

Produção de material básico livre de vírus para viveiros de macieiras



Osmar Nickel¹
Thor Vinícius Martins Fajardo²

1. INTRODUÇÃO

O trabalho de limpeza clonal ou remoção de infecções virais de clones comerciais de copas e porta-enxertos de macieiras reveste-se de grande importância para a pomicultura brasileira em vários sentidos. Observa-se uma mudança profunda de consciência por parte de consumidores e produtores sobre doenças de plantas em geral e seu controle. Vírus são agentes causadores de danos às plantas e, portanto, geradores de perdas financeiras.

Os principais países produtores de maçãs na Europa e nos Estados Unidos determinam que a implantação de pomares deve ser feita com mudas certificadas livres de vírus. No Brasil, a legislação recente de produção de mudas acompanha esta tomada de consciência e mudança de paradigma. Afinal, quando se fala em agricultura de precisão faz-se necessário excluir do processo de produção os fatores que afetam negativamente a planta. As alterações fisiológicas causadas por vírus em plantas são por demais conhecidas. Daí a necessidade de se obter clones livres de vírus de cultivares relevantes e mantê-los separadamente como fontes identificáveis de material de propagação livres de vírus. Clones livres de vírus são necessários para: 1. melhorar o desempenho e a qualidade do material propagativo comercial 2. evitar resultados científicos errôneos; 3. criar padrões para todo tipo de experimentação científica com macieiras e programas de avaliação.

Os variados efeitos nocivos dos vírus à produção e à qualidade das maçãs e o desenvolvimento de considerável consciência ambiental da parte de produtores e consumidores sublinham a necessidade de produção e uso de material propagativo livre de vírus para produtores e viveiristas. Se junta a isto a conformidade com diretrizes legais para a produção de mudas de fruteiras em geral, assim como para a elevação do patamar tecnológico da produção de mudas e frutas no país. Macieiras são infectadas por um grande número de vírus entre os quais se destacam os vírus latentes em cultivares comerciais como “vírus da mancha clorótica da macieira” (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV), “vírus das caneluras do tronco da macieira”

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

² Eng. Agrônomo, Pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, CEP 95700-000, Bento Gonçalves, RS. E-mail: thor@cnpuv.embrapa.br

(*Apple stem pitting virus*, ASPV) e o “vírus do acanalamento do tronco da macieira” (*Apple stem grooving virus*, ASGV) (LESSA et al., 1998; NICKEL et al., 2001; RADAELLI et al., 2004, 2006). Outros agentes, ainda pouco caracterizados, são o “descascamento de platycarpa” (inglês: platycarpa scaly bark) e o “nanismo de platycarpa” (inglês: platycarpa dwarf), o primeiro detectado por indexagem biológica em clones de macieiras oriundos de RS e SC (CRESTANI, 2000). Várias disfunções de relevância econômica e a “epinastia e declínio” da cv. Spy 227 são causados por ASPV (PAUNOVIC et al., 1999; PAUNOVIC; RANKOVIC, 1998). Por não produzirem sintomas visualmente perceptíveis na maioria das cultivares comerciais de macieiras, os vírus “latentes” podem passar despercebidos e serem propagados indefinidamente. Infecções complexas de vírus latentes são comuns no sul do Brasil (NICKEL et al., 2001). ACLSV foi detectado só ou em complexo com ASGV em 92% das 24 cultivares testadas (KNAPP et al., 1995). Um segundo grupo, cuja infecção pode ser visível, inclui o “vírus do mosaico da macieira” (*Apple mosaic virus*, ApMV). O ApMV é um patógeno cosmopolita transmissível por pólen, ao contrário dos vírus latentes, transmissíveis exclusivamente pela enxertia. Outros agentes neste grupo são a “depressão do lenho” (inglês: flat limb), “casca áspera do fruto” (inglês: apple rough skin), “ruga verde” (inglês: green crinkle), e “rachadura-estrela” (inglês: star crack) de natureza desconhecida ou causados por viróides e, geralmente, removíveis por termoterapia (HOWELL et al., 1998), todos já observados na região sul do Brasil (NICKEL et al., 2001; NICKEL, 2004).

Os vírus afetam a produção e a qualidade dos frutos, o desenvolvimento de mudas e a longevidade do pomar (LEMOINE, 1990), podendo ainda induzir deformações, acelerar a maturação, e provocar alterações fisiológicas em frutos, aumentando a suscetibilidade a outros patógenos. 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, ramos e em raízes da macieira. A invasão dos tecidos da macieira por estes agentes é sistêmica, porém, geralmente, desuniforme. Infecções complexas, i.é, simultâneas por mais de um vírus, são comuns.

No Brasil a publicação da Lei 10.711 (2003) e do Decreto 5.153 (2004) que a regulamenta, definiram parâmetros de qualidade para mudas. Embora o conceito “livre de vírus” não tenha sido absorvido por estes marcos regulatórios, normas subsequentes prevêm que deve ser garantida por produtores e comerciantes de mudas, não somente a identidade genética ou varietal, mas também a sanidade.

O objetivo do presente projeto foi obter material pré-básico de cultivares comerciais de macieiras livres de vírus latentes e do vírus do mosaico da macieira por eliminação de vírus via termoterapia *in vivo*, quimioterapia e cultura de tecidos *in vitro*. A avaliação da sanidade do material propagativo obtido foi efetuada por testes moleculares, sorológicos, imunoeletróforéticos e por indexagem biológica em plantas indicadoras lenhosas. A terminologia “livre de vírus” aplicou-se no sentido de que os materiais produzidos são livres dos vírus de macieiras ASGV, ACLSV, ASPV e ApMV com as restrições e as condições experimentais mencionadas no texto. Estes procedimentos levam a materiais que são qualitativamente superiores em termos de

sanidade, produtividade e longevidade e representam um avanço tecnológico. A observação de que certas infecções virais em Maxi Gala provocam maior suscetibilidade a patógenos fúngicos (manchas foliares e podridões de frutos) levou à condução de experimentos de caráter preliminar, cujos resultados serão abordados, sem detalhamento metodológico, na discussão de resultados.

2. METODOLOGIA

2.1. Termoterapia

Cultivares: Ao longo do projeto foram tratadas para remoção de vírus as cvs. Fuji Suprema M095 (número de acesso clonal, Embrapa), Fuji Standard M078, Fuji Select M184, Fuji More M182, Mishima M191, Imperial Gala M059/183, Royal Gala M073 e M053, MaxiGala M163/180, Galaxy M181 e Cripps Pink M075 e M080 e os porta-enxertos M9 M072, M7 M097, M26, M106 e Maruba-kaido (vários acessos). Do tratamento térmico foram obtidos explantes para quimioterapia *in vitro* e cultivo *in vivo* de brotações apicais e laterais e cultivo *in vitro* de meristemas.

Foram escolhidas as cultivares, segundo critérios agrônômicos, pomológicos, fitossanitários e mercadológicos e as plantas foram preparadas para o tratamento térmico por garfagem da cultivar-candidata, geralmente, em porta-enxertos de semente. Um bom enraizamento de não menos de seis meses foi observado para a sobrevivência das plantas em termoterapia. Foram feitos poda severa, boa fertilização e suprimento de água, para forçar nova brotação sob temperaturas que variaram de 36 a 38° C por cerca de quatro a seis semanas. Foi utilizada câmara de crescimento semi-automatizada para manutenção de temperatura. A umidade relativa do ar de cerca de 40%, adequada para este tratamento, foi atingida pela molhamento manual das plantas.

2.2. Cultivo *in vivo* de brotações emitidas sob calor

As brotações obtidas sob tratamento térmico chamadas “termonúmeros” (TN) foram enxertadas em porta-enxertos de semente (4 – 5 mm de espessura), cobertas com sacos plásticos para manutenção de atmosfera de alta umidade e aclimatadas em estufa (Figura 1) e desenvolveram-se por 8-10 meses até a primeira análise de sanidade por indexagem biológica. O número TN acompanha as plantas até a conclusão da avaliação de sanidade, que constatada, confere à planta a denominação “material pré-básico”.



Figura 1: Enxertia de brotações emitidas sob calor, em câmara úmida para desenvolvimento cerca de 30 dias após a termoterapia.

A clássica termoterapia convencional ou *in vivo* fez contribuição substancial para a pomicultura mundial, mas além de ser um processo longo, trabalhoso e, portanto, caro, tem várias restrições como espaço limitado nas câmaras, condições não-estéreis favoráveis à incidência de pragas e doenças, e a preparação das plantas consome muito tempo. Mais promissor é o seu uso *in vitro*, associado ou não à cultura de meristemas ou à quimioterapia (KNAPP et al., 1995; JAMES et al., 1997).

2.3. Quimioterapia e Cultivo *in vitro* de tecidos e meristemas

Na sequência da termoterapia e obtenção de quantidade suficiente de tecido para avaliação de sanidade optou-se por estabelecer um lote de cultivares *in vitro* com o objetivo de propagar, executar a remoção de vírus por quimioterapia e fazer o diagnóstico em tecidos de cultivo *in vitro*.

Foram estabelecidos *in vitro* diversos acessos das cvs. Maxi Gala, Galaxy, Imperial Gala, Royal Gala, Castel Gala, Baigent, Fuji Suprema, Fuji Standard, Fuji More, Fuji Select, Mishima, Cripps Pink e Hatsuaki, com e sem vírus, num total de cerca de 180 plantas *in vitro*, que podem ser rapidamente incorporados em experimentos de limpeza clonal e propagação. Este procedimento visou um encurtamento do tempo necessário para a obtenção de tecidos livres de vírus. O cultivo para multiplicação *in vitro* foi feito em meio (MS) Murashige e Skoog (1962), com alterações para as diversas fases do desenvolvimento.

Quimioterapia. Para avaliar a eficácia de ribavirina como agente antiviral na remoção de vírus latentes de macieiras, foram conduzidos experimentos-piloto. Duas cultivares foram utilizadas, Royal Gala M073 infectada com ACLSV e Cripps Pink

M080 infectada com ACLSV e ASPV, estabelecidas *in vitro*, em meio de cultura MS, suplementado com 1 mg.L^{-1} de benzilamino-purina (BAP), 30 g.L^{-1} de sacarose e 6 g.L^{-1} de ágar, sob fotoperíodo de 16:8 h e temperatura de $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$. A presença dos vírus foi determinada previamente por RT-PCR. As plantas provenientes de seis explantes de 1 a 2 cm de comprimento de cada cultivar foram submetidas ao tratamento de quimioterapia com ribavirina adicionada ao meio de cultura à concentração de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e avaliadas em três repetições independentes. O material foi repicado uma vez após 30 dias. Após 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* com ribavirina o material foi analisado por RT-PCR e as plantas foram transferidas para meio de cultura MS sem o agente anti-viral para destoxificação. Das plantas tratadas e das testemunhas foram isolados e cultivados meristemas (extremidades apicais não diferenciadas, i.e., sem continuidade do sistema vascular com o restante do explante). As plantas regeneradas foram enraizadas *in vitro* e aclimatadas em casa de vegetação. Os controles consistiram de plantas cultivadas *in vitro*, não-tratadas com ribavirina.

Num segundo experimento foi avaliada a remoção de vírus das cvs. Royal Gala M053 (ASGV), Castel Gala M193 (ACLSV+ASGV+ASPV), Cripps Pink M075 (ASGV) e Fuji Select M184 (ASGV+ASPV), comparando-se o efeito de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ribavirina com 7,5 e $5,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. O material foi repicado para meio fresco aos 30 dias. Após 30 e 60 dias o material foi analisado por RT-PCR e as plantas foram transferidas para meio MS sem ribavirina por 30 dias para destoxificação antes da transferência para meio de enraizamento, após o qual as plantas foram aclimatadas. Finalmente foi tentada a eliminação de vírus latentes na comparação com $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de ribavirina, utilizando-se o mesmo desenho experimental e as mesmas cultivares usados no experimento anterior.

Multiplicação *in vitro* de porta-enxertos. Técnicas de propagação são empregadas rotineiramente para a multiplicação de macieira. No entanto, a eficiência do processo é altamente dependente da espécie e do genótipo (clone) empregado. A fim de aumentar a eficiência da propagação do porta-enxerto M9, a partir de explantes de casa de vegetação, foram testadas combinações de meios de cultura, reguladores de crescimento e condições de ambiente.

Foram removidos ápices caulinares de aproximadamente 1 cm de comprimento de plantas M9, acesso M072, propagadas por multiplicação clonal. O material foi estabelecido *in vitro*, em meio MS, pH 5,8, suplementado com $4 \text{ } \mu\text{M}$ de 6-benzil-aminopurina (BAP), 30 g.L^{-1} de sacarose e 6 g.L^{-1} de ágar. A partir do material estabelecido *in vitro*, foram testados os sistemas de regeneração descritos na tabela 1. Os testes descritos abaixo foram realizados na tentativa de estabelecer M9 *in vitro*. Os explantes para a realização dos testes abaixo foram retirados de plantas em casa de vegetação. Os explantes para as tentativas de regeneração por organogênese vieram de plantas *in vitro* que não estavam estabelecidas, ou seja, não produziram novas brotações apenas desenvolveram os primórdios foliares do meristema lateral.

Tabela 1. Explantes, sistemas de regeneração, meios de cultura e reguladores de crescimento testados para a propagação do porta-enxerto de macieira M9

Explante	Sistema de Regeneração	Meio de Cultura	Regulador de Crescimento
Gemas axilares	Brotação de meristema lateral	MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)	4µM BAP
Gemas axilares	Brotação de meristema lateral	MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)	4µM BAP, 0,5 µM ácido indolbutírico (IBA)
Gemas axilares	Brotação de meristema lateral	MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962)	4µM BAP, 0,5 µM IBA, 2 µM ácido giberélico (GA)
Gemas axilares	Brotação de meristema lateral	DKV (DRIVER; KUNIYUKI, 1984)	8,86 µM BAP, 0,53 µM GA 0,3 µM IBA – luz monocromática vermelha (650 nm)
Gemas axilares	Brotação de meristema lateral	DKV (DRIVER; KUNIYUKI, 1984)	17,72 µM BAP, 0,53 µM GA 0,3 µM IBA
Segmentos foliares e caulinares	Organogênese	N6 (CHU, 1978)	15 µM tidiazuron (TDZ)
Segmentos foliares e caulinares	Organogênese	N6 (CHU, 1978)	15 µM TDZ – explantes na posição horizontal, com face abaxial em contato com o meio
Segmentos foliares e caulinares	Organogênese	N6 (CHU, 1978) líquido	15 µM tidiazuron (TDZ)

Com o propósito de acelerar a propagação de M9 foi realizado um experimento preliminar da eficiência de pasta com ácido indol-butírico (IBA) no enraizamento do porta-enxerto M9. Foram testadas três concentrações de IBA, 100, 500 e 1000 ppm, incorporado em pasta a base de lanolina. Foram coletadas estacas lenhosas de aproximadamente 20 cm, de comprimento e espessura variável de plantas de macieira M9 cultivadas em casa de vegetação. A extremidade abaxial das estacas foi cortada em bisel e coberta com pasta de enraizamento contendo IBA, sendo que para cada concentração do regulador de crescimento foram testadas três plantas. As estacas com pasta na extremidade foram plantadas, verticalmente, em copos plásticos contendo aproximadamente 200 mL de areia média compactada. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, sob condições ambiente de luz e temperatura por três meses. Após este período, as estacas foram desenterradas e a presença de raízes ou primórdios radiculares foi avaliada visualmente.

2.4. Avaliação da sanidade de plantas oriundas de termoterapia, quimioterapia e cultivo de meristemas

A aclimação pós-cultivo *in vitro* foi feita em substrato comercial para sementes em copos plásticos em câmaras úmidas. A checagem de sanidade que se seguiu ao trabalho de eliminação de vírus é uma prática-padrão, necessária porque quaisquer tratamentos de eliminação de vírus não representam garantia de eliminação e é comum que o tratamento tenha levado somente a uma redução do título viral na planta abaixo do nível de detecção. Nestas condições de temperatura, o crescimento vegetativo da planta é mais rápido e a replicação e o movimento do vírus são reduzidos. Como consequência, as brotações laterais e apicais ainda

herbáceas têm alta probabilidade de estarem livres de vírus. Enquanto ACLSV, ASPV e ApMV e as doenças de frutos e dos troncos são, geralmente, de fácil remoção pelo calor, o ASGV é extremamente termoestável, e, geralmente, não é eliminado somente pela termoterapia (JAMES et al., 1997). Embora a termosensibilidade específica dos vírus determine a eficácia de eliminação destes agentes em certo grau, o êxito da termoterapia parece depender não somente do método usado e do vírus em questão, mas de uma relação específica entre o patógeno e um certo genótipo (PAPRSTEIN et al., 2008).

Cerca de um ano após início da aclimação foram iniciados os testes de sanidade por indexagem biológica em plantas indicadoras lenhosas. Foram utilizadas *Malus domestica* cvs. Spy227 (ASPV), Virginia Crab (ASGV), Radiant Crab (ASPV), *Malus adstringens* cv. Hopa (ACLSV), *Malus micromalus* cv. GMAL 273.a (ASGV) *Malus platycarpa* (ACLSV, “platycarpa scaly bark”) e *Pyronia veitchii* (ACLSV, ASGV e ASPV) com três repetições por planta e por indicadora, o que implicou em que cada termonúmero foi avaliado em 15 a 21 plantas, mantidas em estufa/casa de vegetação ou em campo (JELKMANN, 2004). Os testes não incluíram a indexagem de doenças de frutos e da madeira nas cvs. Stayman, Gravensteiner, Golden Delicious, Lord Lambourne, Virginia Crab, Spy227 e R12740-7-A devido a que as plantas originais não apresentavam sintomas nestes tecidos. Os dois testes de laboratório utilizados foram o enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), e a RT-PCR ou IC-RT-PCR. Os extratos de ácidos nucléicos totais para RT-PCR foram obtidos por adsorção em SiO₂ como descrito anteriormente (NICKEL et al., 1999, 2001) e foram usadas diversas combinações de iniciadores já avaliados anteriormente (Tabela 2) (NICKEL; FAJARDO, 2009).

Tabela 2. Iniciadores utilizados na detecção de vírus em macieiras por RT-PCR

Denominação do iniciador	Sequências (5' – 3')	Posição no genoma	Tamanho fragmentos
ACLSV 7233r ACLSV 6875s	CAGACCCTTATTGAAGTCGAA GGCAACCCTGGAACAGA	7213-7233 6875-6891	358 pb ⁽¹⁾
ACLSV 7365r ACLSV 6784s	CTAAACGCAAAGATCAGTTGTA ATGGCGCAGTGCTGAACCTCC	7343-7365 6784-6805	581 bp ⁽²⁾
ACLSV 7429r ACLSV 6751s	CACACTTGAGCACACAACACA CAGTTTGCTCGACAGAACCA	7409-7429 6751-6770	678 pb ⁽²⁾
ASPV 9262r ASPV 8993s	ATAGCCGCCCGGTTAGGTT CTCTTGAACCAGCTGATGGC	9243-9262 8993-9012	270 pb ⁽³⁾
ASPV 3480s ASPV 3770r	AGCGGTTGCCTATTTTTGCTC GTCAGGTCAAAGATGCTGAA	3480-3501 3750-3770	291 ⁽³⁾
ASGV 6396r ASGV 5641s	CTGCAAGACCCGACCAAGTTT ATGAGTTTGGAAAGACGTGCTTC	6373-6396 5641-5663	755pb ⁽⁴⁾
ASGV 6396r ASGV 5873s	CTGCAAGACCCGACCAAGTTT CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC	6373-6396 5873-5898	523 pb ⁽⁵⁾
ApMVcp 1776r ApMVcp 1126s	TCATAATTCTAACAAATCTT ATGGTCTGCAAGTACTGTAA	1776-1795 1126-1145	669 pb ⁽⁶⁾

1) Candresse et al. (1995); 2) Silva et al. (2008), com base no acesso M58152/NC_001409 do Genbank do NCBI; 3) Radaelli et al. (2006); 4) Nickel et al. (2001); 5, MacKenzie et al. (1996); 6, www.ncbi.nlm.nih.gov, NC_00340.

2.5. Estabelecimento e manutenção de bloco de matrizes livres de vírus

Foram estabelecidas em um bloco nuclear protegido por cerca de tela as plantas oriundas de tratamentos de remoção de vírus cuja avaliação de sanidade foi completada. Este lote de plantas, estabelecido na Embrapa Uva e Vinho contém os materiais pré-básicos que devem dar origem matrizes borbulheiras, fornecedoras de material propagativo para produção de mudas. A manutenção dos materiais pré-básicos em campo ocorrerá em dois lotes, na sede da Embrapa Uva e Vinho e na sua EEFT, Vacaria, RS, e deve obedecer práticas culturais que assegurem sanidade e vigor vegetativo.

Especificamente para a propagação do porta-enxerto M9 *in vitro* com o intuito de acelerar o processo de multiplicação, foram avaliados vários meios de cultivo que não deram resultado satisfatório. Daí a ênfase na obtenção de maior quantidade de termonúmeros de M9 e propagação em campo e em estufins. A propagação massal dos materiais obtidos deve ser feita conjuntamente com os parceiros do projeto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Termoterapia *in vivo* e cultivo de termonúmeros

Apesar de algumas perdas significativas de plantas durante a termoterapia, devido à suscetibilidade de algumas cultivares à exposição a longos períodos de alta temperatura, o projeto logrou obter por esta via uma série de materiais que foram enxertados e submetidos à avaliação de sanidade. O material original utilizado estava bastante infectado e infecções virais múltiplas foram comuns. Parte dos explantes de brotações ocorridas sob termoterapia de todas cvs. tratadas não sobreviveu à enxertia pós-tratamento térmico; nas cvs. Mishima e Maxi Gala TNs, a perda foi total, exceto um explante desta última cultivar (Tabela 3).

Tabela 3. Termonúmeros de cultivares de porta-enxerto e copas obtidos por termoterapia *in vivo* (Outubro/2011)

Cultivar/Acesso	Infecção planta-mãe*	Termonúmeros enxertados Agosto/2010	Termonúmeros Vivos** - Out/2011
M9 M072	Nt	20	12
Fuji More M182	ASPV	8	8
Maxi Gala M180	ASGV	4	1
Galaxy M181	ASPV/ACLSV	4	4
Mishima M185	ASPV/ACLSV	8	0
Fuji Suprema M095	ASGV	12	8
Fuji Standard vários	ASPV/ASGV/ACLSV	42	32
Imperial Gala M059	ACLSV/ASGV	6	4
Royal Gala vários	ASPV/ASGV/ACLSV	11	7
Cripps Pink vários	ASPV/ASGV/ACLSV	6	4

Nt, não testado; *Análises referem-se às amostras analisadas, aos isolados de vírus latentes mencionados e a ApMV, com base em RT-PCR em conexão com os iniciadores e condições experimentais utilizados.

Os resultados obtidos confirmaram observação anterior da dificuldade de remoção de ASGV de tecidos de macieiras, sendo a infecção residual com ASGV, pós-tratamento térmico a mais frequente nos materiais aqui analisados. A remoção de ASGV é dificultada por sua termoestabilidade, fenômeno já constatado por outros autores (KNAPP et al., 1995; JAMES et al., 1997). Esta observação corrobora relatos de outros autores de que a detecção de uma infecção residual pode ocorrer longo tempo após o tratamento, o que justifica a necessidade de se acompanhar estes materiais avaliando-os periodicamente (GILLES; VERHOYEN, 1992) e sublinha o caráter de longo prazo deste tipo de tecnologia (JAMES, 2001).

A clássica termoterapia *in vivo* levou a avanços substanciais, mas é um processo longo, trabalhoso e, portanto, caro. Mais promissor e econômico é o seu uso associado à cultura de meristemas ou à quimioterapia *in vitro*.

3.2. Quimioterapia, cultivo de tecidos e de meristemas

Entre as substâncias mais utilizadas e pesquisadas como agentes antivirais para quimioterapia, destacam-se os flavonóides a exemplo de quercetina e outras substâncias naturais muito disseminadas no reino vegetal como a morina e a saponina glicirizina, e outras com atividade contra uma série de vírus animais como *Herpes*, poliomielite e pseudo-raiva. Vários flavonóides são inibidores do vírus do mosaico do fumo, vírus X da batata e vírus da mancha anelar do tomate (JAMES et al., 1997). Outras substâncias antivirais são os análogos de bases nitrogenadas de ácidos nucléicos, como ribavirina, dioxihexahidrotiazina (DHT), deshidroxipropiladenina (DHPA) e outras. Interferindo em caminhos metabólicos, estas substâncias estão envolvidas num complexo mecanismo de interferência na síntese de DNA e RNA viral em animais e plantas. É possível que o efeito dessas substâncias inclua a degradação de partículas de vírus já sintetizadas. A ribavirina, dependendo da sua rotação, assemelha-se a adenosina ou guanossina. Quando incorporada em RNA, como um análogo de adenina ou guanidina, parecia-se igualmente bem com uracila ou citosina, induzindo mutações na replicação de vírus de RNA dependente de RNA. O acúmulo destas mutações pode ser letal para vírus de RNA. Ribavirina é conhecida como um potente agente quimioterapêutico, já utilizado na remoção de vírus de macieiras (ASGV e ACLSV) (Hansen & Lane, 1985; JAMES, 1997), e na combinação com DHPA num tratamento termo-quimioterápico na obtenção de videiras livres de *Grapevine virus A*, agente do “Kober stem grooving”, uma das importantes doenças do complexo rugoso da videira. Devido ao alto custo e à longa duração da limpeza clonal, principalmente considerando-se a avaliação biológica de sanidade, faz-se necessário optar por métodos mais precisos e econômicos de obtenção de clones livres de vírus, como a termoterapia e quimioterapia *in vitro*. (HANSEN ; LANE, 1985; JAMES et al., 1997; ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 2006; PANATTONI et al., 2007).

Análises de plantas das cvs. Royal Gala (M073) e Cripps Pink (M080) após 30 dias de tratamento com ribavirina apresentaram 33% de eliminação de ACLSV+ASPV (cv. Cripps Pink), enquanto todas as plantas da cultivar Royal Gala permaneciam infectadas por ACLSV. Após 60 dias de tratamento com ribavirina

ocorreu excisão e cultivo de meristemas. Nas plantas regeneradas a partir destes meristemas a remoção de ACLSV da cv. Royal Gala e de ACLSV+ASPV da cv. Cripps Pink foi completa (NICKEL et al., 2010) (Tabela 4). As plantas cultivadas *in vitro* por 60 dias de tratamento com ribavirina apresentaram algumas alterações morfológicas nas regiões apicais, e danos restritos do tipo escaldadura das folhas. O efeito, que desapareceu após a transferência das plantas para meio sem ribavirina por 20-30 dias para destoxificação, foi mais visível na cultivar Cripps Pink, aparecendo com menor frequência e intensidade na cultivar Royal Gala. Na sequência, não se observou qualquer efeito fitotóxico no desenvolvimento das plantas tratadas com ribavirina.

Tabela 4: Remoção de vírus por quimioterapia *in vitro* e avaliação de sanidade de material *in vitro* por RT-PCR (Outubro 2011)

Cultivar	Acesso	Vírus	Plantas infectadas*/ nº de plantas tratadas					
			30 dias			60 dias		
			Ribavirina µg/ml			Ribavirina µg/ml		
			5	7,5	10	5	7,5	10
Royal Gala	M073	ACLSV	**	**	3/3	**	**	0/3
Cripps Pink	M080	ACLSV ASPV	**	**	2/3	**	**	0/3
Royal Gala	M053	ASGV	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Castel Gala	M193	ACLSV ASPV ASGV	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4	1/4
Cripps Pink	M075	ASGV	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Fuji Select	M184	ASPV ASGV	4/4	4/4	4/4	1/4	1/3	1/3

* Análises referem-se às amostras analisadas, aos isolados de vírus latentes mencionados, com base em RT-PCR em conexão com os iniciadores e condições de reação utilizados; ** concentração de ribavirina não utilizada com estes acessos.

Concentrações de 5 e 7,5 µg/ml do agente antiviral foram comparadas com 10 µg/ml nas cultivares Royal Gala (M053), Cripps Pink (M075), Castel Gala (M193) e Fuji Select (M184) (Tabela 4). O ASGV foi removido após 30 dias de tratamento com ribavirina em 100% das plantas das cvs. Royal Gala e Cripps Pink em todos os tratamentos e repetições, demonstrando-se que o ASGV pode ser eliminado em menor tempo com concentrações de ribavirina menores que as utilizadas por James et al. (1997). Por outro lado, chama a atenção a persistência dos três vírus em parte das cvs. Fuji Select e Castel Gala, ambas com infecções mistas após 60 dias de tratamento com ribavirina. A infecção de ASPV da cv. Fuji Select foi eliminada em 66-75% das plantas somente após 60 dias de tratamento com ribavirina. A eliminação de ACLSV, ASGV e ASPV na cv. Castel Gala atingiu 66%. As alterações morfológicas e escaldadura de folhas e caules observados anteriormente não se repetiram. É plausível que certas cultivares de maçã ou seus clones, em certas condições, sejam mais afetados pela ribavirina. Quecini et al. (2008) demonstraram um efeito negativo da ribavirina no crescimento de protoplastos. Relevante no presente estudo foi o caráter transitório do dano ocorrido no material.

Num terceiro experimento, comparou-se 1 µg/ml com 5 e 10 µg/ml de ribavirina, um controle não tratado e o mesmo cronograma do experimento anterior com análise de RT-PCR realizada aos 60 dias de tratamento com ribavirina. Foi demonstrado que ocorreu eliminação de vírus em tratamentos com 1 µg/ml de

ribavirina. Parte das plantas deste experimento ainda encontra-se *in vitro*, sem avaliação de sanidade. O material já aclimatado e analisado consiste de plantas livres da infecção original das cultivares Castel Gala (20 de 22 plantas aclimatadas), Fuji Select (7 de 8), Royal Gala (7 de 17) e Cripps Pink (0 de 4). Estas análises preliminares não permitem observar uma correlação entre concentração de ribavirina e eficácia de eliminação de vírus. Em algumas amostras os vírus originalmente presentes nas plantas das cvs. Fuji Select e Royal Gala não foram amplificados a partir dos controles não tratados (concentração 0 µg/ml de ribavirina).

Este fato pode ser resultado do efeito chamado “diluição”, produzido pelo vigoroso desenvolvimento das plântulas *in vitro*, levando a rápida emissão de brotações novas. Essas brotações novas podem desencadear morte celular por senescência nas brotações velhas mais infectadas por vírus, reduzindo assim a concentração do patógeno na planta e dificultando sua detecção em determinado momento. Knapp et al. (1995) observaram que o título de *Plum pox virus* em folhas jovens de damascos submetidos a termoterapia *in vitro* era quase negativo, enquanto folhas velhas mostravam reação positiva. Esses mesmos autores avaliaram macieiras originalmente infectadas por ASGV e ACLSV após termoterapia e observaram alta porcentagem de valores de absorvância de ASGV próximos dos controles negativos, i.é, apenas no limiar de detecção. Surpreendentemente, quando analisadas seis meses após o tratamento, as mesmas plantas estavam positivas. Considerando-se o curto espaço de tempo necessário para o reestabelecimento da infecção viral após terapias de eliminação é plausível que estas tenham produzido somente uma redução do agente patogênico abaixo do limiar de detecção. Daí a necessidade de se avaliar o status sanitário destas plantas por um longo período após procedimentos de eliminação de vírus (JAMES, 2001).

As cultivares Maxi Gala, acessos M163/180, Galaxy, acesso M181, Fuji More, acesso M182 e Mishima, acesso M185, todas originárias de Vacaria, RS, infectadas, respectivamente, com ASGV, ACLSV+ASPV, ASPV e ACLSV+ASPV foram estabelecidas *in vitro* e estão prontas para início quimioterapia *in vitro*.

Propagação de porta-enxertos. Como resultado dos intentos de desenvolver um método de enraizamento visando uma rápida propagação do M9 observou-se no experimento-piloto que maior concentração do regulador de crescimento (1000 ppm) induziu maior número de raízes em estacas lenhosas de M9, comparativamente com as concentrações 100 e 500 ppm, indicando que testes posteriores podem incorporar concentrações mais elevadas de IBA para o enraizamento. Os resultados preliminares indicam que, apesar do uso de estacas desuniformes em espessura e comprimento, estas retêm a capacidade de resposta à aplicação do hormônio e que experimentos posteriores, empregando material com diâmetro uniforme, podem oferecer melhor condição de enraizamento do porta-enxerto.

3.3. Avaliação de Sanidade

Tanto a indexagem biológica como a RT-PCR revelaram-se instrumentos excelentes de avaliação de sanidade. Ambos os métodos tiveram suas deficiências e

vantagens. A indexagem biológica com a substituição de algumas indicadoras (R12 por *M. platycarpa* e Virginia Crab por *M. micromalus*, MM) ainda requereu meses, mas já pôde ser realizada em cerca de um ano e meio com avaliações de primavera da reação de indicadoras. A associação de ambos métodos conferiu maior segurança aos resultados. Todos os materiais obtidos foram submetidos aos dois testes. É relevante que estas plantas, como matrizes de fruteiras em geral, sejam regularmente analisadas. A RT-PCR é um teste muito sensível, mas passível de produzir reações inespecíficas, ou podem ocorrer, como demonstrado anteriormente (SILVA et al., 2008), falsos negativos por falta de pareamento adequado dos iniciadores de PCR, resultante de diferenças moleculares entre os isolados virais. Por esta razão, no caso de material pré-básico deste estudo foi feita a avaliação com os dois métodos.

Recomenda-se que ocorra uma análise dos materiais obtidos a cada dois anos para detectar vírus cuja concentração, após tratamentos de remoção de vírus (termo-/quimioterapia), tenha sido reduzida abaixo do nível de detecção (falsos negativos) ou eventuais infecções de material recontaminado na manipulação, podas e corte de material propagativo.

Os resultados das análises e indexagens dos termonúmeros obtidos na última fase do projeto demonstraram que alguns TNs das cvs. Fuji More, Fuji Suprema, Fuji Standard, Imperial Gala, Royal Gala e Galaxy estavam livres de vírus latentes da macieira e de ApMV. Os dados constantes da Tabela 5 demonstram a relevância e a necessidade da indexagem biológica e das análises moleculares após os tratamentos de remoção de vírus. É comum que uma porcentagem maior ou menor dos TNs esteja contaminada com uma infecção residual, quando havia uma infecção na planta original.

Tabela 5: Avaliação de sanidade por RT-PCR e/ou indexagem biológica em indicadoras lenhosas de plantas obtidas de termoterapia *in vivo* (Outubro/2011)

Cultivares/Acessos	Plantas Sadias/Plantas avaliadas	Infecção residual *				Origem do acesso
		ACLSV	ASGV	ASPV	ApMV	
Fuji Suprema M095	3/8	-	+	-	-	Epagri, SC
Fuji standard vários	17/25	+	+	+	-	Vacaria, RS
Imperial Gala M059	2/4	+	+	-	-	Vacaria, RS
Royal Gala	1/6	+	+	+	-	Vacaria, RS
Cripps Pink M075	0/4	+	+	+	-	Vacaria, RS
Maxi Gala	0/1**	-	+	-	-	Vacaria, RS
Fuji More	6/7	-	-	+	-	Vacaria, RS
Galaxy	6/8	+	-	+	-	Vacaria, RS
Mishima	0/0**	-	-	-	-	Vacaria, RS

* Análises referem-se às amostras analisadas, aos isolados de vírus latentes mencionados e a ApMV, com base em RT-PCR em conexão com os iniciadores e condições de reação utilizados e/ou à indexagem biológica; ** morte de plantas.

A avaliação de sanidade via indexagem biológica e RT-PCR revelou a presença de ACLSV assintomático em dois clones do porta-enxerto Maruba, que, ao

contrário dos “isolados tipo” de ACLSV, assim como isolado de ASGV já descrito na região sul do Brasil (NICKEL et al., 1999), não induz a típica formação de cancro do Maruba e não leva *Malus prunifolia* var. *ringo* ao declínio. O isolado chamado “Maruba” é latente nessa cultivar. Ambos isolados de ACLSV podem coexistir naturalmente em plantas de pomares (YANASE, 1974). Em Maxi Gala (M163/180) foi detectado o ASGV por indexagem biológica em *Malus micromalus* GMAL 273.a, infecção não revelada anteriormente por RT-PCR.

3.4. Estabelecimento de lote de material pré-básico livre de vírus

Como previsto, estabeleceu-se na Embrapa um lote de materiais pré-básicos que estão sendo propagados em escala para fornecer material propagativo para formação de matrizes borbulheiras. A Tabela 6 engloba 186 plantas “livres de vírus” *stricto sensu*, incluindo propagações de TNs, sem identificar os diversos termonúmeros e meristemas que as originaram.

Tabela 6: Material pré-básico de cultivares de copas e porta-enxertos em campo, Embrapa Uva e Vinho (Outubro/2011)

Cultivar/Acesso	Processo de Obtenção*	Número de plantas	Origem do acesso
Copas			
Fuji Suprema M095	ME	27	Epagri, SC
Fuji Standard M057-58-78	ME/TN	30	Embrapa, Epagri
Royal Gala	ME	17	Epagri, Lages
Imperial Gala M059	TN	4	Vacaria, RS
Porta-enxertos			
M9, M072, M070	TN	33	Embrapa, Epagri
M7, M097	ME	23	Vacaria, RS
M26, M076	TN	1	Vacaria, RS
M106, M102	TN	1	Vacaria, RS
Maruba, Vários acessos	ME	50	Embrapa, Epagri

*TN, termonúmero; ME, meristema; esta denominação informa sobre o processo de obtenção da planta.

As observações ao longo deste trabalho demonstraram que existem outros aspectos relevantes da relação vírus vs. planta pouco considerados. Plantas infectadas com vírus foram avaliadas quanto ao seu desempenho produtivo, à qualidade dos frutos e quanto a sua relação com patógenos fúngicos, causadores de manchas foliares e podridões em frutos. Algumas constatações desses estudos, embora preliminares, merecem atenção e eventualmente uma abordagem aprofundada em experimento específico.

As infecções virais, nestes estudos, foram responsáveis por reduzir o tamanho dos frutos, aumentar a incidência de podridões de frutos durante a armazenagem em câmaras frias e aumentar a suscetibilidade a certas infecções fúngicas. Estudos em frutos de macieiras cv. Maxi Gala infectadas experimentalmente com vírus demonstram que estes têm menor firmeza após dois meses de armazenagem, em decorrência do aumento da abertura de lenticelas e da transpiração em frutos de plantas virosadas (GUERRA, 2007). Estes dados

permitem deduzir que a vida de prateleira de frutos de plantas virosadas também pode ser afetada. Entretanto as cultivares podem ter reações distintas que têm que ser avaliadas especificamente.

Um estudo, conduzido na Embrapa em cooperação com a UFRGS, em macieiras jovens da cv. Maxi Gala avaliou o efeito da infecção prévia de *Apple stem grooving virus* (ASGV) de *Apple stem pitting virus* (ASPV) sobre infecções subsequentes por *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da “mancha foliar da Gala” ou “mancha foliar de Glomerella”, principal doença de verão da macieira. As plantas infectadas por ASGV-ASPV foram inoculadas com *C. gloeosporioides*. em câmaras com temperatura e umidade monitoradas. Os dados submetidos a uma análise estatística revelaram um estímulo significativo da infecção de vírus sobre a porcentagem de folhas infectadas (incidência) e sobre o número de manchas de *C. gloeosporioides* por folha (severidade) comparativamente aos controles sem vírus. O estudo demonstra que ocorre uma aceleração do ciclo biológico da Glomerella em plantas virosadas. Plantas com ASGV-ASPV criam condições favoráveis ao fungo a ponto de reduzir o seu período de incubação, causando assim maior dano às plantas. O estudo revelou também que, nas plantas infectadas com vírus, foram necessárias 69,5 horas após a inoculação com o fungo para se atingir 50% de incidência em plantas de Maxi Gala com ASGV-ASPV, enquanto nas plantas livres desses vírus este valor foi de 80,5 horas (GUERRA et al., 2007a). Conclui-se que as infecção virais promoveram uma aceleração da infecção fúngica. Estes dados são relevantes, uma vez que podem afetar o custo da produção, a eficácia e o impacto ambiental das medidas de controle químico (GUERRA et al., 2011, no prelo).

Na presença de *Cryptosporiopsis perennans*, infecções virais, principalmente por vírus latentes, aumentaram a suscetibilidade dos frutos à podridão “olho de boi” após armazenagem em câmaras frias, enquanto o vírus do mosaico da macieira afetou menos esta relação (GUERRA et al., 2007b).

Em experimentos de campo, avaliados entre 2004 e 2009, observou-se uma tendência a menor produção média de plantas virosadas na comparação com as testemunhas sadias nos calibres maiores (71-75, 67-70 e 56-66 mm) respectivamente 32%, 55% e 78%, enquanto a produção média de frutos de calibre < 55 mm de diâmetro, dos tratamentos virosados, superou a produção das testemunhas sadias em 24%. Portanto, a produção de plantas infectadas por vírus foi menor com maior porcentagem de frutos de menor valor comercial (NICKEL et al., 2008).

4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES FINAIS

- ✓ Os objetivos do projeto de obter materiais livres de vírus de copas e porta-enxertos de macieiras de relevância comercial foram alcançados. Tanto de copas como de porta-enxertos foram obtidos materiais de sanidade superior que devem passar por um processo de propagação massal. A quimioterapia revelou-se um método eficiente para obtenção de materiais de superior qualidade fitossanitária comparativamente à termoterapia in vivo, que

apresentou tanto um alto grau de mortalidade como de infecções residuais. Dada a longa duração da eliminação de vírus, observa-se um descompasso entre os produtos obtidos desde o início do projeto e aqueles atualmente mais demandados. Entretanto as cultivares com maior potencial comercial e demanda atual para plantio como Maxi Gala, Galaxy Fuji More, Fuji Select e Mishima já estão em tratamento. Considerando-se a utilização de métodos de eliminação de maior eficiência e métodos de indexagem mais rápida, o tempo de obtenção desses materiais livres dos vírus abordados neste projeto, poderá ser substancialmente reduzido.

- ✓ Uma moderna pomicultura de precisão passa pelo estudo detalhado de limitantes bióticos e abióticos da produção, refinando progressivamente o conhecimento sobre o “funcionamento” da macieira e de suas relações com agentes patogênicos. Neste contexto os vírus e agentes similares têm papel de destaque.
- ✓ Os resultados aqui alcançados com a obtenção de clones livres de vírus latentes e ApMV são relevantes para uma nova postura face à questão do material propagativo. É relevante seguir uma etapa de propagação massal do material obtido, continuar regularmente a avaliação de sanidade nos próximos anos, no mínimo a cada dois anos nos lotes de material pré-básico e estabelecer os materiais sadios isoladamente em lotes específicos. É importante criar um grupo de trabalho do setor que avalie regularmente a fidelidade varietal do material produzido pelos métodos aqui descritos e aporte ao programa de novas cultivares consideradas relevantes para a pomicultura nacional.
- ✓ A mudança de consciência ambiental e dos danos causados por doenças virais aos pomares nos países tecnologicamente avançados tornou o uso de plantas livres de vírus um procedimento-padrão na implantação de pomares. A recente legislação brasileira vai ao encontro dessa exigência. Isto é, especialmente o caso de métodos de produção integrada, produção orgânica ou produção de base agroecológica. Os efeitos fisiológicos causados por infecções virais são tão abrangentes que necessariamente questionam sistemas de produção modernos enquanto os pomares forem implantados com material infectado por vírus. Assim, a pomicultura moderna requer plantas certificadas livres de vírus, oriundas de borbulheiras livres de vírus, enxertadas em porta-enxertos livres de vírus. Isto é um pré-requisito de rentabilidade e sustentabilidade ambiental. É muito provável que frutos produzidos num sistema equilibrado com material propagativo sadio, livre de vírus tenham cada vez maior aceitação pelo público consumidor tanto no mercado nacional como no internacional.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pela valiosa contribuição da pesquisadora Dra Vera M. Quecini, e das assistentes Iraci Sinski e Daniela Dal Bosco (Laboratório de Cultura de Tecidos), pelo excelente apoio técnico do assistente Sr. Marcos F. Vanni (Laboratório de Virologia) e reconhecem o apoio financeiro da FINEP e do CNPq.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; BERMUDEZ, L. C.; ALVARENGA, S.; RIVERA, C. Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (*Sechium edule* Jacq. Sw.) pra la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV). **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, Turrialba, v. 77, p. 17-23, 2006.
- CANDRESSE, T.; LANNEAU, M.; REVERS, F.; GRASSEAU, N.; MACQUAIRE, G.; GERMAN, S.; MALINOWSKI, T.; DUNEZ, J. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 386, p 136-147, 1995.
- CHU, C. C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: SYMPOSIUM ON PLANT TISSUE CULTURE, 1978, Beijing. **Proceedings...** Peking: Science Press, 1978. p. 43-50.
- CRESTANI, O. A. **Fomento à capacitação tecnológica para a produção de mudas frutíferas via métodos biotecnológicos**: relatório de projeto. Brasília, DF: Embrapa-SPSB, 2000. 49 p.
- DRIVER, J. A.; KUNIYUKI, A. H. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. **Hortscience**, Alexandria, v. 19, p. 507-509, 1984.
- FRIDLUND, P. R. IR-2, A virus-free, interregional, deciduous fruit tree repository. In: FRIDLUND, P. R. (Ed.). **Virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders**. Pullmann: College of Agriculture and Home Economics, Washington State University, 1989. p. 308. Cooperative Extension.
- GILLES, G. L.; VERHOYEN, M. **Viroses et maladies apparentées des arbres fruitiers et ornementaux**: assainissement et selection. Bruxelles: Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, 1992. 166 p.
- GUERRA, D. S. **Predisposição de macieiras (*Malus domestica* Borkh.) com infecções virais a *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber em frutos e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig.) Penzig & Sacc. em folhas**. 2007. 99 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
- GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MARODIN, G. A. B.; FAJARDO, T. V. M. Apple stem grooving virus afeta infecções de manchas foliares causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em macieiras cv. Maxi Gala. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. S318, ago, 2007. Suplemento. Edição dos resumos do XL Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Maringá, 13 a 17 de agosto de 2007. Resumo 1053.
- GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; FAJARDO, T. V. M.; CAMPOS, Á. D.; MARODIN, G. A. B. Infection by *Cryptosporiopsis perennans* in Virus Infected Apple Fruits Cv. Maxi Gala. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF TEMPERATE FRUITS IN THE TROPICS AND SUBTROPICS, 7., 2007, Florianópolis. **Program & Abstracts...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007b. p. 42.
- HANSEN, A. J.; LANE, W. D. Elimination of Apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by Ribavirin. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, p. 134-135, 1985.
- HOWELL, W. E.; BURGESS, J.; MINK, G. I.; SKRZECZKOWSKI, L. J.; ZHANG, Y. P. Elimination of apple fruit and bark deforming agents by heat therapy. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 472, p. 641-646, 1998.
- JAMES, D.; TRYTTEN, P. A.; MACKENZIE, D. J.; TOWER, G. H. N.; FRENCH, C.J. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of na immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. **Annals of applied Biology**, Cambridge, v. 131, p. 459-470, 1997.
- JAMES, D. Long term assessment of the effects of *in vitro* chemotherapy as a tool for Apple stem grooving virus elimination. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 550, p. 459-462, 2001.

- JELKMANN, W. International Working Group on Fruit Tree Viruses. Detection of virus and virus-like diseases of fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 657, p. 575-596, 2004.
- KNAPP, E.; HANZER, V.; WEISS, H.; MACHADO, A. da C.; WEISS, B.; WANG, H.; KATINGER, H.; MACHADO, M. L. da C. New Aspects of virus elimination in fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 386, p. 409-417, 1995.
- LEMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. **L'Arboriculture fruitière**, Paris, 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**, Brasília, DF, v. 23, p. 314, 1998.
- MACKENZIE, D. J.; MACLEAN, M. A.; MUKERIJ, S.; GREEN, M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 222-226, 1996.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NICKEL, O.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Occurrence of Apple stem grooving virus in Santa Catarina Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 444-446, 1999.
- 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**, Brasília, v. 26, p. 655-659, 2001.
- NICKEL, O.; GUERRA, D. S.; BERNARDI, J.; FAJARDO, T. V. M. Infecções virais em macieiras 'Maxi Gala' provocam redução de produção e da qualidade dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória. **Anais...** Vitória: Incaper, 2008. Não paginado. 1 DVD.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 54 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69).
- PANATTONI, A.; D'ANNA, F.; CRISTANI, C.; TRIOLO, E. Grapevine vitivirus: a eradication in Vitis vinifera explants by antiviral drugs and thermotherapy. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 146, p. 129-135, 2007.
- PAPRSTEIN, F.; SEDLAK, J.; POLAK, J.; SVOBODOVA, L.; HASSAN, M. Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, The Hague, n. 94, p. 347-352, 2008.
- PAUNOVIC, S.; MAKSIMOVIC, V.; RANKOVIC, M.; RADOVIC, S. Characterization of a virus associated with pear stony pit in cv. Württemberg. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, p. 695-700, 1999.
- PAUNOVIC, S.; RANKOVIC, M. Relationship between quince fruit deformation virus and some pome fruit viruses. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 472, p. 125-133, 1998.
- QUECINI, V. M.; LOPES, F. T. H.; PACHECO, M. das G. O. Ribavirin, a guanosine analogue mammalian antiviral agent, impairs tomato spotted wilt vírus multiplication in tobacco cell cultures. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Berlin, v. 41, p. 1-13, 2008.
- 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**, Brasília, DF, v. 31, p. 51-56, 2006.
- RADAELLI, P.; RIZZON, D. F.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; FAJARDO, T. V. M. Detecção do Apple stem grooving virus em macieiras por RT-PCR, IC-RT-PCR e ELISA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p. S251, 2004. Resumo 844.

SILVA, F. N. da; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 157-161, 2008.

YANASE, H. Studies on Apple latent viruses in Japan. **Bulletin of the Fruit Tree Research Station - Series C**, Morioka, v. 1, p. 47-109, 1974.

7. PUBLICAÇÕES GERADAS PELA ATIVIDADE

ALVES, S. A. M.; NICKEL, O. Infecções virais como fator de predisposição para o desenvolvimento da Mancha foliar de Glomerella em macieiras Maxi Gala. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. S151, ago. 2010. Resumo (04.108) apresentado no XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsidial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 5-9, 2011.

GIACOMINI, R.; NICKEL, O.; QUECINI, V.; SINISKI, I.; DAL BOSCO, D.; FAJARDO, T. V. M.; MONTIPO, S.; SOUZA, F. A eficácia do cultivo de meristemas na remoção de infecções virais in vitro de macieiras cvs. Royal Gala e Cripps Pink. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA UVA E VINHO, 7.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA UVA E VINHO, 3., 2009, Bento Gonçalves, RS. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. p. 48.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 55 p. 2009. ISSN 1516-8107. (Embrapa Uva e Vinho, Documentos, 69).

NICKEL, O.; GUERRA, D. S.; BERNARDI, J.; FAJARDO, T. V. M. Infecções virais em macieiras 'Maxi Gala' provocam redução de produção e da qualidade dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008, Vitória, ES. **Anais...** Vitória: Incaper, 2008. Não paginado. 1 DVD.

NICKEL, O.; QUECINI, V.; FAJARDO, T. V. M. Remoção de infecções virais das cultivares Royal Gala e Cripps Pink por quimioterapia *in vitro*. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 18, n. 222, p. 24, 2009.

NICKEL, O.; QUECINI, V.; FAJARDO, T. V. M.; ECKERT, C. Remoção de infecções virais latentes de macieira por quimioterapia in vitro. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 4., 2010, Bento Gonçalves. **Resumos...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. p. 36. Resumo.

NICKEL, O.; QUECINI, V.; FAJARDO, T. V. M.; SOUZA, F. Remoção de *Apple stem pitting virus*, *Apple stem grooving virus* e *Apple chlorotic leaf spot virus* de macieiras por quimioterapia *in vitro*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. S277, ago. 2010. Suplemento. Resumo (11.035) apresentado no XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá.

NICKEL, O.; QUECINI, V.; FAJARDO, T. V. M.; SOUZA, F. Remoção de *Apple stem pitting virus*, *Apple stem grooving virus* e *Apple chlorotic leaf spot virus* de macieiras por quimioterapia *in vitro*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. S277, 2010. Suplemento. Resumo apresentado no XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2010, Cuiabá.

SILVA, F. N.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 157-161, 2008.