

12 DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS

Osmar Nickel

INTRODUÇÃO

Com cerca de 30 anos de idade, ocupando uma área aproximada de 30 mil hectares, em quatro Estados da União (RS, SC, PR e SP) a pomicultura brasileira se depara com questões de sanidade do material propagativo muito similares àquelas já enfrentadas pelos países tradicionais produtores de maçãs.

Embora programas europeus e norte-americanos de limpeza clonal tenham sido iniciados em meados dos anos 50, ainda nos anos 80, a contaminação com vírus e doenças similares em pomares e viveiros de maçã podia chegar até 60% dos clones amostrados. Isto dá uma idéia do caráter de longa duração de um programa até a eliminação total de vírus e similares e da necessidade de permanente monitoramento.

Assim, não surpreende que o material propagativo utilizado na implantação dos primeiros pomares brasileiros estivesse altamente contaminado e que até mesmo introduções recentes dos Estados Unidos, da Europa e do Japão ainda contenham vírus.

Os vírus são agentes patogênicos que se encontram, segundo definição consensual, *além da fronteira que delimita e agrupa os seres vivos*; afetam o desenvolvimento das plantas, interferindo de forma parasítica no metabolismo vegetal.

Cerca de 30 doenças de macieiras são causadas por vírus, viróides e agentes similares e, segundo a virulência do isolado viral, a suscetibilidade do tecido afetado e

as condições ambientais, podem manifestar-se em folhas, flores, frutos, na casca e na madeira de troncos e em galhos estruturais, ramos e raízes.

A título de simplificação da abordagem, far-se-á distinção entre dois grupos de vírus em macieiras: aqueles que produzem sintomas reconhecíveis visualmente nas variedades comerciais e os chamados vírus latentes que exigem a indexagem (enxertia em plantas indicadoras lenhosas e inoculação mecânica em plantas herbáceas, e testes serológicos e moleculares) para sua detecção. No primeiro grupo incluem-se a depressão-do-lenho (*"Flat Limb"*), ruga-verde (*"Green crinkle"*), rachadura-estrela (*"Star crack"*) e o lenho-mole (*"Apple rubbery wood"*), de natureza ainda desconhecida, o vírus-do-mosaico-da-macieira (*"Apple mosaic virus"*, ApMV), e casca-áspera (*"Apple rough skin"*). Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis na maioria das cultivares comerciais, os vírus latentes podem passar despercebidos e ser propagados indefinidamente. Incluem-se neste grupo: vírus-do-acanalamento-do-tronco-da-macieira (*"Apple stem grooving virus"*, ASGV), vírus-das-caneluras-do-tronco-da-macieira (*"Apple stem pitting virus"*, ASPV), e o vírus da mancha clorótica da folha da macieira (*"Apple chlorotic leafspot virus"*, ACLSV). Embora haja controversia, existem evidências experimentais de que o sintoma epinastia e declínio do Spy (*Spy epinasty and decline*, SED) possa ser causado por ASPV, razão porque o mesmo, a título

12 DOENÇAS CAUSADAS POR VÍRUS

Osmar Nickel

INTRODUÇÃO

Com cerca de 30 anos de idade, ocupando uma área aproximada de 30 mil hectares, em quatro Estados da União (RS, SC, PR e SP) a pomicultura brasileira se depara com questões de sanidade do material propagativo muito similares àquelas já enfrentadas pelos países tradicionais produtores de maçãs.

Embora programas europeus e norte-americanos de limpeza clonal tenham sido iniciados em meados dos anos 50, ainda nos anos 80, a contaminação com vírus e doenças similares em pomares e viveiros de maçã podia chegar até 60% dos clones amostrados. Isto dá uma idéia do caráter de longa duração de um programa até a eliminação total de vírus e similares e da necessidade de permanente monitoramento.

Assim, não surpreende que o material propagativo utilizado na implantação dos primeiros pomares brasileiros estivesse altamente contaminado e que até mesmo introduções recentes dos Estados Unidos, da Europa e do Japão ainda contenham vírus.

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

Cerca de 30 doenças de macieiras são causadas por vírus, viróides e agentes similares e, segundo a virulência do isolado viral, a suscetibilidade do tecido afetado e

as condições ambientais, podem manifestar-se em folhas, flores, frutos, na casca e na madeira de troncos e em galhos estruturais, ramos e raízes.

A título de simplificação da abordagem, far-se-á distinção entre dois grupos de vírus em macieiras: aqueles que produzem sintomas reconhecíveis visualmente nas variedades comerciais e os chamados vírus latentes que exigem a indexagem (enxertia em plantas indicadoras lenhosas e inoculação mecânica em plantas herbáceas, e testes serológicos e moleculares) para sua detecção. No primeiro grupo incluem-se a depressão-do-lenho (“*Flat Limb*”), ruga-verde (“*Green crinkle*”), rachadura-estrela (“*Star crack*”) e o lenho-mole (“*Apple rubbery wood*”), de natureza ainda desconhecida, o vírus-do-mosaico-da-macieira (“*Apple mosaic virus*”, ApMV), e casca-áspera (“*Apple rough skin*”). Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis na maioria das cultivares comerciais, os vírus latentes podem passar despercebidos e ser propagados indefinidamente. Incluem-se neste grupo: vírus-do-acanalamento-do-tronco-da-macieira (“*Apple stem grooving virus*”, ASGV), vírus-das-caneluras-do-tronco-da-macieira (“*Apple stem pitting virus*”, ASPV), e o vírus da mancha clorótica da folha da macieira (“*Apple chlorotic leafspot virus*”, ACLSV). Embora haja controversia, existem evidências experimentais de que o sintoma epinastia e declínio do Spy (*Spy epinasty and decline*, SED) possa ser causado por ASPV, razão porque o mesmo, a título

de simplificação, é abordado neste contexto, como sintoma de ASPV.

Há farta documentação científica sobre os efeitos negativos de vírus em macieiras. Entre os danos causados por infecções virais, destacam-se:

- Danos em mudas — redução do pegamento de enxertias de material infectado, vigor reduzido das mudas, cancos nos porta-enxertos sensíveis e declínio da planta no viveiro ou após a implantação do pomar.

- Redução de produção de frutas — pode variar de 16% a 84% segundo a variedade de maçã e do isolado viral ou da mistura dos vírus.

- Redução no crescimento das plantas — redução do calibre dos frutos, do tamanho e do vigor das plantas, do diâmetro do tronco, do comprimento dos ramos laterais e da brotação.

- Aumento da suscetibilidade a infecções por fungos — plantas infectadas são mais sensíveis à ocorrência de podridões foliares e radiculares, cancos e pragas o que torna necessário o aumento do uso de agrotóxicos.

- Redução da capacidade de aproveitamento de fertilizantes — plantas livres de vírus crescem satisfatoriamente com doses menores de fertilizantes, reduzindo o impacto ambiental e o custo de produção.

- Redução da armazenabilidade das frutas.

- Aumento da sensibilidade a geadas tardias pela indução de floração precoce de plantas infectadas.

VÍRUS LATENTES

Vírus-da-mancha-clorótica-foliar-da-macieira (ACLSV)

O ACLSV é um vírus latente amplamente difundido em macieiras em todo o mundo; afeta também a pêra, *Prunus* spp., outras espécies de rosáceas frutíferas

e ornamentais além de espécies de outros gêneros. Sua relevância econômica, em virtude do elevado potencial de destruição, é grande, mas variável segundo a estirpe viral e a cultivar contaminada. Em média, a produção de plantas infectadas é reduzida em cerca de 10% a 20%. Embora considerado um vírus relativamente pouco importante por causa da tolerância observada nos principais porta-enxertos comerciais, adquiriu destaque em algumas regiões pomicultoras brasileiras com o incremento significativo do uso do porta-enxerto Maruka-kaido, altamente sensível, resultando em declínio de plantas adultas em consequência de severas caneluras na madeira e necrose interna da casca do porta-enxerto (Fig.1). É comum observar-se depósitos de resíduos da casca necrosada nas caneluras.



Fig. 1. Caneluras (C) na madeira e necrose interna (N) da casca do porta-enxerto Maruba-kaido causadas por ACLSV. Notar que os sintomas não atingem a copa da cv. Fuji (São Joaquim, SC).

ACLSV transformou-se em problema em razão do uso de porta-enxertos clonais infectados e, na ausência de matrizes livres de vírus, pela utilização indiscriminada de plantas de pomares, infectadas, não-indexadas, como matrizes de material propagativo (borbulheiras).

Levantamentos em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul revelam que ACLSV ocorre de forma latente com frequência nos porta-enxertos das séries M e MM.

Vírus do acanalamento do tronco da macieira (ASGV)

ASGV ocorre em todas as regiões do mundo onde se planta maçã. O vírus infecta um espectro considerável de hospedeiros, incluindo a maioria das variedades comerciais de *Malus domestica* sem produzir nestas, reações perceptíveis visualmente. Estima-se que 75% do material proveniente do Japão contenha ASGV, que causa, em média, uma redução da produção de cerca de 15%.

No Brasil, ASGV foi diagnosticado em 1997 em Santa Catarina como causa de declínio e morte generalizada de plantas de viveiro, nas cvs. Fuji, Royal Gala, Belgolden, Braeburn e outras, enxertadas no porta-enxerto sensível Maruba-kaido (*M. prunifolia* var. *ringo*), nas quais se observam necrose (cancro) e destruição total da casca do porta-enxerto (Fig.2), declínio e morte de mudas.

Alguns isolados de ASGV não produzem sintomas em espécies de *Malus* normalmente sensíveis. Na indicadora Virginia Crab o ASGV produz uma clássica necrose na união de enxertia e provoca o inchamento da base do ramo da indicadora (Fig. 3).

Vírus-das-caneluras-do-tronco-da-macieira (ASPV)

O vírus das caneluras do tronco da macieira ocorre em todas as regiões pomicultoras do mundo, freqüentemente em combinação com ACLSV e epinastia e declínio do Spy 227. O vírus é latente na maioria das cultivares comerciais e não causa sintomas perceptíveis, exceto o efeito sobre crescimento e a produção, a qual pode ser reduzida em cerca de 10% a 20%. A epinastia e declínio de Spy (SED) é uma disfunção causada por um vírus latente, considerado por alguns autores idêntico a ASPV. Nesse contexto, ambas as disfunções são consideradas conjunta-

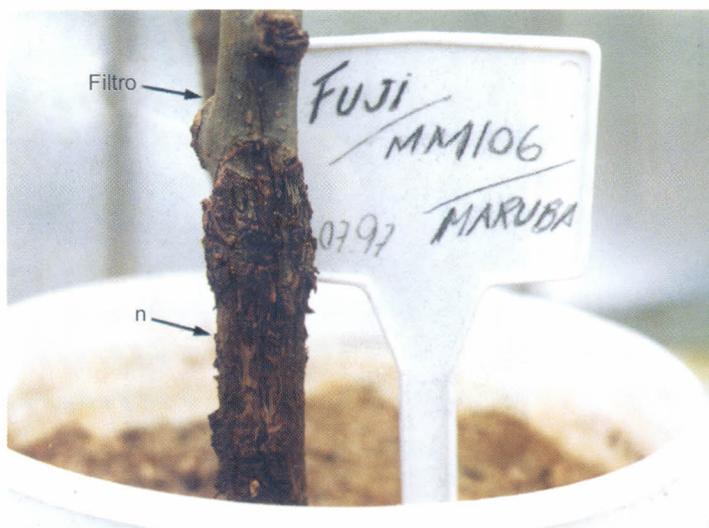


Foto: O. Nickel

Fig. 2. Cancro da casca do porta-enxerto Maruba-kaido causado por ASGV em mudas de viveiro cv. Fuji. Notar que a necrose não atinge o filtro MM106 (Fraiburgo, SC).

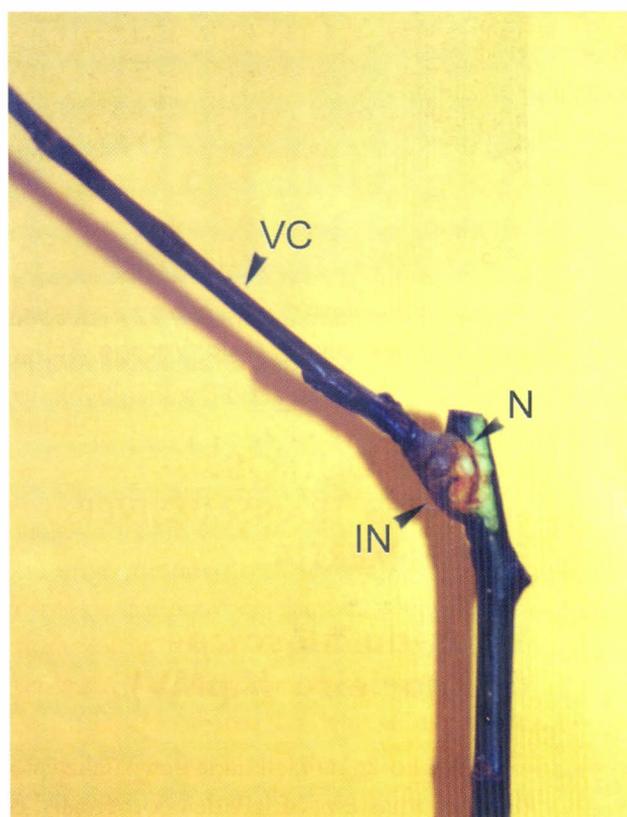


Foto: O. Nickel

Fig. 3. Necrose na união de enxertia (N) e inchamento da base do ramo da indicadora Virginia Crab (VC) (IN) causados por ASGV; inóculo cv. Hillwell (Vacaria, RS).

mente. ASPV produz em Spy 227 epinastia foliar em 4-6 semanas pós-inoculação (Fig. 4). A formação de caneluras em Virginia Crab requer incubação no mínimo de um ano.



Fig. 4. Epinastia foliar em Spy 227 causada por ASPV (inóculo cv. Gala; Vacaria, RS).

VÍRUS E OUTROS AGENTES TRANSMISSÍVEIS POR ENXERTIA

Vírus-do-mosaico-da-macreira (ApMV)

Por conta da facilidade de visualização dos sintomas em variedades comerciais, o vírus do mosaico-da-macreira causa uma das doenças virais mais conhecidas da macreira. Os sintomas foliares variam, segundo a virulência do isolado e a sensibilidade da cultivar e podem ser muito discretos, passando despercebidos. Plantas infectadas mostram áreas irregulares de cor amarelo-creme nas folhas, podendo reduzir-se a diminutas manchas nas nervuras, bandeamento de nervuras, manchas

em toda a superfície foliar, ou ocupar toda a área entre as nervuras (Fig. 5).



Fig. 5. Manchas e áreas irregulares de cor amarelo-creme de macieiras infectadas com ApMV (Vacaria, RS).

Os sintomas, geralmente, são mais fortes em primaveras frias. É comum as cvs. Gala e Granny Smith conterem o vírus de forma latente. Após períodos de forte expressão de sintomas podem ocorrer flores anormais, atrofiadas e queda de frutas jovens (não confundir com infecção de fungos). ApMV causa danos relevantes à macreira, reduzindo a pega da enxertia e o crescimento da planta. A redução de produção pode ser da ordem de 30%, mas varia segundo a cultivar, o ano e a estirpe do vírus. O efeito de ApMV é especialmente forte quando ocorre infecção mista com vírus latentes.

Lenho-mole-da-macreira ("Apple rubbery wood")

O lenho-mole ou emborrachamento-do-lenho é uma disfunção de natureza ainda desconhecida. O envolvimento de agentes do tipo fitoplasma, bactérias restritas ao xilema e rickettsias na etiologia dessa doença foi proposto, mas não há prova de patogenicidade. É uma doença muito difundida em variedades comerciais de macieiras e pereiras e porta-enxertos clonais. Provoca perdas de produção, em média, de cerca de 20% a 30%. A flexibilidade anormal da madeira, principal

sintoma da doença, resultado de síntese deficiente de lignina, dificulta a formação das macieiras; os ramos, sem frutos, curvam-se sob a ação do próprio peso. O calibre dos frutos é menor e a maturação é retardada. Os internós são curtos e o crescimento vegetativo é reduzido. A condição lenho-mole observa-se principalmente nos ramos jovens, do 2º ano de crescimento, com espessura de no máximo um dedo. Mais tarde as plantas podem produzir madeira normal e “ladrões” oriundos do líder e de galhos estruturais, e os sintomas podem desaparecer por completo. A transmissão da doença ocorre pela união de tecidos ou pela propagação vegetativa de porta-enxertos clonais infectados.

Vírus-da-mancha-anelar-do-tomateiro (“*Tomato ringspot virus*”, ToRSV)

Este *Nepovirus* (vírus transmitido por nematóides, com partículas poliédricas) é associado à necrose-da-união-da-enxertia da macieira. Essa forma um anel marrom ao redor do tronco, na junção da copa com o porta-enxerto. Às vezes, ao invés desse anel necrótico observam-se caneluras muito discretas na união de enxertia. A necrose impede a soldadura da enxertia, deixa a planta debilitada e raquítica, e passível de ser derrubada por ventos fortes. ToRSV induz sintomas em cultivares-copa e porta-enxertos comerciais das séries MM, EM e MAC. ToRSV é facilmente transmissível pela enxertia durante a propagação clonal.

DOENÇAS DE MENOR IMPORTÂNCIA ECONÔMICA TRANSMISSÍVEIS POR ENXERTIA

A depressão-do-lenho, cuja natureza ainda se desconhece, inicia-se com depressões locais, curtas, em ramos jovens; posteriormente, desenvolvem-se ranhuras

longitudinais que se alargam, dando lugar às depressões da madeira (Fig. 6). O agente pode ser eliminado por termoterapia.



Foto: O. Nickel

Fig. 6. Sintomas de depressão-do-lenho na cv. Royal Gala, 3 anos de idade (Caxias do Sul, RS).

Em pomares mais velhos foram observadas frutas infectadas com ruga verde. Os sintomas desenvolvem-se em frutinhas de cerca de 2 a 3 cm de diâmetro, logo após a floração, na forma de pequenas depressões da casca, que se tornam mais severas (Fig. 7).

O tecido abaixo das depressões é verde, mais escuro que o tecido que o circunda. O agente foi transmitido somente pela enxertia, mas há relatos de disseminação vagarosa em pomares. Assim, medidas de sanidade, como a termoterapia, representam a melhor forma de prevenção. O patógeno, de natureza ainda desconhecida, é latente em algumas variedades comerciais, e afeta a produção e a armazenabilidade.

Embora ocorra raramente, a rachadura-estrela foi constatada em pomares mais antigos. A natureza do agente, transmissível

Foto: O. Nickel



Fig.7. Sintomas de ruga-verde em frutininhos da cv. Gala Standard (Vacaria, RS).

pela enxertia, é desconhecida, mas o agente pode ser eliminado por termoterapia. Os isolados mais virulentos causam, além da rachadura típica, distorção e redução do tamanho dos frutos (Fig. 8), redução do vigor, declínio e cancrios ao redor das gemas.

Foto: O. Nickel

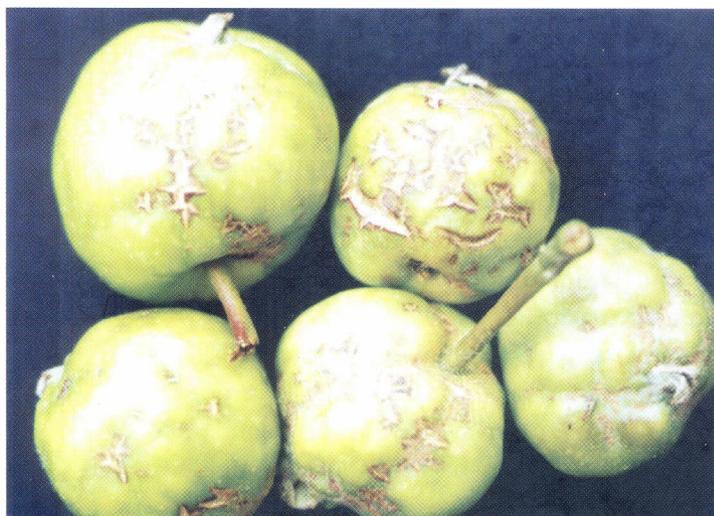


Fig.8. Sintomas de rachadura-estrela em frutininhos da cv. Gala Standard (Vacaria, RS).

DIAGNÓSTICO DE VÍRUS

Geralmente, chama-se “indexagem” o diagnóstico de vírus de fruteiras perenes. Pode ser biológica, enxertando-se tecidos de plantas suspeitas em plantas indicadoras

em casa de vegetação, telado ou em campo, ou conduzida em laboratório por serologia e técnicas moleculares como a PCR.

Muitos vírus são latentes em macieiras e, por isso, usam-se plantas indicadoras para realizar a indexagem biológica (Tabela 1). Sintomas dessas indicadoras, quando infectadas, incluem: manchas necróticas e/ou cloróticas, mosaico, necrose foliar, distorção foliar, bandeamento clorótico das nervuras, epinastia, morte de ponteiros, necrose da casca e da união de enxertia, caneluras na madeira, enfezamento e declínio da planta, entre outros.

O teste imunoenzimático ELISA (e variações) é, atualmente, o mais amplamente utilizado teste serológico para a detecção de doenças virais em fruteiras em geral. Consiste na reação de um extrato da amostra com um anticorpo específico que será detectado por um anticorpo (específico ou universal) ligado a uma enzima. Uma vez adicionado à mistura o substrato dessa enzima, a reação positiva produzirá uma alteração de cor visível a olho nu. Apesar de algumas peculiaridades (sazonalidade do teste; distribuição desuniforme dos vírus em certos tecidos) que podem dificultar o diagnóstico em certas estações do ano o diagnóstico serológico apresenta-se como instrumento que reúne simplicidade, possibilidade de execução em larga escala, baixo custo e alta sensibilidade. Anticorpos e conjugados existentes no mercado, necessários à execução de ELISA, ainda são importados.

A PCR ou reação de polimerase em cadeia (e suas variações) é um método de detecção extremamente sensível que permite o diagnóstico de agentes virais, geralmente, desde que se conheça pelo menos parte do vírus. Consiste no uso de pequenos oligonucleotídeos chamados “iniciadores”, que se pareiam com o vírus e permitem sua amplificação em reações catalizadas por enzimas. Os produtos resultantes dessa amplificação são visualizados sob luz ultravioleta. A necessidade de extração dos ácidos nucléicos virais das amostras com agentes desproteinizantes, enquanto ELISA

Tabela 1. Espécies/cultivares utilizadas na indexagem biológica de vírus de macieiras e os sintomas que desenvolvem.

Espécie / Variedade	Vírus	Sintomas ¹
<i>M. domestica</i> 'LL-S5'	ACLSV	MC, DF, M
<i>M. adstringens</i> 'Hopa'	ACLSV	MV, MN, NF, NC, LA
<i>M. platycarpa</i>	ACLSV	MC, EC, MAC ²⁾
<i>M. prunifolia</i> cv. ringo 'Mo84', Maruba-kaido	ACLSV	MC, NF, MP, NIC, E, EC, (C)
<i>M. domestica</i> 'Spy 227'	ASPV-SED, ACLSV	MC, C, E, NIC
<i>M. domestica</i> 'R-12740.A'	ACLSV	MC, NF, NIC, C
<i>Pyronia veitchii</i>	ACLSV, ASGV, ASPV	MAC, BC, C ²⁾
<i>M. domestica</i> cv. Virginia Crab	ASGV, ASPV	NUE, C, IBE
<i>M. domestica</i> cv. Radiant Crab	ASPV	E, NN
<i>M. domestica</i> cv. Lord Lambourne	Lenho-mole, ApMV	M, CR
<i>M. micromalus</i> cv. GMAL 273.A	ASGV	NC, MN, E, DF
<i>M. domestica</i> cv. Golden Delicious	Rachadura-estrela, Lenho-mole, ApMV	REF, CR, M ³⁾
<i>M. domestica</i> cv. Gala	Ruga-verde	DSF ³⁾
<i>M. domestica</i> cv. Gravenstein	Depressão-do-lenho	DL ³⁾

1) LL-S5: Lord Lambourne Seedling nº 5; Mo84: Maruba-kaido Seleção Morioka nº 84; BC: bandejamento clorótico de nervuras; C: caneluras; CR: curvatura de ramos; DF: deformação foliar; DSF: depressões verde-escuras na superfície dos frutos; E: epinastia; EC: erupções da casca; IBE: inchamento da base do enxerto; LA: lenho avermelhado; M: mosaico; MAC: manchas anelares cloróticas; MC: manchas cloróticas; MN: manchas necróticas; MP: morte de ponteiros; MV: manchas vermelhas, que se tornam necróticas; NF: necrose foliar; NIC: necrose interna da casca; NC: necrose do caule; NN: necrose de nervuras; NUE: necrose na união de enxertia; REF: rachadura de frutos; DL: depressão longitudinal do lenho; () : sintoma ocorre com certos isolados, não via de regra.
Fonte: 2) Siebert & Engelbrecht, 1981; 3) Fridlund, 1989.

e suas variações usam seiva bruta ou clarificada, reduz a versatilidade da PCR como método para análises massais. Ambos os métodos, entretanto, têm seu lugar no instrumental de diagnóstico, e especialmente na limpeza clonal, formando um tripé com a indexagem biológica.

PRODUÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS

Controle de vírus é sempre profilático. Consiste na prevenção. Não há métodos curativos ou viricidas aplicáveis em pomares. Planta infectada, uma vez no pomar, permanece infectada e é irreversível. O único controle eficiente de vírus, especificamente daqueles de fruteiras lenhosas, que se transmitem exclusivamente pela enxertia, consiste no uso de plantas livres de vírus na formação do pomar.

É comum, na ausência de plantas livres de vírus de uma variedade ou clone de importância comercial, que essas plantas tenham que ser desenvolvidas a partir do material infectado, o que pode ser feito por a) avaliação de "escapes" naturais (plantas que permaneceram sadias) via indexagem; b) termoterapia; c) por cultura de tecidos. Na prática, é comum a associação de termoterapia à cultura de tecidos.

Termoterapia ou tratamento com calor (nesse contexto entendido como ar quente) pratica-se, hoje, como nos anos 60, quando estes trabalhos se iniciaram nos EUA e Europa. Para o tratamento térmico, utilizam-se desde câmaras de crescimento totalmente automatizadas até simples gabinetes de madeira com lâmpadas como fontes internas de calor. Câmaras de termoterapia devem preencher três requisitos básicos: ser controláveis, confiáveis e permitir a exposição a temperaturas constantes.

Os procedimentos consistem de: a) escolha da variedade segundo critérios agrônômicos, pomológicos, fitossanitários e mercadológicos; b) preparação da cultivar destinada ao tratamento térmico em plântulas de semente bem desenvolvidas e enraizadas. Uma vez soldado o enxerto, a planta recebe tratamento para fomentar vigorosa brotação e crescimento, permitindo o acúmulo de substâncias de reserva na raiz e no tronco, fundamental para o êxito da termoterapia, que é um tratamento bastante agressivo. Forte poda, boa fertilização e suprimento de água forçam nova brotação sob temperaturas que variam de 36°C a 40°C, por diferentes períodos, conforme o vírus ou o isolado. Nessas condições de temperatura, o crescimento vegetativo da planta é mais rápido que a replicação e o movimento do vírus na planta. Como consequência os ápices laterais e apicais de plantas tratadas têm alta probabilidade de estar livres de vírus (viróides não são, aparentemente, afetados pela termoterapia). Esses ápices são cortados e enxertados em cunha, em porta-enxertos preparados simultaneamente. Deve-se ter em mente que a termoterapia tem efeito diferenciado sobre os diversos vírus. ACLSV e ApMV são de fácil eliminação pelo calor, ASPV-SED ocupa posição intermediária e ASGV, extremamente termoestável, segundo a termosensibilidade do isolado, pode não ser eliminado pela termoterapia. Neste último, e em outros casos, a termoterapia pode ser um ótimo pré-tratamento do material destinado à cultura de meristemas.

Como o tratamento térmico não representa garantia de que todos os vírus sejam eliminados, é procedimento-padrão a indexagem (biológica, serológica e molecular) na seqüência da termoterapia, segundo a disponibilidade de material. Após a termoterapia, se não houver a eliminação

total dos vírus, pelo menos terá ocorrido uma forte redução na sua concentração, possivelmente inferior ao nível de detecção, o que exige cuidados especiais na avaliação das plantas e determina o monitoramento posterior durante três enfolhamentos.

A cultura de tecidos engloba procedimentos para a eliminação de vírus de tecidos vegetais, entre os quais destacam-se a cultura de meristemas e a microenxertia *in vitro*. A cultura de meristemas já foi usada com êxito para eliminar um grande número de vírus de numerosas espécies de plantas. Há relatos da eliminação de ASGV de macieiras por microenxertia.

A concentração de vírus em plantas reduz-se na proximidade do meristema apical. Geralmente, no próprio meristema não há vírus. Esse é o fundamento do uso desse tecido para a limpeza clonal. Trata-se de um tecido ainda não diferenciado, de cerca de até 0,25 mm de comprimento. O meristema é extraído sob lupa em condições assépticas, de tecidos que podem ter sido submetidos previamente à termoterapia, e cultivado em meios de cultivo para: iniciação de cultivo, proliferação e enraizamento. As plântulas, na seqüência, são aclimatadas em casa de vegetação, reduzindo-se gradativamente a umidade, e são submetidas, assim que possível, aos primeiros testes de vírus, idênticos aos descritos em plantas oriundas da termoterapia e enxertia de ápices caulinares.

Os procedimentos de limpeza clonal de macieiras, seja pela termoterapia seja por cultura de tecidos, caracterizam ações de longa duração, envolvendo etapas de indexação (três enfolhamentos), avaliação da autenticidade varietal e o monitoramento dos materiais egressos desses procedimentos.