

25 **Produção de material propagativo livre de vírus latentes e indexação integrada em macieiras**

Osmar Nickel*¹, Iraci Sinski, Thor Vinicius Martins Fajardo, Marcos Fernando Vanni, João Bernardi

Os níveis de infecção viral em macieiras flutuam, com base em dados obtidos recentemente, entre 50 e 80% em pomares comerciais do sul do Brasil (Lessa et al., 1998; Nickel et al., 2001). Nossos dados revelam a ocorrência generalizada de vírus latentes e assemelhados: *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), Epinastia e Declínio do Spy227, "Descascamento" e "Nanismo de Platycarpa" (*Platycarpa scaly bark* e *Platycarpa Dwarf*); *Apple mosaic virus* (ApMV), "Rachadura-estrela", "Ruga verde", e "Depressão do lenho", entre outros de natureza ainda desconhecida como o "Lenho Mole". Material propagativo de macieiras livres de vírus está sendo produzido com a remoção dos vírus por 1. Termoterapia e cultivo in vivo de ápices caulinares e 2. Termoterapia e cultivo in vitro de meristemas apicais. Toda planta oriunda destes tratamentos tem que ser submetida à indexação para avaliação do êxito dos procedimentos de remoção de vírus. O diagnóstico destes agentes patogênicos em tecidos lenhosos é complexo e requer estratégias e métodos específicos. Geralmente sua distribuição nos tecidos vegetais é desuniforme e flutua fortemente conforme a estação do ano; o quadro é agravado pela presença de substâncias inibidoras (polifenóis, taninos, quinonas, etc) que interferem no diagnóstico, produzindo falso-negativos e impondo limites à versatilidade potencial de todos os métodos de detecção em maior ou menor grau. A produção de material propagativo livre de vírus exige, entretanto, níveis altos de confiabilidade do diagnóstico. Face à insegurança imposta ao diagnóstico pelas características dos agentes virais e das limitações técnicas, a integração dos métodos torna possível minimizar suas deficiências individuais. A integração de métodos biológicos, sorológicos e moleculares de detecção de vírus e assemelhados de macieiras aplica-se, neste programa, a todos agentes conhecidos e detectáveis por pelo menos um destes métodos. A integração permite a retro-alimentação complementar mútua de informação que aumenta o rigor do resultado finalmente aceito. Faz-se uma leitura de sintomas foliares 6-8 semanas p.i. (pós-inoculação) na primavera seguida de leitura por três enfolhações (sintomas na madeira a partir de 1 ano p.i.). As principais indicadoras usadas são *Malus domestica* cvs. Virginia Crab, Hopa, Radiant Crab, Spy 227 e Lord Lambourne S5, *Malus platycarpa* e *Pyronia veitchii*. Cada vírus é indexado em 2 plantas indicadoras com três repetições. O teste ELISA indireto é usado para detecção sorológica de ASGV e ACLSV. Para ASGV o teste está sendo executado, com êxito, com antissoros próprios produzidos em coelhos contra a proteína capsídica do vírus expressada em *Escherichia coli*; antissoros usados contra ACLSV são comerciais. O teste molecular RT-PCR é usado para ASGV, ACLSV e ASPV. Os protocolos estabelecidos para estes três vírus permitem a amplificação de fragmentos de 523 pb (Nickel et al., 1999), 358 pb (Nickel et al., 2003) e 243 pb (Jelkmann & Keim-Konrad, 1997) respectivamente. Os fragmentos obtidos por RT-PCR de isolados brasileiros de ACLSV e ASGV foram clonados e sequenciados garantindo a presença no material analisado do vírus diagnosticado nas indicadoras. A indexação integrada apoia-se, portanto, em três análises independentes, cujos resultados são repetidos e confirmados por três anos pós-enxertia.

Referências bibliográficas

- Nickel, O., Jelkmann, W. & Kuhn, G.B. Occurrence of *Apple stem grooving capillovirus* in Santa Catarina Brasil, detected by RT-PCR. *Fitopatol. Bras.*, 24:444-446. 1999.
- Nickel, O., Fajardo, T.V.M., Jelkmann, W. & Kuhn, G.B. Sequence analysis of the capsid protein gene of *Apple stem grooving virus* and its survey in Southern Brazil. *Fitopatol. Bras.*, 26:655-659. 2001.
- Nickel, O., Aragão, F.J.L., Fajardo, T.V.M. & Trivilin. Detection and partial molecular characterization of an isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). *Fitopatol. Bras.* 28 (supl.): S371-372. 2003.
- Jelkmann, W. & Keim-Konrad, R. Immunocapture polymerase chain reaction and plate-trapped ELISA for the detection of *Apple stem pitting virus*. *J. Phytopathology*, 145: 499-503, 1997.

¹ Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, 95700-000 Bento Gonçalves-RS. E-mail: nickel@cnpuv.embrapa.br.