

# Diagnóstico Biológico e Molecular e Análise da Sequência de Nucleotídeos do Gene da Proteína Capsidial de um Isolado do *Apple stem pitting virus*

Paula Radaelli<sup>1\*</sup>, Osmar Nickel<sup>2</sup>, Jurema Schons<sup>1</sup>, Francisco J.L. Aragão<sup>3</sup> & Thor V. M. Fajardo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS; <sup>2</sup>Embrapa Uva e Vinho, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS, e-mail: nickel@cnpuv.embrapa.br; <sup>3</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900, Brasília, DF

(Aceito para publicação em 06/09/2005)

Autor para correspondência: Osmar Nickel

RADAELLI, P., NICKEL, O., SCHONS, J., ARAGÃO, F.J.L. & FAJARDO, T.V.M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da sequência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. Fitopatologia Brasileira 31:051-056. 2006.

## RESUMO

O *Apple stem pitting virus* (ASPV) foi detectado por RT-PCR em amostras de cultivares de pereiras européias (*Pyrus communis* L.) cvs. Starkrimson e Abate Fetel, e asiáticas (*P. pyrifolia* var. *culta*) cvs. Kousui e Housui coletadas no início do outono de 2003 em pomar da Estação Experimental da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS. Utilizando várias combinações de oligonucleotídeos, foram amplificados fragmentos de DNA de 269 e 1554 pb, este último contendo o gene completo (1131 nt) da proteína capsidial do ASPV. Outro fragmento amplificado de 291 pb compreende parte do gene da polimerase viral. Estes fragmentos constituem-se em um excelente instrumento de diagnóstico do ASPV em pereiras. A comparação das seqüências de nucleotídeos do gene da proteína capsidial do ASPV com seqüências do banco de dados GenBank, revelou identidades de 89% com seqüências de um isolado alemão de macieira e de 85 a 88% com isolados poloneses, de pereiras. A indicadora herbácea *Nicotiana occidentalis* cv. 37B, inoculada mecanicamente com extrato foliar da cv. Housui, apresentou lesões locais necróticas, necrose foliar marginal e das nervuras. O ASPV também foi detectado por dot-ELISA nas cvs. Abate Fetel e Kousui, na cv. Starkrimson por imunoblot, e em *Pyronia veitchii* (Trabut) Guill. por enxertia de borbulhas da cv. Abate Fetel infetada.

**Palavras-chave adicionais:** *Pyrus communis*, *P. pyrifolia*, *Malus* spp., *Flexiviridae*, ASPV, dot-ELISA, imunoblot, RT-PCR.

## ABSTRACT

**Biological and molecular diagnosis and nucleotide sequence analysis of the coat protein gene of an isolate of *Apple stem pitting virus***

*Apple stem pitting virus* (ASPV) was detected in samples of European pear (*Pyrus communis*) cvs. Starkrimson and Abate Fetel, and Asian pear (*P. pyrifolia* var. *culta*) cvs. Kousui and Housui. The samples were collected in the beginning of autumn 2003 at the Experimental Station of Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS. Using several combinations of primers, DNA fragments of 269 and 1554 bp were amplified, the latter containing the complete coat protein gene (1131 nt) of ASPV. Another amplified fragment of 291 bp comprised part of the viral polymerase gene. These fragments are excellent tools for the diagnosis of ASPV in pear. Comparison of the nucleotide sequences with sequences of the GenBank showed 89% identity with sequences from the German isolate of apple, and 85 to 88% with Polish isolates, both from pear. The herbaceous indicator *Nicotiana occidentalis* cv. 37B, mechanically inoculated with leaf extracts from cv. Housui, presented necrotic local lesions, marginal leaf necrosis and severe vein necrosis. ASPV was also detected by dot-ELISA in the cvs. Abate Fetel and Kousui, by immunoblot in the cv. Starkrimson and by indexing on *Pyronia veitchii*, graft-inoculated with buds of the infected cv. Abate Fetel.

**Additional keywords:** *Pyrus communis*, *P. pyrifolia*, *Malus* spp., *Flexiviridae*, ASPV, dot-ELISA, immunoblot, RT-PCR.

## INTRODUÇÃO

*Apple stem pitting virus* (ASPV), família *Flexiviridae*, gênero *Foveavirus*, ocorre na maioria das cultivares comerciais de macieiras (*Malus domestica* L.),

pereiras (*Pyrus communis* L.) e marmeleiros (*Cydonia oblonga* Mill.) em todas as regiões pomicultoras do mundo, geralmente em combinação com outros vírus. Possui partículas alongadas, filamentosas e flexuosas, de 12 a 15 nm de espessura e 800 nm de comprimento (Koganezawa & Yanase, 1990; 1992). O genoma é composto de RNA de fita simples, senso positivo, com 9306 nt e cinco fases abertas de leitura (ORF – *open reading frames*) (Jelkmann, 1994).

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade de Passo Fundo (2005).

As ORFs 1, 2-4 e 5 codificam, respectivamente, a polimerase de RNA, as proteínas do bloco triplo de genes encontrado tipicamente em vírus dos gêneros *Potexvirus* e *Carlavirus*, envolvidas no movimento célula-a-célula das partículas virais, e a proteína capsial (Jelkmann, 1994).

Por ser um vírus latente em macieiras, pereiras e marmeleiros, comum em cultivares comerciais, e por não produzir sintomas visualmente perceptíveis, pode passar despercebido e ser propagado indefinidamente, ocorrendo um alto grau de infecção nos materiais utilizados. Os danos consistem em redução de vigor das plantas, da qualidade dos frutos e da produtividade.

Diversos sintomas estão associados ao ASPV. Entre eles destacam-se as caneluras produzidas em cultivares suscetíveis de macieiras, como a cv. Virginia Crab; o amarelamento das nervuras, o empedramento dos frutos, e o mosqueado vermelho da pêra; a deformação dos frutos e as manchas anelares ferruginosas do marmelo; a epinastia e o declínio do Spy 227; e o descascamento e o nanismo de platycarpa, (Refatti & Osler, 1975; Stouffer, 1989; Cameron, 1989; Jelkmann, 1997; Paunovic & Rancovic, 1998; Schwarz & Jelkmann, 1998; Paunovic *et al.*, 1999).

Entre as indicadoras biológicas do ASPV, destacam-se cultivares de macieira e outras espécies do gênero *Malus*, *P. communis* e o híbrido *Pyronia veitchii* (Trabut) Guill.

A enxertia é o único meio pelo qual o ASPV é transmitido para plantas hospedeiras lenhosas. Transmissão experimental por inoculação mecânica foi obtida para *Nicotiana occidentalis* Wheeler cv. 37B (Van der Meer, 1986) e *N. occidentalis* Wheeler subsp. *obliqua* (Koganezawa & Yanase, 1990). Leone *et al.* (1995) demonstraram a retrotransmissão do vírus de *N. occidentalis* para macieiras e pereiras.

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de estabelecer o diagnóstico biológico, em plantas indicadoras, e molecular de isolados do ASPV em pereiras por meio de RT-PCR e efetuar a caracterização biológica e molecular parcial de um isolado do vírus.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem do material vegetal

Folhas e ramos das pereiras européias (*P. communis*) cvs. Starkrimson e Abate Fetel, e asiáticas (*P. pyrifolia* var. *culta* Burm.) cvs. Kousui e Housui foram coletadas na Estação Experimental da Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, no outono de 2003. A cultivar Pyrodwarf, um híbrido de *P. communis* ('Old Home' x 'Bonne Luise D'Avranches') oriunda de cultura de meristemas (cedida gentilmente por Antonio Oliveira Lessa, Epagri, Lages, SC), já avaliada anteriormente neste laboratório, foi utilizada em todo o experimento como controle negativo, livre de ASPV.

### Extração de ácidos nucléicos totais, síntese de cDNA e amplificação por PCR.

A extração de RNA total de folhas e cascas de ramos

foi realizada por adsorção de ácidos nucléicos totais em partículas de dióxido de silício (Boom *et al.*, 1990).

A reação de síntese de cDNA constituiu-se, para todas as amostras, de: 1 µl de RNA total, 9,6 µl de água, 28 unidades de inibidor de RNase (40 U/µl) e 10 µM de iniciador oligo dT. A mistura foi incubada por 10 min a 70 °C e 5 min no gelo. Posteriormente foram acrescentados 4 µl de tampão 5x da transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen), 10 mM de DTT, 2,5 mM de cada dNTP e 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e a 70 °C por 15 min.

Para a PCR foram preparados para cada amostra 50 µl da seguinte mistura de amplificação: 5 µl de tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM de cada dNTP, cinco unidades da polimerase de DNA de *Thermus aquaticus* (Ludwig Biotecnologia), 1 µl (10 µM) de iniciadores (0,2 µM de cada oligonucleotídeo) e 5 µl de cDNA. O volume foi completado para 50 µl com água esterilizada e deionizada. A mistura foi desnaturada a 95 °C por 10 min, seguidos de 35 ciclos de amplificação (1 min, desnaturação a 94 °C; 1 min, pareamento a 50 °C, 1 min, extensão a 72 °C), e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Foram utilizados os oligonucleotídeos ASPV1, ASPV2 (Malinowski *et al.*, 1998), ASPV3, ASPV4 e ASPV5 (Jelkmann, 1994) (Tabela 1).

A análise dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose 1,2%, preparado em tampão TBE pH 8,0. A banda correspondente a um dos fragmentos amplificados, de tamanho esperado de 1554 pb, obtida com os oligonucleotídeos ASPV3 e ASPV5, foi recortada do gel e o DNA foi eluído com o kit de purificação GFX (Amersham Biosciences) de acordo com as especificações do fabricante.

### Ligação do fragmento de 1554 pb ao vetor e transformação de *Escherichia coli*

Para a ligação do fragmento ao vetor de clonagem foram adicionados 5 µl do DNA purificado, 10 µl de tampão ligase 2X, 0,06 µg do vetor pGEM-T Easy (0,06 µg/µl) (Promega), cinco unidades de ligase de DNA de T4 (5 U/µl) (Promega) e 3 µl de água esterilizada deionizada. A reação foi incubada por 3 h a 15 °C. Foram transferidos 200 µl de células competentes de *E. coli* DH5α para tubo Eppendorf e adicionados 20 µl da reação de ligação. As células foram incubadas em gelo por 30 min e posteriormente a 42 °C por 90 s. A mistura foi imediatamente recolocada em gelo e foram adicionados 800 µl de meio de cultura LB. Após incubação por 1 h a 37 °C e centrifugação por 15 s, retiraram-se 800 µl do meio líquido, as células foram ressuspendidas no volume restante de 200 µl e plaqueadas em meio de cultura LB sólido com ampicilina (100 µg/ml), 40 µl de X-Gal (20 mg/ml) e 4 µl de IPTG (200 mg/ml) por placa. As colônias brancas, recombinantes, foram transferidas para tubos de ensaio com meio de cultura LB com ampicilina e incubadas com agitação de 120 rpm durante a noite a 37 °C.

### Extração e digestão de DNA plasmidial

O DNA plasmidial de clones transformados foi

extraído utilizando-se o kit FlexiPrep (Amersham Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A confirmação da presença de fragmento de ASPV nos plasmídeos recombinantes foi realizada por clivagem com a enzima de restrição *Eco* RI e visualização do fragmento em gel de agarose como mencionado anteriormente.

O clone recombinante foi seqüenciado e a seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos foi analisada e comparada com as seqüências do banco de dados GenBank, utilizando-se a função BLAST do NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov).

### Indexação Biológica

As cultivares Abate Fetel e Housui foram indexadas por borbulhas em duas indicadoras, a pêra européia cv. Beurrée Hardy e o híbrido *P. veitchii*, ambas enxertadas no porta-enxerto *P. calleryana* (Decaisne) com três repetições por tratamento. As plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação.

Folhas das pereiras européias cvs. Starkrimson e Abate Fetel, e asiáticas cvs. Kousui e Housui, suspeitas de estarem infetadas com o ASPV, foram maceradas em tampão fosfato de potássio 0,01 M e nicotina 2,5%, pH 7,5. Para a tentativa de transmissão experimental do ASPV, o extrato foi inoculado mecanicamente em folhas primárias de *N. occidentalis*, *N. occidentalis* var. *obliqua* e *N. occidentalis* 37B, com três repetições por tratamento. A RT-PCR foi executada conforme descrito acima com os oligonucleotídeos ASPV1 e ASPV2.

### Dot-ELISA e imunoblot

Para o dot-ELISA utilizaram-se como antígeno extratos de cascas de ramos e de folhas de pereiras cvs. Abate Fetel e Kousui, e *P. veitchii* usada na indexagem de ASPV, enxertada com gemas da cv. Abate Fetel.

As amostras foram maceradas em tampão TBS, pH 7,5 com sulfito de sódio a 0,2% (p/v), na proporção 1:5, e aplicados 20 µl sobre membrana de nitrocelulose. A seguir a membrana foi mergulhada em solução bloqueadora [TBS, pH 7,5, Triton X-100 a 2% (v/v), leite em pó desnatado (LPD) a 2% (p/v)] por 1 h sob agitação lenta. A membrana foi tratada com 10 µl de anti-soro contra ASPV (gentilmente doado por L. A. Suíta de Castro, Embrapa Clima Temperado,

Pelotas, RS) diluído em TBS com LPD a 2% (p/v) por 16 h sob agitação, lavada em TBS com Tween 20 a 0,05% (v/v) sob agitação forte e incubada por 1 h com adição de 10 µl do conjugado universal anti-IgG (Sigma), diluído em TBS com LPD a 2% (p/v). Em seguida, procedeu-se a nova lavagem da membrana e a revelação foi realizada com a adição dos substratos NBT e BCIP (Sigma) (Fajardo *et al.*, 2000). Para o imunoblot as membranas receberam idêntico tratamento, exceto que as proteínas totais separadas em géis descontínuos de poli(acrilamida com SDS (3,8%/12%, 90 min/120V) foram transferidas por eletroforese (1 h/80 V) para membranas de nitrocelulose. Utilizou-se o anti-soro ASPV 647 contra a CP do isolado PA66 (cedido gentilmente por W. Jelkmann, Agência Federal Biológica, Alemanha).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os oligonucleotídeos ASPV4 e ASPV5 foi amplificado um fragmento de 269 pb (Figura 1A) de extratos foliares das quatro cultivares de pereira testadas. Esses oligonucleotídeos representam, portanto um excelente instrumento para detecção do ASPV. A partir deste resultado, as amostras que permitiram a amplificação deste fragmento com este par de oligonucleotídeos passaram a ser utilizadas como controle positivo da infecção por ASPV. A combinação dos oligonucleotídeos ASPV3 e ASPV5 resultou na amplificação de um fragmento de 1554 pb (Figura 1B), contendo o gene completo da proteína capsial (CP), o qual foi clonado, seqüenciado e a seqüência obtida depositada no banco de dados Genbank sob número de acesso AY572458.

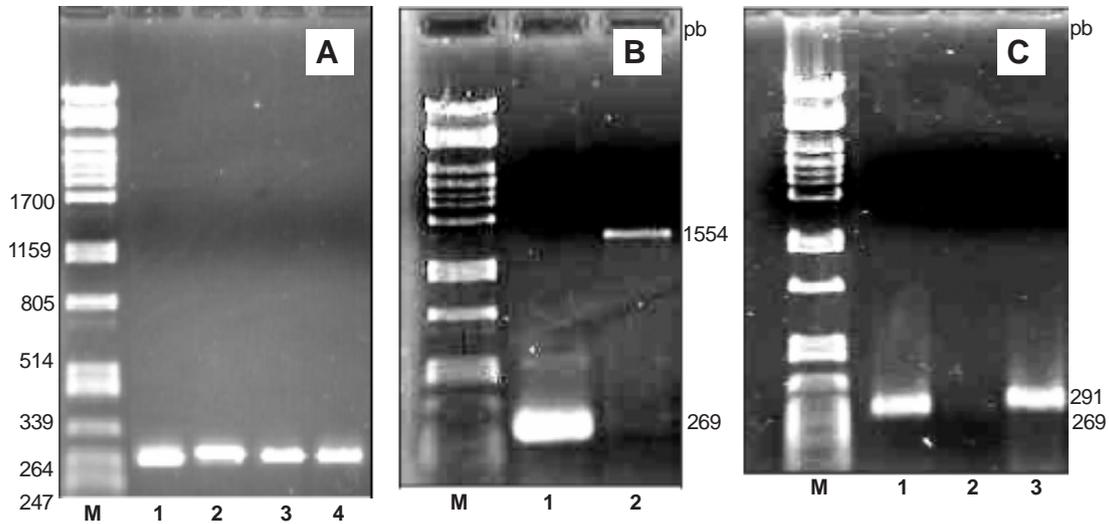
Dos extratos foliares de *N. occidentalis* 37B inoculada mecanicamente com extrato foliar de pereiras infetadas amplificou-se um fragmento de 291 pb (Figura 1C) utilizando-se os oligonucleotídeos ASPV1 e ASPV2, que contém parte do gene da polimerase viral.

A maior identidade de nucleotídeos do isolado de ASPV (89%) foi observada com um isolado alemão (D21829) e a menor (85%) com isolados poloneses (AF345893 e AF345894). A maior identidade de aminoácidos deduzidos foi de 84% com dois isolados poloneses de pereira (AAK30563 e AAK30566) e a menor identidade foi de 75% com dois isolados alemães (BAA04852 e BAA04853). Foi possível,

**TABELA 1** - Oligonucleotídeos usados para detecção do isolado BR1 do *Apple stem pitting virus*, posição no genoma e tamanho esperado dos fragmentos

| Nome (Sigla) | Seqüência 5' - 3'      | Posição no genoma | Orientação   | Tamanho esperado    |
|--------------|------------------------|-------------------|--------------|---------------------|
| ASPV1        | AGCGGTTGCCTATTTTTGCTCC | 3480-3501         | Complementar | 291pb <sup>1</sup>  |
| ASPV2        | GTCAGGTCAAAGATGCTGAAA  | 3750-3770         | Reverso      |                     |
| ASPV3        | GTACATGAGTAACTCGAGCC   | 7709-7728         | Complementar | 1554pb <sup>2</sup> |
| ASPV4        | CTCTTGAACCAGCTGATGGC   | 8993-9012         | Complementar | 269pb <sup>3</sup>  |
| ASPV5        | ATAGCCGCCCGGTTAGGTT    | 9243-9262         | Reverso      |                     |

<sup>1</sup>combinação: ASPV1 e ASPV2. <sup>2</sup>combinação: ASPV3 e ASPV5. <sup>3</sup>combinação: ASPV4 e ASPV5.



**FIG. 1** - Análise de produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de agarose 1,2%. (M) DNA $\lambda$ /PstI. **A)** Iniciadores *Apple stem pitting virus* (ASPV) 4 e 5: **1-** cv. Starkrimson; **2-** cv. Abate Fetel; **3-** cv. Kousui; **4-** cv. Housui; **B)** Iniciadores ASPV 3 e 5: **1-** Controle infetado, cv. Housui; **2-** cv. Abate Fetel. **C)** Iniciadores ASPV 1 e 2: **1-** Controle infetado, cv. Housui; **2-** controle sadio, cv. Pyrodwarf; **3-** *Nicotiana occidentalis* 37B.

na análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos, associar esse clone a outros isolados do mesmo vírus (Tabela 2), confirmando a identificação do isolado como ASPV. Como regra geral, espécies na família *Flexiviridae* têm entre seus genes completos de CP e polimerase, identidade de  $\geq 72\%$  de nucleotídeos e  $\geq 80\%$  de aminoácidos. Espécies de gêneros diferentes têm menos de 40% de identidade de nucleotídeos e de aminoácidos (Adams *et al.*, 2004).

O alinhamento da seqüência obtida do isolado brasileiro com as seqüências dos isolados alemães e poloneses revelou uma diferença no tamanho do gene de CP quando comparado com os isolados alemães, não diferindo substancialmente dos isolados poloneses. Os dois isolados alemães (CP de 1244 nt) apresentam duas regiões diferentes no gene CP, uma com deleção e outra com inserção de aproximadamente 100 nucleotídeos. Mesmo assim, o isolado brasileiro apresentou alta identidade (89%) com o isolado alemão. Malinowski (1998) também verificou essa diferença dos isolados poloneses (CP de 1124 a 1128 nt) em relação aos isolados alemães. Não estão elucidadas nem a causa nem o efeito dessas mutações, merecendo o assunto, portanto, estudos adicionais.

Embora pela análise das seqüências os valores de identidade sejam suficientemente altos para permitir que se determine com segurança a identidade do vírus encontrado nas amostras analisadas, a variação apresentada pode ser explicada pela variabilidade natural existente entre isolados de uma mesma espécie ou isolado viral, especialmente significativa nesta espécie. Nas condições brasileiras ainda é desconhecida a variabilidade do ASPV. Por diferir das condições climáticas de outras regiões do mundo, a pressão de seleção no Brasil poderia produzir variantes distintas

daquelas encontradas em outras regiões.

Nas tentativas de transmissão mecânica, de 36 plantas inoculadas com extrato foliar da cv. Housui, somente uma planta foi infetada. A infecção pelo ASPV caracterizou-se por forte amarelamento, seguido de necrose de nervuras de toda a folha e lesões locais necróticas, além de necrose das extremidades apicais e laterais da lâmina foliar de *N. occidentalis* 37B. A necrose sistêmica de nervuras não foi relatada para os isolados do hemisfério norte, facilmente transmissíveis pela via mecânica (Van der Meer, 1986; Van Dijk *et al.*, 1987; Koganeza & Yanase, 1990; Leone *et al.*, 1995; Jelkmann, 1997). O isolado ASPV BR1, aqui descrito, apresenta, portanto, comportamento biológico diferente. Sua transmissão mecânica foi difícil, o que confirma diferenças biológicas entre isolados de diferentes regiões geográficas já relatadas (Pilotti *et al.*, 1995). Assim, pode-se considerar adequado o uso de *N. occidentalis* 37B para o diagnóstico de isolados de ASPV do sul do Brasil, como complemento à indexagem do vírus em indicadores lenhosas.

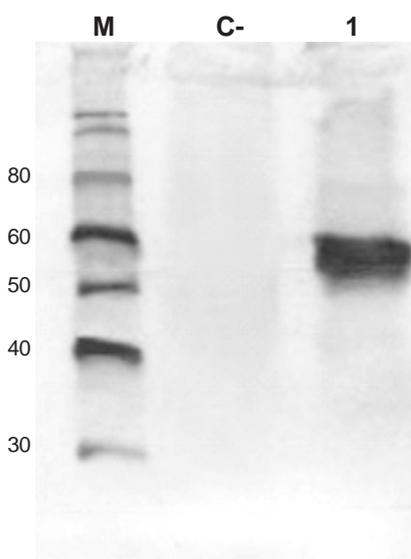
Das duas espécies lenhosas indexadas, somente *P. veitchii* desenvolveu sintomas da infecção pelo ASPV, constituídos de manchas cloróticas nos espaços entre as nervuras secundárias, lesões locais necróticas, anéis e meios-anéis cloróticos e bandeamento clorótico de pouca extensão de nervuras secundárias.

O dot-ELISA revelou-se um teste sensível e confiável para a detecção do ASPV em todas as cultivares e tecidos analisados, cujos resultados foram confirmados pela PCR. As manchas roxas-rosadas das amostras infetadas contrastam fortemente com o amarelo-esverdeado do controle sadio (não mostrado). O imunoblot detectou uma forte reação positiva e específica dos anticorpos produzidos contra um isolado alemão do ASPV com uma proteína de

**TABELA 2** - Comparação de identidade (%) das seqüências de nucleotídeos (diagonal superior) e de aminoácidos deduzidos (diagonal inferior) do gene da proteína capsial do *Apple stem pitting virus* BR1 com as respectivas seqüências de isolados disponíveis em bancos de dados

| Isolado Viral | Brasil  | Alemanha |           | Polônia       |           |           |
|---------------|---------|----------|-----------|---------------|-----------|-----------|
|               | Br1 (1) | Pa66 (2) | PSA H (3) | GNKVII 34 (4) | St132 (5) | St113 (6) |
| BR1           |         | 89%      | 88%       | 85%           | 85%       | 88%       |
| PA66          | 75%     |          | 99%       | 80%           | 88%       | 91%       |
| PSA-H         | 75%     | 89%      |           | 80%           | 88%       | 90%       |
| GNKVII/34     | 84%     | 76%      | 83%       |               | 81%       | 82%       |
| ST132         | 82%     | 76%      | 76%       | 74%           |           | 92%       |
| ST113         | 84%     | 76%      | 78%       | 74%           | 89%       |           |

Números de acesso no GenBank : (1) AY572458/AA578637; (2) D21829/BAA04853; (3) D21828/BAA04852, (4) AF345893/AAK30563; (5) AF345894/AAK30565; (6) AF345895/AAK30566; (1), (3), (4), (5) e (6) de pêra; (2) de maçã.



**FIG. 2** - Análise por western blot. **M**- Marcador molecular, em kDa (Invitrogen). **C-** *Pyrus communis* (controle negativo) cv. Pyrodwarf sadia (folha), **1**- cv. Starkrimson (casca de ramos).

cerca de 55 kDa (Figura 2). Jelkmann (1994) e Koganezawa & Yanase (1990) observaram uma proteína de 48 kDa correspondendo à proteína capsial em folhas de *N. occidentalis* inoculada com ASPV. Apesar da diferença entre o tamanho previsto segundo cálculo computacional de 44 kDa, deduzido da seqüência de aminoácidos da subunidade protéica do ASPV e os valores observados em western blot, os autores consideram-nos compatíveis. Similarmente ao que se constata no presente estudo, a diferença entre o valor calculado e o observado foi atribuída à alta hidrofobicidade da proteína capsial de ASPV, a exemplo de discrepância similar já observada com a proteína capsial de *Shallot virus X* (ShVX), família *Flexiviridae* gênero *Allexivirus*, sugerida por Kanyuka *et al.* (1992), que determina um aumento aparente do tamanho da molécula em consequência de uma redução da mobilidade eletroforética. As mutações do ASPV mencionadas acima não afetaram, aparentemente,

determinantes antigênicos, uma vez que o ASPV BR1 reagiu positivamente com ambos os anti-soros produzidos contra isolados europeus em dot-ELISA e imunoblot.

A implementação de testes diagnósticos biológicos, sorológicos e moleculares demonstrada neste trabalho apresenta relevância para a detecção do ASPV em *Malus* sp., *Pyrus* sp., *Pyronia* sp., *Cydonia* sp. e hospedeiros experimentais, permitindo a indexagem segura de plantas, de maneira a evitar a disseminação do ASPV em materiais propagativos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Marcos F. Vanni pelo excelente suporte técnico, ao pesquisador João Bernardi pela coleta e envio das amostras analisadas, à FINEP e à Embrapa Uva e Vinho, pela bolsa concedida à primeira autora.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.J., ANTONIW, J.F., BAR-JOSEPH, M., BRUNT, A.A., CANDRESSE, T., FOSTER, G.D., MARTELLI, G.P., MILNE, R.G. & FAUQUET, C.M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149:1045-1060. 2004.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM VAN DILLEN, P.M.E. & VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28:495-503. 1990.
- CAMERON, H.R. Pear vein yellows. In: Fridlund, P.R. (Ed.) *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics. Washington State University. 1989. pp. 175-179.
- FAJARDO, T.V.M., KUHN, G.B., EIRAS, M. & NICKEL, O. Caracterização parcial de um isolado de *Grapevine fanleaf virus*. *Fitopatologia Brasileira* 25:505-511. 2000.
- JELKMANN, W. Nucleotide sequences of *Apple stem pitting virus* and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with

- potex- and carlaviruses. *Journal of General Virology* 75:1535-1542. 1994.
- JELKMANN, W. Apple stem pitting virus. In: D. Vesely & P. Monette (Eds.) *Recent Research Development in Plant Pathology – filamentous viruses of woody plants*. Trivandrum 695.008, India, 1997. capítulo 12, pp.133-142.
- KANYUKA, K.V., VISHNICHENKO V.K., LEVAY K.E., KONDRIKOV, D.Y.U., RYABOV, E.V. & ZAVRIEV, S.K. Nucleotide sequence of shallot virus X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistrons. *Journal of General Virology* 73:2553-2560. 1992.
- KOGANEZAWA, H. & YANASE, H. A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74:610-614. 1990.
- KOGANEZAWA, H. 1992. Apple stem pitting virus. *Plant viruses online: Descriptions and list from the VIDE Database*. Disponível em: <http://image.fs.uidaho.edu/vide.descr027.htm>. Acesso em: 02/10/2003.
- LEONE, G., LINDNER, J.L., JONGEDIJK, G. & VAN DER MEER, F.A. Back transmission of a virus associated with apple stem pitting and pear vein yellows, from *Nicotiana occidentalis* to apple and pear indicators. *Acta Horticulture* 386:72-77. 1995.
- MALINOWSKI, T., KOMOROWSKA, B., GOLIS, T. & ZAWADZKA, B. Detection of apple stem pitting virus and pear vein yellows virus using reverse transcription – polymerase chain reaction. *Acta Horticulture* 472:87-95. 1998.
- PAUNOVIC, S. & RANKOVIC, M. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. *Acta Horticulture* 472:125-133. 1998.
- PAUNOVIC, S., MAKSIMOVIC, V., RANKOVIC & S. RADOVIC. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Württemberg. *Journal of Phytopathology* 147:695-700. 1999.
- PILOTTI, M., FAGGIOLI, F. & BARBA, M. Characterization of Italian isolates of pear vein yellows virus. *Acta Horticulturae* 386:142-154. 1995.
- REFFATI, E. & OSLER, R. Possible relationships among pome fruit viruses detected in graft transmission trials. *Acta Horticulture* 44:201-208. 1975.
- SCHWARZ, K. & JELKMANN, W. Detection and characterization of European apple stem pitting virus sources from apple and pear by PCR and parcial sequence analysis. *Acta Horticulturae* 472:75-83. 1998.
- STOUFFER, R.F. Apple stem pitting. In: Friedlund, P.R. (Ed.) *Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders*. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics. Washington State University. 1989. pp.138-144.
- VAN der MEER, F.A. Observations on the etiology of some virus diseases of apple and pear. *Acta Horticulture* 193:73-74. 1986.
- VAN DIJK, P., VAN DER MEER, F.A. & PIRON, P.G.M. Accessions of Australian *Nicotiana* species suitable as indicator hosts in the diagnosis of plant virus diseases. *Netherlands Journal Plant Pathology* 93:73-85. 1987.