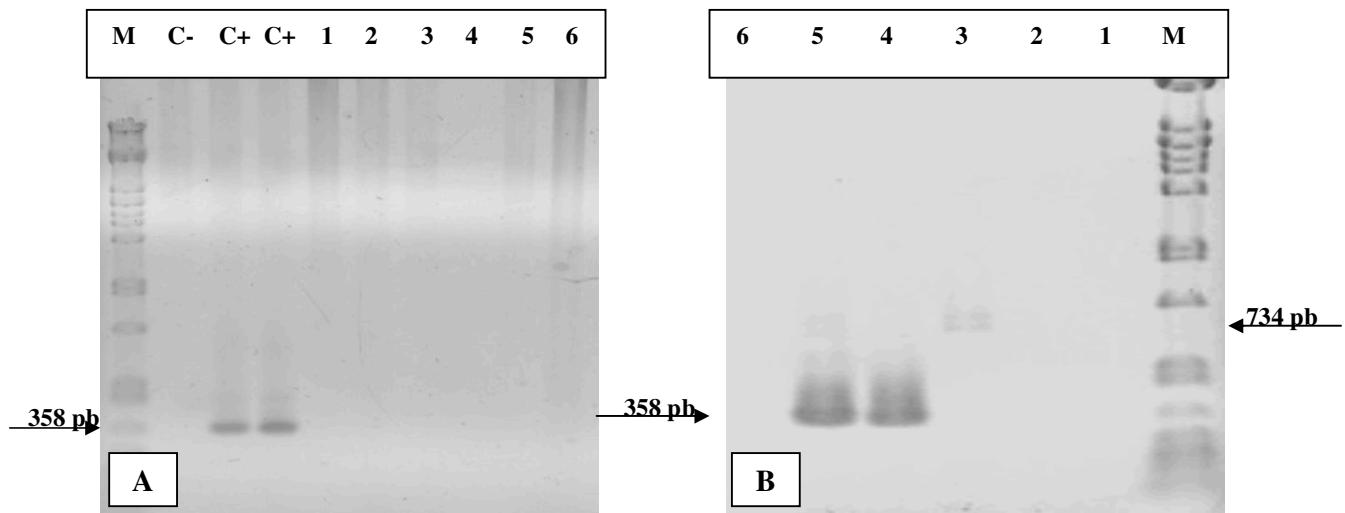


Figura 6. Análise de produtos da RT-PCR de ACLSV por eletroforese em gel de agarose (1,2%). **A.** M, Marcador molecular Lambda DNA/*Pst*I; C-, controle negativo; C+, controle positivo (RNA total de 'Gala' Vacaria); 1-6, cultivares antigas de macieira (5, 10, 11, 14, 15 e 18), respectivamente. **B.** 1-3, Acessos MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious', respectivamente (iniciadores: 6784-7518); 4-6. Acessos MR1789, 'Golden Delicious' e 'Delicious', respectivamente (iniciadores A52 e A53).

Os protocolos de RT-PCR para isolados brasileiros de ASPV e ASGV presentes nos materiais avaliados produziram resultados confiáveis e reproduzíveis, oferecendo suporte aos resultados obtidos na indexação biológica múltipla. No

entanto, para ACLSV houve escapes, ou seja, amostras positivas no teste biológico e negativas no teste molecular, para os seis acessos provenientes do Rio Grande do Sul, sendo que três deles apresentavam-se infectados por ACLSV. Já para os acessos de Santa Catarina os protocolos de RT-PCR foram adequados.

Dentro de um programa de produção de material propagativo livre de vírus os testes moleculares fecham o ciclo de diagnóstico, uma vez que só chegam até eles aquelas plantas com resultados negativos nos testes biológicos e sorológicos, a fim de excluir o escape devido a algum mascaramento ou baixo título viral. A soma de informações dos diferentes testes de detecção viral confere maior confiabilidade aos resultados.

### 1.5. CONCLUSÕES

A associação de mais de um método de detecção é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis;

A indexação biológica múltipla pode ser utilizada em programas de limpeza clonal, para a detecção de vírus latentes em macieira;

A indexação múltipla é uma prática confiável e economicamente vantajosa, comparativamente à indexação individual, pois pode reduzir em até 80% o número de plantas utilizadas e consequentemente os custos totais de indexação biológica.

## CAPÍTULO 2

### CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE UM ISOLADO BRASILEIRO DE *Apple chlorotic leaf spot virus*

#### 2.1. RESUMO

*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) é amplamente distribuído pelo mundo e é um dos mais importantes vírus que infectam fruteiras de clima temperado como maçã, marmelo, pêra, ameixa, damasco, cereja e pêssego. ACLSV é membro-tipo do gênero *Trichovirus*, família *Flexiviridae*, e caracteriza-se por não induzir sintomas na maioria das cultivares comerciais. Este trabalho teve como objetivo a caracterização biológica e molecular, baseada na indexação em indicadoras lenhosas e na análise da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial de um isolado brasileiro (BR1), presente em uma cultivar antiga de macieira do estado de Santa Catarina. O fragmento amplificado de 645 pb foi克隆ado e seqüenciado. Este fragmento contém o gene completo da proteína capsidial de ACLSV com 582 nucleotídeos e 193 aminoácidos. As menores homologias observadas entre a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do isolado brasileiro BR1 são 83% e 91% respectivamente, com o isolado dos EUA B-81 de ACLSV. As maiores homologias entre nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do isolado BR1 foram obtidas em comparação com o isolado japonês MO-31 com 94% e 99%, respectivamente. Os sintomas induzidos pelo isolado BR1

em *Malus domestica* Borhk cv. Lord Lambourne-S5 consistiram em manchas cloróticas, deformação foliar e nanismo. Em *M. platycarpa* Rehder este isolado induziu necrose e deformação na lateral da base da folha.

Termos de indexação: *Trichovirus*, homologia, ACLSV, proteína capsidial, RT-PCR, indicadoras lenhosas

## 2.2. INTRODUÇÃO

O “vírus da mancha clorótica foliar” *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) infecta um grande número de espécies frutíferas como maçã, marmelo, pêra, ameixa, damasco, cereja e pêssego (Nemchinov et al., 1995). Atualmente, o ACLSV pertence como membro-tipo ao gênero *Trichovirus* da família *Flexiviridae*. É constituído por um RNA de fita simples, senso positivo com 7.555 nucleotídeos e possui partículas com dimensões de 720 nm de comprimento por 12 nm de diâmetro (Lister & Bar Joseph, 1981; German et al., 1990). O genoma apresenta três fases abertas de leitura ORFs (open reading frames) codificando três proteínas, uma de 216,5 kDa que codifica uma proteína que contém seqüência conservada e homologia com proteínas envolvidas na replicação viral, uma de 50 kDa associada ao movimento do vírus na planta e a proteína capsidial de 22 kDa. As proteínas de 50 kDa e 22 kDa são expressas, provavelmente, de RNAs mensageiros subgenômicos. Já a proteína de 216 kDa é traduzida diretamente do RNA genômico (Candresse et al., 1995).

O ACLSV, geralmente, é latente em cultivares comerciais de macieiras podendo causar significativos danos econômicos, especialmente em infecções complexas com outros vírus latentes ou individualmente em combinações sensíveis

de copa e porta-enxerto. Pode causar severos danos, por exemplo, em frutos de caroço como fendas na casca dos frutos e pseudo-erupções em ameixa; ondulações e mosqueado em frutos de pêssego; deformação de folhas e frutos em pêssego e damasco e incompatibilidade na enxertia em algumas combinações de damasco (Desvignes & Boye, 1989). Este vírus em associação com *Apple stem grooving vírus* e *Apple stem pitting virus* está associado ao declínio de plantas observado em pomares de macieira. (Yanase, 1983; Nickel et al., 1999).

Os diferentes isolados de ACLSV apresentam alta variabilidade biológica (Mink et al., 1971; Yanase, 1974) e molecular (Candresse et al., 1995). A variabilidade molecular é determinada com base na comparação da homologia da seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos da região situada entre a proteína de movimento e da proteína capsidial (Pasquini et al., 1998).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente o gene da proteína capsidial do isolado brasileiro BR1, obtido a partir de uma cultivar antiga de macieira coletada no estado de Santa Catarina, bem como, avaliar os sintomas induzidos por este isolado em duas indicadoras lenhosas.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1. Fonte do vírus

O isolado BR1 de ACLSV foi obtido a partir de uma cultivar antiga de macieira (MR1789) com 35 anos de idade. As amostras de ramos e folhas para os testes biológico e molecular foram coletadas na Estação Experimental da Epagri (Empresa de Pesquisa Agropecuária Catarinense) de São Joaquim/SC.

#### 2.4.2. Testes biológicos

As indicadoras utilizadas na indexação biológica foram 'Lord Lambourne-S5' e *Malus platycarpa*, ambas indicando infecção por ACLSV, com três repetições. O inóculo foi composto de duas borbulhas da cultivar de macieira antiga MR1789 infectada com o isolado BR1 de ACLSV, as quais foram enxertadas na base do porta-enxerto livre de vírus, obtido de sementes de *M. domestica* cv. Gala, com um ano de idade e, aproximadamente, 100 cm de comprimento. Utilizou-se controle negativo, no qual se enxertou apenas a indicadora sem o inóculo. As estacas das indicadoras foram mantidas previamente em câmara fria (4ºC) por um mês, visando a quebra de dormência. As plantas enxertadas, na primeira semana de agosto de 2006, foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente (temperatura média em novembro de 2006: 19,7 ºC) e avaliadas sintomatologicamente após três meses da enxertia das borbulhas.

#### 2.4.3. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR

As extrações de ácidos nucléicos totais foram feitas de acordo com Rott & Jelkmann (2001), sendo que a partir do RNA viral, efetuou-se a síntese de um DNA complementar (cDNA). Foram utilizados 1µL do iniciador oligo dT (10 µM), 0,7 µL de inibidor de RNase (40 U/µL), 1 µL de RNA totalAN e 9,3 µL de água desionizada e autoclavada. A mistura destes componentes permaneceu por 10 minutos a 70 ºC e, posteriormente, por 5 minutos no gelo. Após adicionaram-se 4 µL de tampão de MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 5X, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de dNTP (2,5 mM de cada nucleotídeo), permanecendo por mais 10 minutos a 25 ºC e, por último, acrescendo-se 1 µL da enzima MMLV-RT (200 U/µL). Toda a mistura ficou por 1 hora a 37 ºC e por 15 minutos a 72 ºC. Posteriormente,

foram acrescidos 5 µL do cDNA, 5 µL de tampão da DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) 10X, 1,5 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL de (Taq DNA polimerase) (5 U/ µL), 1 µL de iniciador complementar, 1 µL de iniciador homólogo e 32 µL de água desionizada e autoclavada. A mistura foi desnaturada a 94 °C por 2 min seguidos de 34 ciclos de amplificação (desnaturação por 40 seg a 94 °C; pareamento por 50 seg a 48 °C; e extensão por 40 seg a 72 °C ) e uma extensão final a 72 °C por 5 min. O DNA foi amplificado exponencialmente em termociclador (MJ Research, Inc. PTC-100) e o produto da RT-PCR foi submetido a análise por eletroforese em gel de agarose (1,2%) com tingimento em brometo de etídio. Foi utilizado água para a reação de RT-PCR no controle negativo e extrato de RNA total de macieira infectada com ACLSV. Foram utilizados três pares de iniciadores em reações distintas para a amplificação do ACLSV:

- 1) Complementar 7233 (A53) – GGCAACCCTGGAACAGA; Homólogo 6875 (A52) – CAGACCCTTATTGAAGTC , tamanho do fragmento 358 pb (Candresse et al., 1995);
- 2) Complementar 7365 – ATGGCGCAGTGCTGAACTCC; Homólogo 6784 – CTAAACGCAAAGATCAGTTGTA, tamanho do fragmento: 582 pb;
- 3) Complementar 7429 – CAGTTGCTCGACAGAACCA; Homólogo 6751 – CACACTTGAGCACACAACACA, tamanho do fragmento: 678 pb.

Um quarto par de iniciadores foi testado (6784 e 7429), dando um fragmento de 645 pb, visando a amplificação do ACLSV.

Os iniciadores 6784/7365 e 6751/7429 foram desenhados utilizando-se de software disponível no site <http://froda.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3>, com base na seqüência de nucleotídeos de um isolado de ACLSV acesso NC 001409 disponível

no Genbank do NCBI (National Center Biotechnology Information-

#### 2.4.4. Clonagem e sequenciamento

O produto da PCR, fragmento amplificado de 645 pb foi ligado ao vetor pCR 2.1 conforme TA Cloning Kit (Invitrogen) com algumas modificações. Utilizaram-se 5 µL da reação de RT-PCR, 1 µL do vetor pCR2.1 (0,025µg/µL), 1 µL de tampão da ligase 10X, 1 µL de T4 DNA Ligase(4U/ µL) e 2 µL de água deionizada e autoclavada. Esta mistura foi incubada a 14 °C durante a noite. Para a transformação, 10 µL da reação de ligação foram adicionados a 100 µL de células competentes (Sambrook, 1989) de *Escherichia coli* (DH10B), sendo as células incubadas por 30 minutos em gelo e, após, foram submetidas a choque térmico (42 °C por 1 minuto) e, imediatamente transferidas para gelo. Adicionaram-se, então, ao tubo Eppendorf contendo as células bacterianas transformadas, 300 µL de meio de cultura SOC (para 100 mL: 2 g de triptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1 mL de NaCl 1 M, 0,25 mL KCl 1 M e 97 mL de água e, após autoclavar, esperar atingir temperatura ambiente e adicionar 1 mL de MgCl<sub>2</sub> 2 M e 1 mL de glicose 2 M) incubando-se a cultura por 1 hora a 37 °C com 180 rpm de rotação em agitador automático (Shaking Incubator GFL Mod 3031).

O plaqueamento foi feito com duas repetições, sendo cada placa uma repetição com 200 µL da reação de transformação. Cada placa continha meio de cultura Luria-Bertani (LB) 2% sólido (1,5% (p/v) de ágar) com 15 mL/placa, onde foram acrescidos ampicilina (100 µg/mL) e 40 µL de 5-bromo-4 cloro-3 indolyl-β-D-Galactoside (X-Gal 20mg/mL). As colônias brancas, provavelmente recombinantes (Figura1), foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio LB líquido com

ampicilina (100 µg/mL), incubando-se as culturas durante a noite a 37 °C, com agitação de 180 rpm. Dos clones transformados foi extraído o DNA plasmidial utilizando-se o Kit FlexiPrep (Amersham Biosciences), conforme recomendação do fabricante. O DNA plasmidial purificado foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RI para verificar a presença do inserto de interesse. O fragmento clonado no vetor pCR 2.1 foi sequenciado usando-se os iniciadores M13 homólogo e M13 complementar em sequenciador automático (ABI Prism 3700, Applied Biosystem). O clone obtido foi seqüenciado quatro vezes nas duas orientações. A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foi analisada e comparada com outras seqüências disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se a função BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, obtida para o isolado BR1 de ACLSV, foi depositada no GenBank, código de acesso EF 138602.

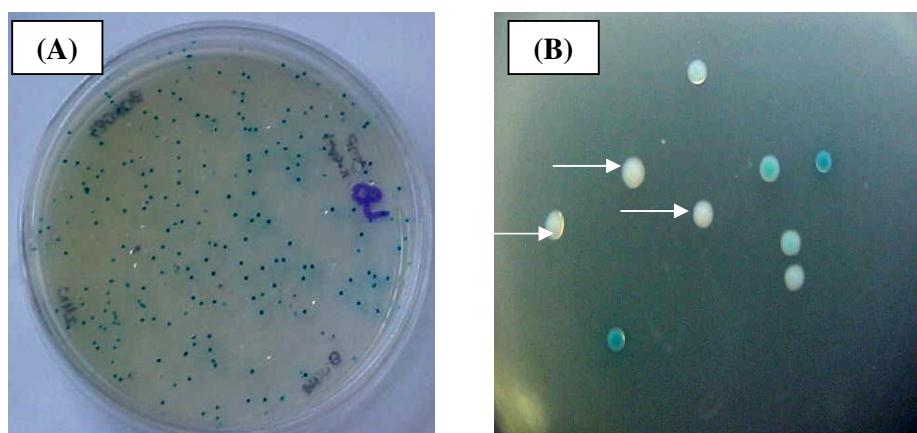


Figura 1. (A). Crescimento de colônias de *Escherichia coli* (DH10B) em meio LB sólido com ampicilina e X-Gal. (B) Setas mostrando detalhes das colônias brancas, correspondentes aos clones recombinantes.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização dos pares de iniciadores 6784-7365 e 6751-7429 não permitiu a amplificação de nenhum fragmento do ACLSV. Entretanto, quando se utilizou o par de iniciadores 6784-7429 foi amplificado um fragmento de 645 pb do isolado BR1 de ACLSV, a partir de RNA total extraído da cultivar de macieira antiga MR1789 (Figura 2). Este fragmento comprehende todo o gene da proteína capsidial de ACLSV, que possui 582 nucleotídeos.

Na digestão do DNA plasmidial, extraído dos clones recombinantes com a enzima *EcoRI*, observou-se que a maior parte dos clones testados, apresentava o fragmento de interesse (645 pb) (Figura 3). Na Figura 4 pode-se observar a seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos do isolado brasileiro BR1 de ACLSV.

Na Tabela 1 são apresentadas informações de origem, nome do isolado e código de acesso de 11 seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de isolados de ACLSV, utilizados no estudo de homologia. Todos os isolados de ACLSV analisados são de macieira com exceção do isolado polonês que é de ameixa. Dentre os isolados de ACLSV relacionados no site do NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> após um estudo de homologia utilizando-se da função BLAST, um isolado japonês e outro americano apresentaram homologias contrastantes com o isolado brasileiro BR1. O isolado americano B81 apresentou as menores homologias de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, 83% e 91%, respectivamente, quando comparado ao isolado BR1. O isolado polonês apresentou 87 e 97% de homologia na seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, respectivamente, com o isolado BR1. O isolado japonês MO31 apresentou as

maiores homologias de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos com 94% e 99%, respectivamente, quando comparado com o isolado BR1 (Tabela 2).

As espécies da família *Flexiviridae* apresentam entre seus genes completos da proteína capsidial e polimerase, identidades de nucleotídeos  $\geq 72\%$  e de aminoácidos deduzidos  $\geq 80\%$ . A variação observada entre os diferentes isolados de ACLSV pode ser atribuída a variabilidade natural encontrada entre diferentes isolados da mesma espécie (Adams et al., 2004).

A baixa especificidade sorológica observada por Candresse et al. (1995), devido à baixa variabilidade na seqüência de aminoácidos da proteína capsidial, sugerem o êxito que se poderia alcançar na utilização do isolado BR1 para a produção de anti-soro para a detecção de ACLSV.

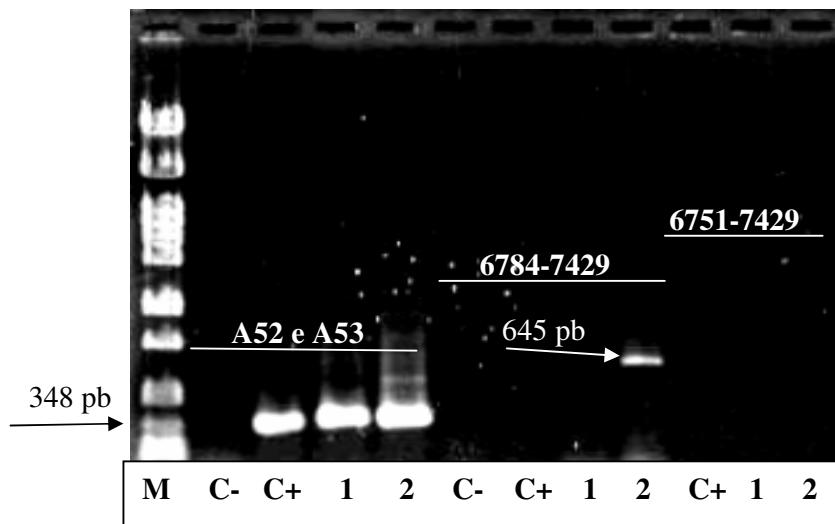


Figura 2. Análise de produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de agarose (1,2%) referente ao teste com três pares de iniciadores para amplificar ACLSV. M. marcador molecular Lambda DNA/PstI; C-. Controle negativo; C+. Controle positivo (Extrato de RNA total de 'Gala' Vacaria); 1. Cultivar antiga de macieira 'Delicious'; 2. Cultivar antiga de macieira MR1789

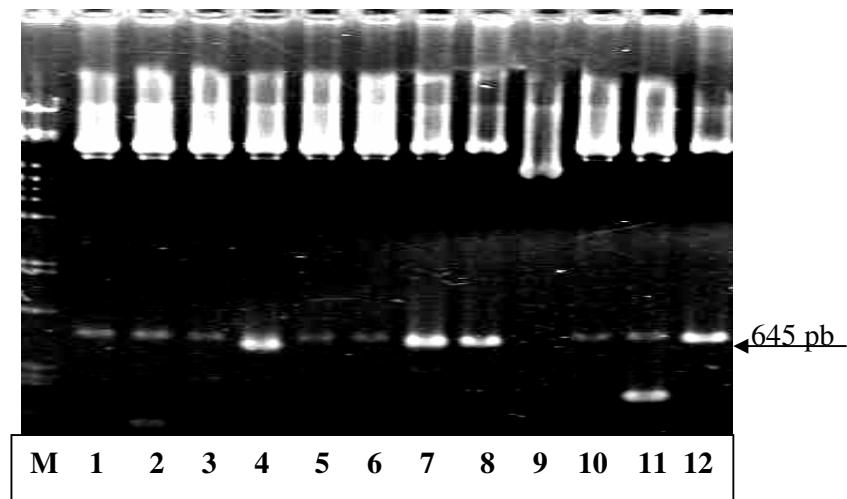


Figura 3. Análise de produtos da digestão de preparações de DNA plasmidial com *Eco*RI por eletroforese em gel de agarose (1,2%). M. Marcador molecular Lambda DNA/*Pst*I; 1-12. amostras de DNA plasmidial de diferentes clones obtidos na transformação.

6784	ATGGCAGCAGTTCTCAATTGCAGCTAAAGTGGACGCAGATCTGAAAGCGTCCTGGCC
	<b>M A A V L N L Q L K V D A D L K A F L A</b>
6844	GCAGAAGGCAGACCCCTCATGGAAGGCAGGGGCAATCTGGAACAGATACTGGAGTCC
	<b>A E G R P L H G R T G A I L E Q I L E S</b>
6904	ATCTTCGCGAACATAGCGATACAAGGAACCGTCGGAGCAAACGGAGTCCTGGATCTGGTG
	<b>I F A N I A I Q G T S E Q T E F L D L V</b>
6964	GTGGAGGTGAAGTCATGGAGGACAGAAAGTAATCGGGTCTACAATTGAAGGAGGTG
	<b>V E V K S M E D Q K V I G S Y N L K E V</b>
7024	GTCAACATGATCAAAGCCTTCAAGACTACCTCTCGGATCCGAACATCAGCAGCATGACT
	<b>V N M I K A F K T T S S D P N I S S M T</b>
7084	TTCCGCCAGGTGTGAGGCTTCGACCGGAGGAACGGGTTGGTAAACTGAAG
	<b>F R Q V C E A F A P E A R N G L V K L K</b>
7144	TATAAAGGGGTTTCACCAACCTTACGACCATGCCGAAGTAGGAAGTAAATAACCGG
	<b>Y K G V F T N L F T T M P E V G S K Y P</b>
7204	GAGCTGATGTTGATTCAATAAGGGCTTAACTGTTATCATGAATAAGGCTCAACAA
	<b>E L M F D F N K G L N M F I M N K A Q Q</b>
7264	AAAGTCATAACTAATATGAACCGCGTCTTACAAACTGAATTGCAAAAAGCGAGAAT
	<b>K V I T N M N R R L L Q T E F A K S E N</b>
7324	GAGGCCGAAGCTCTCATGTTACAACGTGATCTTGCAATTAG
	<b>E A K L S S V T T D L C I *</b>

Figura 4. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial do isolado brasileiro BR1 de ACLSV. O asterisco no final da seqüência indica o códon de terminação.

Tabela 1. Isolados, origem e número de acesso de seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de ACLSV disponíveis na base de dados do Genbank no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e utilizadas nos estudos de homologia

Isolado	Origem	Código do acesso
BR1	Brasil	EF138602
MO31	Japão	AB060963
P195	Japão	AB060950
MK9	Japão	AB060962
PK5	Japão	AB060959
B81	EUA	AB060957
MK1	Japão	AB060961
HBP	China	AY728180
Polônia	Polônia	AF251275
Alemanha	Alemanha	AJ243438
França	França	M58152

Tabela 2. Porcentagem (%) de homologia entre as seqüências de nucleotídeos (acima da diagonal) e aminoácidos deduzidos (abaixo da diagonal) dos diferentes isolados de ACLSV.

Isolado	BR1	MO31	P195	MK9	PK5	B81	MK1	HBP	Polônia	Alemanha	França
<b>BR1</b>	-	94	90	91	85	83	84	88	87	87	86
<b>MO31</b>	99	-	90	90	86	83	83	87	87	86	87
<b>P195</b>	95	96	-	86	89	84	81	84	83	83	83
<b>MK9</b>	99	98	95	-	83	81	84	88	86	85	85
<b>PK5</b>	94	94	96	93	-	87	83	85	84	85	83
<b>B81</b>	91	91	92	91	93	-	79	80	79	80	79
<b>MK1</b>	95	94	92	93	90	90	-	84	83	83	82
<b>HBP</b>	98	96	93	96	91	88	91	-	94	88	84
<b>Polônia</b>	97	95	91	94	90	87	91	96	-	88	84
<b>Alemanha</b>	96	94	90	94	89	86	91	92	93	-	85
<b>França</b>	96	94	90	93	89	87	92	92	93	93	-

A seguir são apresentados os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos (Figura 5) e aminoácidos deduzidos (Figura 6), dos diferentes isolados de ACLSV, constantes da Tabela 1.





	*	180	*	193
BR1	.....	.....	.....	
MO31	.....	.....	.....	
P195	.....	.....	.....	
MK9	.....	.....	.....	
PK5	.....	.....	.....	
B81	.....	X	.....	
MK1	.....	.....	.....	
HBP	.....	.....	.....	
POLÔNIA	.....	.....	.....	
FRANÇA	.....	.....	.....	
ALEMANHA	..P..	.....	.....	
CONSENSO	NRRLQTEFAKSEN	AKLSSV	TDLCI	

Figura 6. Alinhamento, obtido pelo programa ClustalX, entre seqüências de aminoácidos deduzidos do gene da proteína capsidial de diferentes isolados de ACLSV.

Os sintomas provocados pelo isolado BR1 de ACLSV nas indicadoras 'Lord Lambourne-S5' e *M. platycarpa* podem ser verificados na Figura 7. Os sintomas observados em *M. platycarpa* não são similares àqueles observados por Yanase (1974) com diferentes isolados de ACLSV. Esta diferença sintomatológica, expressão de uma necrose na lateral da base da folha, a qual não foi observada por Yanase (1974), pode ser atribuída a diferenças genômicas consideráveis, com outros isolados, em outras regiões do genoma, que possam estar associadas a virulência e a expressão de sintomas. A grande variabilidade biológica observada em indicadoras sensíveis infectadas com ACLSV se deve, parcialmente, à grande variabilidade da proteína de movimento 50 k (Candresse et al., 1995; Nemchinov et al., 1995). Os sintomas observados em *M. platycarpa* utilizando-se outros materiais vegetativos infectados com ACLSV consistem em enfezamento e manchas cloróticas em forma de banda (Figura 8). Variações biológicas de ACLSV já foram observadas induzindo ou não, sintomas leves nas mesmas indicadoras lenhosas (Mink et al., 1971; Yanase, 1974). Em 'Lord Lambourne - S5' os sintomas consistiram de manchas cloróticas irregulares em toda a folha (Figura 7), também observaram-se enfezamento e deformação foliar.

O isolado de ACLSV BR1 encontra-se muito próximo do isolado MO-31 nas árvores filogenéticas que foram geradas neste estudo (Figuras 9 e 10). Este último

se caracteriza, biologicamente, por ser latente em *M. prunifolia* var. *ringo*. Este biótipo latente reveste-se de importância em termos epidemiológicos, visto que em viveiros e pomares que utilizem este porta-enxerto os sintomas da infecção de ACLSV não serão percebidos, levando à manutenção e propagação de plantas infectadas. O isolado MO-31 é amplamente distribuído no Japão (Yanase, 1974).

Outro resultado relevante foi que as menores homologias entre seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do isolado BR1 foram observadas, comparativamente, com o isolado B-81, o qual é sintomático em *M. prunifolia* var. *ringo* (Yanase, 1974).

Em trabalho realizado com diferentes indicadoras, Yanase (1974) observou que o isolado MO-31, além de ser assintomático em *M. prunifolia* var. *ringo*, é latente em 'Hopa Crab' e 'Purple Wave'. O isolado MO-31 é capaz de induzir manchas cloróticas foliares em 'R12740-7A', necrose foliar em 'Jay Darling' e enfezamento e manchas em forma de banda em *M. platycarpa*.

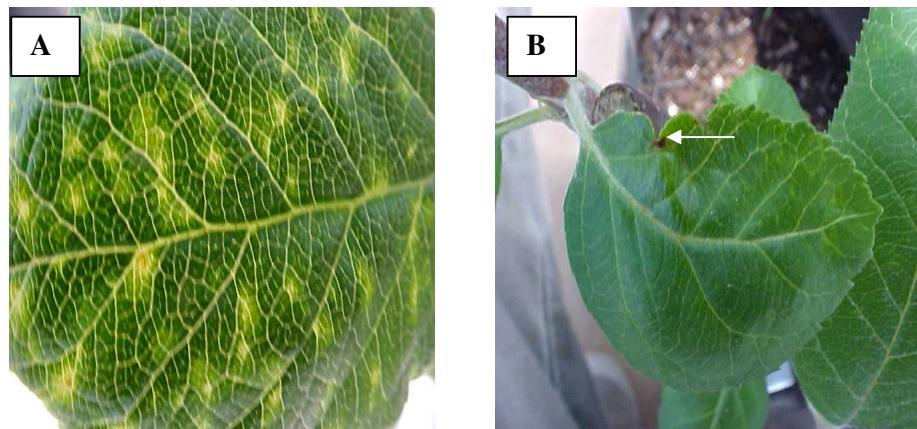


Figura 7. Sintomas induzidos pelo isolado brasileiro BR1 de ACLSV, em: **A.** 'Lord Lambourne - S5' com manchas cloróticas irregulares; **B.** *Malus platycarpa* com necrose na lateral da base da folha provocando deformação foliar (seta indicando posição do sintoma).



Figura 8. Sintomas de nanismo, deformação foliar e manchas cloróticas dispersas em forma de banda observados em *M. platycarpa* inoculada com o acesso 'Delicious' infectado por ACLSV.

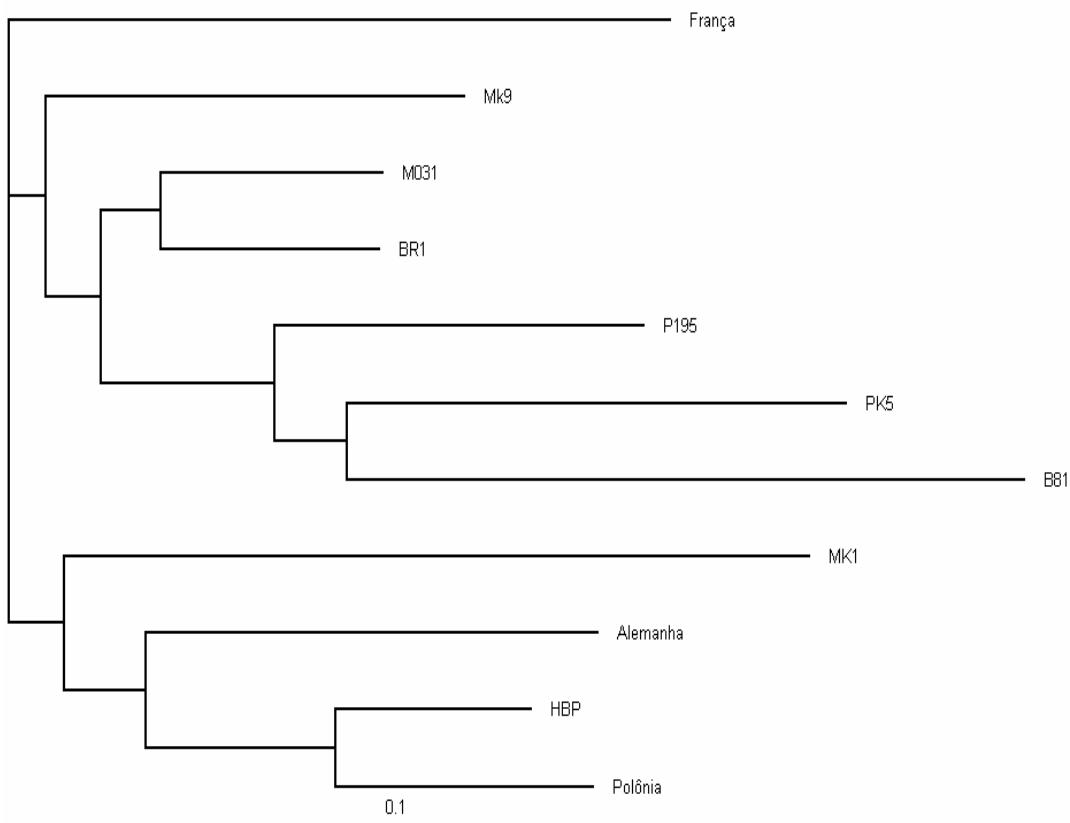


Figura 9. Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de 582 nucleotídeos do gene da proteína capsidial de 11 isolados de ACLSV. Barra: número de substituições por posição.

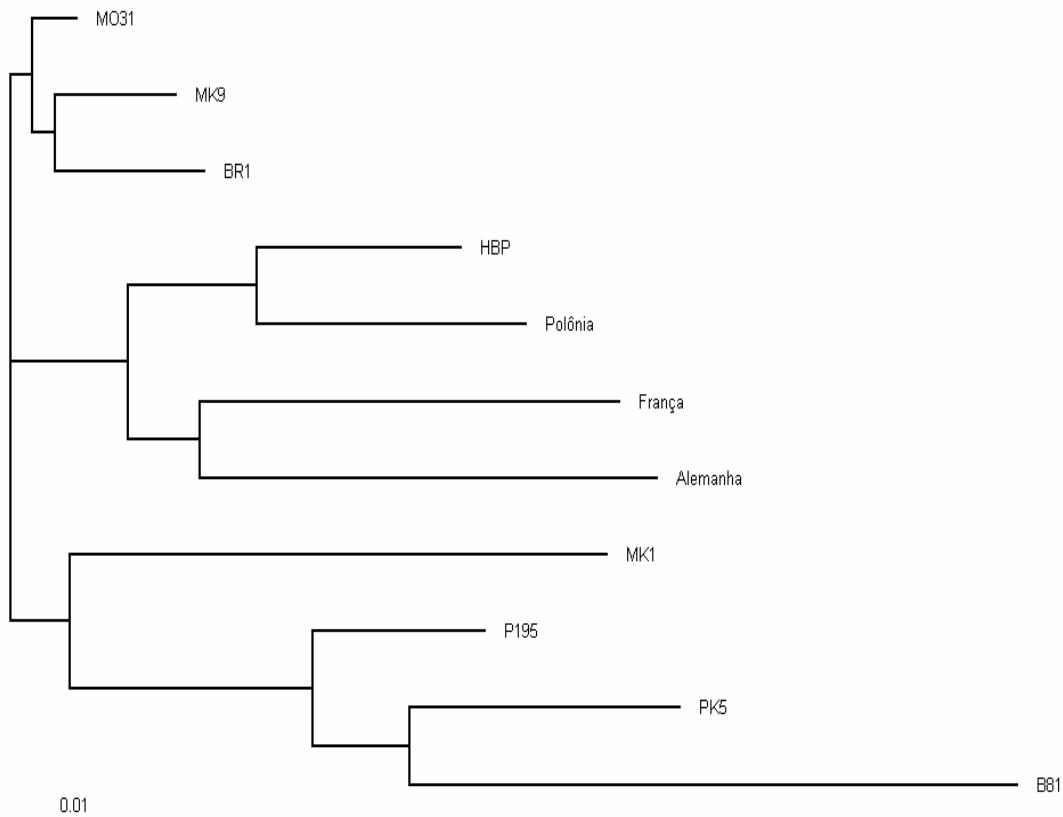


Figura 10. Árvore filogenética gerada pelo alinhamento de 193 aminoácidos deduzidos que correspondentes ao gene da proteína capsidial de 11 isolados de ACLSV. Barra: número de substituições por posição.

## 2.6. CONCLUSÃO

O isolado brasileiro de ACLSV BR1 apresentou maior homologia com o isolado japonês MO-31, e possivelmente seja uma variação deste vírus que anteriormente foi caracterizado no Japão;

## CAPÍTULO 3

### DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UM ISOLADO BRASILEIRO DE *Strawberry mild yellow edge virus*

#### 3.1. RESUMO

*Strawberry mild yellow edge virus* (SMYEV, vírus da clorose marginal do morangueiro) é amplamente distribuído pelo mundo, tendo espécies do gênero *Fragaria* como hospedeiros. SMYEV, geralmente, é latente em cultivares comerciais e reduz o vigor das plantas e a qualidade dos frutos. Os danos ocasionados por este vírus são potencializados em infecções mistas com *Strawberry mottle virus* e *Strawberry crinkle virus*. O objetivo deste trabalho foi a detecção e caracterização biológica e molecular um isolado de SMYEV infectando morangueiro cultivar Camarosa. Nos testes biológicos observou-se a expressão de sintomas nas duas indicadoras utilizadas (UC-5 e UC-10). Pelo teste molecular de RT-PCR foi possível amplificar um fragmento de 271 pb, confirmando a presença de SMYEV na amostra analisada. Na análise da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos observou-se que o isolado brasileiro BR1 apresentou a maior homologia na seqüência de nucleotídeos com os isolados D-74 (Alemanha) e a menor foi observada com os isolados do Chile 2CH, 3CH e 5CH com 88% de homologia na seqüência de nucleotídeos. Na seqüência de aminoácidos deduzidos encontraram-

se homologias em torno de 98,5 e 100% entre os diferentes isolados analisados, comparativamente, com o isolado brasileiro de SMYEV BR1.

Termos de indexação: *Fragaria X ananassa*, SMYEV, nucleotídeos, aminoácidos deduzidos, proteína capsidial, indicadoras, RT-PCR

### 3.2. INTRODUÇÃO

*Strawberry mild yellow edge virus* é um dos mais importantes vírus de morangueiros, sendo amplamente distribuído pelo mundo. Este vírus é membro da família *Flexiviridae* e do gênero *Potexvirus*. O genoma é constituído de RNA de fita simples senso positivo com 5966 nucleotídeos excluindo a cauda poli (A) na extremidade 3'. SMYEV apresenta 6 fases abertas de leitura (ORFs), a primeira codifica a replicase viral, seguida do bloco triplô de genes, associado ao movimento do vírus na planta, pela ORF 5 que codifica a proteína capsidial e pela ORF 6 que codifica uma proteína de 11 kDa (Adams et al., 2004). Uma característica que o distingue dos membros do gênero *Potexvirus* é transmissão de maneira persistente por afídeos do gênero *Chaetosiphon*. Isto sugere a existência de um vírus "helper" na transmissão deste vírus (Martin & Tzanetakis, 2006).

Este vírus causa perda de vigor nas plantas, redução na qualidade de frutos e pode reduzir o produção de frutos em até 30% em infecção simples (Converse et al., 1987; Martin & Tzanetakis, 2006). Os métodos para detecção deste vírus, mais comumente utilizados, envolvem técnicas biológicas, sorológicas e moleculares. No teste biológico utilizam-se indicadoras sensíveis como *Fragaria vesca* L. e *F. virginiana* Mill., os sintomas aparecem cerca de 8 a 10 dias após a inoculação e consistem em epinastia, mosaico, manchas cloróticas, salpicado clorótico e necrose das nervuras (Martin & Tzanetakis, 2006; Silva et al., 2006).

A grande quantidade de metabólitos secundários (taninos, polifenóis e polissacarídeos), presente em morangueiros, confere uma baixa qualidade aos extratos vegetais e de ácidos nucléicos obtidos para fins de amplificação por PCR e síntese de cDNA. Os problemas decorrentes da grande quantidade destes metabólitos não são observados somente na purificação do vírus, mas também nas reações de transcrição reversa e reação de polimerase em cadeia (RT-PCR), conforme observado por Posthuma et al (2000).

Dentro da caracterização molecular, a análise filogenética da proteína capsidial de 23 isolados de SMYEV mostrou a ocorrência de três distintos grupos: I (tipo D74); II (tipo 9Redland) e III (tipo MY18). No grupo I encontra-se a maioria dos isolados caracterizados de SMYEV, sendo formado na sua maioria por isolados europeus e quatro isolados americanos. No Grupo II encontra-se cinco isolados, quatro chilenos e um australiano e, no grupo III contém quatro isolados, três chilenos e um americano (Thompson & Jelkmann, 2004).

O objetivo deste trabalho foi a detecção e caracterização biológica e molecular de um isolado de SMYEV encontrado infectando morangueiro cultivar Camarosa.

### 3.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1. Fonte de vírus e indexação biológica

Coletaram-se plantas de morango das cultivares Camarosa, Oso grande, Dover, Tudla, Aromas, Verão, Burkley, Diamante, Serrana, Comanche, Sweet Charlie e Ventana. Foram coletadas amostras de vários produtores em diferentes municípios e distritos do Rio Grande do Sul. A região de coleta abrangeu locais de plantios comerciais como: São Sebastião do Caí, Feliz, Vacaria, Bom Princípio, Pinto

Bandeira (distrito do município de Bento Gonçalves), Bento Gonçalves (Cnpuv) e Flores da cunha; E também locais de produtores de mudas comerciais como: Farroupilha, Caxias do Sul, São Francisco de Paula e Pelotas.

Estas plantas foram transplantadas para sacos plásticos contendo uma mistura de substrato comercial, terra e palha de arroz, na proporção de (1:2:1), sendo que o pH e a concentração de nutrientes foram corrigidos quando necessário, conforme recomendação para a cultura. As amostras foram mantidas em casa de vegetação em temperatura ambiente. As amostras, indicadoras e plantas indexadas receberam fertilizantes (N, Ca, Zn, K e B) via foliar, a cada 15 dias. Na indexação biológica utilizou-se UC-5 (hibrido complexo de *F. vesca*, *F. chiloensis* Mill. e *F. virginiana*) e a UC-10 (*F. virginiana*). A indexação biológica foi repetida três vezes para cada indicadora, através de enxertia de uma folha de morango da cv. Camarosa na indicadora. A planta indicadora (UC5 ou UC10) foi podada para que ficasse apenas com uma a duas folhas. De uma destas folhas foi removido o folíolo central e o pecíolo foi cortado longitudinalmente (1 – 2cm). Da amostra a ser avaliada foi removido 1 folíolo, cujo base sofreu um corte com bisturi em formato de cunha, e foi inserido na indicadora (Figura 1). Com uma fita adesiva (parafilme) protegeu-se a enxertia, e as plantas enxertadas foram cobertas com sacos plásticos, formando uma câmara úmida por dez dias. Após retirá-las da câmara úmida avaliou-se semanalmente o surgimento de sintomas. Utilizaram-se controle negativo e controles positivos de infecções simples de SMYEV, Strawberry crinkle vírus (SCV) e Strawberry mottle vírus (SMoV), indexados nas indicadoras UC-5 e UC-10.

A cultivar de morango Camarosa coletada em Farroupilha/RS será objeto de maior detalhe no trabalho, visto que apresentava sintomas de deformação foliar, manchas cloróticas e enfezamento, indicando infecção viral.

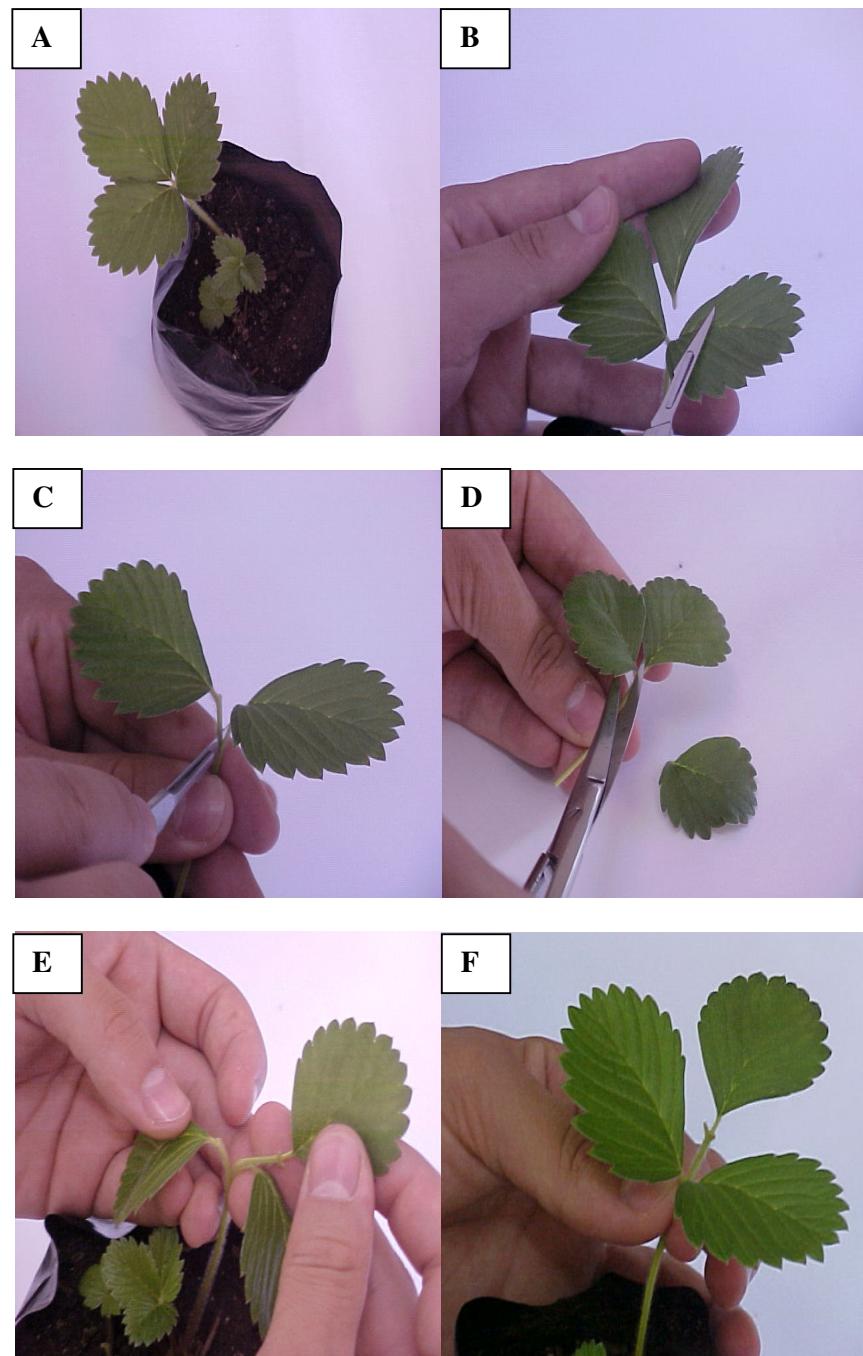


Figura 1. Indexação biológica em morangos. **A.** Indicadora UC-10 após retirada de algumas folhas; **B.** Corte do folíolo central da indicadora; **C.** Corte longitudinal no pecíolo da folha da indicadora; **D.** Retirada dos folíolos laterais da folha a ser analisada e corte do pecíolo em forma de cunha; **E.** Inserção do folíolo da planta suspeita de estar infectada na planta indicadora; **F.** Junção dos tecidos e colocação da fita de enxertia.

### 3.3.2. Extração de ácidos nucléicos totais e reação de RT-PCR

Para extração de ácidos nucléicos totais, foram avaliados três diferentes métodos de extração: o método de extração com sílica (Rott & Jelkmann, 2001), com modificações, no qual se substituiu o tampão de guanidina (4 M tiocianato de guanidina, 0,2 M acetato de sódio pH 5,2, 25 mM EDTA pH 8,0, 1 M acetato de potássio, 2,5% p/v PVP-40) pelo tampão fosfato (0,14M NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, ajustar pH 7,4, 0,05 % v/v Tween 20, 2 % p/v PVP 40, 0,2 % p/v ovalbumina, 0,5 % p/v soro albumina bovina); o método descrito por Thompson et al. (2003), com diferentes diluições do extrato inicial macerado em tampão fosfato e o tampão de guanidina (1:1; 1:2; 1:4; 1:5 e 1:6); e a extração com o Kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Na síntese do DNA complementar, a partir do RNA total, utilizou-se 1µL do iniciador oligo dT (10 µM), 0,7 µL de inibidor de RNase (40 U/µL), 5 µL de RNA total e 5,3 µL de água desionizada e autoclavada. A mistura destes componentes permaneceu por 10 minutos a 70 °C e por 5 minutos em gelo, adicionaram-se, a seguir, 4 µL de tampão da enzima transcriptase reversa (RT) 5X, 2 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de dNTP (2,5 mM), ficando por mais 10 minutos a 37 °C. Adicionou, então, 1 µL da enzima MMLV-RT (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase – 200 U/µL) e toda a mistura permaneceu por 50 minutos a 42 °C e por 10 minutos a 70 °C, em termociclador PTC-100 (MJ Research). A seguir, a 5 µL de cDNA foram acrescidos 5 µL de tampão da Taq polimerase 10X, 1,5 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL de DNA polimerase de *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase) (5 U/ µL), 1 µL de iniciador complementar (10 µM) (5' CATGGCACTCATTGGAGCTGGG 3'), 1 µL de iniciador homólogo (10 µM) (5' GTGTGCTCAATCCAGCCAG 3') (Thompson et al., 2003) e 32 µL de água

desionizada e autoclavada, formando-se assim a reação de PCR. O DNA alvo foi amplificado exponencialmente em termociclador com uma desnaturação inicial (94 °C por 2 minutos) seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 40 segundos e 68 °C por 40 segundos e, uma elongação final a 68 °C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v), com tingimento em brometo de etídio. Como controle da reação de RT-PCR utilizou-se extrato de ácido nucléico total de *Fragaria virginiana* infectada com SMYEV, proveniente da Alemanha.

### 3.3.3. Clonagem e seqüenciamento

O produto da PCR, fragmento amplificado de 271 pb foi ligado ao vetor pCR 2.1 e clonado em *E. coli* (DH10B) conforme recomendação do fabricante do TA Cloning Kit (Invitrogen). Os clones recombinantes foram selecionados, cultivados, digeridos e sequenciados conforme descrito no capítulo II. A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos foi analisada e comparada com as seqüências do banco de dados GenBank, utilizando-se a função BLAST do NCBI. A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, obtida para o isolado BR1 de SMYEV, foi depositada no GenBank, código de acesso EF 143351.

## 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na indexação biológica observaram-se, manchas cloróticas e outras vermelhas e necróticas na extremidade da folha na indicadora UC-10, e mosaico na UC5, enxertadas com folíolo da cv. Camarosa (Figura 2). A expressão dos sintomas ocorreu cerca de 15 dias após a enxertia. Os sintomas observados em UC10 enxertada com a cv. Camarosa, são similares àqueles observados no controle positivo que apresentava infecção simples por SMYEV, proveniente da Alemanha. Entretanto, o sintoma de

mosaico em UC-5 também pode ser induzido por outros vírus como SCV e SMoV. Esta observação confirma relato de Frazier et al. (1987) em que os autores descrevem sintomas similares induzidos por diferentes vírus em *F. vesca* var. *semperflorens* cv. Alpine.

A cultivar Camarosa apresentava, forte expressão de sintomas, como, manchas cloróticas, deformação foliar e enfezamento. Este fato é incomum, visto que, geralmente, SMYEV não induz sintomas perceptíveis em cultivares comerciais, entretanto reduz o vigor das plantas e o rendimento de frutos (Converse et al., 1987; Martin & Tzanetakis, 2006). Cultivares como 'Hood', Puget Beauty' e 'Marshall' são sensíveis a SMYEV e desenvolvem nanismo, clorose marginal, deformação de folhas e frutos. Em infecções complexas, os sintomas são mais severos e causam o declínio de plantas (Martin & Tzanetakis, 2006). Cultivares mais antigas como 'Cascata' e 'Pelotas' e, mais recentes, como 'Camarosa' são mais sensíveis a infecções virais (Nickel et al., 2006). A sensibilidade de algumas cultivares está diretamente relacionada a especificidade entre o patógeno e o hospedeiro, ou seja, interações entre componentes celulares do hospedeiro com o patógeno condicionam a maior suscetibilidade do hospedeiro e expressão de sintomas.

Os sintomas observados em 'Camarosa' (Figura 3) indicam a presença de mais de um vírus, porém não foi possível identificá-los pelo teste biológico, pois o sintoma observado (mosaico) em controles positivos na indicadora UC-5 foram os mesmos para SMYEV, SMoV e SCV.

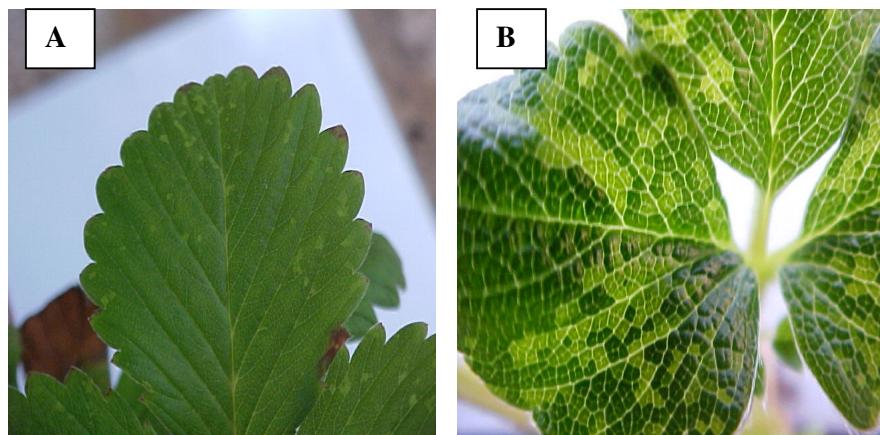


Figura 2. Sintomas observados na indexação biológica. **A.** Manchas cloróticas e manchas vermelhas e necróticas na extremidade da folha, característico de SMYEV na indicadora UC-10 inoculada com a cv. Camarosa; **B.** Mosaico em UC-5 inoculada com a cv. Camarosa.



Figura 3. Deformação foliar, manchas cloróticas e enfezamento observados na cultivar Camarosa, possivelmente ocasionado por infecção complexa.

Dentre os métodos de extração de ácidos nucléicos totais testados, o método descrito por Thompson et al. (2003), foi o único que apresentou resultados consistentes, sendo que a diluição dos tampões utilizada pelos autores foi modificada, obtendo-se assim uma preparação de RNA total de melhor qualidade. Nas diferentes diluições testadas observou-se que a adição de 200 µL de tampão de guanidina em 100 µL do extrato inicial (tampão fosfato + extrato vegetal) (1:2 v/v) propiciou os melhores resultados na amplificação de SMYEV. Com esta diluição reduz-se, a quantidade de ácidos nucléicos totais e principalmente os inibidores (polifenóis, polissacarídeos, taninos) que interferem na purificação do vírus e nas reações de RT-

PCR. A diluição de 1:4 v/v foi a que propiciou melhores resultados na amplificação de SMYEV, SMoV, SCV e Strawberry vein banding virus no trabalho realizado por Thompson et al. (2003). Entretanto, neste trabalho, com a diluição 1:2 v/v foi possível detectar SMYEV na cv. Camarosa por meio de RT-PCR, amplificando-se um fragmento de 271 pb (Figura 4). SMoV e SCV presentes em controles positivos não foram amplificados nas diferentes diluições testadas. As dificuldades na obtenção de um bom extrato de RNA total e também na inconsistência das reações de RT-PCR atribuem-se a grande quantidade de inibidores como polifenois, polissacarídeos e taninos em morangueiros (Posthuma et al., 2000).

As seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do terminal 3' do gene da proteína capsidial, além da parte da seqüência não traduzida após este gene, de um isolado de SMYEV foi obtida a partir de um clone seqüenciado (Figura 5). As informações referentes ao isolado caracterizado de SMYEV e outros 25 isolados de SMYEV, disponíveis no GenBank, são apresentados na Tabela 1. Pela análise de homologia das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos pôde-se observar que o isolado BR1 apresentou maior homologia (92%) de nucleotídeos com o isolado alemão (D74) e 100% de homologia de aminoácidos deduzidos com a maioria dos isolados analisados. A menor homologia de nucleotídeos foi observada com os isolados chilenos 2CH, 3CH e 5CH, comparativamente, com o isolado BR1 de SMYEV. A homologia de aminoácidos deduzidos foi entre 98,5 e 100%, sendo que apenas sete isolados (2CH, 3CH, 5CH, MY-18, D/L.19,1182-53F e D/K159) apresentaram 98% de homologia quando comparados com o isolado BR1 de SMYEV.

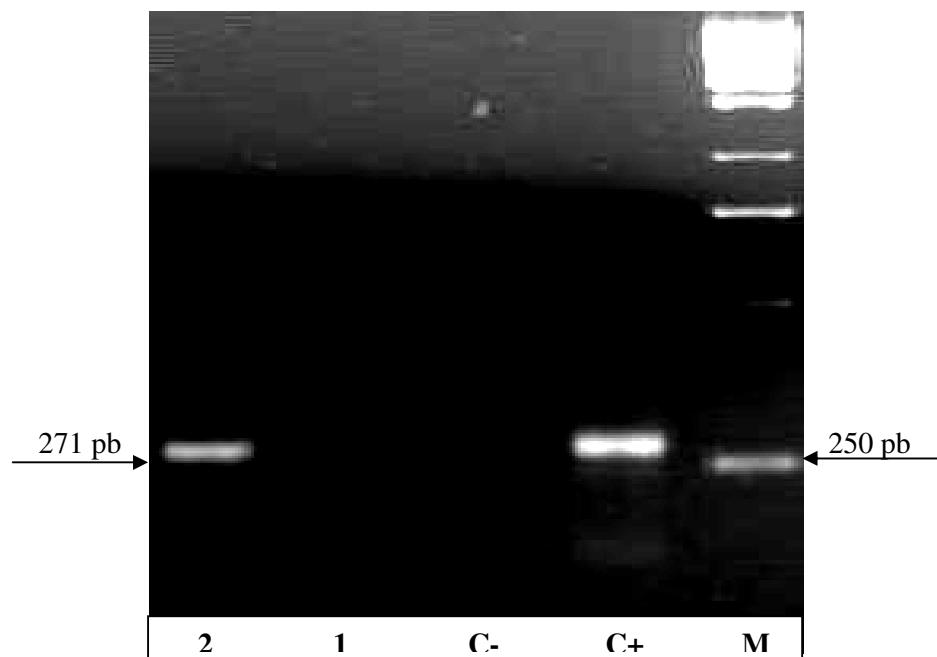


Figura 4. Análise de produtos da RT-PCR de SMYEV por eletroforese em gel de agarose (1,2%) tingido com brometo de etídeo. M. Marcador molecular (1 Kb DNA Ladder, Fermentas); C+. Controle positivo; C-. Controle negativo; 1. amostra sadia; 2. amostra proveniente da cultivar Camarosa.

```

gtgctcaatccagccagccaggcgggtcgccctgtggcgccagcccacaccgcaggagatt
V L N P A S Q Q V A L W R Q P T P Q E I
tacgcttcagccacgcacaaggatgttagctacttatcgctgcgcagtaaggcgcacgac
Y A S A T H K D V A T Y R A A S K A H D
cgcatttcaattctacgctcctgactaaaggagctagtagatcaaccccgccgcctt
R I S N S T L L T K G A S R S T P P A L
ctggccggggcccgacgcttaacgtgggtcgattaggctaaatggagtttcttctcac
L P G P D A *
ttcttctaccctacgctccaaatgagtaagccga

```

Figura 5. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do terminal 3' (5639 nt ao 5910 nt) do gene da proteína capsidial e parte não traduzível de um isolado brasileiro BR1 de SMYEV. O asterisco no final da seqüência indica o códon de terminação.

Tabela 1. Isolado, origem, código de acesso e porcentagem de homologia de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) entre o isolado brasileiro BR1 e os outros isolados de SMYEV disponíveis no Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Isolado	Origem	Código de acesso	Homologia de nt com BR1	Homologia de aa com BR1
BR1	Brasil	EF143351	-	-
D74	Alemanha	AJ577359	92	100
1CH	Chile	AJ577337	91	100
69N	Bélgica	AJ577350	91	100
WSU1988	EUA	AJ577358	91	100
IndukaA	República Checa	AJ577356	91	100
D/V.180	Alemanha	AJ577354	91	100
D/M.110	Alemanha	AJ577352	91	100
314CP2cav	Itália	AJ577351	91	100
D/L.14	Alemanha	AJ577348	91	100
D/K159	Alemanha	AJ577353	89	98,5
IndukaB	República Checa	AJ577357	90	100
1182-53F	EUA	AJ577355	90	98,5
D/L.19	Alemanha	AJ577349	90	98,5
D/L.9	Alemanha	AJ577344	90	100
Sy01	China	AY955375	90	100
D/L13	Alemanha	AJ577347	90	100
6CH	Chile	AJ577342	89	100
4CH	Chile	AJ577340	89	100
3CH	Chile	AJ577339	88	98,5
10CH	Chile	AJ577346	89	100
7CH	Chile	AJ577343	89	100
MY-18	EUA	D12515	89	98,5
5CH	Chile	AJ577341	88	98,5
2CH	Chile	AJ577338	88	98,5
9Redland	Austrália	AJ577345	89	100

Nas Figuras 6 e 7 são apresentados os alinhamentos dos nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, respectivamente, do terminal 3' do gene da proteína capsidial e parte da região não traduzível após o gene da proteína capsidial de diferentes isolados de SMYEV juntamente com o isolado BR1 caracterizado neste trabalho. O fragmento amplificado foi de 271 pb, entretanto, o alinhamento foi feito com 264 nucleotídeos, pois os isolados analisados apresentavam a seqüência de nucleotídeos até este ponto.

BR1	*	20	*	40	*	60	*	80	
D74		.G..G.			.G..	.C..T.	.G..C..		82
1CH		G							
69N									
IndukaA			G			G			
WSU1988								T	
D/V.180				A			G		
D/M.110				A			G		
314CP2cav									
D/L.14				A			G		
D/K.159				A			G		
IndukaB			G			G..G			
1182-53F			T	C			C		
D/L.19			T						
D/L.9								A	
sy01								T	A
D/L.13									
6CH			G	T			G..A		A
4CH			G	T			G..A		A
3CH			G	TC..G..T	T	C..T..G..	C	T..G..	
10CH			G	T			G..A	T	A
7CH			G	T			A		A
MY-18			G	C..G..T	T	C..C..G		G	
5CH			G	TC..G..T	T	C..C..G		T..G	
2CH			G	TC..G..T	T	C..C..G		T..G	
9Redland			G	T	A		G..A		A
consenso									
									GTGCTCAATCCAGGCCAACAGTCGCCCCGTGCGGCCAGCCCACACCGCAAGAGATTATGCCTCAGCCACCCATAAGG
	*	100	*	120	*	140	*	160	
BR1		T..T			A..T				164
D74		T							
1CH		T							
69N		T							
IndukaA		C..T							
WSU1988		T..G							
D/V.180									
D/M.110									
314CP2cav		C..T							
D/L.14									
D/K.159									
IndukaB		C..T							
1182-53F		T							
D/L.19									
D/L.9									
sy01			T						
D/L.13				T..C					
6CH		C		C..A			A		
4CH		C		C..A			A		
3CH			C..T	A..T..T			A..T		
10CH		C		C..A			A		
7CH		C		C..A			A		
MY-18			C..T	A..T..T			A		
5CH			C..T	A..T..T			A..T		

2CH	.....C..T.....A..T..T.....A.....T.....
9Redland	.....C.....T.....A.....A.....C.....
consenso	ATGTAGCTACTTACCGTGCAGCCAGTAAGGCGCACGACCGCATTCCAATTCCACGCTCTGACTAAAGGAGCTAGTAGATC
BR1	* 180 A..C.....C..CT..GC.....G.....C.....G.GG..C.....
D74	.....G.....
1CH	.....C.....
69N	.....
IndukaA	.....
WSU1988	.....C.....
D/V.180	.....
D/M.110	.....
314CP2cav	.....
D/L.14	.....
D/K.159	.....CT.....CT.....C.....C.T..
IndukaB	.....
1182-53F	.....T.....
D/L.19	.....
D/L.9	.....
sy01	.....C.....G.....
D/L.13	.....
6CH	.....A.....T..T.....
4CH	.....A.....T..T.....
3CH	.....T.....C.....T.....G.....A.....A.....
10CH	.....A.....T..T.....
7CH	.....A.....T..T.....
MY-18	.....T.....C.....CT.....G.....A.....A.....
5CH	.....T.....C.....CT.....G.....A.....A.....
2CH	.....T.....C.....CT.A..G.....A.....A.....
9Redland	.....A.....T..T.....G.....C.....
consenso	CACGCCGCCTGCGCTTATGCCAGGCCCGATGCTAACATCCGTGGATTAGGCTTAAATGGGAGTTCTTCTCACTCTTC
BR1	* 260 .....
D74	.....
1CH	.....
69N	.....
IndukaA	.....
WSU1988	.....
D/V.180	.....
D/M.110	.....
314CP2cav	.....
D/L.14	.....
D/K.159	.....
IndukaB	.....
1182-53F	.....
D/L.19	.....
D/L.9	.....
sy01	.....
D/L.13	.....
6CH	.....
4CH	.....
3CH	.....
10CH	.....
7CH	.....
MY-18	.....
5CH	.....
2CH	.....
9Redland	.....
consenso	TTCTACCCAGCTCCAATGAGT

Figura 6. Alinhamento obtido pelo programa ClustalX (Thompson et al., 1997), entre seqüências parciais de nucleotídeos do gene da proteína capsidial e parte não traduzível na extremidade 3'de SMYEV, do isolado BR1 e outros 25 disponíveis no GenBank.

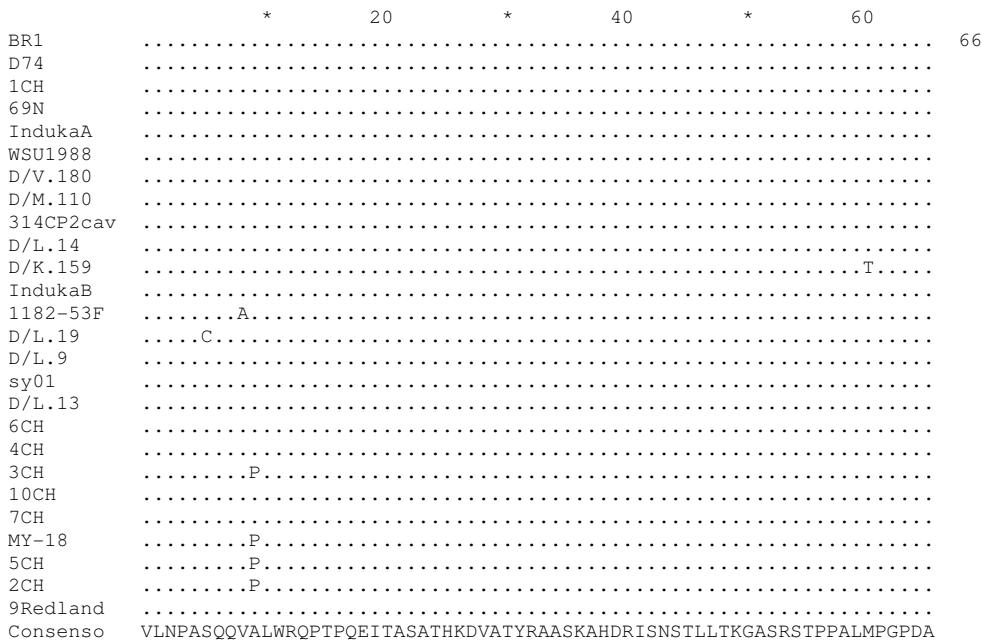


Figura 7. Alinhamento, obtido pelo programa ClustalX, entre seqüências de aminoácidos deduzidos do terminal 3' do gene da proteína capsidial de SMYEV, do isolado Br1 e outros 25 disponíveis no GenBank.

As árvores filogenéticas (dendogramas) obtidas a partir dos alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos dos diferentes isolados de SMYEV são apresentadas nas Figuras 8 e 9. Thompson & Jelkmann (2004), em estudo de análise filogenética da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial, observaram a formação de três grupos distintos entre diferentes isolados de SMYEV. Os três grupos definidos por estes autores foram: grupo I (representado pelo isolado D74); grupo II (representado pelo isolado 9Redland); e grupo III (representado pelo isolado MY18). Com base nos resultados de análise filogenética de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos, o isolado brasileiro BR1 está mais próximo dos grupos I e II. Uma análise filogenética mais consistente poderia ser obtida com a clonagem e sequenciamento de todo o gene da proteína capsidial do isolado BR1 de SMYEV, visto que, o fragmento seqüenciado apresenta apenas 27% (198 nt) do total de nucleotídeos da proteína capsidial (726 nt).

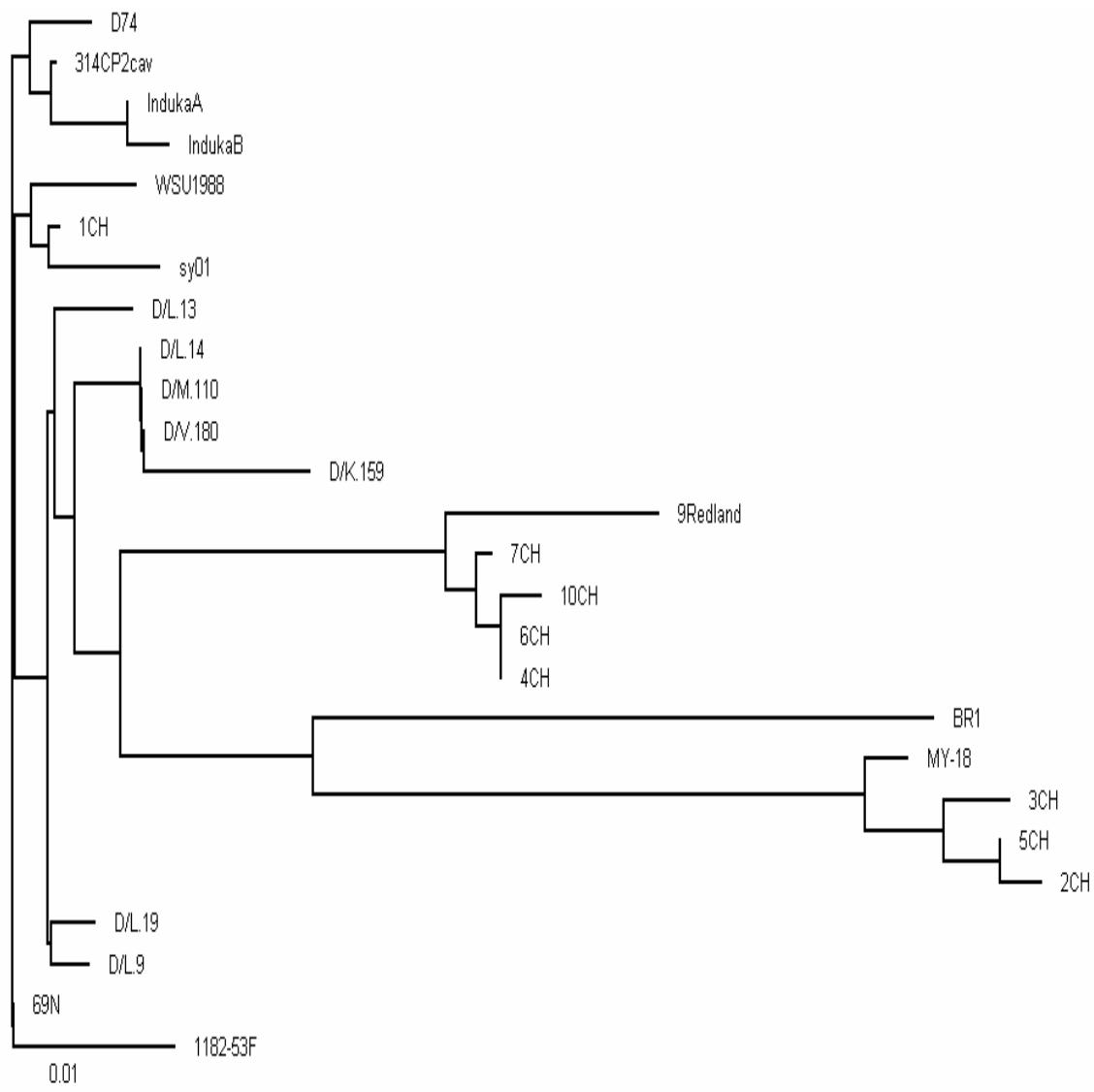


Figura 8. Árvore filogenética (dendrograma) obtida a partir do alinhamento de 264 nucleotídeos correspondentes ao terminal 3' do gene da proteína capsidial e parte da região 3' não traduzida de SMYEV. Barra: número de substituições por posição.

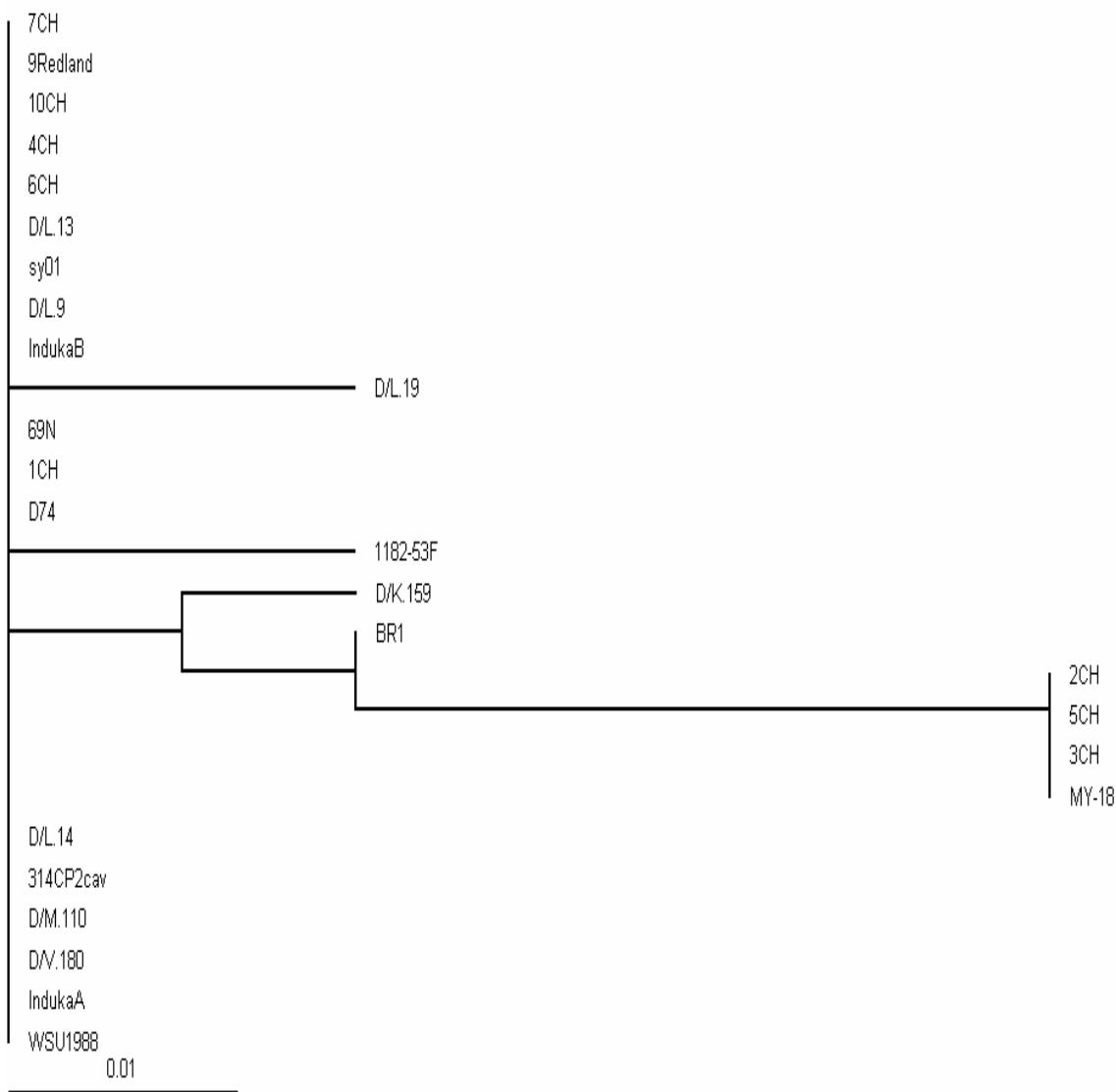


Figura 9. Árvore filogenética (dendrograma) obtido a partir do alinhamento de aminoácidos deduzidos (66 aa) correspondentes ao terminal 3' do gene da proteína capsidial de SMYEV. Barra: número de substituições por posição.

### 3.5. CONCLUSÕES

As indicadoras UC-5 e UC-10 permitem a constatação de que determinada planta está infectada por vírus, mas, geralmente, não permitem a identificação inequívoca de espécies virais;

Os protocolos de extração de ácidos nucléicos totais e RT-PCR utilizados proporcionaram a detecção molecular de SMYEV no morangueiro cv. Camarosa, entretanto não foram funcionais para SCV e SMoV;

Os protocolos de diagnóstico por RT-PCR devem ser ajustados, especialmente para SCV e SMoV;

O Isolado BR1 de SMYEV está próximo dos isolados pertencentes aos grupos I e II.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G. & Fauquet, C.M. The new plant viruses family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149:1045-1060. 2004.

Antunes, L.E.C. Situação da produção integrada de morango (PIMo) no Brasil. In: III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro sobre pequenas frutas nativas do Mercosul. Pelotas/RS. Palestras. p.101-104. 2006.

Antunes, L.E.C. & Duarte Filho, J. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 5, Versão eletrônica, novembro, 2005.

Bleicher, J. História da macieira. In: EPAGRI (Ed.) A cultura da macieira. Florianópolis. p. 29-36. 2002.

Boneti, J.I. da S., Cesa, J.D., Petri, J.L. & Bleicher, J. Evolução da cultura da macieira. In: EPAGRI (Ed.) A cultura da macieira. Florianópolis. p. 37-57. 2002.

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.

Carvalho, A.M.B. & Costa A.S. Ocorrência do vírus do mosqueado do morangueiro no estado de São Paulo. *Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo*. Campinas. Vol. 20, nº 19. p.563-578. 1961

Cieslinska, M., Malinowski, T. & Zawadzka, B.J. Studies on several strains of Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) isolated from different fruit tree species. *Acta Horticulturae* 386: 63-71. 1995.

Converse, R.H., Martin, R.R. & Spiegel, S. Strawberry mild yellow edge virus. *USDA Agricultural Handbook. Virus Disease of Small Fruits*. p.25-29. 1987

Cropley, R. Comparison of some apple latent viruses. Annual Application Biology. 61: 361-422. 1968.

Daniels, J. & Assis, M. Reinfecção de morangueiros por virus no município de Pelotas-RS. Embrapa – UEPAE de Cascata. Comunicado Técnico 36: 5p. 1983

Desvignes, J.C. & Boyé, R. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruit trees. Acta Horticulturae 235: 31-38. 1989.

Frazier, N.W., Sylvester, E.S. & Richardson, R. Strawberry crinkle. In: Converse, R.H. (ed.) Virus Disease of Small Fruits. USDA, ARS, Agricultural Handbook 631:20-25. 1987.

Fridlund, P.R. Temperature effects on virus disease symptoms in some *Prunus*, *Malus* and *Pyrus* cultivars. Washington Agricultural Experiment Station Bulletin. 726: 6p. 1970.

German, S., Candresse, T., Lanneau, M., Huet, J.C., Pernollet, J.C. & Dunez, J. Nucleotide sequence and genomic organization of Apple chlorotic leaf spot closterovirus. Virology 179: 104-112. 1990.

Goppo, G.A., Tessarioli Neto, J. & Blanco, M.C.S.G. A cultura do morangueiro. Campinas: CATI, 27p. 1997. (CATI. Boletim Técnico, 201).

Groppi, G.A. & Tessarioli Neto, J. A cultura do morangueiro. Campinas: CATI, 16p. 1991. (CATI. Boletim Técnico, 201).

Hansen, A.J. & Lane, W.D. Elimination of Apple chlorotic leaf spot virus from apple shoot cultures by ribavirin. Plant Disease 69: 134-135. 1985.

Hollings, M. Disease control through virus-free stock. Annual Revision Phytopathology 3: 367-396. 1965.

Howell, W.E., Mink, G.I., Hurt, S.S., Foster, J.A. & Postman, J.D. Select *Malus* Clones for Rapid detection of Apple stem grooving virus. Plant Disease 80: 1200-1202. 1996.

Instituto Cepa. Florianópolis, Secretaria do Estado do desenvolvimento Rural e da Agricultura de Santa Catarina. Disponível em <<http://www.icepa.com.br>>. Acesso em 16/01/2007.

James, D., Trytten, P.A., Mackenzie, D.J., Towers, G.H.N. & French, C.J. Elimination of Apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. Annual Application Biology. 131:459-470. 1997.

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 75:1535-1542. 1994.

Kinard, G.R., Scott, S.W. & Barnett, O.W. Detection of apple chlorotic leaf spot and apple stem grooving viruses using RT-PCR. Plant Disease 80: 616-621. 1996.

Koganezawa, H. & Yanase, H. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74: 610-614. 1990.

Lémoine, J. Les maladies de dégénérescence. *L' Arboriculture fruitière* 434: 38-47. 1990.

Leone, G., Lindner, J.L., Jongedijk, G. & Van Der Meer, F.A. Back transmission of a virus associated with apple stem pitting and pear vein yellows, from *Nicotiana occidentalis* to apple and pear indicators. *Acta Horticulturae* 386: 72-77. 1995.

Lessa, A.O., Castro, L.A.S. & Daniels, J. Ocorrência do vírus da mancha clorótica das folhas na macieira em pomares de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 23 (4): 505. 1998.

Lister, R.M. & Bar-Joseph, M. Closteroviroses. In: *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Kurstak, Ed., Elsevier: 809-844. 1981.

Luchi, V.L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI (Ed.) *A cultura da macieira*. Florianópolis. 59-104. 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* 87: 389-396. 1997.

Martin, R.R. & Tzanetakis, I.E. Characterization and Recent Advances in detection of Strawberry Viruses. *Plant Disease*: 90(4): 384-396. 2006.

Martin, R.R. & Converse, R.H. An Improved buffer for mechanical transmission of viruses from *Fragaria* and *Rubus*. *Acta Horticulturae* 129: 69-74. 1982.

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* 99: 81-92. 2002.

Miller, P.W. & Belkegren, O. Elimination of Yellow Edge, Crinkle and veinbanding Viruses and certain Other Virus Complexes From Strawberries by Excision and Culturing of Apical Meristems. *Plant Disease Reporter* 47(4): 298-300. 1963.

Mink, G.I., Shay, J.R., Gilmer, R.M. & Stouffer, R.F. Latent viruses in apple II. Symptoms in woody indicators and strain variation. N. Y. Agricultural Experiment Station Search Agricultural 1: 9-15. 1971.

Mullin, R.H., Smith, S.H., Frazier, N.W., Schlegel, D.E. Mcall, R. Meristem Culture Frees Strawberries of Mild Yellow Edge, Pallidosis, and Mottle Diseases. *Phytopathology* 64: 1425-1429. 1974.

Nemchinov, L., Hadidi, A., Candresse, T., Foster, J.A. & Verderevskaya, T. Sensitive detection of apple chlorotic leaf spot virus from infected apple or peach tissue using RT-PCR, IC-RT-PCR, or multiplex. *Acta Horticulturae* 386: 51-62. 1995.

Nickel, O., Fajardo, T.V.M. & Silva, F.N. Vírus de morangos: novos e velhos desafios. *Jornal da Fruta* 176: 20-21. 2006.

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* 26: 655-659. 2001.

Nickel, O., Jelkmann, W. & Kuhn. G.B. Ocurrence of apple stem grooving capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. *Fitopatologia Brasileira* 24 (3): 444-446. 1999.

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* 386: 100-108. 1995.

Pasquini, G., Faggioli, F., Pilotti, M., Lumia, V. & Barba, M. Characterization of apple chlorotic leaf spot virus isolates from Italy. *Acta Horticulturae* 472: 195-202. 1998.

Paunovic, S., Maksimovic, V., Rankovic, M. & Radovic, S. Characterization of a virus associated with Pear Stony Pit in cv. Wurttemberg. *Phytopathology* 147: 695-700. 1999.

Paunovic, S. & Rankovic, M. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. *Acta Horticulturae* 472: 125-133. 1998.

Posthuma, K.I., Hong, Y. G. & Adams, A.N., Molecular detection of *Strawberry crinkle virus*. *Acta Horticulturae* 551: 75-79. 2000.

Radaelli, P., Nickel, O., Schons, J., Aragão, F.J.L. & Fajardo, T.V.M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. *Fitopatologia Brasileira* 31: 657-662. 2006.

Radin, B. Implicações do uso de estufa no cultivo do morango. In: III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro sobre pequenas frutas nativas do Mercosul. Pelotas/RS. Palestras. p.105-112. 2006.

Ramel, M.E., Gugerli, P., Saugy, R., Crausaz, P.H. & Brugger, J.J. Contrôle virologique du pommier et du poirier par indexage rapide en serre et isolement des agents des principales viroses. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 30: 13-21. 1998.

Romano, E. & Monte, D. Métodos não convencionais de resistência a vírus. In: Torres A.C., Buso J.A.. (Org.). Técnicas de Células e Cultura de Tecidos Vegetais. 2 ed. Brasília-DF: SPI, 783-804. 1999.

Rott, M. E. & Jelkmann, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *Europe Journal Plant Pathology*. 107, 411-420. 2001.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Second edition. New York. Cold Spring harbor Laboratory Press. 1989.

Silva, F.N., Nickel, O., Sinski, I., Bogo, A., Fajardo, T.V.M. & Bernardi, J. Ocorrência de Vírus em Morangos no Rio Grande do Sul: Detecção Biológica e Molecular. III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro sobre pequenas frutas nativas do Mercosul. Pelotas/RS. p.279-284. 2006.

Stouffer, R.F. & Fridlund, P.R. Indexing using wood indicators. In: Fridlund, P.R. (Ed.). Virus and virus-like disease of pome fruits and simulating noninfectious disorders. Washington:Washington State Cooperative Extension, 1989. p. 255-264.

Thompson, J.R. & Jelkmann, W. Variation in the coat protein of *Strawberry mild yellow edge virus* and the complete sequence of aphid transmissible strain D74. Acta Horticulturae 656: 57-62. 2004.

Thompson, J.R., Wetzel, S., Klerks, M.M., Vascová, D., Schoen, C.D.; Spak, J. & Jelkmann, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. In combination with a plant mRNA specific internal control. Journal of Virological Methods 111:85 – 93. 2003.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24:4876-4882. 1997

Van der Meer, F.A. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. Acta Horticulturae 193: 73-74. 1986.

Vine, S. Improved culture of apical tissues for production of virus-free strawberries. Journal. Horticulturae Science 43:293-297. 1968.

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 130: 117-122. 1983.

Yanase, H. Studies on apple latent viruses in Japan. Bulletin Fruit Tree Research. Station. (Japan), Series C1:47-109. 1974.

Yoshikawa, N. & Takahashi, T. Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. Journal of General Virology 69: 241-245. 1988.