

4 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 é relativamente jovem, comparada com as regiões pomicultoras do hemisfério norte, mas se depara com questões de sanidade do material propagativo muito similares àquelas enfrentadas por aqueles países.

Os primeiros cultivos comerciais da macieira iniciaram-se no Brasil por volta de 1970, quando os programas de limpeza clonal nos países com tradição na produção de maçã, europeus e norte-americanos, começavam, desde meados dos anos 50, a produzir os primeiros resultados, acompanhados de legislação específica. O fato de que, ainda nos anos 80 a 90, a contaminação com vírus e similares em pomares e viveiros de maçã franceses e estrangeiros atingia mais de 60% dos clones amostrados, dá uma idéia do caráter de longa duração de tal empreendimento, até a eliminação total de vírus e similares.

Assim, não é de surpreender que o material propagativo utilizado na implantação dos primeiros pomares brasileiros estivesse altamente contaminado e que até mesmo as introduções recentes dos Estados Unidos, da Europa e do Japão ainda apresentem graus consideráveis de contaminação.

Durante décadas, os programas IR-2 nos EUA e no Canadá, e as rigorosas diretrizes para produção de material propagativo de alguns países da União Européia (UE) garantiram o alto grau de limpeza dos principais clones comerciais em uso naqueles países. Recentemente, na UE as regras foram alteradas, aparentemente para permitir a comercialização de materiais oriundos de países com padrões tecnológicos mais baixos e sistemas de controle de sanidade menos rigorosos. A partir da “Diretriz Européia para a Comercialização de Material Propagativo e Plantas para a Produção de Frutas”, produziu-se uma corrente favorável à introdução de uma terceira categoria de material propagativo ao lado de “livre de vírus” (“vf”) e “testada para vírus” (“vt”), denominada “CAC” (*Conformitas Agraria Communitatis*). Nessa categoria garante-se somente que o material está livre de sintomas virais reconhecíveis visualmente, isto é, tanto os vírus latentes como aqueles que ainda não se expressaram na fase de viveiro (vírus de frutos), são desconsiderados. Assim, o material “CAC” para comercialização na UE (diretriz de 1993) e exportação pode conter a maior parte dos vírus e dos agentes similares que produzem doenças em macieiras. Embora “vt” e “CAC” tenham pouca relevância comercial, é importante saber que sua comercialização é legal. Para se adequar a esta norma, os países membros adaptaram suas legislações. Na Alemanha, por

exemplo, entrou em vigor, em julho de 1998, uma portaria ministerial (chamada Agoz) que engloba plantas ornamentais, hortícolas e fruteiras de semente e caroço, criando duas classes de material propagativo: material certificado, que preenche requisitos de sanidade e liberdade de vírus, e material padrão que corresponde à categoria “CAC” da UE.

Os vírus são agentes patogênicos, que se encontram, segundo definição amplamente aceita, além da fronteira que delimita e agrupa os seres vivos e afetam o desenvolvimento das plantas, interferindo de forma parasítica no metabolismo vegetal. Em “agentes similares” ou assemelhados agrupam-se agentes transmissíveis pela enxertia como os microrganismos fitoplasmas e rickettsias e outros ainda não caracterizados. Cerca de 30 doenças de macieiras são causadas por vírus, viróides e agentes similares. Geralmente faz-se distinção entre dois grupos de vírus em macieiras: aqueles que produzem sintomas claramente visíveis em variedades comerciais e os chamados vírus latentes. Segundo a virulência do isolado viral e a suscetibilidade do tecido afetado, eles podem manifestar-se em folhas, flores, frutos, na casca e na madeira de troncos e galhos estruturais, em ramos e raízes da macieira.

No primeiro grupo, os danos da doença são evidentes e por essa razão a indexagem de vírus nos anos 60 concentrou-se nesses agentes, e o material que não apresentava sintomas visíveis recebia a denominação “vt”. Incluíam-se nesse grupo a depressão-do-lenho (“*flat limb*”) 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*”). Entretanto, posteriormente demonstrou-se que vírus latentes, especialmente em infecções mistas, também causavam danos consideráveis. Exata-

mente por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis na maioria das cultivares comerciais, podem passar despercebidos e ser propagados indefinidamente. Incluem-se nesse 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), vírus-da-mancha-clorótica-da-folha-da-macieira (“*apple chlorotic leafspot virus*”, ACLSV). Embora haja controvérsia, existem evidências experimentais de que a síndrome epinastia e declínio do Spy (“*Spy epinasty and decline*”, SED) possa ser causada por ASPV, razão porque ela, a título de simplificação, é abordada neste contexto como associada ao ASPV. Com a eliminação desses vírus por termoterapia, o material recebe a denominação “vf”. O diagnóstico de vírus em fruteiras é chamado de indexagem. Consiste em enxertar num porta-enxerto de cerca de 0,8 cm de espessura, oriundo de semente, duas borbulhas da espécie-candidata e acima destas, uma borbulha da espécie indicadora. Pode-se substituir a borbulhia pela garfagem de uma indicadora (garfo) na combinação porta-enxerto/espécie-candidata em casa de vegetação ou em campo. O ambiente fechado (telados, casas de vegetação) permite controlar as condições ambientais e dirigir os tratamentos culturais para influenciar a expressão de sintomas; altas temperaturas, entretanto, mascaram os sintomas de vírus.

Os vírus causam danos em todas as fases de desenvolvimento da macieira, desde a pega da enxertia no viveiro até o desempenho da planta adulta no pomar, seu crescimento e sua produção. Há farta documentação científica sobre os efeitos negativos de vírus em macieiras. É relevante para os danos em macieiras o efeito de sinergismo entre vírus latentes entre si, e com ApMV. Entre os danos causados por infecções virais, destacam-se:

- Redução do pegamento de enxertias de material infectado: as plantas no viveiro têm pouco vigor, ou podem desenvolver sintomas e definharem nos primeiros anos após a implantação do pomar.

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

- Redução do crescimento: redução do calibre dos frutos e do tamanho e do vigor das plantas, do diâmetro do tronco, do comprimento dos ramos laterais e da brotação.

- Aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas como podridões radiculares e cancos o que provoca aumento do uso de agrotóxicos.

- Redução da capacidade de aproveitamento de fertilizantes: crescimento e produção satisfatórios de plantas livres de vírus podem ser garantidos com doses menores de fertilizantes, reduzindo o custo de produção e o impacto ambiental da cultura sobre lençóis freáticos e mananciais.

- Redução da armazenabilidade dos frutos.

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

Na continuação serão abordados os principais vírus de macieiras individualmente, juntamente com a indexagem em plantas indicadoras lenhosas por união de tecidos e pela via mecânica em plantas indicadoras herbáceas. Esta última consiste em esfregar-se extratos de tecidos doentes (preferencialmente, botões florais e pétalas, frutos amassados ou folhas bem jovens) em folhas da indicadora herbácea previamente pulverizada com um abrasivo. O extrato é feito em tampão fosfato de potássio 0.01-0.05 M, pH 7.0, com 2,0% de nicotina e aplicado em plantinhas com 6 a 8 folhas, mantidas, posteriormente, a temperaturas de 22°C a 25°C.

VÍRUS LATENTES

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

ACLSV é um vírus latente, amplamente difundido em macieiras em todo o mundo; afeta também a pêra, *Prunus* ssp., outras espécies de rosáceas frutíferas e ornamentais além de espécies de outros gêneros. Sua relevância econômica, em virtude do grande potencial de dano, é grande, mas variável, segundo a estirpe do vírus 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. 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).

ACLSV, membro-tipo do gênero *Trichovirus*, possui partículas filamentosas e flexíveis de 720 x 12 nm, contendo subunidades da capa protéica com massa molecular de cerca de 22 kDa que encapsidam um RNA genômico de fita simples, senso positivo com 7555 nucleotídeos de comprimento, excluindo a extremidade não-codificante 3' poli(A).

Sua disseminação em pomares e bancos de germoplasma é ampla, não só no Brasil, como também na Europa. Estudos recentes revelaram que ACLSV tem alta incidência em variedades-copa em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Na França, estudo mostrou que

90% dos pomares com mais de 10 anos estão contaminados, índice que cai para 20% nos pomares novos.

Há isolados de ACLSV chamados biótipos Maruba, que ao contrário dos isolados típicos de ACLSV não produzem sintomas nesta espécie.

Indexagem

Um considerável número de *Malus* spp. reage com sintomas à infecção com ACLSV e, devido à sua extrema sensibilidade, são utilizadas como indicadoras. Sintomas em *Malus* spp. incluem: manchas cloróticas, clorose de nervuras, necrose e distorção foliar, enfezamento, morte de ponteiros, necrose do floema (casca), caneluras no xilema (madeira), e declínio da planta. ACLSV forma inúmeros isolados que podem produzir, individualmente, somente parte deste espectro de reações. Há isolados de ACLSV que não produzem sintomas em indicadoras lenhosas. O mais importante destes isolados, ACLSV biótipo Maruba-kaido, é latente nesta espécie. Alguns isolados de ACLSV produzem necrose na união de enxertia do porta-enxerto Mitsuba-kaido. Em Maruba-kaido, as reações à infecção com isolados típicos de ACLSV, observada em plantas adultas em pomares de SC, são profundas caneluras na madeira e necrose da casca, ambas extremamente severas, sem necrose na união de enxertia (Fig. 1). As caneluras na madeira contêm depósitos necrosados da casca e avançam sobre as raízes. Ocasionalmente os troncos podem adquirir uma cor avermelhada

Os sintomas de ACLSV em R-12740.7A (Fig. 2) e *M. platycarpa* são mais expressivos sob temperaturas entre 18°C e 22°C, enquanto sintomas de ACLSV induzidos em Spy 227 são mais intensos entre 22°C e 26°C.

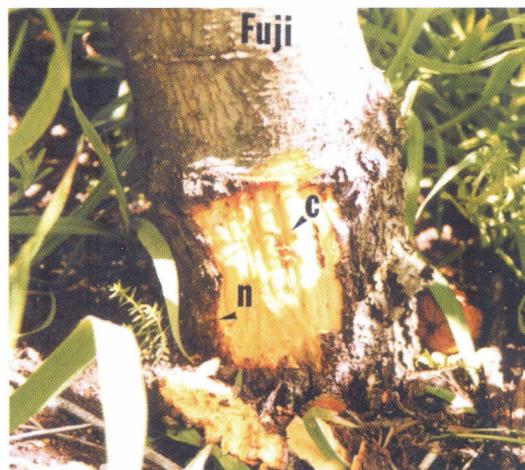


Foto: Osmar Nickel.

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.



Foto: Osmar Nickel.

Fig. 2. Manchas e bandeamento clorótico de nervuras em folhas de R-12740.7A causadas por ACLSV.

R-12740.7A é menos sensível que, e pode ser substituída por *M. adstringens* cv. Hopa e Lord Lambourne Seleção nº 5 (LL-S5) que têm reações muito sensíveis a ACLSV.

Infecções fortes em 'Hopa' induzem sintomas 6-8 semanas p.i. (pós-inoculação): a brotação é retardada, as primeiras folhas podem aparecer deformadas e pequenas, a planta pode morrer pouco depois da brotação. Em infecções fracas, algumas folhas apresentam-se deformadas na brotação, que se curvam levemente e são menores que folhas sãs. Cerca de 6-8 semanas p.i. as folhas apresentam-se estreitas, e curvadas lateralmente, com *manchas vermelhas na lâmina foliar* que se tornam necróticas (Fig. 3).

Foto: Osmar Nickel.



Fig. 3. 'Hopa' com manchas foliares vermelhas causadas por ACLSV.

A depender da virulência do isolado, o crescimento da indicadora é *fortemente reduzido*. Na base do caule e dos ramos ocorrem erupções ou rachaduras. No segundo ano pode-se observar caneluras na madeira que adquire cor vermelha intensa limitada por uma linha necrótica que se forma na união da enxertia. A regra geral de que indexagens são conduzidas a temperaturas de até 22°C é especialmente válida para a cv. Hopa, na qual a intensidade dos sinto-

mas cai consideravelmente quando a temperatura passa de 18 para 22°C. Em casas de vegetação mal-refrigeradas, telados ou no campo, em climas quentes, pode haver mascaramento de sintomas.

Também o clone LL-S5 destaca-se por alta sensibilidade e reação rápida. Os sintomas variam de clareamento e bandeamento clorótico de nervuras, manchas cloróticas, mosaico e deformação do limbo foliar na primeira brotação p.i. (Fig. 4).

Foto: Osmar Nickel.

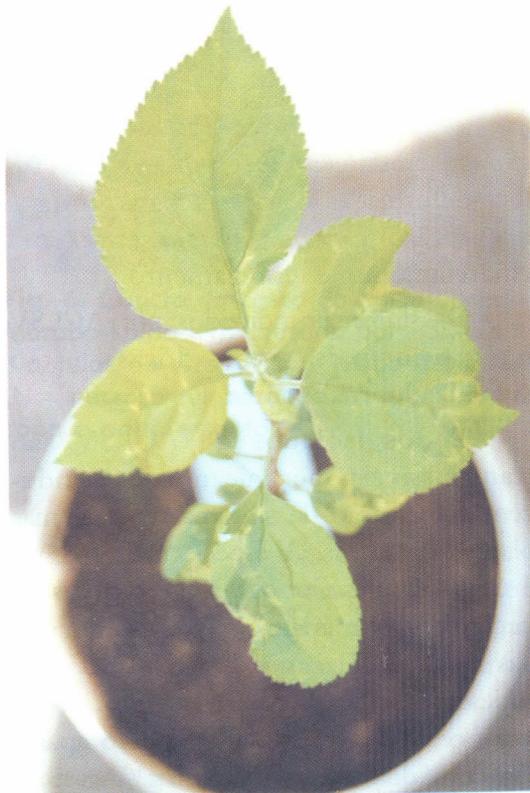


Fig.4. Lord Lambourne S5 com manchas cloróticas, mosaico e deformação foliar causadas por ACLSV.

O clone Maruba-kaido Mo84 (Morioka 84, seleção de *M. prunifolia* cv. ringo, Fruit Tree Research Station, Morioka Branch, Japão) produz uma rápida reação foliar: na primeira brotação a partir de 4-6 semanas p.i., folhas pequenas com manchas cloróticas (mais tarde necróticas) e bandeamento clorótico das nervuras.

Deve ser mencionada ainda, como alternativa ou complementação, a indicadora *Pyronia veitchii*, que, mantida a 18-22°C, é muito sensível. Ela reage com anéis cloróticos a muitos isolados de ACLSV, especialmente àqueles oriundos de maçãs. A ausência de sintomas de ACLSV em *P. veitchii*, mantidas a 22-26°C, mas positivas em ELISA, demonstra a relevância da manutenção e controle de temperatura para a expressão de sintomas virais.

Fora do gênero *Malus* ACLSV infecta algumas espécies cuja reação tem relevância diagnóstica. *Cotoneaster divaricata* desenvolve no 1º ano p.i. necrose da casca e declínio, no 2º ano p.i. profundas caneluras e depressões no lenho do caule. *Aronia melanocarpa* mostra forte redução de crescimento na primavera, e folhas deformadas com manchas cloróticas no verão. *Photinia villosa* apresenta amarelamento e enfezamento.

Os sintomas induzidos por ACLSV nas principais indicadoras estão sumarizados na Tabela 1.

Todos isolados de ACLSV são transmissíveis mecanicamente e induzem a formação de sintomas em algumas plantas herbáceas. A espécie mais sensível é *Chenopodium quinoa* que reage com lesões necróticas primárias nas folhas inoculadas cerca de 5 dias p.i., e manchas cloróticas sistêmicas em folhas não inoculadas cerca de 10 a 12 dias após o aparecimento das lesões primárias (Fig. 5).

Há grande variação no desenvolvimento de sintomas sistêmicos entre isolados. Alguns isolados induzem a formação de manchas cloróticas com áreas necróticas, manchas anelares e cloroses lineares, outros produzem poucos sintomas sistêmicos. Outras espécies herbáceas utilizadas para indexagem de ACLSV incluem: *C. amaranticolor*, feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), *Celosia cristata*, *Beta vulgaris* var. *cicla*, e *Tetragonia expansa*, entre outras.

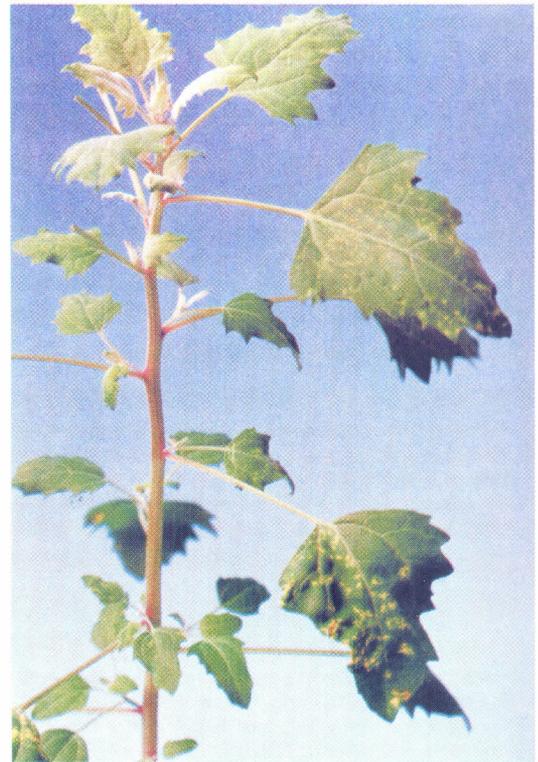


Foto: Osmar Nickel.

Fig. 5. Manchas e anéis necróticos em folhas inoculadas e manchas cloróticas sistêmicas em folhas não inoculadas em *C. quinoa* causadas por ACLSV.

Tabela 1. Espécies de plantas indicadoras utilizadas para a indexagem de ACLSV e os sintomas que elas desenvolvem.

Espécie/variedade	Sintomas*
<i>M. domestica</i> 'LL-S5'	MC, DF
<i>M. adstringens</i> 'Hopa'	MV, MN, NF, NCC, LA
<i>M. platycarpa</i>	MC, CL, EC
<i>M. prunifolia</i> 'Mo84'	MC, NF, MP, NIC, C, EC
<i>M. domestica</i> 'Spy227'	MC, (C)
<i>M. domestica</i> 'R12740.A'	MC, NF, (NIC), (C)
<i>Pyronia veitchii</i>	MAC

(*) C, caneluras; CL, clorose linear; DF, deformação de folhas; EC, erupções da casca; LA, lenho avermelhado; 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, (): sintoma ocorre com certos isolados, não via de regra.

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 últimas, reações perceptíveis visualmente. Embora menos presente na Europa, estima-se que 75% do material proveniente do Japão contenha ASGV, que causa em média uma redução da produção de cerca de 15%.

ASGV, membro-tipo do gênero *Capillivirus*, tem partículas filamentosas, flexíveis, com estrias transversais, de 600 a 700 nm de comprimento, que contêm um RNA genômico poliadenilado, de fita simples e senso positivo com 6496 nucleotídeos, excluída a extremidade não-codificante 3' poli(A). As subunidades da capa protéica têm massa molecular de 27 kDa.

O vírus causa declínio e morte generalizada de plantas de viveiro com cerca de um ano de idade, como constatado em SC nas cvs. Fuji, Royal Gala, Belgolden, Braeburn, Imperatriz e outras, enxertadas no porta-enxerto sensível Maruba-kaido (*M. prunifolia* var. *ringo*). Nos clones de Maruba-kaido em uso, um porta-enxerto cuja utilização tem se expandido fortemente no Brasil, ASGV provoca em plantas jovens um cancro que destrói completamente a casca do tecido sensível (Fig. 6) e leva à morte ou ao declínio gradual da planta ainda nos viveiros. Há isolados de ASGV que não produzem reações perceptíveis em espécies de *Malus* normalmente sensíveis.



Foto: Osmar Nickel.

Fig. 6. Cancro da casca do porta-enxerto Maruba-kaido (N), causado por ASGV em plântulas de viveiro com 1 ano de idade (N= necrose na base do filtro M9 entre copa e porta-enxerto).

Indexagem

Embora ASGV não produza nenhuma reação perceptível a olho nu na maioria das cvs. comerciais, sintomas muito fortes são produzidos em *M. domestica* cv. Virginia Crab, e no porta-enxerto Maruba-kaido pelo isolado diagnosticado em SC. As folhas de Virginia Crab tornam-se cloróticas ou apresentam manchas cloróticas na primeira brotação p.i. somente. Uma necrose foliar típica, produz uma curvatura no eixo longitudinal da nervura central. O tronco, ou caule, desenvolve, a partir de cerca de 1 ano p.i., acanalamento, geralmente, somente visível após a remoção da casca. Um acúmulo dessas caneluras forma depressões visíveis da casca. É muito típico o inchamento da

base da indicadora e o desenvolvimento de necrose na união de enxertia (Fig. 7), seguidos do declínio da planta.



Foto: Osmar Nickel.

Fig. 7. Necrose na união de enxertia na base do ramo da indicadora Virginia Crab causada por ASGV.

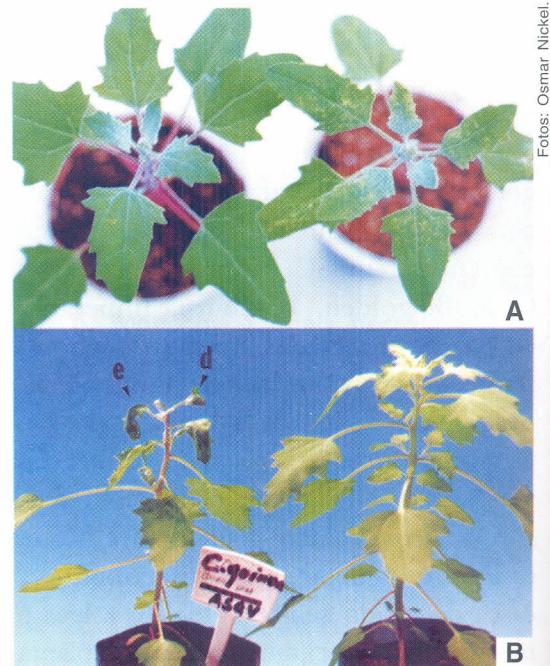
M. micromalus (GMAL 273.a) tem uma reação muito rápida e desenvolve sintomas diagnósticos pronunciados duas a quatro semanas p.i, consistindo basicamente de manchas cloróticas e necróticas, avermelhamento, epinastia e deformação de folhas, e necrose do caule; *M. yunnanensis* (GMAL 2342) requer (similarmente a Virginia Crab) seis a dez semanas p.i. para a expressão de sintomas foliares, que consistem de distorção severa, necrose e manchas cloróticas foliares.

Pyronia veitchii é relatada como excelente indicadora lenhosa para ASGV. Manchas foliares amarelas aparecem em quatro semanas p.i.. Nos caules produz-se um forte acanalamento permeado de tecido do floema necrosado no final do primeiro ciclo vegetativo (a partir de 12 meses p.i.). Para *P. veitchii* usa-se pereiras de semente como porta-enxertos; em *Cydonia oblonga* o crescimento de *P. veitchii* é insatisfatório. ASGV infecta ainda os gêneros *Aronia*, *Cotoneaster* e *Sorbus*.

ASGV é transmissível pela via mecânica para *Chenopodium quinoa*, que pro-

duz sintomas diagnósticos sistêmicos cerca de 5 a 8 dias pós-inoculação, caracterizados por manchas, anéis e mosqueado cloróticos e, posteriormente, epinastia verde-escura e distorção foliar, curvatura em zigue-zague do caule, folhas pequenas e nanismo (Fig. 8).

O melhor tecido para a transmissão de ASGV de macieiras para plantas herbáceas consiste de folhas bem jovens, pétalas e botões florais. Ao utilizar-se *C. quinoa* na indexação biológica de ASGV deve-se considerar que o vírus é transmitido pela semente desta herbácea. ASGV infecta também *C. amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa*, *N. occidentalis* 37B, pepino (*Cucumis sativus*), abobrinhas e abobrinha verde (*Cucurbita* spp.) entre outras. Embora Virginia Crab apresente forte reação a ASGV, tentativas de transmitir ASGV desta indicadora para plantas herbáceas, não têm tido êxito, provavelmente, devido a uma reação de hipersensibilidade ao vírus.



Fotos: Osmar Nickel.

Fig. 8. *Chenopodium quinoa* infectado com ASGV: A. manchamento clorótico das folhas (à esquerda, controle sadio); B. estágio avançado da infecção, folhas aconcavadas, com epinastia verde-escura (e) e deformadas (d) (à direita controle sadio).

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. Foi descrito originalmente como caneluras e necrose decorrentes de uma incompatibilidade entre Virginia Crab e algumas cultivares de macieira. O vírus é latente na maioria das cultivares comerciais e não causa sintomas perceptíveis, exceto o efeito no crescimento e na produção, a qual pode ser reduzida em cerca de 10% a 20%. A epinastia e declínio de spy (“*Spy epinasty and decline*”, SED) é uma disfunção causada por um vírus latente, associado, e, segundo alguns autores, idêntico a ASPV com base na correlação (infecção e sintomas) entre ASPV e SED. Observou-se que o inóculo que causava caneluras em Virginia Crab, induzia na indicadora Spy 227 epinastia e declínio. Embora haja experimentos que questionam essa identidade, e postulam que seriam, pelo menos, estirpes muito diferentes de um mesmo vírus, em razão da diferença de termossensibilidade observada entre eles, neste contexto, a título de simplificação, ambos serão tratados conjuntamente. Atualmente, há consenso entre a maioria dos pesquisadores da área de que ambas as síndromes são causadas, muito provavelmente, por ASPV.

O agente causal das caneluras do tronco da macieira é um vírus com partículas filamentosas e flexíveis, de 800 nm x 12 a 15 nm, sem estriação transversal evidente, membro-tipo do gênero *Foveavirus*. O genoma do vírus consiste de RNA de fita simples, senso positivo e 9.474 nucleotídeos. A massa molecular das subunidades da capa protéica foi estimada em cerca de 44 kDa.

Indexagem

Embora assintomático nas principais cvs. comerciais de maçã, ASPV-SED induz sintomas em algumas espécies indicadoras e algumas espécies de *Malus* ornamentais, entre os quais destacam-se dois sintomas clássicos: Virginia Crab inoculada por enxertia desenvolve caneluras de severidade variável, que param na união de enxertia; 10 a 12 meses p.i. Ocasionalmente, caneluras e as projeções internas da casca não ocorrem no tronco da indicadora, mas em vez disso um anel de caneluras se forma na linha de enxertia e há depósitos marrom-escuros de floema necrótico nelas. Na casca do tronco aparecem manchas pretas que marcam o início do processo de erupção da casca. Um síndrome similar é produzido por ASPV em *M. bonanensis*. Em Spy 227 observa-se em cerca de seis a oito semanas p.i. epinastia severa (enrolamento da folha) (Fig. 9) e após 1 ano p.i. necrose interna da casca, desorganização do xilema (caneluras), morte de ponteiros e declínio. Manchas cloróticas em Spy geralmente são causadas por presença de ACLSV no inóculo.



Foto: Osmar Nickel.

Fig. 9. Epinastia foliar em Spy 227 causada por ASPV-SED.

M. domestica cv. Radiant Crab é uma indicadora tão ou mais sensível que Spy 227. Sua reação, na primeira brotação p.i. consiste de epinastia foliar, manchas cloróticas e necrose das nervuras centrais (com menos intensidade, das nervuras secundárias) (Fig. 10).

Pyronia veitchii, também altamente sensível a ASPV, reage em quatro semanas p.i. com forte enfezamento e declínio a todos isolados de ASPV de maçã que causam caneluras em Virginia Crab e epinastia em Spy 227.

Até o momento ASPV-SED foi transmitido pela via mecânica somente para um número restrito de plantas herbáceas. O vírus causa um mosaico e amarelamento sistêmico de nervuras, seguido de epinastia foliar e enfezamento em *Nicotiana occidentalis* 37 B. Sintomas mais severos são produzidos em *N. occidentalis* ssp. *obliqua* que mostra lesões locais necróticas seguidas de necrose foliar.

Foto: Osmar Nickel.

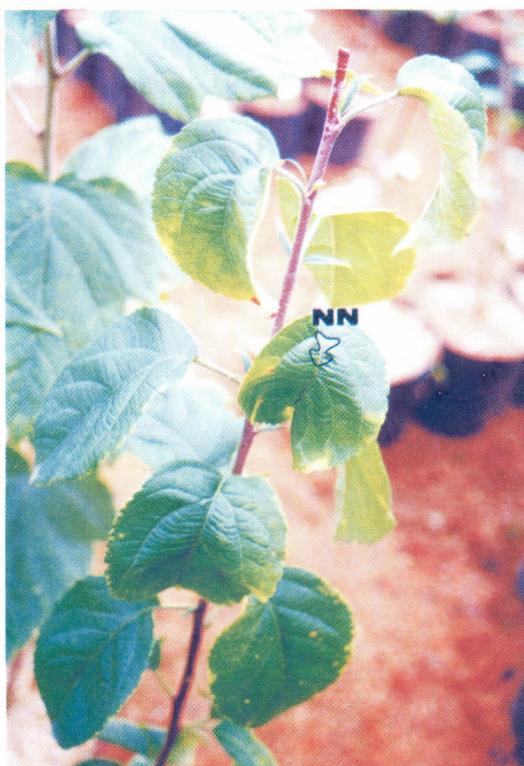


Fig.10. Radiant Crab com epinastia foliar, manchas cloróticas e necrose das nervuras (NN) causadas por ASPV-SED.

VÍRUS NÃO-LATENTES E SIMILARES TRANSMISSÍVEIS POR ENXERTIA

Esses agentes representam, pela sua natureza visível, um risco menor de ser perpetuados e propagados, pois, em parte, podem ser reconhecidos e eliminados. Embora de menor importância econômica, podem, individualmente ou em complexos virais, causar danos substanciais à macieira.

Vírus-do-mosaico-da-macieira (ApMV)

O mosaico-da-macieira causa uma das mais conhecidas doenças virais de macieira. A evidência dos sintomas que causa em folhas, permite, geralmente, ao viveirista e ao pomicultor, eliminar plantas infectadas. Os sintomas foliares variam, entretanto, segundo a virulência do isolado e a sensibilidade da cultivar, e podem ser muito tênues, passando despercebidos. 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 frutos jovens. ApMV causa danos relevantes à macieira, 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, as condições do tempo e a estirpe do vírus. O efeito de ApMV é especialmente danoso quando ocorre infecção mista com vírus latentes. Além da macieira e da ameixeira, o vírus ocorre naturalmente em lúpulo, morango, essências florestais (*Betula* sp.) e *Rubus* ssp. Avaliações de material da Nova Zelândia, da Austrália e da África do Sul revelam infecção de 10% a 15% com ApMV, enquanto cerca de 2% a 3% do material proveniente dos EUA estão contaminados.

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

Indexagem

ApMV pode ser indexado em variedades comerciais de *Malus* sp. Especialmente sensíveis são as cvs. Golden Delicious, Jonathan e mutantes, Granny Smith e mutantes, Gala e mutantes, Braeburn, Melrose e *Malus domestica* cv. Lord Lambourne. Plantas infectadas mostram áreas irregulares de cor amarelo-creme nas folhas, com limites bem definidos podendo estas reduzir-se a diminutas manchas nas nervuras, bandeamento de nervuras, manchas em toda superfície foliar ou ocupar toda área entre nervuras. Em Lord Lambourne (Fig. 11) aparecem geralmente na primeira brotação p.i. manchas amarelo-creme típico de ApMV.

Deve-se estar atento para não confundir sintomas de ApMV com aqueles produzidos por alguns defensivos, como amônia quaternária e produtos à base de aminotriazol, como também para o fato de que ApMV não é totalmente sistêmico em ramos de mais de 2 anos.

O conhecido mosaico da macieira, ApMV, é transmissível pela via mecânica para um grande número de plantas herbáceas. Sintomas em algumas espécies inoculadas experimentalmente incluem: manchas anelares, manchas cloróticas e epinastia em cotilédones e vários sintomas sistêmicos como mosaico e manchas anelares nas primeiras folhas de pepino (*Cucumis sativus*) e mosaico sistêmico em folhas e manchas anelares em pétalas de *Cataranthus roseus*; mosaico sistêmico, anéis necróticos e anéis cloróticos concêntricos em folhas pri-

márias de caupi (*Vigna unguiculata*); lesões necróticas em cotilédones de abobrinha verde (*Cucurbita* sp.) e bandeamento necrótico em cotilédones e folhas primárias de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).



Foto: Osmar Nickel.

Fig. 11. Manchas e áreas irregulares de cor amarelo-creme causadas por ApMV em Lord Lambourne.

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

O lenho-mole ou emborrachamento-do-lenho é uma disfunção de natureza ainda desconhecida. Foi proposto o envolvimento de agentes do tipo fitoplasma, bactérias restritas ao xilema e rickettsias na etiologia da doença. Não há, entretanto, prova de patogenicidade. Trata-se de uma doença muito difundida em macieiras, pereiras e porta-enxertos, que provoca perdas de produção, em média, de cerca de 20% a 30%. A flexibilidade anormal da madeira, principal sintoma da doença, dificulta a formação das macieiras; os ramos, sem frutos, curvam-se sob a ação do seu 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 produzem madeira normal e ladrões oriundos do líder, e os

sintomas podem desaparecer por completo. A transmissão da doença ocorre pela união de tecidos ou propagação vegetativa de porta-enxertos clonais.

Indexagem

O lenho-mole pode ser indexado em grande número de variedades. A cvs. Gala e mutantes, Lord Lambourne (LL), Gravenstein e Golden Delicious são muito sensíveis. O procedimento comum e mais rápido de indexagem é a enxertia de LL na copa da planta a ser indexada. Alternativamente pode-se inocular indicadores com tecidos infectados em plântulas de semente envasadas. Estirpes severas do lenho-mole produzem reação de LL em cerca de 6 meses p.i., enquanto estirpes fracas requerem mais tempo, e outras sequer induzem qualquer reação da indicadora. A flexibilidade do lenho é produto da insuficiente lignificação do tecido (Fig. 12). Pode-se diagnosticar lenho-mole por teste bioquímico, tingindo-se cortes histológicos em solução de floroglucina/HCl, um corante de lignina. Ausência de tingimento vermelho (ausência de lignina), significa presença da doença.

Foto: Osmar Nickel.



Fig. 12. Curvatura de ramos na cv. Fuji causada pelo lenho-mole.

DOENÇAS DE MENOR IMPORTÂNCIA DOS FRUTOS E DO LENHO

Durante o levantamento de doenças virais, no sul do Brasil, observou-se a ocorrência de viroses de importância secundária, que merecem menção, a título de informação. Os sintomas que causam são tão evidentes que levam geralmente à eliminação das plantas afetadas. Estas doenças não são cobertas pelos programas de limpeza clonal, pois se expressam na madeira das plantas e especialmente nos frutos, isto é, geralmente na fase adulta das plantas e em pomares mais velhos. Geralmente não são reconhecíveis no viveiro.

Vírus-do-mosaico-do-tomateiro ("Tomato ringspot virus", ToRSV)

Este vírus causa doenças em macieiras e outras fruteiras de clima temperado. ToRSV é um Nepovirus (vírus com partículas poliédricas transmitido por nematóides) 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. Segundo o isolado, em vez de necrose, pode produzir-se uma canelura muito discreta e o inchamento do porta-enxerto. A necrose impede a soldadura da enxertia, deixando a planta debilitada e passível de ser derrubada por ventos fortes. O sintoma é similar ao da linha marrom da necrose-da-união-de-enxertia em Virginia Crab em porta-enxertos infectados por ASGV. Os sintomas aparecem quando a planta entra em produção. ToRSV induz sintomas em copas e porta-enxertos. A invasora dente-de-leão (*Taraxacum officinale*) e outras invasoras do gênero *Xiphinema*, são fundamentais na disseminação de ToRSV em poma-

res. O vírus é facilmente transmissível pela enxertia durante a propagação e tem um amplo espectro de hospedeiros nos gêneros *Malus*, *Prunus*, *Rubus*, *Ribes*, *Vitis*, *Vaccinium* e em orquídeas. Não há dados experimentais da sua ocorrência em macieiras no Brasil, mas já foi constatado em invasoras em pomares no RS.

O vírus é multiparticulado, possui RNA de fita simples de 7,6 a 7,9 kb e partículas poliédricas de 28 nm. A necrose-da-união-de-enxertia representa um caso a parte entre as doenças virais de macieiras com características epidemiológicas específicas (possui um vetor e hospedeiras herbáceas nos pomares). Assim, onde ocorre, estratégias para seu controle podem ser modelo para a implementação de um programas de manejo integrado em face dos vários fatores que envolve.

Indexagem

ToRSV é facilmente transmitido pela via mecânica para *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*, *Gomphrena globosa* e *Cucumis sativus* a partir de tecido tenro e suculento. A reação biológica tem que ser complementada por exemplo por ELISA para confirmação, devido à similaridade aos sintomas produzidos por outros vírus.

Depressão-do-lenho

Descrita na Europa há mais de um século. Inicia-se com depressões locais, curtas, em ramos jovens; posteriormente desenvolvem-se ranhuras longitudinais que se alargam, dando lugar às depressões da madeira. O patógeno, cuja natureza ainda se desconhece, desenvolve isolados de virulência variável. O agente pode ser eliminado por *terapia*. A *transmissão da depressão-do-lenho dá-se exclusivamente pela enxertia e pela propagação clonal de tecidos*

infectados de copas e porta-enxertos. A exclusão de plantas afetadas visando à seleção de plantas-elite para a propagação exige análise criteriosa, pois, com o aumento da idade da planta, os sintomas tendem a desaparecer, como ocorre também com o lenho-mole. É relevante que essa disfunção tenha sido observada em pomares jovens na região de Caxias do Sul, RS (Fig. 13), o que mostra que ainda há matrizes contaminadas com o patógeno sendo propagadas.



Foto: Osmar Nickel.

Fig.13. Sintoma da depressão-do-lenho na cv. Royal Gala com 3 anos de idade.

Indexagem

A indexagem da depressão-do-lenho é feita por borbulhia na cv. Gravenstein ou por garfagem desta indicadora em planta-candidata. O tempo de incubação varia de cerca de 1 a *5 anos segundo a variedade e as condições de crescimento até o aparecimento das depressões locais.*

Ruga-verde

Em pomares de mais de 20 anos foram observados frutos com sintomas de ruga-verde. Os sintomas desenvolvem-se em frutinhas de cerca de 2 a 3 cm de diâmetro, ou 3 a 4 semanas pós-floração, na forma de pequenas depressões da casca, que se tornam mais profundas. O tecido abaixo das depressões é verde, de um tom mais escuro do que o do tecido que o circunda (Fig. 14).

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 pode reduzir substancialmente a produção e a armazenabilidade dos frutos.



Fig.14. Sintomas de ruga-verde em frutinhas da cv. Gala Standard.

Indexagem

A ruga-verde é indexada por garfagem nas cvs. Golden Delicious e Granny Smith ou de ramos destas em plantas doentes ou suspeitas. Os sintomas aparecem logo após a floração em forma de depressões verde-escuras na casca dos frutos (Fig. 14). O tempo de incubação é de 3 a 4 anos até a expressão de sintomas.

Rachadura-estrela

Embora ocorra raramente, a rachadura-estrela foi constatada em pomares velhos no Rio Grande do Sul. A natureza desta disfunção não é conhecida. O agente, transmissível pela enxertia, pode ser eliminado por termoterapia. Experimentos comprovaram a existência de isolados de virulência variável; os mais virulentos causam além da rachadura típica, distorção e redução do tamanho dos frutos (Fig. 15), redução do vigor, declínio e cancrios nas gemas.

Para a indexagem de vírus em frutos, além da sensibilidade, é relevante a precocidade no desenvolvimento de frutos da variedade-indicadora. A cv. Golden Delicious é indicada para detectar precocemente a rachadura-estrela. Dupla borbulhia de isolados severos induz necrose da casca de ramos e morte de ponteiros no primeiro ano na maioria das cultivares. Sintomas de rachaduras em frutos podem requerer um tempo de incubação de 2 a 4 anos após garfagem de ramos infectados em copas sadias.



Fig. 15. Sintomas de rachadura-estrela na cv. Gala Standard.

TESTES SEROLÓGICOS E MOLECULARES: INDEXAGEM EM LABORATÓRIO

O diagnóstico por meio da indexagem biológica, embora geralmente sensível e confiável, é um procedimento de longa duração e passível de ser

influenciado por uma série de fatores como suscetibilidade das indicadores, pela virulência e características biológicas dos isolados virais e pelas condições ambientais em que é executado, principalmente pela temperatura. É, portanto, um processo longo, trabalhoso e caro. Portanto, além da busca de indicadores que reajam em menor tempo, lança-se mão de instrumentos diagnósticos como os testes de laboratório, que, devem significar, especialmente no caso de indexagem de uma matriz livre-de-vírus destinada à certificação, uma complementação necessária e uma redução do tempo de testagem.

Entre os testes de laboratório mais usados, destacam-se os testes imunoenzimáticos (ELISA e variantes) para uso massal (grande número de amostras) e os testes moleculares baseados na PCR (reação da polimerase em cadeia e variantes).

O teste imunoenzimático ELISA (e variantes) é, atualmente, o mais amplamente utilizado e mais sensível teste serológico para detecção de doenças virais em fruteiras em geral. O teste é executado em placas de microtitulação ou membranas. Consiste, basicamente de se fazer reagir um extrato da amostra com um anticorpo específico (primário) que será detectado por um segundo anticorpo (secundário) ligado a uma enzima. Uma vez adicionado à mistura o substrato desta enzima, a reação positiva produzirá uma alteração de cor visível a olho nu (Fig. 16), mensurável no espectro de luz visível a 405 nm.

Apesar de algumas peculiaridades dos vírus em tecidos lenhosos (baixa concentração do vírus; acúmulo do vírus em certos tecidos; distribuição desuniforme do vírus no tecido) que podem dificultar o diagnóstico em certas estações do ano, o diagnóstico serológico apresenta-se como instrumento diagnóstico que possui indiscutíveis virtudes: simplicidade, possibilida-

de de execução em larga escala, baixo custo e alta sensibilidade, desde que executado adequadamente, considerando-se a época da colheita das amostras, tipo, idade, e posição do tecido na planta. Falsos positivos indicam, ocasionalmente, a necessidade de testes adicionais de confirmação. A recíproca é válida: isolados que infectam mas não produzem sintomas nas indicadores podem vir a ser detectados serologicamente, de forma que os métodos de detecção se complementam. Isto é especialmente necessário na produção de matrizes certificadas.



Foto: Thor V.M. Fajardo.

Fig. 16. Teste imunoenzimático ELISA em placa. Os poços de cor amarela mostram reações positivas. A primeira coluna à esquerda representa o "branco", poços sem amostras. Os controles positivo e negativo estão aleatoriamente distribuídos na placa.

Indexagem molecular

A PCR ou reação da polimerase em cadeia (e suas variações, p.ex. IC-PCR, amplificação precedida de imunocaptura das partículas virais com anticorpos específicos) é um método de detecção muito sensível que permite o diagnóstico de agentes virais, geralmente, desde que se conheça pelo menos parte da sequência de nucleotídeos do genoma viral. Consiste de duas fases. Na primeira, "iniciadores", pequenos fragmentos de DNA chamados oligonucleotídeos,

sintetizados com base naquela sequência, se pareiam com a fita de RNA viral e permitem o início da síntese de um DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa. Na segunda fase, a enzima polimerase de DNA, ou Taq (de *Thermus aquaticus*) DNA polimerase multiplica aquele DNA complementar em vários ciclos de amplificação. Os produtos deste processo de amplificação são em seguida separados por eletroforese (campo elétrico) num suporte gelatinoso solidificado (agarose), tingidos e visualizados sob luz ultravioleta (Fig. 17).

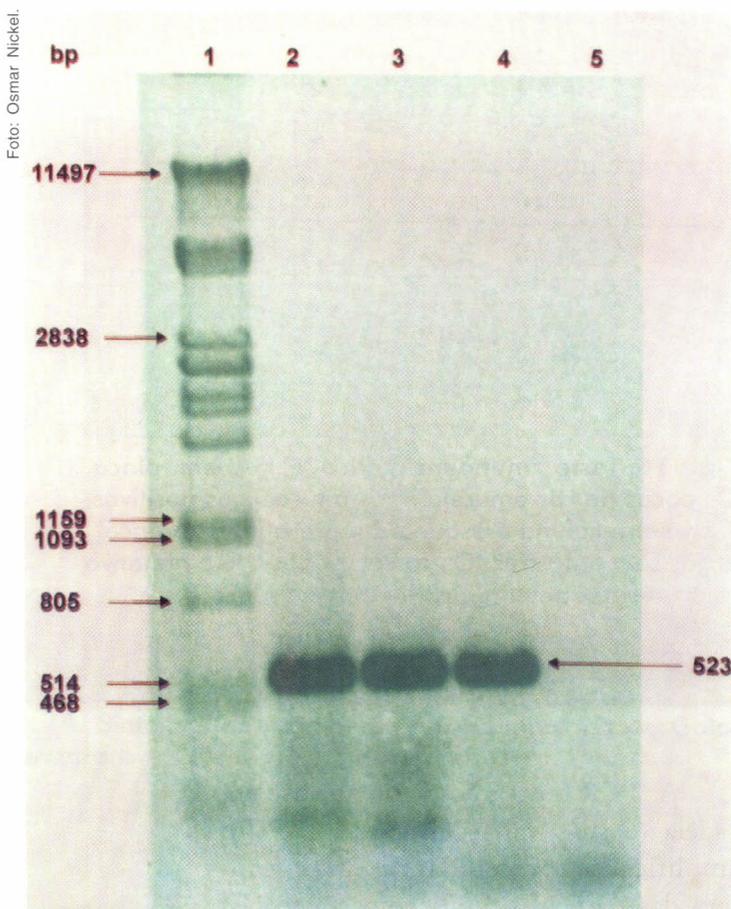


Fig. 17. Produtos da PCR separados por eletroforese em agarose 1.2%, visualização com luz ultravioleta: amostras 2, 3 e 4, ASGV, 4, controle sadio; 1, marcador molecular.

O advento da PCR aumentou a sensibilidade do diagnóstico e expandiu o período dos testes para os tecidos dormentes. O custo dos equipamentos e

dos reagentes e a necessidade de processamento do RNA viral com agentes desproteinizantes, enquanto ELISA e suas variantes usam seiva bruta ou clarificada, reduz muito a versatilidade da PCR para análises massais. Ambos métodos, entretanto, têm seu lugar no instrumentário de diagnóstico, e especialmente na limpeza clonal, formando um tripé com a indexagem biológica.

LIMPEZA CLONAL: PRODUÇÃO DE PLANTAS LIVRES DE VÍRUS

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

É comum não haver plantas livres de vírus de uma variedade ou clone de importância comercial passíveis de utilização para a obtenção de matrizes livres de vírus e sua propagação vegetativa. Estas têm 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 massal, b) termoterapia, e, c) por cultura de tecidos. A quimioterapia, geralmente é utilizada como acessório da cultura de tecidos. Na prática é comum a associação de métodos, visando ao aumento da eficácia do processo de limpeza. Para uma série de agentes virais há dados experimentais que comprovam um aumento substancial do número de plan-

tas livres de vírus obtidas de cultura de meristema, quando a planta doadora foi previamente submetida ao tratamento térmico.

Os procedimentos para eliminar vírus de plantas caracterizam ações de longa duração, seja pela termoterapia ou pela cultura de tecidos, pois envolvem além execução física de um e outro método, um série de etapas adicionais, como os testes ELISA, indexagem biológica, PCR, controle de autenticidade varietal e monitoramento periódico de matrizes.

Termoterapia e enxertia *in vivo* de ápices caulinares

O tratamento térmico com ar quente pratica-se hoje da mesma forma usada nos anos 60, quando estes trabalhos se iniciaram nos EUA e Europa.

Basicamente os procedimentos consistem das seguintes etapas. Após a escolha da variedade segundo critérios agrônômicos, pomológicos, fitossanitários e mercadológicos, a planta é preparada para o tratamento térmico. Isto acontece por garfagem da cultivar-candidata 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. Isto é pré-condição para o êxito da termoterapia, que não deixa de ser 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, segundo o vírus ou isolado. Alternativamente as plantas destinadas à termoterapia podem ser preparadas por borbulhia que é submetida diretamente ao tratamento. Tem-se então somente uma brotação. Como os brotos de borbulhia reagem sensivelmente às altas temperaturas, há que se

preparar um número maior de plantas, o que exige maior capacidade nas câmaras. Observa-se ainda que a soldadura de material infectado é bem pior na borbulhia que na garfagem.

Para o tratamento térmico utilizam-se desde câmaras de crescimento totalmente automatizadas até simples gabinetes de madeira com lâmpadas como fontes internas de calor. Sistemas mais desenvolvidos permitem manter a temperatura ambiente alta, enquanto baixam a temperatura das raízes por meio de um sistema separado de refrigeração. Câmaras de termoterapia devem preencher três requisitos básicos: que sejam controláveis, confiáveis e permitam exposição a temperaturas constantes. Nestas condições de temperatura o crescimento vegetativo da planta é mais rápido que a replicação e o movimento do vírus na planta. Como consequência os ápices laterais e apicais têm alta probabilidade de estarem livres de vírus (viróides não são, aparentemente, afetados pela termoterapia). Estes ápices são cortados e enxertados em cunha em porta-enxertos preparados simultaneamente (Fig. 18B). As plantas enxertadas são aclimatadas sob alta umidade ambiental neste período, cobertas com sacos plásticos ou frascos de vidro, trocados ou levantados à medida que a planta cresce. Quando o broto estiver crescendo vigorosamente, retira-se a cobertura, mas mantem-se as plântulas sob observação diária. Nesta fase não pode ocorrer desidratação. É relevante, entretanto, considerar-se a termo-sensibilidade específica dos vírus e de seus isolados, que determina a ordem de eliminação destes agentes. Grosso modo, ACLSV e ApMV são de fácil remoção pelo calor, ASPV-SED ocupa posição intermediária e ASGV, extremamente termoestável, geralmente não é eliminado pela termoterapia. Neste último, e em outros casos, a termoterapia é um ótimo pré-tratamento do material a ser submetido à cultura de meristemas.

Como o tratamento térmico não representa garantia de que todos os vírus foram eliminados, é procedimento-padrão a indexagem na sequência da enxertia de ápices caulinares. Novamente, aqui deve haver uma seleção dos métodos de diagnóstico (biológico, serológico e molecular), segundo o tipo e quantidade de tecido disponível, de forma a permitir a indexagem o mais precocemente possível. Não é exagero enfatizar a importância de temperaturas de 18°C a 22°C e de baixa luminosidade para otimizar a expressão de sintomas da maioria das indicadoras. No primeiro enfolhamento após o tratamento as plantas produzirão poucas gemas, assim que para a indexação biológica abrangente em várias indicadoras, o material só estará disponível em quantidade suficiente para todas inoculações após o segundo enfolhamento (cerca de 1 ano). Há que se considerar ainda após a termoterapia, que, caso não houve eliminação total dos vírus, certamente ocorreu uma forte redução na sua concentração, eventualmente inferior ao nível de detecção. Por estes motivos as séries completas de testes só podem começar no segundo período vegetativo pós-tratamento térmico, quando a concentração de vírus, porventura não eliminado, atingiu novamente níveis detectáveis. Estes testes se orientam por normas internacionais que determinam a escolha da indicadora. O mesmo fato determina a necessidade do monitoramento periódico de matrizes já indexadas.

Em regiões em que se estima que um considerável grau de limpeza clonal já foi atingido é possível fazer-se uma seleção de plantas-élite. Encurta-se então o procedimento, fazendo-se uma indexagem-piloto com ELISA para ACLSV na floração, o que dá uma idéia preliminar do estado de sanidade do material. Em caso negativo conclui-se a

indexagem completa em indicadoras lenhosas, ELISA e PCR para garantir que o material esteja livre dos outros principais vírus. Em caso positivo o material volta para a termoterapia. Considerando-se o início da indexação no 2º enfolhamento, estima-se a duração do processo de limpeza e indexagem de uma variedade de maçã em cerca de 5 a 6 anos. É relevante que o material livre de vírus seja disponibilizado somente para viveiros credenciados.

Cultura de tecidos *in vitro*

Entre os procedimentos para a eliminação de vírus de tecidos vegetais destacam-se a cultura de meristemas e a microenxertia. A cultura de meristemas já foi usada com êxito para eliminar um grande número de vírus de numerosas espécies de plantas.

A concentração de vírus em plantas se reduz na proximidade do meristema apical. Geralmente, no próprio meristema não há vírus. Este é o fundamento do uso deste tecido para limpeza clonal. Trata-se de um tecido ainda não diferenciado 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 a) iniciação de cultivo, b) proliferação e c) enraizamento, conforme procedimentos e protocolos já descritos. As plântulas são aclimatadas em casa de vegetação em condições similares às da câmara de crescimento (baixa luminosidade e alta umidade) por cerca de 45 a 60 dias, reduzindo-se gradativamente a umidade até que as plântulas tornem-se resistentes a condições naturais de luz e umidade (Fig.18A).

Neste estágio elas passam a receber tratamento-padrão para plantas de casa

de vegetação e são submetidas assim que possível aos primeiros testes de vírus, idênticos aos descritos para plantas oriundas da termoterapia. A micro-enxertia *in vitro* utiliza fragmentos de ápices um pouco maiores, enxertados em hipocótilos de plântulas (com cerca de duas semanas) decapitadas, germinadas *in vitro*. Em condições assépticas,

copa e hipocótilo se unem para formar uma planta de seis folhas em cerca de seis semanas. Estas são transferidas para um suporte estéril (vermiculita) e adaptadas gradativamente à umidade ambiente e então transplantadas para solo e mantidas em casa de vegetação, para posterior indexagem, como já descrito.



Fig. 18. Início fase de aclimação em casa de vegetação. Porta-enxertos Maruba-kaido oriundos de cultura de meristemas *in vitro* (A); enxerto *in vivo* de ápice caulinar oriundo de termoterapia (B).

5 REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. N.; BARBARA, D. J.; CLARK, M. F. An indirect ELISA using a single antiserum and a general purpose conjugate. *Acta Horticulturae*, v. 130, p. 179-182, 1982.
- AGNELLO, A.; KOVACH, J.; NYROP, J.; REISSIG, J.; WILCOX, W. **Simplified integrated management program: a guide for apple sampling procedures in New York.** 1991. (Cornell Cooperative Extension, IPM, n. 201 C).
- ALFORD, D. V. **A colour atlas of fruit pests, their recognition, biology and control.** London: Wolfe, 1984. 320 p.
- BAUMANN, G.; LOUIS, F. Untersuchungen an virusfreien und virusgetesteten M9-Klonen. *Obstbau*, v. 338, p. 599-600, 1980.
- BERTOLDI, L. H. M. **Flutuação populacional de Grapholita molesta (Busck, 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae) e alguns aspectos de sua bioecologia em pomar de pessegueiro.** 1988. 48 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1988.
- BERTON, O.; MELZER, R. **Sistema de alerta para o controle de sarna da macieira.** Florianópolis: Empasc, 1989. 75 p.
- BETTI, J. A.; MÜLLER, G. W. Melhor pegamento da borbulhia e maior crescimento observados para clones de macieira livrados de vírus por termoterapia. *Summa Phytopathologica*, v. 13, p. 25, 1987.
- BONETTI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y. Epidemiologia da mancha foliar de Gala. In: REUNIÃO ANUAL DE FITOSSANIDADE NA CULTURA DA MACIEIRA, 4., 1999, São Joaquim, SC. **Relatório.** São Joaquim: Epagri, 1999. p. 5.
- BONETTI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y.; GREINER, L. C. Efeito da mistura de fungicida curativo com fungicida protetor aplicado no sistema curativo sobre o controle da sarna da macieira. *Fitopatologia Brasileira*, v. 14, p. 263-268, 1989.
- BONETTI, J. I. da S.; RIBEIRO, L. G.; KATSURAYAMA, Y. **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira.** Florianópolis: Epagri, 1999. 149 p.
- BOTTON, M. **Bioecologia e controle de Bonagota cranaodes (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira.** 1999. 73 f. Tese (Doutorado) - ESALQ, USP, Piracicaba, 1999.
- CAMERON, H. R. Effects of viruses on deciduous fruit trees. *Horticultural Science*, v. 12, n. 5, p. 484-487, 1977.
- CAMPBELL, A. I.; BOULD, C. **Effects of latent viruses on growth of apples and pears under different nutritional regimes.** Long Ashton Research Station Report, 1974. 40 p.
- CAMPBELL, A. I.; SPARKS, J. Virus induced changes in the growth of pome fruit trees. *Acta Horticulturae*, v. 75, p. 123-132, 1977.
- CEREZINE, P. C.; LEITE, R. P.; TSUNETTA, M. Efeito de tratamentos químicos no controle da mancha foliar de Glomerella em macieira, no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*, v. 17, n. 3, p. 258-267, 1992.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v. 34, p. 475-483, 1977.
- COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil: lepidópteros, 1ª parte.** Rio de Janeiro: Escola Nacional de Agronomia, 1945. v. 5.
- DELMORE, L. R. K.; EIRAS, A. E.; VILELA, E. F.; KOVALESKI, A. Observações preliminares do ciclo biológico de Phtheochroa cranaodes (Lepidoptera: Tortricidae) em folhas de macieira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14., 1993, Piracicaba, SP. **Resumos.** Piracicaba: ESALQ-USP, 1993. p. 86.
- EIRAS, A. E.; DELMORE, L. R. K.; PARRA, J. R. P.; PIQUE, M. P. R.; VILELA, E. F.; KOVALESKI, A. Biologia comparada da lagarta-enroladeira Phtheochroa cranaodes Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae) em duas dietas artificiais. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 23, n. 2, p. 252-257, 1994.
- EIRAS, A. E.; KOVALESKI, A.; VILELA, E. F.; CHAMBON, J. P.; UNELIUS, C. R.; BORG-KARLSON, A. K.; LIBLIKAS, I.; MOZURAITIS, R.; BENGTSSON, M.; WITZGAL, P. Sex pheromone of the Brazilian apple leafroller, Bonagota cranaodes Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae). *Z. Naturforsch.*, v. 54c, p. 595-601, 1999.
- FORTES, J. F.; SALLES, L. A. B. **Guia de tratamentos fitossanitários para macieira.** Bento Gonçalves: Embrapa-UEPAE Cascata, 1982. 28 p. (Embrapa-UEPAE Cascata. Circular, 6).
- FREIRE, C. J. da S.; CAMELLATO, D.; CANTILLANO, R. F. F.; KOVALESKI, A.; FORTES, J. F. **A cultura da maçã.** Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 107 p. (Coleção Plantar, 19).
- FRIDLUND, P. R. Temperature effects on virus disease symptoms in some Prunus, Malus and Pyrus cultivars. *Washington Agricultural Experiment Station Bulletin*, n. 726, 1970. 6 p.

- FRIDLUND, P. R. The objectives and methods of the IR-2 virus-free deciduous fruit tree repository. **Horticultural Science**, v. 12, n. 5, p. 487-489, 1977.
- FUCHS, E. Serological detection of apple chlorotic leaf spot virus (CLSV) and apple stem grooving virus (SGV) in apple trees. **Acta Horticulturae**, v. 94, p. 69-73, 1980.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.
- GILLES, G. L.; VERHOYEN, M. **Viroses et maladies apparentées des arbres fruitiers et ornementaux; assainissement et selection**. Bruxelles, Belgique: Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, 1992. 166 p.
- GONZÁLEZ, R. H. **Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile**. Santiago: Universidad de Chile. 310 p.
- GRAVENA, S.; CORREIA, A. C. B.; YAMAMOTO, P. T.; MUNUERA, M. C. M.; SALVA, R. A. **Pantomorus & Naupactus: uma ameaça à fruticultura**. Jaboticabal: Funep, 1982. 9 p. (Funep. Boletim Técnico, 2).
- GRELMANN, E. O. **Exigências térmicas e estimativa do número de gerações de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae) em Pelotas, RS**. 1991. 43 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1991.
- HELM, H. H.; LÜDDERS, P. Einfluß der Nitraternahrung auf das vegetative Wachstum von Apfelbäumen mit unterschiedlichem Virusbefall. **Gartenbauwissenschaft**, v. 47, n. 3, p. 124-131, 1982.
- HOWELL, W. E.; MIN, G. I.; HURTT, S. S.; FOSTER, J. A.; POSTMAN, J. D. Select Malus clones for rapid detection of apple stem grooving virus. **Plant Disease**, v. 80, n. 10, p. 1200-1202, 1996.
- HUANG, S.-C.; MILLIKAN, D. F. In vitro micrografting of apple shoot tips. **Horticultural Science**, v. 15, n. 6, p. 741-743, 1980.
- INTERNATIONAL SOCIETY OF HORTICULTURAL SCIENCE. Detection of viruses and other graft-transmissible virus-like diseases of fruit trees. **Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 15, p. 407-413, 1980.
- JELKMANN, W. Apple stem pitting virus. In: VESELY, D.; MONETTE, P. (Ed.). **Recent research development in plant pathology: filamentous viruses of woody plants**. India: Research Signpost, 1997. p. 133-142.
- JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. (Ed.). **Compendium of apple and pear diseases**. St. Paul: APS Press, 1990. 100 p.
- JONES, A. L.; SUTTON, T. B. **Disease of tree fruits in the East**. Michigan: Michigan State University, 1996. p. 17-18.
- KATSURAYAMA, Y.; BONETTI, J. I. da S. Epidemiologia da mancha foliar da Gala. In: REUNIÃO ANUAL DE FITOSSANIDADE NA CULTURA DA MACIEIRA (1998/99), 4., 1999, São Joaquim, SC. **Relatório**. São Joaquim: Epagri, 1999. p. 5-8.
- 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**, v. 80, p. 616-621, 1996.
- KOVALESKI, A. **Aspectos biológicos e preferência para alimentação e oviposição de *Panonychus ulmi* (Koch, 1936) (Acari: Tetranychgudae) em cultivares de macieira**. 1988. 122 f. Tese (Mestrado) – ESALQ, USP, Piracicaba, 1988.
- KOVALESKI, A. Efeito residual de inseticidas sobre adultos do burrinho da macieira, *Asynonychus cervinus*. **HortiSul**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 33-35, 1994.
- KOVALESKI, A. Eficiência de inseticidas no controle da lagarta-enroladeira (*Phtheochroa cranaodes*), em condições de laboratório. **HortiSul**, Pelotas, v. 3, n. 2, p. 30-33, 1994.
- KOVALESKI, A. Manejo da lagarta-enroladeira *Phtheochroa cranaodes* (Meyrick) em pomares de macieira. In: ENCONTRO DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2., 1996, Vacaria, RS. **Anais**. Vacaria: UCS, 1996. p. 42-43.
- KOVALESKI, A. **Processos adaptativos na colonização da maçã (*Malus domestica* L.) por *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) na região de Vacaria, RS**. 1997. 122 f. Tese (Doutorado) – IB, USP, São Paulo, 1997.
- KOVALESKI, A. Tratamento de inverno para o controle de pragas da macieira. **HortiSul**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 21-23, 1989.
- KOVALESKI, A.; BOTTON, M. Manejo de lagartas na cultura da macieira. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2., 1999, Fraiburgo, SC. **Anais**. Fraiburgo: Epagri, 1999. p. 144-149.
- LANKES, C. Anbaumaterialverordnung löst Obstvirus-Verordnung ab. **Obstbau**, n. 7 p. 387-391, 1999.
- LEITE, G. B.; BLEICHER, J. Viroses e microplasmoses da macieira no Estado de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, v. 6, n. 3, p. 21-24, 1993.

- LEITE, R. P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A. Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná.** Curitiba: Iapar, 1988. 5 p. (Iapar. Informe de Pesquisa, 81).
- LEMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. **L'Arboriculture Fruitière**, v. 434, p. 38-48, 1990.
- LESSA, A. O.; CASTRO, L. A. S. de; DANIELS, J. Incidência do vírus da mancha clorótica das folhas da macieira em pomares de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 314, 1998.
- LORENZATO, D. Ensaio laboratorial de controle da "traça-da-maçã" *Phtheochroa cranaodes* Meyrick, 1937 com *Bacillus thuringiensis* Berliner e inseticidas químicos. **Agronomia Sul-Rio Grandense**, v. 20, n. 1, p. 157-163, 1984.
- MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Biologia de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae). II. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 40, p. 17-24, 1980.
- MEIJNEKE, C. A. R. Ideal schemes and associated problems in the production, maintenance, multiplication, distribution and certification of fruit crops. Report on a general discussion. **Acta Horticulturae**, v. 130, p. 29-31, 1982.
- MELZER, R. R.; BERTON, O. Incidência de *Botryosphaeria berengeria*, na cultura da macieira (*Malus domestica*) no Estado de Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 891-898, 1986.
- NEMETH, M. **Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of fruit trees.** Netherland: Verlag Martinus Nijhoff Publishers, Kluwer Academic Publishers Group, 1986.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the coat protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus and its survey in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 655-659, 2001.
- NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of apple stem grooving virus in Santa Catarina Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 444-446, 1999.
- OGAWA, J. M.; ENGLISH, H. **Diseases of temperate fruit and nutcrops.** Oakland, CA: University of California, Div. Agric. Nat. Resources, 1991. 461 p.
- ORTH, A. I.; RIBEIRO, L. G.; REIS FILHO, W. Manejo de pragas. In: EMPASC. **Manual da cultura da macieira.** Florianópolis, 1986. p. 341-379.
- PARRA, J. R. P.; EIRAS, A. E.; HADDAD, M. L.; VILELA, E. F.; KOVALESKI, A. Técnica de criação de *Phtheochroa cranaodes* Mleyrick (Lepidoptera: Tortricidae) em dieta artificial. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 4, p. 537-543, 1995.
- QUAK, F. Meristem culture and virus-free plants. In: APPLIED and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. New York: Springer Verlag, 1977. p. 598-615.
- RAMSDELL, D. C. Immunosorbent assays for detection of viruses infecting pome fruits. In: FRIDLUND, P. R. (Ed.). **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders.** Washington State Cooperative Extension, 1989. p. 266-272.
- RAZOWSKI, J. Descriptions of new tropical genera of Archipini and rectification of the Deltinea problem (Lepidoptera: Tortricidae). **Science and Naturae**, v. 52, p. 21-25, 1986.
- RIBEIRO, L. G. **Plano de amostragem de presença-ausência e ciclo de vida de *Panonychus ulmi* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae) em macieira *Malus domestica*.** 1988. 125 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1988.
- RICH, A. E. Influence of dapple apple and stem pitting viruses on tree growth and fruit yield over a fourteen year period. **Plant Disease Reporter**, v. 51, n. 4, p. 293-296, 1967.
- ROSENTHAL, M. D. **Viabilidade de dietas artificiais e naturais para criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae).** 1992. 59 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1992.
- SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana.** Pelotas: Embrapa-CPACT, 1995. 58 p.
- SALLES, L. A. B. **Moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wied.): bioecologia e controle.** Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1990. 16 p. (Embrapa-CNPFT. Documentos, 41).
- SALLES, L. A. B. Períodos de ataque e de controle da mosca-das-frutas em pessegueiro. **HortiSul**, v. 3, p. 47-51, 1994.
- SALLES, L. A. B.; KOVALESKI, A. Moscas-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **HortiSul**, v. 1, p. 5-9, 1990.
- SHI, Y.; CORREL, J. C.; GUERBER, J. C. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Southeastern United States. **Plant Disease**, v. 80, p. 692-696, 1996.
- SIEBERT, V. Z.; ENGELBRECHT, D. J. Field and glasshouse evaluation of *Pyronia veitchii* as na indicator of some apple latent viruses. **Phytophylactica**, v. 13, p. 199-201, 1981.
- SLINGERLAND, M. V. Codling moth in New England in 1750. **New York Agriculture Experiment Station Bulletin**, n. 142, p. 185-155, 1988.
- SOZO, J. **Estudos sobre a cultura da maçã no Rio Grande do Sul e perspectiva de crescimento.** Vacaria: Associação Gaúcha de Produtores de Maçã e Pera, 1992. 28 p.

- STOUFER, R. F.; FRIDLUND, P. R. Indexing using woody indicators. In: FRIDLUND, P. R. (Ed.). **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. Washington State Cooperative Extension, 1989. p. 255-264.
- TAYLOR, J. A necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by a strain of *Glomerella cingulata*. **Phytopathology**, v. 61, p. 221-224, 1971.
- UNELIUS, C. R.; EIRAS, A.; WITZGALLI, P.; BENGTTSSON, M.; KOVALESKI, A.; VILELA, E. F.; BORG-KARLSON, A. Identification and synthesis of the sex pheromone of *Phthorochroa cranaodes* (Lepidoptera: Tortricidae). **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 9, p. 1505-1508, 1996.
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Avaliação de fungicidas utilizados para o controle de *Venturia inaequalis* na cv. Gala em Vacaria, RS (1987-1991)**. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1993. 24 p. (Embrapa-CNPFT. Boletim de Pesquisa, 24).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Características e controle de *Glomerella cingulata* (C. gloeosporioides), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira - II**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1999. 16 p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica, 54).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Cancro europeu das pomáceas (*Nectria galligena*)**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1998. 16 p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica, 23).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. Controle de *Penicillium expansum* Link resistente aos benzimidazóis em maçãs frigorificadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 8, p. 31-34, 1986.
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Podridão de raízes de macieira: guia para diagnóstico**. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1988. 16 p. (Embrapa-CNPFT. Documentos, 32).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Podridões de maçãs frigorificadas, guia para diagnóstico**. Brasília: Embrapa-SPI, 1993. 20 p.
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M. **Recomendações para o controle pós-colheita das podridões de maçãs**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1996. 4 p. (Embrapa-CNPUV. Comunicado Técnico, 21).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; CANTILLANO, F. F. **Controle da podridão de maçãs causada por *Alternaria alternata***. Pelotas: Embrapa-CNPFT, 1987. 5 p. (Embrapa-CNPFT. Comunicado Técnico, 58).
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; HERTER, F.; BERNARDI, J. **Fogo bacteriano das pomáceas**. Bento Gonçalves: Embrapa-CNPUV, 1996. 12 p. (Embrapa-CNPUV. Circular Técnica, 21).
- VERMEULEN, J.; CICHON, L.; PARRA, E. **Sistema de alarma termoacumulativo para el control de carpocapsa (*Cydia pomonella* L.) para el Alto Valle del Río Negro y Neuquen**. INTA - Estación Experimental Agropecuária Alto Valle, 1988. 15 p.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E.; CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of General Virology**, v. 33, p. 163-167, 1976.
- YANASE, H. Studies on apple latent viruses in Japan: The association of apple topworking disease with apple latent viruses. **Bulletin Fruit Tree Research Station, Series C (Morioka)**, Japan, v. 1, p. 47-109, 1974.
- ZAHN, V. *Malus adstringens* cv. 'Hopa' - ein guter Indikator zum Nachweis des Apple chlorotic leafspot virus am Apfel. **Erwerbsobstbau**, v. 38, p. 107-110, 1996.
- ZAHN, V. **Nachweis und Identitätsbestimmungen von Virose bei Apfelbäumen**. 1995. 126 f. Tese (Doutorado) - Universidade Hannover, Hannover, 1995.
- ZIMMERMAN, R. H. Meristem tip culture of pome fruits. In: FRIDLUND, P. R. (Ed.). **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. Washington State Cooperative Extension, 1989. p. 278-283.