

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

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

Denis Salvati Guerra  
M.Sc. Eng. Agrônomo (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
Doutor em Fitotecnia  
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Novembro de 2007

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda família Salvati, principalmente a minha mãe, meus irmãos (e família) e a minha nona.

A Cristina Wünsche e família por ter me recebido em seu convívio como parte da sua família.

Aos amigos pelo companheirismo, nas horas boas e ruins, a família do Michel Casali, do Mércio Strieder, do Maurício “Grau”, do Armando “Carioca”. Aos meus colegas de ‘república’ da Lima e Silva: Igor, Vagner, Mário e Pierre e aos meus colegas de pós-graduação da UFRGS.

Ao meu amigo e orientador Prof. Marodin pela orientação desde a iniciação científica até o doutorado (8 anos).

Aos meus amigos da pousada da Embrapa de Vacaria e Bento Gonçalves (Wagner, Wilson, Cristiano, Cristiane, Jô, Marcelo, Cabelo, Aline, Geraldo, Florian) que dividimos alguns churrascos, prosa e também trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Virologia da Embrapa em Bento (Marcus Vanni, Fábio, Paula, Ana, Eluíza e Juliana) e de Fitopatologia em Vacaria (Tina, Valdair).

Aos pesquisadores de todas as unidades da Embrapa que possibilitaram que eu fizesse parte do meu trabalho ou acrescentaram através de discussões e conhecimento: CNPUV (Dra. Rosa, Dr. Osmar Nickel, Dr. Thor, Dra. Lucimara, Dr. Girardi e Dr. Henrique), CPACT (Dra. Ângela) e CNPT (Dr. Maurício).

A empresa Rasip Agropastoril e principalmente ao Técnico Biazi por possibilitarem a execução dos experimentos durante todo o doutorado.

# **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<sup>1</sup>**

Autor: Denis Salvati Guerra

Orientador: Gimar Arduino Bettio Marodin

Co-orientador: Osmar Nickel

## **RESUMO**

A cultura da macieira no Brasil ocupa cerca de 35 mil hectares com uma produção que chega, em alguns anos, a 1 milhão de toneladas. Dentre os principais vírus que infectam as plantas estão os chamados latentes *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV) como também o *Apple mosaic virus* (ApMV). Atualmente, entre as doenças fúngicas mais importantes estão a podridão de olho de boi causadas por *Cryptosporiopsis perennans* e a mancha foliar da gala causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a predisposição em frutos e folhas da cultivar Maxi Gala com infecções virais a *C. perennans* e a *C. gloeosporioides*, respectivamente. Em frutos as infecções virais utilizadas foram: ACLSV (C), ACLSV+ ASPV+ ApMV (C+P+M), ASGV (G), ASGV + ASPV (G+P), ASGV + ACLSV + ASPV (G+C+P), ASGV + ACLSV + ASPV + ApMV (G+C+P+M). Foram analisadas nos frutos durante a colheita e após o armazenamento as variáveis de incidência e o número de lenticelas necrosadas, teor de açúcar, firmeza, escala iodo-amido, lenticelas abertas (l.a.), atividade das enzimas peroxidases (PO) e polifenol oxidase (PPO) e teor de fenóis. Em plantas com infecção do vírus ASGV foram avaliadas a incidência, número de manchas, severidade, taxa de progresso da doença, período de incubação, a atividade de enzimas PO e PPO e teor de fenóis analisadas em ramos. Os frutos com infecções virais apresentam maior predisposição a *C. perennans*, pois tiveram mais incidência, exceção de C, durante a colheita e após armazenamento e número de lenticelas necrosadas após o armazenamento. Os frutos com G+C+P+M apresentaram-se mais maduros e mais l.a. na colheita e após o armazenamento. Os frutos com infecção de G e G+C+P+M apresentaram menor atividade da PO, mas sem alteração da PPO ou do teor de fenóis. As plantas com ASGV apresentaram maior predisposição à infecção de *C. gloeosporioides*, pois apresentaram maior incidência, número de manchas, severidade e menor tempo de incubação e PPO.

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (99p.) Novembro, 2007.

**PREDISPOSING OF APPLE PLANTS (*Malus domestica* Borkh.) WITH VIRAL INFECTIONS TO *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenwebwe IN FRUITS AND TO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig.) Penzig. & Sacc. IN LEAVES<sup>2</sup>**

Author: Denis Salvati Guerra  
Advisor: Gimar Arduino Bettio Marodin  
Co-Advisor: Osmar Nickel

**ABSTRACT**

Apples are grown in Brazil on approximately 35 thousand hectares with a production that reaches 1 million ton in some years. The so called latent apple viruses *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV) as well as *Apple mosaic virus* (ApMV) stand out as the most commonly involved in apple viral infections. Bull's eye rot caused by *Cryptosporiopsis perennans* and the Gala leaf spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* are among the most important fungal diseases. The objective of this study was to evaluate the effect of viral infections on predisposing apple plants, cv. Maxi Gala, to subsequent infections by *C. perennans* and by *C. gloeosporioides* in fruits and leaves, respectively. In fruits the treatments ACLSV (C), ACLSV+ ASPV+ ApMV (C+P+M), ASGV (G), ASGV + ASPV (G+P), ASGV + ACLSV + ASPV (G+C+P), ASGV + ACLSV + ASPV + ApMV (G+C+P+M) were analyzed at harvest and after cold room storage period in relation to disease incidence, number of necrotic lenticels, sugar content, firmness, iodine-starch, lenticel opening (l.o.), the activity of peroxydases (PO), polyphenol oxydase (PPO) and the phenol content. In plants pre-infected with ASGV the incidence and the number of leafspots per leaf, severity and the rate of disease progress, incubation period of *Colletotrichum gloeosporioides*, the activity of the enzymes PO and PPO and phenol content in twigs were analysed. The incidence of *C. perennans* in fruits pre-infected with viruses was higher, excepting C, in these fruits at harvest and after cold storage, and the number of necrotic lenticels was higher. Ripeness of fruits pre-infected with G+C+P+M was advanced and fruits had higher l.o. at harvest and after storage. Fruits pre-infected with G and G+C+P+M showed a lower PO activity, but their PPO activity and phenolics contents were unaltered. *C. gloeosporioides* had a higher infectivity on leaves of plants with ASGV, showed higher disease incidence, leafspots and disease severity and lower incubation period and activity of PPO.

---

<sup>2</sup>Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (99p.) November, 2007.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1. Principais vírus da macieira</b> .....	4
1.1.1. Família <i>Flexiviridae</i> .....	4
1.1.1.1. <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV).....	4
1.1.1.2. <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV).....	5
1.1.1.3. <i>Apple chlorotic leafspot virus</i> (ACLSV).....	7
1.1.2. Família <i>Bromoviridae</i> .....	9
1.1.2.1. <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV).....	9
<b>1.2. Métodos de detecção viral</b> .....	10
1.2.1. Indexação biológica.....	11
1.2.2. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	12
1.2.3. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction).....	13
1.2.4. Immunocapture PCR (IC/RT-PCR) e outros métodos.....	16
<b>1.3. Métodos, fonte de material e épocas de extração de RNA total</b> .....	17
<b>1.4. Doenças fúngicas</b> .....	19
1.4.1. Podridão olho de boi.....	19
1.4.1.1. Infecção por <i>Cryptosporiopsis perennans</i> em frutos de macieira.....	21
1.4.2. Mancha foliar da gala.....	22
1.4.2.1. Infecção por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folhas de macieira.....	23
<b>1.5. Hipóteses</b> .....	24
<b>1.4. Objetivos</b> .....	25
<b>2. CAPÍTULO I - INFECTIVIDADE DE <i>Cryptosporiopsis perennans</i> (Zeller &amp; Childs) Wollenweb EM FRUTOS DE MACIEIRAS ‘MAXI GALA’ PRÉ-INFECTADAS COM VÍRUS LATENTES E <i>Apple mosaic virus</i></b> .....	26
<b>2.1. Introdução</b> .....	26
<b>2.2. Materiais e Métodos</b> .....	30
2.2.1. Estabelecimento do plantio, cultivar utilizada e local da coleta dos frutos.....	30
2.2.2. Metodologia de detecção viral.....	30
2.2.3. Inoculações dos frutos com <i>C. perennans</i> .....	32
2.2.4. Avaliações de doença dos frutos.....	32
2.2.5. Análise da atividade de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis dos frutos.....	33
2.2.6. Avaliações de Sólidos Solúveis Totais, firmeza e escala iodo amido..	33
2.2.7. Avaliação de lenticelas abertas.....	34

2.2.8. Análise estatística.....	34
<b>2.3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Predisposição dos frutos a <i>C. perennans</i> .....	35
2.3.2. Alterações na atividade de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis em frutos com infecção viral.....	39
2.3.3. Alterações da firmeza, teor de sólidos solúveis totais (SST) e escala iodo-amido.....	44
2.3.4. Alterações no número de lenticelas abertas.....	47
<b>3. CAPÍTULO II - PARÂMETROS MONOCÍCLICOS DE “MANCHA FOLIAR DA GALA” (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. e Sacc.) EM MACIEIRAS ‘MAXI GALA’ PRÉ-INFECTADAS COM <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV).....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Introdução.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>53</b>
3.2.1. Material vegetativo e vírus utilizado.....	53
3.2.2. Inóculo de <i>C. gloeosporioides</i> .....	54
3.2.3. Metodologia de inoculação.....	54
3.2.4. Métodos de avaliação.....	55
3.2.5. Análise da atividade de peroxidase, de isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidases, polifenol oxidase e teor de fenóis das plantas.....	55
3.2.6. Análise epidemiológica.....	56
3.2.7. Delineamentos e análise estatística.....	57
<b>3.3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>57</b>
3.3.1. Predisposição de mudas de Maxi Gala pré-infectadas com ASGV a <i>C. gloeosporioides</i> .....	57
3.3.2. Alterações na atividade da peroxidase, das isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis.....	65
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>91</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Efeito na redução de produção de maçã devido às doenças virais: <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV), <i>Apple chlorotic leafspot virus</i> (ACLSV) e <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV), <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV) e Spy epinasty and decline .....	3
2. Espécies mais utilizadas para diagnóstico em indexação (plantas lenhosas) e com plantas herbáceas para os vírus <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV), <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV), <i>Apple chlorotic spot virus</i> (ACLSV) e <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV).....	11
3. Iniciadores (nome, orientação, seqüência, posição no RNA viral e tamanho esperado do fragmento amplificado) em gel de agarose (1%), usados na RT-PCR para identificação dos vírus <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV), <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV), <i>Apple stem pitting virus</i> (ASPV) e <i>Apple mosaic virus</i> (ApMV) em frutos de maçã ‘Maxi Gala’ utilizados para inoculação com <i>Cryptosporiosis perennans</i> , 2007.....	31
4. Número de lenticelas necrosadas (n.l.c.) por fruto (32 dias após inoculação) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de <i>C. perennans</i> em frutos inoculados na colheita e armazenados de ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com um vírus isoladamente ou formando complexos, 2007.....	37
5. Análise estatística por contrastes ortogonais para o número de lenticelas necrosadas, medida pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), em frutos inoculados com <i>C. perennans</i> após a armazenagem (1 mês a 2 °C) de ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com um vírus isoladamente ou formando complexos, 2007.....	38
6. Análise epidemiológica de incidência, número de manchas, modelo epidemiológico (Mod) e coeficiente de determinação ajustado – $R^2$ , intercepto do eixo y (Int.), taxa de progresso da doença (taxa), valor máximo ( $y_{m\acute{a}x}$ ), horas após a inoculação para atingir 50% de incidência (50%) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV), inoculadas com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em duas épocas de avaliação, 2007.....	59
7. Correlação e significância pelo coeficiente de Pearson ( $Pr>F$ ) entre o número de manchas por folha, Software ImageJ (144 h.a.i.) e incidência (exp. I e II) 60, 72, 96, 120, 144 horas após a inoculação de macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV), inoculadas com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no experimento II, 2007.....	63

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Progresso da incidência de <i>C. perennans</i> em frutos inoculados na colheita (a) e armazenados (b) e média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (c) em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (C), <i>Apple stem grooving virus</i> (G), <i>Apple stem pitting virus</i> (P) e <i>Apple mosaic virus</i> (M) e sem infecção viral (teste), 2007. (ANOVA com dados transformados por raiz de x e $Pr > F: 0,0077$ ) .....	36
2. Atividade das enzimas peroxidase e polifenol oxidase (u.e/min/gr tecido) e teor de compostos fenólicos (mg/100gr) extraíveis em água, metanol 50% e metanol P.A. em frutos pré-infectados com <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (C), <i>Apple stem grooving virus</i> (G), <i>Apple stem pitting virus</i> (P), <i>Apple mosaic virus</i> (M) e sem infecção viral (teste), 2007. (ANOVA: 5% de significância).....	40
3. Firmeza (lb), teor de Sólidos Solúveis Totais (°brix) e escala iodo-amido (índice de Townsend & Heuberger, 1943) em frutos de macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas isoladamente ou em complexos virais com <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (C), <i>Apple stem grooving virus</i> (G), <i>Apple stem pitting virus</i> (P) e <i>Apple mosaic virus</i> (M) e sem infecção viral (teste) após a colheita (superior) e após 2 meses de armazenagem em câmara fria (2 °C) (inferior). (ANOVA: 5% de significância), 2007.....	45
4. Abertura lenticelar em frutos de macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas isoladamente ou em complexos virais com <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (C), <i>Apple stem grooving virus</i> (G), <i>Apple stem pitting virus</i> (P) e <i>Apple mosaic virus</i> (M) e sem inoculação viral (teste). Após a colheita (a) e após 2 meses de armazenamento em câmara fria (2 °C), 2007. O asterisco diferencia os frutos da infecção viral GCPM dos demais (ANOVA).....	48
5. Incidência e número de manchas por folha em macieiras ‘Maxi Gala’ com e sem pré-infecção de <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV) inoculadas com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> no experimento I (a,c): avaliadas de 0 a 192 horas após inoculação e no experimento II (b,d): avaliadas de 0 a 144 horas após inoculação, 2007. Barras indicam o desvio padrão em cada data.....	58
6. Porcentagem da área de folha necrosada em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com <i>Apple stem grooving virus</i> (ASGV) e sem infecção viral (testemunha), medida pelo programa ImageJ as 144 horas após inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , 2007. *: difere os tratamentos pelo teste <i>t</i> (5% probabilidade).....	62



7. Regressão linear entre incidência e número de manchas por folha em macieiras ‘Maxi Gala’ com (a) e sem pré-infecção (b) de *Apple stem grooving virus* (ASGV) inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* no experimento I e II, 2007. \*\*: regressão linear com  $Pr > F: <0,01$ ..... 63
8. Atividade das enzimas peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO) (u.e/min/gr tecido) e teor de compostos fenólicos (mg/100gr) extraíveis em água, metanol 50% e metanol puro (P.A.) em plantas pré-infectadas com *Apple stem grooving virus* (ASGV) e sem infecção viral (teste), 2007. \*: difere os tratamentos pelo teste  $t$  10%; fenóis: ANOVA: 5% de significância; n.s.: não significativo..... 67

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo da macieira no mundo ocupa uma superfície de 5,2 milhões de hectares com uma produção de aproximadamente 58 milhões de toneladas de frutos em 2003, tendo a Ásia com 52% da produção, e deste 66% na China (Castellarnau, 2004). Segundo a FAO (2007), na safra de 2005, a China produziu 25 milhões de toneladas de frutos, seguida pelos Estados Unidos com 4,25 milhões. O Brasil ocupa a 14ª colocação, com 845 mil toneladas. Em 2004, foi responsável por cerca de 18% da produção da América do Sul com 1 milhão de toneladas, sendo que as cultivares Fuji e a Gala respondem por 90% do total (Hauagge, 2003; Castellarnau, 2004).

A cultura da macieira tem apresentado uma evolução considerável nos últimos anos dispondo-se atualmente de uma ampla gama de cultivares nos circuitos comerciais que permite cobrir as diferentes épocas de colheita, aportando grande variedade de colorações e gostos adaptados às exigências de grande parte dos consumidores (Castellarnau, 2004). O germoplasma de macieira é rico e variado, mas devido aos cruzamentos entre parentais, principalmente entre as cultivares modernas, há um processo de diluição genética, no qual há uma perda da diversidade do germoplasma resultando numa maior suscetibilidade à algumas doenças (Way et al., 1990).

Um grande número de vírus e agentes assemelhados infectam a macieira, entre os quais se destacam o “*Apple stem grooving virus*” (ASGV), “*Apple chlorotic leafspot virus*” (ACLSV) e “*Apple stem pitting virus*” (ASPV) (Nickel et al., 1999 e 2001). Os

vírus influenciam na produção de mudas diminuindo a quantidade e qualidade das mesmas, afetando a viabilidade das enxertias, reduzindo a produtividade do pomar devido à menor produção por planta como também o tamanho dos frutos. Os consumidores podem também ser afetados pelo aumento dos preços dos frutos e redução da oferta dos mesmos (Cembali et al., 2003). Para Castro & Lessa (2001) a baixa qualidade das mudas produzidas está relacionada ao alto índice de infecções de virais em pomares de macieira no Brasil.

Segundo Nickel (2003) há ainda a redução da produção de mudas viáveis quando é utilizado um material infectado, assim como o vigor das mudas, presença de cancos nos porta enxertos sensíveis e declínio precoce da planta. As doenças virais em plantas perenes são mais perigosas do que em plantas anuais, pois infecções latentes podem afetar pouco na produção e com isso não ser identificada à presença da doença no pomar e, desta maneira a mesma se espalhar através de material propagativo (Cembali et al., 2003). As plantas podem começar a ter o declínio da produção após 1 a 2 anos depois de realizado o enxerto com a cultivar copa ou porta-enxerto infectado (Yanase et al., 1997).

Nas cultivares comerciais, as plantas infectadas com vírus latentes, não demonstram os sintomas característicos da doença e é impossível selecionar plantas sadias pela simples observação a campo (Kuhn, 1999). Segundo Yanase et al. (1997) a doença conhecida por 'apple topworking disease' (ATD) - causada provavelmente por uma infecção geralmente mista de ACLSV, ASGV e ASPV, não ocorrem em cultivares copa sobre porta-enxertos das séries Malling (M) e Malling-Merton (MM), que são tolerantes as viroses latentes de maçã.

Uma planta infectada levada ao pomar poderá ter desempenho comprometido por toda vida, pois a produção pode ser reduzida entre 15 a 45% segundo a cultivar e o isolado do vírus ou segundo ao complexo viral, sendo que a queda de produção é

potencializada por infecções múltiplas (Lemoine, 1990). O impacto na produção depende do isolado em combinação com a cultivar, porta-enxerto, nutrição e idade da planta (Tabela 1).

Castro & Lessa (2001) em pequenas amostragens em pomares no país encontraram 67% de incidência de com ACLSV, 37% com ASGV, pouca presença de ApMV e ausência de ASPV, além dos pomares mais novos apresentarem menor infecção. Entretanto, Nickel et al. (2001) em amostragem realizada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul identificaram ACLSV, ASGV e ASPV em diversas cultivares copa e porta-enxertos. Segundo Nickel (2003) a viabilidade de pomares com plantas viróticas é menor, pois são mais sensíveis a doenças fúngicas e isso aumenta a necessidade de agrotóxicos, além de serem mais sensíveis a estresses abióticos (geadas tardias) e bióticos (como o replantio).

TABELA 1 – Efeito na redução de produção de maçã devido às doenças virais: *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple mosaic virus* (ApMV) e *Spy epinasty and decline* (SED).

Cultivar de maçã	Vírus	Redução de produção (%)
	ApMV	46
Golden Delicious	ASGV, ASPV e ACLSV	12 – 30
	ApMV (isolado 1)	10
	ApMV (isolado 2)	49
Granny Smith	ACLSV, SED e ASGV	13 – 18
	ACLSV + SED + ASGV	35
McIntosh	ApMV	9
Red Delicious	ApMV	42

Adaptado de Cembali et al. (2003); Nickel (2003)

Pela análise da tabela 1 verifica-se que a cultivar Golden Delicious possui grande sensibilidade às infecções virais. A Gala provendo do melhoramento desta (Kidd's Orange Red x Golden Delicious; Way et al., 1990), pode ter o mesmo problema, indicando que é de suma importância fazer um estudo com isolados presentes no Sul do Brasil nas

cultivares de maior destaque econômico.

Além da redução de produção pode ocorrer uma diminuição da qualidade dos frutos. Zanuz et al. (1993) e Kuhn & Protas (1988), identificaram em videiras viróticas uma diminuição da qualidade dos frutos para vinificação, produzindo cachos com menor teor de sólidos solúveis totais e intensidade de cor.

## **1.1. Principais vírus da macieira**

### **1.1.1 - Família *Flexiviridae***

As espécies virais para pertencer a esta família devem possuir no mínimo 72% de identidade nas seqüências dos nucleotídeos e 80% de identidade na seqüência dos aminoácidos para os genes da proteína do capsídio e da polimerase (Adams et al., 2004).

#### **1.1.1.1 - *Apple stem grooving virus* (ASGV)**

- Taxonomia: Gênero: *Capillovirus*
- Propriedades biológicas

O ASGV ocorre em macieiras, pereiras, pereiras japonesas, damasqueiros, cerejeiras, citros, lírios e em *Actinidia chinensis* (Clover et al., 2003; Kinnard et al., 1996; Magome et al., 1997). Citros são infectados pelo Citrus tatter leaf virus isolado, identificado como isolado ASGV, com o qual compartilha ampla identidade genética (Yoshikawa et al., 1993). Em combinações de enxerto e porta-enxerto sensíveis, nas quais os sintomas de necrose se desenvolvem usualmente na região de união, causa a doença de sobre-enxertia (Yanase et al., 1997). No Japão provoca declínio da macieira no porta-enxerto Mitsuba-kaido, *Mitsuba sieboldii* (Yanase, 1974). Plantas enxertadas sobre o porta-enxerto EM 9 são mais sensíveis às infecções virais que as plantas sobre EM 26 ou

MM 106 e essa sensibilidade se expressa na redução de produção de porta-enxertos clonais viróticos no viveiro (Nickel, 2003). O vírus é usualmente latente em muitas cultivares comerciais e os sintomas são de severas caneluras e enegrecimento do xilema, necrose do floema, redução de vigor da copa e declínio da planta, sendo algumas vezes associado com ACLSV (Nickel et al., 2001). O ASGV é disseminado apenas por enxertia (Magome et al., 1999). Segundo esse autor numa mesma planta infectada podemos encontrar uma mistura de seqüências variantes e polimorfismo deste vírus. Esta variação pode ocorrer devido às sucessivas acumulações de nucleotídeos pré-existentes no porta-enxerto e/ou pela transmissão do enxerto.

- Propriedades morfológicas e moleculares

O ASGV é constituído de uma fita simples de RNA positivo com 6496 nt de comprimento excluindo o 3' terminal poliadenilado, contém 2 “fitas de leituras aberta” (ORFs) com sobreposição, 1 e 2 (Yoshikawa et al., 1992). O ASGV pode causar doença, sendo o agente causal de desordem na união entre copas de citrus sobre porta-enxerto *Poncirus trifoliata*, em citrus tem o sinônimo de *Citrus tatter leaf virus* (CTLV), pois este não pode ser distinguido de ASGV baseado na seqüência de nucleotídeos, considerando-se CTLV um isolado de ASGV (Magome et al., 1997; Ito et al., 2002). A ORF 1 codifica uma poliproteína de 242 kDa contendo transferase, helicase, RNA polimerase e proteína do capsídeo (CP) na região terminal, enquanto a ORF2 é responsável pela provável proteína do movimento de 36 kDa (Magome et al., 1999). A simples mutação no nucleotídeo 4646, de U para C no ORF1, leva a atenuação de sintomas em plantas, pela diminuição na atividade da replicase, afetando assim a replicação viral (Hirata et al., 2003).

#### **1.1.1.2 *Apple stem pitting virus* (ASPV)**

A descrição do ASPV segue o trabalho de Martelli & Jelkmann (1998):

- Taxonomia: Gênero: *Foveavirus*
- Propriedades biológicas

ASPV infecta primariamente pomáceas, causando doenças em macieiras (copa) bem como na área da enxertia em porta-enxertos suscetíveis (*Malus prunifolia* var. *ringo* - Maruba, *M. sieboldii* - Mitsuba, *M. sieboldii* var. *arborescens* – Kobanozumi e pêras). Os sintomas consistem em caneluras cilíndricas corticosas, epinastia e declínio, desenvolvendo-se em algumas espécies de *Malus* e de Virginia Crab (maçã silvestre da América do Norte) e na planta indicadora Spy 222. Além disso, há uma estreita relação entre ASPV e o agente causal da mancha necrótica da pereira, doença ainda não relatada no Brasil (Becker et al., 2001).

Não há vetores conhecidos e a transmissão ocorre por enxertia e o vírus é persistente no material propagativo do hospedeiro. É transmissível mecanicamente, com alguma dificuldade, para *Nicotiana occidentalis* e subespécie *obliqua* e para *Chenopodium murale*, elicitando infecções localizadas. O vírus pode ser facilmente inoculado quando se utiliza *N. occidentalis* cv. 37B (Radaelli et al., 2006).

O ASPV frequentemente ocorre em combinação com outros vírus como ACLSV e ASGV (Klerks et al., 2001). O ASPV ocasiona severa desorganização da citologia das células infectadas, mas não com específicas estruturas citopatológicas ou corpos de inclusão. As partículas virais acumulam-se em “pacotes” no citoplasma.

- Propriedades morfológicas, moleculares e físico-químicas

Os vírions são filamentos fortemente flexionados com comprimento de 800 nm. As partículas de ASPV sedimentam a 2 ou 3 bandas em gradiente de densidade de sucrose, resistem moderadamente a altas temperaturas (inativação termal ao redor de 60 °C) mas não a solventes orgânicos, e são instáveis a clorito de cézio e sulfato.

São constituídos de uma fita simples de RNA positivo, poliadenilado no

terminal 3', com tamanho de 9306 nt (Jelkmann, 1994). O capsídio viral é um simples polipeptídeo de 44 kDa de tamanho. As proteínas não estruturais consistem de um grande polipeptídeo de 230 – 240 kDa contendo o viral RNA-dependente RNA polimerase (RdRp), helicase e metiltransferase. Os vírions aparentemente não contem lipídios ou carboidratos. O genoma de ASPV contem 5 ORFs: ORF 1 codifica as proteínas relacionadas com a replicação, 2 a 4 constituem um bloco triplo de genes envolvidos na movimentação célula-célula e o 5 na proteína do capsídio. Os ASPV vírions acumulados no citoplasma das células infectadas possuem a estratégia de replicação comparável aos potexvirus, baseada na direta expressão do 5' proximal ORF e expressão a jusante ORFs em RNAs subgenômicos. A organização genômica é muito correlata com o potexvirus, mas apresenta uma grande proteína do capsídio de 44 kDa (Jelkmann, 1994).

### **1.1.1.3 *Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)***

- Taxonomia: Gênero: *Trichovirus*
- Propriedades biológicas

O ACLSV ocorre em pomáceas e drupáceas, sendo possível à distinção de duas linhagens por sorologia, a linhagem típica e ao porta-enxerto 'Marubakaido' (Maruba), sendo os sintomas identificados em plantas indicadoras arbóreas e herbáceas (Yanase et al., 1997). A linhagem típica induz ao declínio de todas as cultivares comerciais propagadas sobre porta-enxerto Maruba e de todas cultivares sobre alguns clones de Mitsuba e Kobanozumi. A linhagem Maruba não induz sintomas em copas sobre Maruba mas causa declínio das plantas em alguns clones de Mitsuba e Kobanozumi.

Algumas desordens nos frutos podem ser ocasionadas por este vírus, como russeting em frutos verdes e até maduros, os danos em folhas podem ser de manchas foliares, e os sintomas podem ser acentuados com a ocorrência de baixas temperaturas após



o florescimento (Yanase et al., 1997). O ACLSV causa alta diversidade de sintomas nos gêneros *Malus* e *Prunus*, isto provém da grande variabilidade genética deste vírus (Desvignes & Boyé, 1988). Recentemente, mais uma nova espécie de vírus foi identificada em infecções virais de *Prunus*, antes definida como um isolado de ACLSV, agora como o nome de *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV) (Liberti et al., 2005). Isto ocorreu através de diferenças sorológicas e de hospedeiros, não infectam *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*, seqüência genômica e reconstrução filogênica das proteínas virais.

Segundo Rwahni et al. (2004) pela análise filogênica da seqüência de nucleotídeos e aminoácidos em ACLSV, este pode ser diferenciado em dois grupos. O grupo A no qual pertencem as infecções em maçãs e a maioria dos frutos de caroço e o grupo B, com apenas 4 isolados presentes em frutos de caroço.

Dos vírus que afetam as espécies de *Malus*, o ACLSV pode ser eliminado relativamente fácil por curtos períodos de tratamento térmico e por cultivos de meristema apical (Knapp et al., 1995; Gabova, 1988).

- Propriedades morfológicas, moleculares e físico-químicas

O ACLSV pertence ao grupo de vírus que apresentam os maiores genomas de RNA, chegando 20000 nt (no caso da tristeza do citrus), e ao contrário dos outros deste grupo não há vetor de transmissão, já que a mesma ocorre apenas mecanicamente (Dolja et al., 1994). O genoma de ACLSV apresenta 7552 nt, fita simples de RNA positivo, excluindo a cauda de poliadenilada e contém 3 ORFs (1, 2 e 3), codificando proteínas com valores de 216 kDa, 50 kDa e 22 kDa respectivamente (Sato et al., 1993). A ORF 1 codifica proteínas envolvidas na replicação, enquanto a ORF 3 é responsável pela proteína do capsídio. A ORF 2 origina a proteína do movimento (Satoh et al., 2000). Esta proteína pode localizar-se no plasmodema e serve para peneirar o tráfico de elementos entre células

vizinhas, demonstrando que pode estar envolvida no movimento em longas distâncias do vírus (Yoshikawa et al., 1999).

### **1.1.2 - Família *Bromoviridae***

#### **1.1.2.1 *Apple mosaic virus* (ApMV)**

- Taxonomia: Gênero: Ilarvirus
- Propriedades biológicas

O mosaico da maçã foi descrito primeiramente no início do século XIX sendo o vírus ApMV associado com esta doença (Howell et al., 1997). Durante a primavera as cores amareladas para creme desenvolvem-se na expansão das folhas, chegando a necróticas, nas plantas infectadas. As folhas severamente atacadas caem prematuramente podendo causar reduções na produção em mais de 50%. Ocorre extrema variação nas severidades dos sintomas, isto é resultado da interação sensibilidade da cultivar, como a Golden Delicious e Granny Smith, e virulência do isolado (Howell et al., 1997). As cultivares Golden Delicious, Lord Lambourne e Jonathan são muito sensíveis enquanto McIntosh e Cortland os sintomas são muito fracos (Kristensen & Thomsen, 1963). Segundo Petrzik (2003), além de macieiras, o ApMV tem ocorrência mais de 30 espécies, como em morangueiros, em todas as frutas de caroço, em pequenas frutas (groselha, amora e framboesa)e mais recentemente em pereiras.

Não há vetores conhecidos de transmissão do vírus, e não há evidências de transmissão por sementes. Pode ser mecanicamente transmitido para plantas herbáceas indicadoras como *Chenopodium quinoa* Willd e *Cucumis sativus* L. O mecanismo de transmissão é ainda desconhecido (Shiel & Berger, 2000).

- Propriedades morfológicas e moleculares

O ApMV é um vírus multigenômico com partículas de formato isométrico a baciliforme (curto) de 25 – 29 nm de diâmetro. A família a qual pertence tem genoma de RNA fita simples positivo dividido em 3 componentes designados RNA 1, 2 e 3 e contém um RNA 4 que é um mensageiro subgenômico (mRNA), derivado de bicistrônico RNA 3 (Petrzik & Lenz, 2002), para a CP do vírus (Shiel & Berger, 2000). O RNA 1 possui 3476 nt de tamanho enquanto RNA 2 tem 2979 nt, os dois codificam para vírus replicases. Estes são muito correlatos com o *Alfafa mosaic virus* (AMV) (*Alfamovirus*), mais que os outros *ilarvirus*, em todos os produtos gênicos, com exceção do CP (Shiel & Berger, 2000). O RNA 3 que codifica para proteína do movimento, 2056 bases, possui grande homologia com AMV e *Prune dwarf virus* (PDV) (Shiel et al., 1995). Segundo Shiel & Berger, 2000 é possível que AMV tenha se originado de ancestrais em comum com ApMV e PDV e adquirido o gene da CP de outros vírus (ou talvez de genes de planta) habilitando-se a ser transmitido por afídios.

## **1.2. - Métodos de detecção viral**

A validação do teste de diagnóstico o controle de qualidade de material de plantas é um clássico problema de teste de hipóteses (Marinho et al. 2003) e dois tipos de erros podem ocorrer: (i) falso positivo quando plantas saudáveis são marcadas como infectadas e (ii) falsa negativa quando os testes concluem que o patógeno é ausente nas plantas infectadas.

Segundo Nolasco (2003), em uva, entre os membros do International Council of Viruses and Virus-like Disease of the Grapevine (ICVG), 39 laboratórios declararam diagnosticar vírus, viróides e fitoplasmas, sendo que destes, 62% são baseados em Centros Acadêmicos ou Instituições de Pesquisas, 23% são Companhias Comerciais (focadas em diagnoses ou atividades em viveiros) e 15% em órgãos de Agricultura governamentais. A

situação não deve ser diferente para a cultura da maçã em todo o mundo. Em 2002 o número de testes com ELISA foi cerca de duas vezes maior do que os realizados com PCR ou de indexação biológica.

### 1.2.1 Indexação biológica

A indexação é reconhecida internacionalmente como a essência da detecção de vírus em plantas frutíferas (Kirby et al., 2001). A utilização de plantas indicadoras como método de identificação é muito trabalhosa e leva muito tempo para ser executada, sendo que os resultados podem ser não confiáveis (James, 1999). Avaliações no campo com este método levam em torno de 3 anos e em casa de vegetação leva de 3 a 4 meses, com espécies de *Malus* (Kirby et al., 2001).

TABELA 2 – Espécies mais utilizadas para diagnóstico em indexação (plantas lenhosas) e com plantas herbáceas para os vírus *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple chlorotic spot virus* (ACLSV) e *Apple mosaic virus* (ApMV).

Vírus	Espécies indicadoras	Fonte
ASGV	<i>Malus sylvestris</i> cv. Virginia Crab, <i>M. micromalus</i> cv. GMAL 273.a, <i>Chenopodium quinoa</i> , <i>Nicotiana glutinosa</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	Kirby et al. (2001), Lister (2004), Gilles & Bormans (1988)
ASPV	<i>M. spp.</i> cv. Spy 227 e Radiant Crab, <i>N. Occidentalis</i> cv. 37B	Klerks et al. (2001), Friduland & Aichele (1987), Gilles & Bormans (1988), Radaelli et al. (2006)
ACLSV	<i>M. sylvestris</i> cv. R12740-7A (apple Russian) e LLS5, <i>M. platycarpa</i> , <i>M. hupehensis</i> , <i>M. prunifolia</i> var. <i>ringo</i> (Maruba), <i>C. quinoa</i> e <i>C. amaranticolor</i>	Yoshikawa (2004), Castro & Lessa (2001)
ApMV	<i>Cucumis sativus</i> , <i>Torenia fournieri</i> , <i>Vinca rósea</i> , <i>Vigna sinensis</i> e <i>M. sylvestris</i> cv. Lord Lambourne, <i>M. domestica</i> cv. Golden Delicious	Fulton (2004), Howell et al. (1997), Gilles & Bormans (1988)

Klerks et al. (2001) utilizaram *Nicotiana occidentalis* como planta indicadora a ASPV, mas encontraram resultados muito insatisfatórios comparados aos métodos de hibridização, devido principalmente à influência da titulação viral nas épocas do ano e

origem do material – casca de ramos, flores, frutos ou folhas. James et al. (1999) encontram disparidades nos resultados na detecção de ASGV, entre indicadoras, *Malus* sp. e RT-PCR, sendo este último mais confiável. As espécies indicadoras mais utilizadas para diagnósticos estão apresentadas na Tabela 2.

### **1.2.2 - ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)**

Este método de detecção, utilizado a cerca de 25 anos, significou um importante avanço na identificação de vírus, não somente com respeito a sua sensibilidade mas também pela produtividade, possibilita um grande número de análises durante o ano (López et al., 2003).

Uma importante característica da imunoborbância é a habilidade para detectar os patógenos em baixas concentrações em comparação aos clássicos métodos de imunoprecipitação (Clark, 1981).

Este método, usando monoclonal ou anticorpos recombinantes, é mais fácil e menos trabalhoso quando comparada com as técnicas moleculares e outras sorológicas (López et al., 2003). Mas este método é menos preciso que os moleculares, IC-PCR (Imunocapture Polymerase chain reaction) – Kirby et al. (2001), devido à baixa titulação viral.

Técnicas sorológicas têm sido usadas para a detecção e ASGV, mas o vírus pode ser indetectável em baixas concentrações e também a dificuldade de produzir o anti-soro deste vírus, conseqüentemente o *citrus tatter leaf virus* (CTLV) – relatado sorologicamente, tem sido usado para a detecção de ASGV (James, 1999). Castro & Lessa (2001) verificaram que o teste foi eficiente para o levantamento de ACLSV, ASGV, ApMV e ASPV em pomares de maçã no Brasil.

Nos últimos anos têm surgido novos métodos nos quais juntam as duas técnicas

– ELISA e RT-PCR, como o Amplidet RNA (Klerks et al., 2001) que possibilitam uma maior sensibilidade e menos trabalho na detecção de vírus.

### **1.2.3. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)**

Devido à alta sensibilidade o RT-PCR é o método molecular mais frequentemente usado para detecção de viroses de plantas (López et al., 2003). As vantagens são a especificidade e rapidez do processo. A especificidade é diretamente relatada com o design dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas e para a amplificação ou protocolos de hibridização.

A utilização do RT-PCR tem como foco o controle das doenças virais, que depende da capacidade de se detectar precocemente e eliminar plantas infectadas por viroses em programas de produção de material livre de vírus e de certificação e em procedimentos de quarentena (Fajardo et al., 2004).

A vantagem sobre o ELISA é de ser mais sensível e isto é uma característica importante para algumas viroses que tem uma errática distribuição na planta e estão em baixa concentração (Nassuth et al., 2000). Ulubaş & Ertunç (2005) encontraram maior eficiência, cerca de 70%, com a utilização de RT-PCR na detecção de ACLSV em *Prunus*. Segundo Mekuria et al. (2003) a utilização RT-PCR possibilita a detecção de *Prune dwarf virus* (PDV) e *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) em folhas de amendoeira, *Prunus dulcis*, durante o ano todo ao contrário do ELISA que se limita a primavera, período de intensa brotação. Em pessegueiros na Argentina, o ELISA para detectar PNRSV se limita a utilização durante o inverno e final da primavera, após este período devido a baixa titulação viral não se recomenda o seu emprego (Zotto et al., 1999). Ao contrário de Maciel (2003), que através de DAS-ELISA detectou estes vírus em pessegueiros ‘Marli’ e ‘Chiripá’ no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, durante o ano todo.

Segundo López et al. (2003) a eficiência do PCR é controlado por muitos parâmetros como o tipo de polimerase, a composição do tampão de extração (James, 1999) e estabilidade, pureza e concentração de dNTPs, parâmetros dos ciclos e bem como as características de início do processo.

Um outro fator que pode afetar a eficiência do processo é o número de etapas para as reações que ocorrem no RT-PCR (dois tubos – duas etapas), o qual aumenta o risco de contaminação, a alternativa é o método one tube-one (Marinho et al., 1998; Ragozzino et al, 2004). Deste modo há um aumento da sensibilidade e diminui significativamente a probabilidade de contaminação, mas, entretanto há uma dificuldade para optimisar as condições para ambos RT e PCR visto que todos os reagentes são misturados antes do início da reação de RT.

A metodologia desenvolvida, também chamada de one tube-one step RT-PCR (Ragozzino et al., 2004), com a utilização de HotStar *Taq* polimerase e AMV (*Avian myeloblastis virus*) aumentam a especificidade e eficiência da identificação multiplex dos vírus alvo, reduzindo ainda a possibilidade de falso positivo pela contaminação cruzada dos específicos produtos amplificados.

Segundo Ragozzino et al. (2004) há outros fatores que podem influenciar a eficiência do RT-PCR: o método de extração – alguns kits são melhores que a utilização de fenol; transcriptase reversa – *Avian myeloblastis virus* (AMV) é menos eficiente que *Moloney-murine leukemia virus* (M-MLV) e polimerase – a HotStar *Taq* DNA é mais eficiente que a standart *Taq* DNA.

Mais recentemente tem sido descrito metodologias para simultânea detecção de diferentes DNA e RNA em uma simples reação, conhecido como Multiplex PCR (López et al., 2003). A técnica do multiplex é hábil para identificar um grande número de combinações virais em diferentes espécies de frutas de caroço, utilizando-se os mesmos

iniciadores (Navarro et al., 2004). Comparado com o protocolo monoespecífico RT-PCR que requer algumas reações para se obter os mesmos resultados, o multiplex diminui o tempo empregado como também a utilização de reagentes (Faggioli & Ragozzino, 2002).

O Multiplex tem sido demonstrado em citrus (Ito et al., 2002), uva (Nassuth et al., 2000; Sabanadzovic et al., 2003) e maçã (Menzel et al., 2002; Hassan et al., 2006), sendo que nestes duas últimas culturas se utilizaram genes da planta como coamplificação de controle da reação, para evitar falso negativo. Navarro et al. (2004) obtiveram identificação viral com multiplex, em frutas de caroço, de 8 vírus mais uma coamplificação (gene Rbcl da planta), entretanto ocorreu a diminuição da sensibilidade com mais de 5 pares de iniciadores, possivelmente pela interferência entre eles.

Saade et al. (2000) desenvolveram esta técnica com a utilização de um iniciador antisense degenerado designado para os RNAs 3 e 4 de três ilarvirus (PNRSV, PDV e ApMV), no qual a eficiência da detecção destes vírus em multiplex RT-PCR foi similar ao obtido com o RT-PCR em reações individuais.

Petrzik & Lenz (2002) verificaram algumas modificações, pontos de inserção com a formação de estáveis estruturas secundárias (harpins), no gene CP de ApMV, variabilidade genética, em isolados Americanos e Europeus, o que, pode ocasionar menor sensibilidade de primers na amplificação de RT-PCR. Apesar de não ser utilizada para amplificações, devida a sua grande variabilidade, conhecida como região variável (V – region) possibilita diferenciação dos diversos isolados (Magome et al., 1999), deste modo não deve ser utilizada para detecção, apenas para caracterizar populações.

Segundo Nickel et al. (2001) os isolados presentes no Brasil de ASGV possuem baixa variabilidade da seqüência dos genes da CP e, que o uso de primers baseados em seqüências de ASGV americanos e japoneses são muito correlatos. Kirby et al. (2001) encontraram um alto grau de similaridade no gene da CP, entre isolados europeus de



ASGV, mas diferenças com isolados encontrados em pêras e CTLV o que levou a procura de primers que mostrassem um alto grau de homologia para correta detecção.

#### **1.2.4 Immunocapture PCR (IC/RT-PCR) e outros métodos**

Novas técnicas vindo sendo desenvolvidas para aumentar a eficiência e facilitar o desenvolvimento dos processos de extração de RNA e detecção. Dentre estes descritos na literatura como o Imunocapture RT-PCR no qual se utiliza anti-soro policlonal e imunoglobulina (Ig) purificada (James, 1999; Kirby et al., 2001). Segundo James (1999) o IC/RT-PCR é 4 vezes mais sensível na detecção de ASGV do que o RT-PCR.

Segundo Candresse et al. (1995), o IC-PCR aumenta a sensibilidade na detecção de ACLSV, especialmente durante o verão quando a titulação é bem baixa, período no qual ELISA é notoriamente de pequena efetividade. IC-PCR pode ser usado não somente com folhas, mas também com casca. Apesar de este método ser menos simples que RT-PCR ele deve ser utilizado no caso de baixa titulação viral (Ulubaş & Ertunç, 2005).

O RT-PCR-ELISA vem sendo utilizado muito recentemente na detecção de vírus em frutíferas e segundo Marinho et al. (2003) esta técnica combina o desempenho da PCR, a especificidade da hibridização molecular e as facilidades do teste de ELISA.

A detecção dos produtos de amplificação RT-PCR é realizada hibridizando esses produtos com uma sonda de captura marcada com biotina, ligada à placa de ELISA previamente sensibilizada com estreptavidina, e uma sonda de revelação marcada com dioxigenina (Marinho et al., 2003) O complexo é detectado utilizando-se um conjugado fosfatase alcalina marcada com anti-DIG.

Menzel et al. (2003) verificaram que não há hibridização cruzada com produtos não específicos do PCR e deste modo indicando que a captura de oligonucleotídeos é

altamente específica, prevenindo falso positivo. Esta técnica também pode ser utilizada para multiplex com controle de amplificação interna prevenindo resultados falsos negativos.

Shamloul et al. (2002) demonstraram a possibilidade do RT-PCR-ELISA na identificação de seis viróides de quatro grupos diferentes com a sintetização simultânea de cDNAs em um único tubo. Os resultados revelaram que cada sonda capturada hibridiza somente o seu amplicon DIG complementar, sendo detectado pelo sistema colorimétrico.

Dovas & Katis (2003a e 2003b) tem desenvolvido o método de detecção simultânea chamado de RT-PCR marcado agrupado, no qual utiliza iniciadores deoxyinosine degenerados. Neste método há uma amplificação adicional de seqüências de DNA desconhecidas e membros identificados de Closteoviridae, com a vantagem de uma efetiva detecção de vírus esquemas de certificação. Segundo os autores este método pode ser usado em larga escala na aplicação de detecção devido a redução do tempo e custo por amostra, pelo emprego de degenerados iniciadores e aumenta a sensibilidade e especificidade pelo uso do formato PCR agrupado, empregando um segundo par de iniciadores degenerados.

### **1.3. Métodos, fonte de material e épocas de extração de RNA total**

A análise *in vivo* é um passo referente à validação do processo para verificar se o mesmo possibilita um alto grau de confiabilidade. Para isso é importante a correta extração dos ácidos nucléicos totais. Algumas dificuldades de interpretação de resultados negativos podem ocorrer devido à degradação do RNA ou pela presença de inibidores da transcriptase reversa ou na atividade da polimerase, em vês da ausência do patógeno (Menzel et al., 2002).

A técnica de RT-PCR tem sido bem descrita para a detecção do vírus ASGV,

mas envolve dificuldades e complexas extrações de RNA, devido a isso é muito importante o tampão de extração (James, 1999). A extração com fenol/clorofórmio é efetiva em tecidos de macieiras durante a primavera, mas posteriormente, no período de crescimento vegetativo, apresenta resultados errôneos (Hassan et al., 2005).

Em macieiras, a extração de RNA total para detecção de ASGV tem sido realizada com muito sucesso através da captura de partículas em sílica (Nickel et al., 2001, Menzel et al., 2002).

Altas concentrações de compostos fenólicos e polissacarídeos podem inibir a atividade da *Taq* polimerase e com isso não ocorrer à detecção do vírus, devido a esses problemas, o tempo consumido e complicados processos possibilitam a contaminação das amostras e subsequente falso-positivo (Dovas & Katis, 2003).

Algumas vezes a detecção é complicada devido à presença de ampliações de DNA não específico (Menzel et al., 2003). Os tecidos de plantas lenhosas, especialmente quando crescem a campo, podem conter altos conteúdos de componentes fenólicos e polissacarídeos que podem ter atividade inibitória e a produção de baixa quantidade de RNA sendo estes especialmente abundantes nos tecidos de frutos e flores (Gasic et al., 2004; Nassuth et al., 2000). Em alguns casos a ausência na detecção da amplificação pode ser devido à degradação do RNA durante o transporte ou armazenamento dos tecidos das plantas ou extratos (Nassuth et al., 2000).

A extração de RNA em frutos pode ser especialmente problemática devido a presença de altas quantidades de compostos fenólicos e polissacarídeos, especialmente de pectinas, pois estas encapsulam grandes moléculas como ácidos nucléicos e proteínas (Asif et al., 2006). Os autores sugerem a utilização de métodos com álcool e acetona, principalmente este por produzir uma boa quantidade de RNA.

Gasic et al. (2004) realizaram um estudo aprofundado sobre épocas e local de

coleta de material para extração de RNA em maçã. Os autores observaram uma maior concentração de RNA em ramos dormentes, flores ou frutos no início da frutificação sendo que próximo à maturação ocorre uma acentuada diminuição.

Segundo Klerks et al. (2001) há dificuldade de detecção de ASPV com utilização de plantas indicadoras após a primavera e até o final do verão, quando se utiliza a casca das plantas para inoculação mecânica, devido à baixa titulação nesta época. Kirby et al. (2001) encontraram disparidades entre os resultados de ELISA e IC-PCR devido à baixa titulação de ASGV quando utilizaram folhas na primavera para otimizar a concentração viral. Os autores mencionam que outros trabalhos tiveram maior sucesso durante a dormência das plantas utilizando casca de ramos, frutos e tecidos das raízes, mas ainda não está claro qual o melhor material em cada sessão para os melhores resultados com IC-PCR. Para ASPV, alguns trabalhos confirmaram uma detecção consistente com RT-PCR em folhas, mas Klerks et al. (2001) demonstraram que as mesmas são uma pobre fonte comparada a gemas ou flores, utilizando o método AmpliDet RNA (sonda).

No Brasil, a utilização de RT-PCR para identificar ASPV em pereiras européias cv. Starkinson e Abate Fetel como nas asiáticas Kousui e Housui, em ramos e folhas durante o outono, apresentou grande confiabilidade. Kundu et al. (2003) identificaram como melhor material vegetal para detecção de ASGV, em 4 cultivares de macieiras, através de RT-PCR, a utilização de folhas durante a época de floração, ao invés de pétalas florais ou folhas e ramos durante o resto do ano.

## **1.4. Doenças fúngicas**

### **1.4.1. Podridão olho de boi**

A podridão de maçãs conhecida como “olho de boi” é causada por

*Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweb (sin. *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs), a fase assexual do fungo. Sua fase sexual é *Pezicula perennans* (Zeller & Childs) (sin. *Neofabraea perennans*). Em pêras, em regiões produtoras nos Estados Unidos, a podridão é causada por *Neofabraea perennans* e *N. alba* (Henríquez et al., 2004). A fase sexual é comparativamente mais rara e sem importância para a dispersão da doença no pomar (Dugan, 1993).

*C. perennans* causa cancos perenes e podridões em frutos, apesar do cancro ter um crescimento lento e não causar morte de plantas é uma fonte de inóculo para as podridões (Mari et al., 2002). A podridão está entre as principais doenças de verão no Brasil e, junto a *Penicillium expansum*, causa as maiores perdas em pós-colheita (Sanhueza et al., 2006). No Brasil a incidência após a conservação, na safra de 2000, ficou entre 13 a 16% nas cultivares Fuji e Golden Delicious (Sanhueza, 2002). Entretanto, na Itália, a incidência de podridão olho de boi em maçãs refrigeradas após 5 meses nas cultivares Fuji e Pink Lady foi de 18 e 30%, respectivamente (Marie t al., 2002).

No Chile a primeira presença de *Neofabraea alba* em frutos destinados ao mercado local ou para exportação, durante a safra de 2004, foi detectado nas cultivares Fuji, Braeburn, Royal Gala e Granny Smith, mas os maiores problemas são em Pink Lady (Henríquez, 2005). Cultivares que são mais propicias a desordens fisiológicas lenticelares, como a antiga cultivar Allington Pippin, também são mais suscetíveis a *G. perennans* (Wilkinson, 1944). Tahir et al (2007) encontraram, na Suécia, maior suscetibilidade a *Pezicula malicorticis* em maçãs ‘Aroma’ provenientes de pomares até 4 anos comparados aos de meia idade (8 anos), possivelmente devido a maior produção de etileno, maior perda de firmeza e “flavor” durante o armazenamento. O atraso na época de colheita também favorece o número de lenticelas com podridão (Landfald, 1981).

#### 1.4.1.1. Infecção por *Cryptosporiopsis perennans* em frutos de macieira

A porta de entrada de infecção é pelas lenticelas, em rachaduras na cera presentes na epiderme dos frutos ou ainda pelas aberturas naturais como a calicinal e a peduncular (Edney, 1956; Sanhueza et al., 2006). O fungo não penetra através da epiderme intacta ou sem a presença de lenticelas (Wilkinson, 1945). Segundo Wilkinson (1944) pode ainda penetrar nas margens de lesões ocasionadas por sarna (*Venturia inaequalis*).

Segundo Edney (1970) os conídios entram nas lenticelas dos frutos antes da sua formação completa, podendo ser inacessíveis a fungicidas. O fungo pode entrar numa curta fase de dormência após a germinação e assim aumentar a resistência a medidas de controle. Kienholz (1956) demonstrou que injúria devida a frio, durante o inverno e intensos períodos de chuva durante o crescimento de frutos da cv. Yellow Newton provocou danos de 57%, causados pela doença, em frutos armazenados. A podridão “olho de boi” usualmente aparece no final da armazenagem e comumente não se dissemina de fruto durante este período (Dugan, 1993).

Segundo Clements (1935) em Pomáceas as lenticelas são derivadas do rompimento do estômato causado pelo estiramento da epiderme, intervalos na epiderme causada pela perda completa de tricomas durante o desenvolvimento do fruto e outros intervalos onde a epiderme não acompanha o desenvolvimento e a expansão do tecido interior (polpa).

As lenticelas nos frutos podem estar abertas ou fechadas. Estarão fechadas se a cutícula se sobre por a lenticela e assim fechando-a, se a cutícula se desenvolver sobre as células sublenticelares, se não houver desenvolvimento da cutícula na lenticela mas as células sublenticelares estiverem suberizadas e se o desenvolvimento do felogênio resulta em camada suberizada.

A presença de lenticelas abertas deve-se aos estômatos permanecerem abertos com células subestomais modificadas incompletamente ou completamente, mas com grandes espaços intercelulares as lenticelas estarem firmemente fechadas, sendo rompidas pela tensão do desenvolvimento do fruto e a falha no reparo dos tecidos, apenas os frutos em estágio inicial de desenvolvimento tem eficiente mecanismo de reparo (Clements, 1935).

Segundo Edney (1956), lenticelas completamente fechadas são uma barreira muito mais efetiva do que as parcialmente fechadas, diminuindo a velocidade de lenticelas necrosadas, por *G. perennans*, em frutos armazenados.

Segundo Mari et al. (2002) apenas as lenticelas que apresentarem uma forte conexão entre a epiderme e o extrato suberizado possuem uma forte barreira à infecção de *Phlyctaema vagabunda* (sin. *Gloeosporium album*), fase imperfeita de *Neofabraea alba*. As junções entre esses dois tecidos constituem-se um ponto fraco na estrutura da lenticela e pó aí frequentemente se observa à entrada do patógeno (Edney, 1958). Rachaduras no extrato suberizado ou inadequadamente reparado também são pontos de entrada do patógeno (Edney, 1958).

Após a germinação, um curto tubo germinativo é originado e geralmente avoluma-se formando o apressório, sem a formação deste ocorre o contínuo crescimento de hifas sobre a superfície do fruto (Edney, 1958). O patógeno não é hábil para penetrar nos tecidos suberizados da câmara subestomática, mas quando os tecidos estão menos suberizados ocorre a penetração intracelular. A dispersão no tecido cortical é geralmente pela penetração intercelular mas a intracelular também pode ocorrer (Edney, 1958).

#### **1.4.2. Mancha foliar da gala**

A doença conhecida como “mancha foliar da gala” (MFG), causada no Brasil

principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc. (fase imperfeita), é uma das doenças de verão da macieira de maior importância (Sanhueza & Amorim, 2003). A fase perfeita (sexual), *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding e Scherenk, é a principal responsável, nos Estados Unidos, por manchas foliares em ‘Golden Delicious’, ‘Granny Smith’ e ‘Gala’ (Sutton & Sanhueza, 1998; Gonzáles & Sutton, 2004).

No Sul do Brasil, estado do Rio Grande do Sul, a predominância do patógeno encontrado em manchas foliares de macieiras é devido a *C. gloeosporioides* (75%) enquanto *C. acutatum* J.H. Simmonds é menos predominante, apenas 8% (Crusius et al., 2002).

O inóculo responsável pelas manchas foliares causadas por *Colletotrichum* é proveniente de gemas dormentes ou ramos, enquanto os isolados recuperados em folhas, no solo ou frutos mumificados induzem os sintomas de podridão nos frutos (Crusius et al., 2002).

As avaliações de suscetibilidade de cultivares a esta doença mostraram que as cv Mollies Delicious, Fuji, Everest, Griffier, Hilliery e *Malus robusta* são resistentes, enquanto a Gala, Royal Gala, Golden Delicious, Belgolden, Granny Smith e Pink Lady são suscetíveis (Sanhueza, 1999).

#### **1.4.2.1. Infecção por *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas de macieira**

A penetração do fungo requer a morfogênese celular, iniciada pela adesão do conídio na superfície do hospedeiro, germinação do conídio, alongação do tubo germinativo, formação do apressório e penetração pelo ‘peg’ infectivo (Ahn et al., 2003).

Tanto *Colletotrichum* como *Glomerella* infectam os tecidos do hospedeiro através de estrutura especializada na infecção, o apressório (Samarrai et al., 2002; Ahn et al., 2003). Segundo Yakoby et al. (2002), em estudo feito com frutos de abacate suscetíveis



a *C. gloeosporioides*, o início dos eventos que afetam a resistência é determinado pela capacidade do patógeno de interagir com a planta durante a formação do apressório.

O patógeno penetra diretamente as células da epiderme e com a formação das hifas primárias coloniza intracelularmente as células da epiderme e intercelularmente entre as células do mesófilo, neste caso as células continuam viáveis e sem sintomas visíveis. A partir do desenvolvimento das hifas secundárias ocorre o aparecimento das lesões necróticas, devido à maceração das paredes celulares (Wei et al. 1997).

O contato com a superfície da folha induz os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina (CaM) a sinalização para a germinação do conídio e diferenciação para a formação do apressório (Kim et al., 1998, Uhm et al., 2003). Ahn et al (2003) demonstraram que a regulação da concentração intracelular de poliaminas, devido ao seu efeito inibitório no patógeno, é indispensável para a germinação do conídio e formação do apressório, pois é envolvida na sinalização para ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e CaM no patógeno. Enquanto Samarra et al. (2002) identificaram 3 peptídeos que inibem o desenvolvimento do apressório, sendo 2 ferômonios de acoplamento provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* e 1 ferômonio produzido por hifas maduras do patógeno.

*C. gloeosporioides* produz enzimas pectínicas (PL) que é um fator de virulência no desenvolvimento da doença (Prusky et al., 2001). A secreção de amônia, com isso o aumento do pH no ponto de infecção, está relacionada com esse aumento de virulência. A atividade das enzimas, no hospedeiro, foi detectada ao final da fase biotrófica e estimulada com a infecção na fase necrotrófica (Shih et al., 2000).

### **1.5. Hipóteses**

Neste trabalho hipotetizou-se que plantas com infecções virais simples ou múltiplas (complexos devido à presença de mais de um vírus) pudessem ter maior

predisposição à infecção por *C. perennans* em frutos e *C. gloeosporioides* nas folhas. Além disso, as infecções virais poderiam ocasionar modificações enzimáticas e fisiológicas que poderiam contribuir na potencial predisposição.

### **1.6. Objetivos**

O objetivo principal do trabalho foi o de avaliar se frutos provenientes de macieiras cv. Maxi Gala com as infecções virais ASGV, ACLSV, ASPV e ApMV apresentam maior predisposição a *Cryptosporiopsis perennans* e em plantas com infecção de ASGV apresentam maior predisposição a *Colletotrichum gloeosporioides*. Ainda, objetivou-se verificar a ocorrência de alterações qualitativas e fisiológicas nos frutos decorrentes das infecções virais, principalmente as alterações na atividade das enzimas peroxidase e polifenol oxidase e teor de fenóis.

## **2. CAPÍTULO I - INFECTIVIDADE DE *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweb EM FRUTOS DE MACIEIRAS ‘MAXI GALA’ PRÉ-INFECTADAS COM VÍRUS LATENTES E *Apple mosaic virus***

### **2.1. Introdução**

A Região Sul do Brasil é responsável por 98% da produção nacional de maçãs (Mello, 2006). A área de macieiras chega a 35.411 ha com uma produção de frutos na safra de 2005 chegou a 846 mil toneladas (Perez, 2006). Somente nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) as produções chegaram a 505 e 297 mil toneladas, respectivamente (Mello, 2006). A maior parte da produção provém das cultivares Gala e Fuji e suas mutações clonais, 55 e 40% respectivamente (Mello, 2006).

Dentre as diversas doenças da cultura no Brasil, as mais importantes que causam podridão de frutos são a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces & De Not, sinn. *B. berengeriana*), a podridão amarga (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, *C. acutatum* J.H. Simmonds), e a podridão “olho de boi” (*Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweb) (Sanhueza et al., 2006).

A podridão olho de boi foi constatada durante a safra de 2000, a qual pode ter sido introduzida no Brasil com a importação de plantas contaminadas assintomáticas, em refugos de maçãs frigorificadas das cv. Fuji e Golden Delicious houve incidência entre 13

a 16% (Sanhueza, 2002). Em macieiras ‘Aroma’ na Noruega a necrose na lenticela causada por *C. curvispora* pode chegar a 12% (Landfald, 1981).

A doença ocorre atualmente em todas as regiões produtoras do Brasil e, junto com *Penicillium expansum*, causa as maiores perdas de maçãs ‘Fuji’ após 6 meses de frigorificação (Sanhueza et al., 2006). Com a utilização de atmosfera controlada podem-se diminuir as perdas por podridões “olho de boi” em ‘Golden Delicious’ e ‘Delicious’ (Sitton & Patterson, 1992).

A podridão “olho-de-boi” nas maçãs é marrom-clara com o centro amarelo-pálido, de forma mais ou menos circular, às vezes com margens marrom-escuras ou avermelhadas, deprimida, de textura firme e desenvolvimento lento. Internamente, os tecidos são de cor marrom amarelado e firme. As margens entre os tecidos doentes e sadios são bem definidas (Sanhueza et al., 2006). O inóculo deste patógeno é encontrado em esporões mortos, nos cancrios e em galhas de tronco com maior frequência em pomares com mais de cinco anos e nas maçãs frigorificadas (Sanhueza & Amorim, 2003).

A porta de entrada de infecção é pelas lenticelas, por rachaduras na cera presentes na epiderme dos frutos ou ainda pelas aberturas naturais como a calicinal e a peduncular (Edney, 1956; Sanhueza et al., 2006). Segundo Edney (1970) os conídios penetram pelas lenticelas dos frutos antes da sua formação completa, podendo ser inacessíveis a fungicidas.

Estudos feitos com a inoculação artificial de 9 isolados de *C. perennans*, encontrados no Brasil, feita após ferimento de frutas com 3 meses de frigorificação das cv. Gala, Fuji, Braeburn, Granny Smith, Golden Delicious, Fuji Suprema e Kiku mostraram não haver diferenças na suscetibilidade das cultivares (Sanhueza, 2007).

Entre as proteínas de defesa codificadas pelos genes da planta estão as proteínas estruturais como glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, glicina peroxidase envolvidas na

lignificação, incorporadas à matriz extracelular, na tentativa de confinamento do patógeno (Stangarlin, 2007). A atividade das peroxidases (EC 1.11.1.7) e polifenol oxidases (EC 1.10.3.1) pode ser diferente entre plantas anuais (Campos et al., 2004) como em frutos de cultivares perenes (Seyhan et al., 2007). Os estudos da função de peroxidases são numerosos em plantas herbáceas, mas escassos em plantas lenhosas (Valentines et al., 2005). As peroxidases catalisam a oxidação de compostos fenólicos utilizando o poder oxidante do  $H_2O_2$  e a sua ação tem envolvimento direto em processos de lignificação (Campos e Silveira, 2003).

As espécies reativas de oxigênio, como o  $H_2O_2$ , estão envolvidas em muitos mecanismos de resistência da planta (Resende et al., 2003): diretamente sobre o patógeno, inibindo o seu desenvolvimento; fortalecendo a parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas com proteínas estruturais e a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, fortalecendo sua integridade devido à redução da sua fluidez (Stangarlin, 2007). Com o aumento da rigidez da mesma, o crescimento diminui e, em contrapartida, aumenta a resistência mecânica e química em condições de estresse (Campos & Silveira, 2003).

A atividade de algumas enzimas, como as peroxidases e polifenol oxidases, é influenciada por estresses abióticos e bióticos (Jouili & Ferjani, 2003; Cuiming et al., 1999; Guo et al., 2007; Sun et al., 2007, Cavalcanti et al., 2007).

A atividade de peroxidases e polifenol oxidases é maior em cultivares de soja resistente a vírus, mesmo antes da inoculação, mas após a infecção ocorre diminuição da atividade das enzimas (Cuiming et al., 1999). Em cultivares, de soja ou feijão, suscetível a vírus, ocorre aumento da atividade de peroxidases após a infecção (Cuiming et al., 1999; Sudhakar et al., 2007). Deste modo a resposta à infecção é diversa conforme o genótipo do hospedeiro.

Um grande número de vírus e agentes assemelhados infecta a macieira. Entre os mais importantes destacam-se os chamados vírus latentes da macieira *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV) (Nickel, 2003). Segundo Adams et al. (2004) estes vírus pertencem à família *Flexiviridae*, incluídos nos gêneros *Capillovirus* (ASGV), *Trichovirus* (ACLSV) e *Foveavirus* (ASPV), apresentam o genoma com RNA de fita simples com calda de poly A.

Levantamento feito em macieiras das regiões de Vacaria (RS), Fraiburgo e São Joaquim (SC) demonstrou altos níveis de infecção por vírus latentes, em plantas adultas usadas como matrizes e mudas introduzidas no país (Nickel et al., 2001).

O ApMV, apesar de poucos relatos no Brasil, em alguns países, como a Turquia, apresenta alta incidência deste vírus, principalmente pomares de ‘Golden Delicious’ e ‘Granny Smith’, com 73 e 95% de incidência, respectivamente (Akbas & Ilhan, 2005). Este vírus, ao contrário dos vírus latentes, induz a formação de sintomas foliares facilmente visíveis em cvs. suscetíveis, está presente em mais de 30 espécies de plantas, como em macieiras, pessegueiros, ameixeiras, amoreiras, morangueiros e mais recentemente foi também detectado em pereiras (Petrzik, 2005). A família *Bromoviridae*, a qual pertence o ApMV, tem genoma de RNA fita simples positivo dividido em 3 componentes designados RNA 1, 2 e 3 e contém um RNA 4 que é um mensageiro subgenômico (mRNA) (Petrzik & Lenz, 2002).

A combinação de vírus latentes (ASGV, ACLSV e ASPV) causa a redução do crescimento de mudas e desuniformidade do pomar, como também em alguns casos a redução de produção (Campbell, 1969; Campbell & Sparks, 1977; Lemoine, 1990). A infecção por ApMV em macieiras ‘McIntosh’ pode ocasionar a diminuição da resistência à danos de frio intenso (Zawadzka, 1988). A maior incidência de podridão do colo, causada por *Phytophthora cactorum*, em porta-enxertos MM 104 é associada a presença de vírus

latentes (Campbell, 1969).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de infecções virais simples (ACLSV e ASGV) e múltiplas (ACLSV + ASPV + APMV, ASGV + ASPV, ASGV + ACLSV + ASPV, e ASGV + ACLSV + ASPV + APMV) na predisposição de maçãs ‘Maxi Gala’ a *C. perennans*. Após, determinar as alterações na atividade das enzimas peroxidase e polifenol oxidase e o conteúdo de compostos fenólicos dos frutos de plantas, visando contribuir para caracterizar mecanismos bioquímicos desencadeados pela infecção viral.

## **2.2. Materiais e Métodos**

### **2.2.1. Estabelecimento do plantio, cultivar utilizada e local de coleta dos frutos**

Utilizaram-se 2 plantas por tratamento com as seguintes infecções dos frutos: ACLSV (símbolo: C), ASGV (G), C + ASPV (P) + ApMV (M), G+P, G+C+P, G+C+P+M e testemunha (não inoculada). As inoculações de vírus foram realizadas por enxertos de gemas infectadas em setembro de 2004, provenientes de plantas adultas com os diferentes vírus, através de 5 gemas por planta nos tratamentos C e G, 6 gemas nos G+P e G+C+P e 9 gemas nos C+P+M e G+C+P+M. A testemunha sadia não recebeu enxerto viral.

Os frutos utilizados foram coletados de macieiras ‘Maxi Gala’ enxertadas sobre porta enxerto EM9, plantadas em agosto de 2004 com espaçamento de 1,25 x 4,00m, na área experimental da empresa Rasip Agropastoril S.A no município de Vacaria/RS. A colheita dos frutos foi realizada em duas épocas, 01/02/07 e 07/02/07.

### **2.2.2. Metodologia de detecção viral**

Empregou-se a extração de RNA total pela captura em partículas de sílica descrita por Menzel et al. (2002), utilizando-se 300mg de casca de frutos, casca de ramos ou pétalas de flores. A síntese de cDNA, PCR, amplificação e análise dos produtos foram realizadas segundo Nickel et al. (1999), Candresse et al. (1995), Jelkmann (1994) e Radaelli et al. (2006). Os iniciadores e ciclos de PCR utilizados estão contidos na Tabela 3.

Utilizou-se a metodologia de ELISA indireto (Mowat & Dawson, 1987) para detecção de ApMV com IgG (Bioreba, cód. 150712 - lot. n° 111415).

TABELA 3 – Iniciadores (nome, orientação, seqüência, posição no RNA viral e tamanho esperado do fragmento amplificado) em gel de agarose (1%), usados na RT-PCR para identificação dos vírus *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) e *Apple mosaic virus* (ApMV) em frutos de maçã ‘Maxi Gala’ utilizados para inoculação com *Cryptosporiopsis perennans*, 2007. Orientação s: senso e a: antisenso.

Nome	Seqüência 5'-3'	Posição	Tamanho
ASGV 5641s <sup>1</sup>	ATG AGT TTG GAA GAC GTG CTT C	5610-5641	755pb
ASGV 6396a	CTG CAA GAC CGC GAC CAA GTT T	6375-6396	
ACLSV A53s <sup>2</sup>	GGC AAC CCT GGA ACA GA	6875-6891	358pb
ACLSV A52a	CAG ACC CTT ATT GAA GTC GAA	7213-7233	
ASPV 4s <sup>3</sup>	CTC TTG AAC CAG CTG ATG GC	8993-9012	269pb
ASPV 5a	ATA GCC GCC CCG GTT AGG TT	9243-9262	
ApMV s	ATC CGA GTG AAC AGT CTA TCC TCT AA	1474-1499	237pb
ApMV a	GTA ACT CAC TCG TTA TCA CGT ACA A	1687-1711	

<sup>1</sup>Nickel et al. (2001); <sup>2</sup>Candresse et al. (1995); <sup>3</sup>Jelkmann (1994), citado por Radaelli et al. (2006). Ciclos de PCR utilizados para ASGV (95° 2', 35x (94° 40'', 50° 40'', 72° 1'), 72° 5'), ACLSV (94° 2', 35x (94° 40'', 50° 50'', 72° 40''), 72° 5'), ASPV (95° 10', 35x (94° 1', 50° 1', 72° 1'), 72° 10') e ApMV (95° 2', 35x (94° 40'', 55° 40'', 72° 1'), 72° 5')

Para verificação da presença viral as análises de RT-PCR foram feitas em casca de ramos dormentes (14/07/2006) durante a plena floração (20/10/2005 e 03/10/2006), frutos verdes (75 dias após plena florada - 20/12/2006) e em casca de frutos durante a colheita (26/01/2006 e 01/02/2007).

A indexação biológica da planta matriz da qual se originaram as estacas de ‘Maxi Gala’ utilizadas no experimento ocorreu segundo o seguinte cronograma: coleta dos ramos da plantas indicadoras em 29/06/06 (*Malus domestica* cvs. Virginia Crab: ASGV e ASPV; Radiant Crab: ASPV; LLS5: ACLSV; Lord Lamborne (LL): ApMV); 17/07/06



coleta e enxertia das gemas das plantas matrizes de 'Maxi Gala'; 28/08/06, enxertia das indicadoras; 20/09/06, início da brotação e avaliação das indicadoras. Como controles positivos utilizaram-se plantas infectadas com um ou mais vírus latentes e negativos, sem enxertia, para certificação do processo.

### **2.2.3. Inoculações dos frutos com *C. perennans***

Os frutos foram desinfestados, antes de cada inoculação, pela imersão em solução com hipoclorito de sódio (2%) + álcool (96°) + água destilada na proporção 1:1:1. Após, enxaguados em água destilada e secos ao ar durante 24 horas.

No experimento se utilizaram discos colonizados com o isolado Cp5 de *C. perennans*, pertencente a Embrapa CNPUV (isolado propagado durante 15 dias em sala climatizada a 22 °C com iluminação fluorescente ininterrupta). Cada maçã foi inoculada com 3 discos (0,4 cm de Ø) de BDA, colonizado por *C. perennans*, colocado sobre uma lenticela. A seguir os discos foram cobertos com algodão úmido e fixados com fita adesiva. Os frutos foram incubados com os discos durante 14 dias em câmara úmida a 22 °C. Após este período os discos e o algodão foram retirados dos frutos, estes permanecendo em câmara úmida a 22 °C até o final da avaliação. Como controle negativo inoculou-se 3 frutos com discos de BDA esterilizado. As inoculações nos frutos foram realizadas em duas épocas, logo após a colheita (01/02/2007) e a segunda em frutos armazenados após 1 mês (01/03/2007) em câmara fria a 2 °C. Os tratamentos tiveram 6 repetições e 3 frutos por parcela.

### **2.2.4. Avaliações de doença dos frutos**

Após a retirada dos discos, 14 dias após a inoculação (d.a.i.) de *C. perennans*, iniciaram-se as avaliações das necroses lenticelares. Avaliaram-se a incidência de frutos

com necroses lenticelares e o número de lenticelas necrosadas por fruto infectado a cada 3 dias, sendo a última avaliação aos 32 d.a.i. Utilizou-se o parâmetro da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para comparar os tratamentos – através da fórmula descrita por Campbell & Madden (1990):

$$\text{AACPD: } \sum_i^{n-1} ((y_i + y_{i+1})/2) * (t_{i+1} - t_i)$$

$y_i$ : valor da incidência ou lenticelas necrosadas na data;  $y_{i+1}$ : valor da incidência ou lenticelas necrosadas na data subsequente;  $t_i$ : data avaliada e  $t_{i+1}$ : data subsequente.

### **2.2.5. Análise da atividade de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis dos frutos**

A metodologia para análise das enzimas peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO) e teor de fenóis foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado por Campos & Silveira (2003), com base nas técnicas descritas por Ponting & Joslyn (1948) e Matsuno & Uritani (1972), utilizando-se 3 gramas de polpa+casca para extração das enzimas e 5 gramas de polpa+casca para fenóis. As análises foram realizadas em frutos colhidos no experimento e armazenados durante 3 meses a 2 °C.

### **2.2.6. Avaliações de Sólidos Solúveis Totais, firmeza e escala iodo amido**

Analisou-se o teor de Sólidos Solúveis Totais com o refratômetro manual, firmeza com penetrômetro manual (Effegi – BISHOP FT 327) com ponteira de 11mm, maturação através da escala de iodo amido de 1 a 5 (Girardi et al., 2002); 1: amido não degradado e 5: sem a presença de amido). Para avaliação da maturação utilizou-se a fórmula de Townsend & Heuberger (1943). Utilizaram-se 5 frutos por parcela e 3 repetições.

### **2.2.7. Avaliação de lenticelas abertas**

A avaliação de lenticelas abertas ocorreu nos seguintes tratamentos durante a colheita: C, G, G+P, G+C+P, G+C+P+M e testemunha e após o armazenamento durante 2 meses em câmara fria: C+M, C+P+M, G+C+P, G+C+P+M e testemunha.

A técnica utilizada para avaliação de lenticelas abertas foi a de tingimento com anilina desenvolvida por Curry & Kupferman (2004), que consistem em preparar solução de anilina azul 0,2% (2g/L); lavar os frutos em água corrente e deixa-los secar sobre bandejas; colocar as maçãs dentro de dessecador e cobri-las com a solução; fechar o dessecador; ligar a bomba de vácuo até o manômetro atingir 250 mmHg, fechar a válvula por 30 segundos e desligar a bomba; liberar o vácuo e manter os frutos por 1 minuto antes de retirá-los; lavar os frutos em água corrente e deixa-los secar para realizar a avaliação.

A escala de notas utilizada para avaliar lenticelas abertas foi à de área da superfície tingida de anilina (adaptado de Curry & Kupferman, 2004): 1. 0 – 5%; 2. 6 – 25%; 3. 26 – 50%; 4. 51 – 75% e 5. maior que 75% (Anexo 8). A fórmula utilizada para diferenciar os tratamentos foi a desenvolvida por Townsend & Heuberger (1943): Grau de tingimento:  $((\sum(n*v))/2N)*100$ ; onde n= número de frutos em cada categoria, v= valor numérico de cada categoria; N= número total de frutos.

### **2.2.8. Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas por meio da Análise de Variância (ANOVA): modelos lineares (teste de Duncan) e também fatoriais com modelos mistos (Diferença Mínima Significativa: DMS), correlação (teste de Pearson) e contrastes ortogonais através da utilização do software SAS 8.1.

## **2.3. Resultados e Discussão**

### 2.3.1. Predisposição dos frutos a *C. perennans*

A análise estatística demonstrou não haver diferença na incidência de frutos com necroses lenticelares entre as inoculações realizadas nas duas épocas de inoculação (ANEXO 1). Verificou-se a alta incidência de frutos com necroses lenticelares na presença da infecção viral G, este aparentemente, é um fator de maior importância na interação patógeno vs. infecção viral. Na figura 1, os frutos inoculados com *C. perennans* após a armazenagem e com as infecções virais G, G+C+P e G+C+P+M, apresentaram estatisticamente maior incidência de frutos com necroses lenticelares aos 14 d.a.i. do que a testemunha (dados não apresentados).

Através análise da AACPD pode-se verificar que os frutos com a presença apenas da infecção viral C apresentaram resultados semelhantes aos da testemunha. Enquanto a infecção mista C+P+M induziu incidência semelhante aos tratamentos com a presença de G (Figura 1). Ao contrário do que encontrou Costa (1985) em dois cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*), infectados com o “vírus do mosaico comum do feijoeiro” (Bean common mosaic virus, BCMV), nos quais não aumentou a porcentagem de infecção da ferrugem (*Uromyces phaseoli*), as infecções virais C+P+M, G, G+P, G+C+P e G+C+P+M em 'Maxi Gala' aumentaram a incidência de *C. perennans*.

Segundo Campbell (1969) infecções virais como ASPV, ACLSV e o agente causal do “lenho mole da macieira” aumentam a incidência da podridão do porta enxerto (p.e.) MM.104, causada por *Phytophthora cactorum*, causando também diminuição da produção de porta enxertos como também a qualidade dos mesmos. No mesmo experimento os resultados não se repetiram com o p.e. MM.106. Entretanto este porta enxerto é altamente sensível a *P. cactorum* (Browne & Mirecetic, 1993; Denardi, 2002).

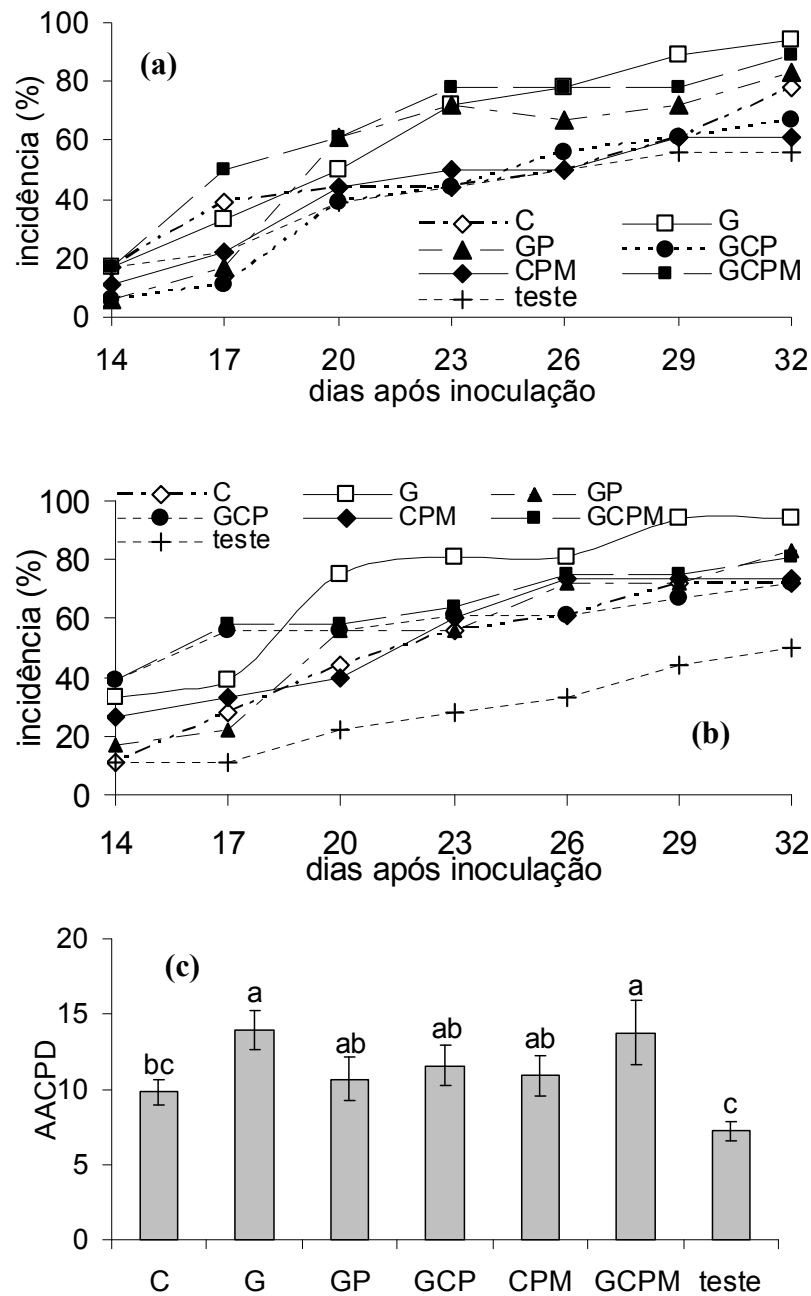


FIGURA 1 – Progresso da incidência de frutos com necroses lenticelares decorridos da inoculação de *C. perennans* na colheita (a) e armazenados (b) e média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (c) em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) e sem infecção viral (teste), 2007. (ANOVA com dados transformados por raiz de x e  $Pr > F: 0,0077$ ).

O estudo realizado por Sanhueza (2007) demonstrou não haver diferença na suscetibilidade a *C. perennans* (Sanhueza, 2007), deste modo pode-se inferir que os resultados obtidos neste experimento com ‘Maxi Gala’ seja extrapolado para outras

cultivares.

Nitzany (1966) concluiu que há efeito sinérgico entre o fungo de solo *Pythium ultimum* e *Cucumber mosaic virus* (CMV), causando maior colonização pelo fungo. No mesmo trabalho o autor não encontrou sinergismo entre outras interações como *Fusarium* e spp., *Melon mosaic virus* (MMV) e *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV). Isto evidencia que as interações fungos-viroses são muito específicas, não bastando apenas à presença de algum vírus para que as plantas sejam mais suscetíveis a doenças.

TABELA 4 – Número de lenticelas necrosadas (n.l.c.) por fruto (32 dias após inoculação) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de *C. perennans* em frutos inoculados na colheita e armazenados de ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com um vírus isoladamente ou formando complexos, 2007.

Infecções virais	Colheita		Armazenagem	
	n.l.c.	AACPD	n.l.c.	AACPD
C	13,18	135,8	11,56	83,0
G	9,73	87,9	10,75	110,8
G+P	11,37	95,4	4,56	69,5
G+C+P	7,63	57,61	8,28	89,0
C+P+M	6,15	71,11	9,94	88,9
G+C+P+M	7,67	101,5	6,22	59,8
testemunha	5,00	58,1	6,58	40,9
ANOVA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Coef. Var. (%)	84,3	73,0	82,2	59,9

*Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M), testemunha sem infecção viral

O número de lenticelas necrosadas apresentou alto coeficiente de variação entre os tratamentos, razão pela qual a análise de variância (ANOVA) não revelou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4). Isto pode ter ocorrido devido ao contato de um número variável de lenticelas ao disco e algodão utilizados na inoculação de *C. perennans* e também ao coeficiente de variação muito elevado (Tabela 4). Sugere-se para os próximos trabalhos utilizar para avaliação do número de necroses lenticelares a densidade de lenticelas necrosadas, como na metodologia desenvolvida por Moggia et al. (2004) para tingimento lenticelar. Utilizando-se outro modelo para avaliação dos dados, a análise de

contrastes ortogonais, observa-se que todos os tratamentos com infecções virais apresentaram mais lenticelas necrosadas do que a testemunha (Tabela 5). Entretanto, os tratamentos G e G+C+P+M, além de induzirem maior incidência de *C. perennans*, também apresentaram maior número de lenticelas necrosadas.

No entanto, nos tratamentos com a presença da infecção viral G o número de lenticelas necrosadas não foi maior do que na presença das outras infecções virais (C e C+P+M) (Tabela 5). A vantagem da utilização de contrastes ortogonais é poder comparar grupos distintos, tratamentos qualitativos que permitam estruturação (Riboldi, 2001). Deste modo, neste experimento o número de lenticelas necrosadas por fruto foi avaliado comparando os tratamentos entre grupos distintos (Tabela 5). Os grupos se dividiram entre infecções virais *versus* a testemunha, infecções virais sem G *versus* as infecções com G e entre G e os complexos formados com G (G+P, G+C+P e G+C+P+M).

TABELA 5 - Análise estatística por contrastes ortogonais para o número de lenticelas necrosadas, medida pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), em frutos inoculados com *C. perennans* após a armazenagem (1 mês a 2 °C) de 'Maxi Gala' pré-infectadas com um vírus isoladamente ou formando complexos, 2007.

Contrastes Ortogonais dos tratamentos dispostos em grupos	Pr > F
Todos os tratamentos com infecções virais vs testemunha	0,0201
C e C+P+M vs G, G+P, G+C+P e G+C+P+M	0,8506
G vs G+P, G+C+P e G+C+P+M	0,0683
G e G+C+P+M vs testemunha	0,0149

*Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P), *Apple mosaic virus* (M) e testemunha sem infecção viral..

Até o presente momento há vários trabalhos relacionados ao aumento da predisposição a doenças fúngicas na presença de infecções virais, mas muito pouca informação para plantas perenes, especificamente em maçã. Campbell & Sparks (1977) relatam necroses em frutos decorrentes da infecção viral, mas não o aumento da suscetibilidade dos frutos a doenças fúngicas. O aumento da severidade de *Alternaria spp.*

foi observado na cultura da beterraba devido a presença de *Beet mild yellowing virus* (BMV), apesar do mesmo efeito não ser observado com *Beet yellows virus* (BYV) (Russel, 1966a).

### **2.3.2. Alterações na atividade de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis em frutos com infecção viral**

Os frutos provenientes de plantas com infecção viral G e G+C+P+M apresentaram menor atividade da peroxidase (Figura 2). A atividade da PO parece estar relacionada com a resistência a *C. perennans*, pois frutos com menor atividade da PO demonstraram maior incidência e número de lenticelas necrosadas (Figura 2). Os mecanismos que envolvem a resistência direta a *C. perennans* são afetados pela infecção viral. O conhecimento desta interação abre caminho ao estudo de outras barreiras que possam afetar a colonização pelo patógeno em frutos com infecções virais.

A velocidade de lignificação do tecido infectado é outro fator muito importante em uma reação de resistência da planta a doenças (Campos & Silveira, 2003). Segundo Cai et al. (2007) o aumento da firmeza e lignificação é associado com a atividade de enzimas, como a PO. Em frutos cítricos o aumento da atividade de peroxidases, detectada no flavedo, indicam que esta atividade tem função na defesa contra o fungo necrotrófico *Penicillium digitatum* (Ballester et al., 2006).

Em maçãs ‘Golden Delicious’ a elevação da atividade da PO, com o conseqüente aumento do conteúdo de lignina, é o fator chave na resistência a *Penicillium expansum*, pois houve correlação entre alto conteúdo de lignina e baixa incidência de doença nos frutos. (Valentines et al., 2005). Ao contrário do que já tinha sido proposto por Torres et al. (2003), no qual o mecanismo de resistência envolvido é o aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concomitantemente com a alta atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).



Ainda segundo Torres et al. (2003), o acúmulo de  $H_2O_2$  em frutos mais resistentes, potencialmente ativa a biossíntese de lignina e reforça das paredes celulares. A presença no Brasil da doença conhecida como “lenho mole da macieira”, em macieiras, também ocasiona a diminuição da formação de lignina com a presença de ramos extramente flexíveis e facilmente dobráveis (Ribeiro et al., 2007).

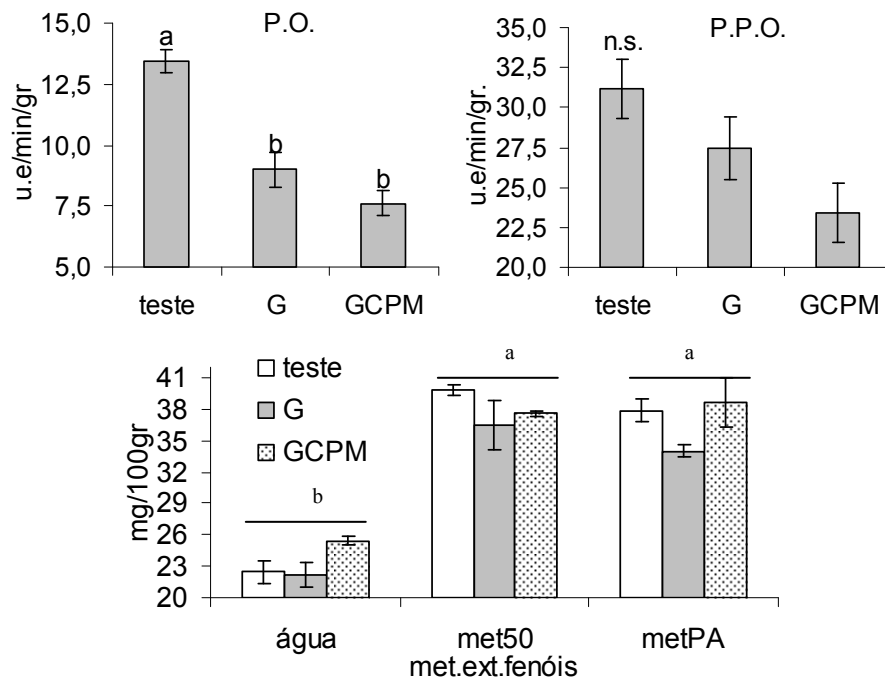


FIGURA 2 – Atividade das enzimas peroxidase e polifenol oxidase (u.e./min/gr tecido) e teor de compostos fenólicos (mg/100gr) extraíveis em água, metanol 50% e metanol P.A. em frutos pré-infectados com *Apple stem grooving virus* (G) e *Apple chlorotic leaf spot virus* (C) + *Apple stem grooving virus* (G) + *Apple stem pitting virus* (P) + *Apple mosaic vírus* (M) e sem infecção viral (teste), 2007. (ANOVA: Pr < 0,05).

No presente estudo não foi realizada avaliação da PO na colheita, sendo este parâmetro objeto de experimentos posteriores. A avaliação da PO em frutos com infecção viral durante períodos mais longos de armazenamento, maiores que o realizado neste experimento, poderia acrescentar maiores informações sobre o patossistema fruto-vírus.

Em pêssegos, Wang et al. (2004) encontraram a diminuição na atividade da PO durante o período de armazenamento, 4 semanas a 0 °C.

Em plantas anuais o efeito de infecções virais no aumento da PO, geralmente, é bem pronunciado, principalmente nas folhas. Na infecção de pepino por *Zucchini yellow mosaic Virus* (ZYMV) ocorrem severos mosaicos, redução e deformações foliares (Radwan et al., 2007), efeito também observado por Burbridge et al. (2007) na morte celular em folhas de tabaco, devido à resposta hipersensível (HR). Em cultivares de soja suscetível a *Soybean mosaic virus* ocorre resposta hipensensitiva (RH) devido ao aumento da atividade de superóxido dismutase (SOD) e PO, enquanto nas cvs resistente há alteração em SOD, mas diminuição da PO (Cuiming et al., 1999). O aumento da atividade da peroxidase também esta associada à infecção de *Plum pox virus* (PPV) em ameixas da cv. Besztercei, com sintomas severos da doença em frutos e folhas (György, 1976). Por outro lado a super-expressão da atividade de peroxidases em batata, sob controle do promotor 35S do *Cauliflower mosaic virus*, não aumentou os níveis de lignificação dos tubérculos e com isso, aparentemente, não influenciou na resistência a *Fusarium sambucinum*, *Erwinia carotovora* ou *Phytophthora infestans* (Ray et al., 1998).

Segundo Riedle-Bauer (2000) o aumento da atividade de peroxidases é restrita a áreas do tecido em que há acumulação viral e a presença de sintomas, via formação de oxigênios reativos, como mosaicos e amarelecimento de tecidos. A presença de clorose é associada à diminuição da capacidade fotossintética, aumento da respiração, mudança na absorção de carboidratos e alteração na acumulação de amido (Maule et al., 2002).

Ao contrário do obtido neste trabalho, a atividade de peroxidases nem sempre é afetada por infecções virais. Hernández et al. (2004) não encontraram diferenças na atividade desta enzima em extratos foliares de pessegueiros GF305 infectados por PPV. Igualmente, a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) envolvida em

processos de resistência, em cvs. de damasco resistentes a PPV não é alterada, ao contrário das suscetíveis, no qual observa-se a sua elevação, devido as cloroses e necroses foliares presentes nas folhas destas cvs. (Hernández et al., 2001). As cvs. resistentes a PPV apresentam alta atividade de SOD, sendo esta responsável pela alta produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e baixa titulação do vírus nas folhas das plantas. A síntese e atividade da enzima aparentemente são afetadas, mas isto depende muitos fatores, entre os quais a resistência genética. Nas cvs. nas quais a ausência de resistência genética permite a invasão e o estabelecimento do patógeno, o sistema de defesa (alta atividade de SOD) não é acionado.

O presente estudo demonstrou que a atividade da PPO não foi afetada, estatisticamente, pela presença das infecções virais G e G+C+P+M nos frutos (Figura 2). O aumento da predisposição, dos frutos de 'Maxi Gala' com as infecções virais, a infecção de *C. perennans* decorreu da diminuição da atividade da PO e não da PPO. Em outro estudo, no patossistema 'Golden Delicious'-*Penicillium expansum* a alteração da atividade da PPO não foi um fator relevante para a infecção do patógeno (Valentines et al., 2005). O *P. expansum* penetra em maçãs através de ferimentos ou em lenticelas abertas (Girardi et al., 2002; Amiri & Bompeix, 2005). Em maçãs a PPO é estimulada por ferimentos e também por escaldadura superficial (Boss et al., 1995). O efeito biótico da presença viral de G e G+C+P+M, neste experimento, não influenciou consistentemente a atividade da enzima, necessitando mais estudos na área. Por outro lado, Wang et al. (2004) concluíram que a enzima chave para resistência a *P. expansum*, em pêsegos, é a PPO. Deste modo, verifica-se que para o mesmo patógeno há diferenças específicas na atividade de enzimas na interação patógeno-hospedeiro. Já em trigo, Mohammadi & Kazemi (2002), observaram que a resistência de algumas cvs. à *Fusarium graminearum* é determinada pela maior atividade da PO e PPO.

No presente estudo o maior conteúdo de fenóis foram os extraíveis em metanol

50% e metanol puro (Figura 2). Entretanto, não ocorreram diferenças nos teores de fenóis nos frutos de ‘Maxi Gala’ com e sem infecções virais. Deste modo, o aumento da predisposição dos frutos infectados com G e G+C+P+M a *C. perennans* foi devida à diminuição da atividade da PO, já que a PPO e a concentração de fenóis não tiveram alterações. Em outro patossistema, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) - “antracnose-do-feijoeiro”, causado por *Colletotrichum lindemuthianum*, ocorre correlação positiva entre teor de compostos fenólicos e resistência ao patógeno (Campos et al., 2004).

Dentre as mudanças fisiológicas encontradas, em plantas de mostarda (*Brassica juncea*) infectadas com *Turnip mosaic virus* (TuMV), destacam-se ainda a diminuição no conteúdo de clorofila, pela diminuição de receptores de elétrons e a geração de radicais reativos que causam injúrias no fotossistema II, como também da condutividade estomática, pela menor atividade da Rubisco, que influem diretamente na diminuição da taxa fotossintética (Guo et al., 2005), expressas em sintomas como cloroses, mosaicos e menor área foliar.

As infecções virais em frutíferas podem interferir de várias maneiras nos mecanismos de resistência das plantas. Cada interação age de uma maneira específica em uma ou mais enzimas em diversas rotas metabólicas. Em infecções de *Beet curly top virus* (BCTV), em beterraba, ocorre a interferência na atividade da enzima envolvida na degradação de amido para sucrose, a frutose 1,6 bifosfatase, comprometendo o transporte do açúcar pelo floema, como também na ribulose 1,5 bifosfato, diminuindo a capacidade do ciclo de Calvin em fixar CO<sub>2</sub> (Swiech et al., 2001). Assim, interferindo em um processo vital das plantas, a fotossíntese, como os casos das infecções de PPV em pessegueiros, do vírus do enrolamento foliar 3 (GLRaV-3) e *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) em videiras (Hernández et al., 2004; Fajardo et al., 2004; Bertamini et al., 2004). Deste modo, as infecções virais podem afetar o vigor das plantas possibilitando alterações

na predisposição a doenças fúngicas.

O potencial das infecções virais em induzir mudanças fisiológicas no hospedeiro, em tecidos distantes do sítio infectado, existe através da desregulação do movimento macromolecular em células infectadas, diretamente pela ação de moléculas de baixo peso molecular, como hormônios, açúcares entre outros (Maule et al., 2002). Essa modificação pode também ser umas das causas da menor atividade da PO nos frutos com infecção de G e G+C+P+M, não apenas nos tecidos infectados como também naqueles que podem ser induzidos distantemente do sítio de infecção.

### **2.3.3. Alterações da firmeza, teor de sólidos solúveis totais (SST) e escala iodo-amido**

Os resultados de firmeza e o teor de SST dos frutos durante a colheita, provenientes de macieira 'Maxi Gala' com infecções virais, não são esclarecedores da influência dos vírus nestas variáveis, pois as plantas sem inoculação viral tiveram resultado semelhante às plantas infectadas (Figura 3). As diferenças entre os tratamentos existiram possivelmente devido a fatores alheios ao controle experimental. Os resultados foram mais evidentes após 2 meses de armazenamento a 2 °C (Figura 3), quando os frutos do tratamento G+C+P+M mostraram-se com menor firmeza e SST que os demais tratamentos.

A menor firmeza observada após a armazenagem neste tratamento pode estar relacionada à maior quantidade de lenticelas abertas, em consequência da maior perda de água provocada pela maior respiração do fruto (Figura 4). Os frutos após o período de armazenamento não demonstraram diferenças na escala iodo-amido, os mesmos estavam com altos valores na escala entre 4,5 a 5 (dados não apresentados).

Houve correlação negativa entre a firmeza dos frutos e o teor de SST, embora baixa, foi significativa pelo teste de Pearson, correlação de -0,47 e significância de 0,0469.

Com exceção dos frutos provenientes do tratamento G+C+P, a menor firmeza na colheita representou frutos com maior teor de SST, ou seja, mais doces e polpa menos firme. Após o armazenamento não houve correlação entre essas variáveis possivelmente devido à influência dos frutos do tratamento G+C+P+M que apresentaram pouca firmeza e menor teor de SST.

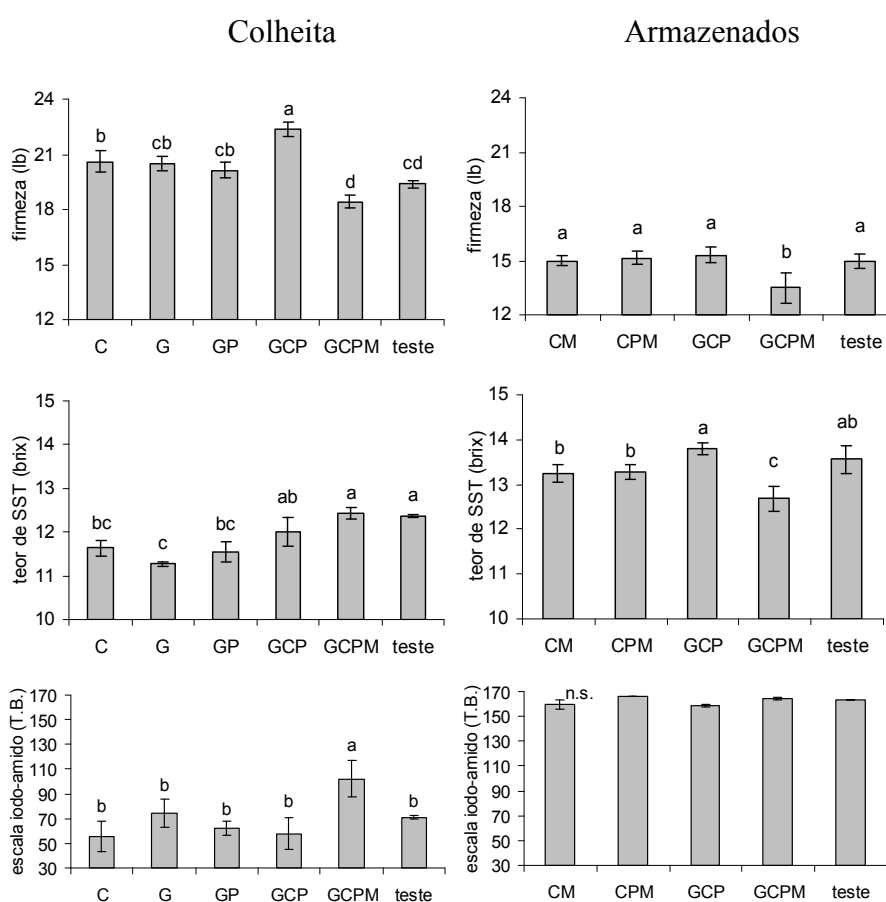


FIGURA 3 – Firmeza (lb), teor de Sólidos Solúveis Totais (°brix) e escala iodo amido (índice de Townsend & Heuberger, 1943) em frutos de maceiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas isoladamente ou em complexos virais com *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) e sem infecção viral (teste) após a colheita e após 2 meses de armazenamento em câmara fria (2 °C). (ANOVA: Pr < 0,05), 2007.

Observou-se que os frutos do tratamento G+C+P+M, na colheita, apresentaram menor firmeza, maior teor de SST e índice iodo-amido que os demais tratamentos na colheita, esses 3 fatores, geralmente utilizados em conjunto para a definição de ponto de

colheita, indicam que os frutos estavam mais maduros. A infecção viral múltipla antecipou a maturação dos frutos. Como demonstram os dados da Figura 3, os valores de firmeza/SST/índice iodo-amido dos frutos do tratamento G+C+P+M foram 18,5/12,5/100 ante 19,5/12,4/75 da testemunha.

Em ameixas com PPV ocorrem à diminuição do teor de açúcar e da armazenabilidade (György, 1976), semelhantes aos observados neste estudo em frutos de macieiras 'Maxi Gala' infectadas com o complexo viral. A redução na armazenabilidade em câmaras frias de maçãs 'Cortland' e 'McIntosh' infectadas pelo *Dapple apple viroide* já foi identificada anteriormente por Rich (1967). Embora o autor não faça menção explícita da causa, o fato poderia estar relacionado a alterações fisiológicas nos frutos. Em maçãs os trabalhos relatados na literatura não são conclusivos quanto ao efeito de infecções virais, pois segundo Campbell & Sparks (1977) as cultivares de maçãs e porta-enxertos diferem muito na suscetibilidade as infecções. Rich (1967) também constatou diferenças na sensibilidade a vírus e viróides entre cultivares copa e porta-enxertos, medidas pela produtividade e armazenabilidade de frutos.

Alterações fisiológicas em decorrência de infecções virais já foram observadas em outras plantas perenes, como em videiras, em que há sintomas visíveis do vírus do enrolamento foliar, há diminuição do teor alcoólico determinado pelo menor °brix do mosto e menor intensidade da cor do vinho produzido com uvas provenientes de plantas infectadas por *Grapevine leaf roll associated-virus 3* (Kunh & Protas, 88; Zanuz et al., 93).

Em maçãs as alterações qualitativas causadas por infecções virais são pequenas se comparadas às encontradas nas infecções com os viróides *Dapple apple* e *Star crack* (Campbell & Sparks, 1977). A severidade da doença, causados por viróides, depende do patossistema vírus-cultivar copa, mas em casos mais severos podem ocasionar distorção nos frutos, rompimento da casca, rugosidade da casca, redução do tamanho ou

descoloração da epiderme.

#### **2.3.4. Alterações no número de lenticelas abertas**

Os frutos provenientes da infecção viral G+C+P+M apresentaram maior número de lenticelas abertas, tanto na colheita como após 2 meses de armazenagem (Figura 4). Isto pode ocasionar maiores perdas de água ou de gases nos frutos. Segundo Clements (1935) a abertura ou fechamento da lenticela depende das características das células da epiderme, quando estas estão cutinizadas ou suberizadas, e assim fechadas, elas dificultam o livre movimento de gases ou líquidos. O maior número de lenticelas abertas pode ter adiantado a maturação dos frutos provenientes das plantas com infecção viral G+C+P+M como também diminuído a firmeza e o teor de SST. Com isso, ocorrendo à diminuição do período de armazenabilidade dos frutos durante a frigorificação. A alteração do número de lenticelas abertas poderia ser uma das alterações fisiológicas observadas por Rich (1967), que ocasionaram a diminuição do período de armazenabilidade de maçãs da cv 'Cortland'.

O bloqueio da abertura lenticelar diminui a permeabilidade a CO<sub>2</sub> e a H<sub>2</sub>O (Amarante et al., 2001). A maior perda de umidade em frutos armazenados é através das lenticelas abertas do que fechadas ou pela epiderme (Veraverbeke et al., 2003b). Em cultivares que apresentam o número de lenticelas abertas semelhante, Jonagold e Elstar, mas esta última com o dobro da densidade de lenticelas ocorre maior perda de água nos frutos armazenados (Veraverbeke et al., 2003a). Assim a maior quantidade de lenticelas abertas em frutos com a infecção G+C+P+M ocasiona a maior perda de água e o menor firmeza principalmente depois da armazenagem (Figura 4).

O maior número de lenticelas abertas poderia ser uma indicação da maior predisposição a *C. perennans*, uma vez que se considera que este patógeno utiliza as



lenticelas para iniciar a infecção dos tecidos do fruto. Segundo Edney (1956) lenticelas fechadas dificultam a penetração do patógeno. Entretanto, observou-se que, mesmo em tratamentos em que a quantidade de lenticelas abertas é semelhante à testemunha, como os frutos da infecção viral G, a incidência de frutos com necroses lenticelares e o número de lenticelas necrosadas foram bem superiores aos frutos sem infecção viral (Figura 1 e 4, Tabela 3). Entretanto, o maior número de lenticelas abertas pode ser importante para outras infecções que penetram pela lenticela. No Chile, as principais podridões em frutos de ‘Pink Lady’ são causadas por fungos que ingressam por lenticelas, como *Glomerella cingulata* e *C. curvispora* (Moggia & Pereira, 2003; Lolas et al., 2005). Segundo Amiri & Bompeix (2005), maçãs que apresentam grande número de lenticelas abertas, combinadas ao grande diâmetro das mesmas (100 a 200  $\mu\text{m}$ ), são mais suscetíveis a *P. expansum* não se limitando apenas a infecção por ferimentos. Seria importante avaliar em pesquisas futuras se as maçãs proveniente de planta com a infecção G+C+P+M seriam então mais predispostas a infecção *P. expansum* devido a maior porcentagem de lenticelas abertas.

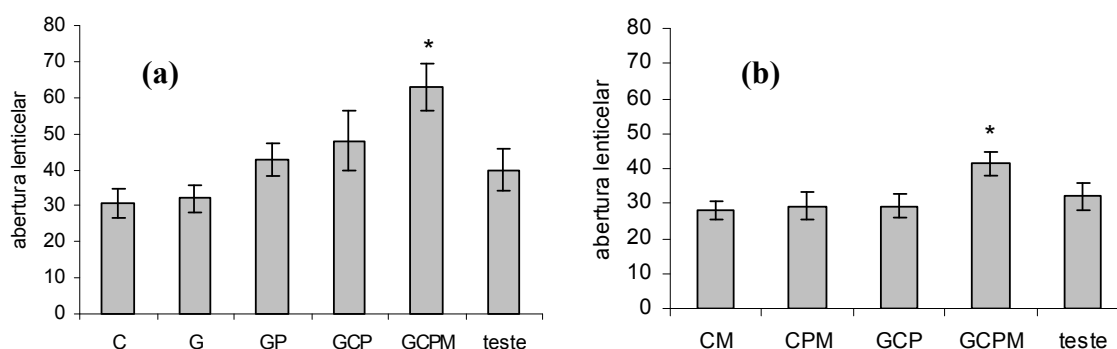


FIGURA 4 - Índice de lenticelas abertas em frutos de macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas isoladamente ou em complexos virais com *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) e sem infecção viral (teste). Após a colheita (a) e após 2 meses de armazenamento em câmara fria (2 °C), 2007. O asterisco diferencia os frutos da infecção viral G+C+P+M dos demais (ANOVA).

Segundo Moggia et al. (2004) ocorre maior intensidade de tingimento de lenticelas por anilina (mais lenticelas abertas) em frutos com maior teor de amido. Neste

trabalho isto ocorreu apenas na colheita, quando os frutos provenientes de plantas infectadas com o complexo viral G+C+P+M apresentaram maior escala de iodo-amido e mais lenticelas abertas (Figura 3 e 4). Segundo Veraverbeke et al. (2003b) as lenticelas podem ser bloqueadas por material suberizado durante a maturação e armazenamento e assim o número de lenticelas fechadas ou bloqueadas pode aumentar. Isso pode ter ocasionado o menor número de lenticelas abertas após o armazenamento, comparado durante a colheita, principalmente em frutos com a infecção G+C+P+M (Figura 4).

Segundo os resultados gerados neste trabalho não é apenas a presença de mais lenticelas abertas que condiciona a maior predisposição a *C. perennans*, na cv. Maxi Gala, pois alterações bioquímicas, como a menor atividade de PO, nos frutos com as infecções virais G e G+C+P+M, parecem estar relacionados com os mecanismos que determinam a resistência a este fungo.

Não foram encontrados dados publicados sobre a relação de resistência a *C. perennans* à estrutura lenticelar. A incidência de podridões causadas por *Botryosphaeria berengeriana* é atribuída à densidade lenticelar como também a características estruturais das mesmas (Xu et al., 2004). Assim, é importante para próximos trabalhos avaliar a possibilidade da modificação na estrutura e densidade lenticelar devido às infecções virais em frutos. Reações fisiológicas, como déficit hídrico no início da frutificação, podem diminuir a densidade e número de lenticelas abertas em maçãs (Clements, 1935).

Este estudo possibilitou constatar que os frutos provenientes de macieiras infectadas com as infecções virais G e G+C+P+M apresentaram modificações na atividade de enzimas peroxidases. Isto pode ter ocasionado alterações que resultaram na maior número de lenticelas abertas.

### **3. CAPÍTULO II – PARÂMETROS MONOCÍCLICOS DE “MANCHA FOLIAR DA GALA” (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc.) EM MACIEIRAS ‘MAXI GALA’ PRÉ-INFECTADAS COM *Apple stem grooving virus* (ASGV)**

#### **3.1 Introdução**

A cultura da macieira (*Malus x domestica* Borkh.) ocupa 35.493 hectares, sendo que deste, 50% com a cultivar Gala e esta com 55% da produção de maçãs (Sanhueza, 1999; Mello, 2006; IBGE, 2007). Devido à cultura da macieira no país estar localizada em regiões de clima marginal para o seu cultivo, está sujeita ao ataque de doenças típicas de clima tropical, como a “mancha foliar da gala” (MFG) (Katsurayama, 2001).

A MFG (*Colletotrichum gloeroporoides* e *Colletotrichum*. Spp.) é uma das doenças de verão de maior importância para a cultura da macieira (Sanhueza & Amorim, 2003). A doença foi relatada pela primeira vez no Paraná em 1983, na ocasião denominada “mancha de glomerella” (Leite et al., 1988). Em 1989, verificou-se a ocorrência de um surto severo de mancha das folhas em macieiras ‘Gala’ e ‘Golden Delicious’ cultivadas em Fraiburgo. Somente em 1993 e 1994 a MFG foi encontrada em Vacaria e Caxias do Sul (Sanhueza, 1999).

No estado do Rio Grande do Sul as lesões em folhas e frutos correspondem às espécies *C. gloeosporioides* (75%), *C. acutatum* (8%) e *Colletotrichum* sp. (17%) (Crusius

et al., 2002). Após o estabelecimento da doença pomar, a frequência das espécies permanece estável entre e durante a estação de crescimento das plantas (González & Sutton, 2004). Segundo os mesmos autores o *C. gloeosporioides* no Norte da Carolina, Estados Unidos, apresenta uma baixa incidência comparada a *C. acutatum* J.H. Simmonds e *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding e Scherenk.

Os prejuízos relacionados com esta doença são graves e, na ausência de controle, pode ocorrer perda total da produção do ano com reflexos na produção do ano seguinte (Sanhueza, 1999). A carência de fungicidas eficientes, associada às condições ambientais favoráveis durante o verão, vem sendo um dos maiores entraves para o manejo da doença na atualidade (Katsurayama & Boneti, 2003).

Segundo Sanhueza (1999), as lesões em folhas são inicialmente avermelhadas, sem margens definidas, distribuídas ao acaso no limbo foliar e de tamanho que varia de 1 a 4 mm de diâmetro. Essa lesão evolui até tornar-se amarelo-acinzentada. No centro da lesão desenvolvem-se pontos escuros que são corpos de frutificação do fungo causador da doença, os quais originam novos ciclos de infecção. Sanhueza, em 1999, relatava que o patógeno poderia sobreviver em ramos, gemas dormentes, em folhas caídas e frutos mumificados. Em trabalho mais recente realizado por Crusius et al. (2002) constatou-se que o patógeno sobrevive apenas em ramos e gemas dormentes.

Em patologia de plantas, os 3 métodos mais comumente utilizados para avaliar a intensidade de doenças são: a prevalência, incidência e severidade (Nutter et al., 2006). Para comparar e prever o desenvolvimento de doenças é necessário a sua quantificação e modelagem matemática, para se observar as mudanças no progresso da doença ao longo do tempo (Bowen, 1997). A descrição matemática de epidemias de plantas é uma ferramenta usada para quantificar e comparar os efeitos de diferentes manejos de práticas fitotécnicas, para estimar futuros danos de produção e mais ultimamente para os produtores diminuir

o custo efetivo do manejo de doenças (Nutter & Parker, 1997). Atualmente, estas informações estão sendo utilizadas para o manejo da MFG e para validação do sistema de previsão (Crusius et al., 2002). Para o Estado de Santa Catarina alguns modelos já foram testados e possibilitaram a diminuição do número de aplicações de fungicidas (Becker, 2007).

A influência das infecções virais na predisposição das plantas a doenças fúngicas é variável e pode causar o aumento da severidade de algumas moléstias (Nitzany, 1966; Costa, 1985; Lamey & Everett, 1967; Russel, 1966a). Os vírus de plantas são responsáveis por alterações na atividade de enzimas envolvidas na resistência a patógenos, como as peroxidases e polifenol oxidases, em processos metabólicos envolvidos na fotossíntese e respiração (Bertamini et al., 2004; Swiech et al., 2001; Guo et al., 2005; Belkengren, 1961, Fajardo et al., 2004), entre outros.

Segundo Nickel et al. (2001), tanto em macieiras adultas usadas como em matrizes ou em mudas introduzidas no país, para produção de frutos, observou-se a presença de *Apple stem grooving virus* (ASGV) em 20% das amostras, geralmente em complexo com outros vírus latentes da macieira (80%). A identificação de ASGV em mudas, como também em plantas matrizes, é de suma importância. Segundo Magome et al. (1999), o ASGV é disseminado apenas por enxertia, sendo muito resistente a termoterapia, e apresenta alta taxa de re-infecção dos tecidos tratados (Knapp et al., 1998).

Além de macieiras, foi verificada a presença de ASGV também em várias espécies de frutíferas como pereiras, pessegueiros, cerejeiras, damasqueiros, citrus (*Citrus tatter leaf virus* – CTLV, reconhecido como isolado de ASGV) e mais recentemente também em quivi, *Actinidia chinensis* (Welsh & van der Meer, 1989; Magome et al., 1997; Magome et al., 1999; Clover et al., 2003).

O ASGV, um vírus latente de macieiras, é constituído de uma fita simples de

RNA positivo com 6496 nt de comprimento excluindo o terminal 3' poliadenilado, contém 2 “fases abertas de leitura” (ORFs) com as ORFs 1 e 2 sobrepostas (Yoshikawa et al., 1992). A ORF 1 codifica uma poliproteína de 242 kDa contendo transferase, helicase, RNA polimerase e proteína do capsídeo (CP), de 27 kDa, na região terminal 3', enquanto a ORF2 codifica proteína do movimento de 36 kDa (Magome et al., 1999).

Os sintomas da infecção de ASGV em macieiras podem ser severos, como a desuniformidade de mudas e o fraco crescimento das plantas (Campbell & Sparks, 1977; Nickel et al., 1999) com cancrios e caneluras em porta-enxertos suscetíveis. Os vírus latentes aparentemente não reduzem o crescimento da maioria das cultivares. Entretanto as combinações de viroses ou singularmente de alguns vírus em cultivares sensíveis podem reduzir severamente a produção e a longevidade do pomar (Cameron, 1977).

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de da presença de vírus em macieiras ‘Maxi Gala’ em parâmetros monocíclicos da mancha foliar da gala.. Até o presente não se encontraram na literatura outros trabalhos de pesquisa referentes ao impacto de infecções virais na predisposição de macieiras à MFG.

## **3.2. Materiais e Métodos**

### **3.2.1. Material vegetativo e vírus utilizado**

Estacas de ‘Maxi Gala’ foram coletadas na área experimental da empresa Rasip Agropastoril, Vacaria/RS, de plantas identificadas como sendo negativas por RT-PCR para ASGV, *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV) e *Apple mosaic virus* (ApMV). O material também foi avaliado através de indexação biológica (ANEXO 5). Os resultados foram negativos para ambos os testes.

As estacas com 2 gemas foram enxertadas em plântulas de sementes de ‘Gala’

em março de 2005 semeadas em sacos de 3L, quando os mesmos tinham diâmetro de 5 a 8mm de diâmetro. Em julho de 2005 enxertaram-se os inóculos de ASGV por meio de 2 borbulhas de 'Fuji Suprema' por planta. As inoculações foram repetidas em julho de 2006 com o mesmo inóculo em 24 plantas, deixando-se outras 24 plantas sem inóculo para o controle sadio do experimento. As checagens de infecção foram realizadas novamente em outubro de 2006, abril e maio de 2007.

### **3.2.2. Inóculo de *C. gloeosporioides***

Foi utilizado o isolado de *C. gloeosporioides* CGF1 pertencente ao banco de isolados fúngicos da Embrapa Uva e Vinho. Discos de BDA com micélio foram repicados para o mesmo meio e colocados em câmara de crescimento a 22 °C e luz intermitente por 3 dias. As culturas foram lavadas e a suspensão com conídios filtrada em gaze e ajustada para concentração de  $10^6$  conídios/ mL, ajustada através de câmara de Neubauer.

### **3.2.3. Metodologia de inoculação**

O experimento constou de dois tratamentos: com inoculação de *Apple stem grooving virus* (ASGV) e sem inoculação viral (testemunha) repetidos 2 vezes (experimentos I e II). No experimento I utilizaram-se 3 concentrações de inóculo: 0,  $10^4$  e  $10^6$  conídios/ mL, com 3 plantas por parcela e 3 repetições em plantas com e sem vírus. No experimento II foram usadas apenas as concentrações de 0 e  $10^6$  conídios/ mL com 3 plantas por parcela e 4 repetições. A inoculação do fungo foi feita por aspersão com a quantidade suficiente para molhar as folhas. Após o término do experimento I as plantas foram podadas, deixando 3 a 4 gemas por estaca, e receberam tratamento com mancozeb a 0,16% de ingrediente ativo. Após brotarem, as plantas foram utilizadas novamente para a segunda inoculação, 1 mês após a brotação. As plantas utilizadas tinham de 1 a 2 ramos e

cada ramo de 10 a 12 folhas.

As plantas foram colocadas em câmara úmida, na Estação Experimental da Embrapa CNPUV (Vacaria, RS), com temperatura e umidade controladas (22 °C e ≈ 99% de U.R.) por 24 horas antes da inoculação (para aclimatação) e 60 horas após inoculação. Após esse período desligou-se o umidificador mantendo-se apenas a temperatura constante.

#### **3.2.4. Métodos de avaliação**

As avaliações de incidência e número de manchas por folha infectada no experimento I foram efetuadas às: 48, 60, 120, 144, 168 e 192 horas após a inoculação (h.a.i.). As avaliações de incidência e número de manchas por folha no experimento II foram efetuadas às: 48, 60, 72, 96, 120 e 144 h.a.i. A severidade máxima foi avaliada com o auxílio do programa computacional Image J, na última avaliação (144 h.a.i.). Nos dois experimentos avaliou-se a o número de horas para se chegar a 50 % de incidência.

A partir da medição de área foliar total da fotografia copiada e após medindo-se a área necrosada pela doença, com o auxílio do Imag J, utilizou-se a seguinte fórmula para severidade:

$$\text{severidade} = \text{área de mancha medida (\%)} / \text{área total da folha (\%)}$$

#### **3.2.5. Análise da atividade de peroxidase, de isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidases, polifenol oxidase e teor de fenóis das plantas**

Os tratamentos constituíram-se de plantas com sem inoculação de ASGV, com três repetições e uma planta por parcela.

A metodologia para análise de peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO) foram desenvolvidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal Embrapa Clima Temperado,



Pelotas RS, e descritas por Campos & Silveira (2003). Para extração de fenóis foram utilizados os protocolos citados por Campos et al. (2004). Utilizaram-se para extração de PO e PPO 200mg de casca dos ramos e para fenóis 10mg de ramo inteiro.

A análise de isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidase foi executada por eletroforese descrita por Scandalios (1969) com 10 mg de casca macerados junto a 30  $\mu$ L de tampão Scandalios A + B (1 parte do tampão lítio-borato 0,2M, pH 8,3 e 9 partes do tampão tris-cítrico 0,2M, pH 8,3) + 0,15% de 2-mercaptoetanol. Utilizou-se papel filtro para a coleta do extrato necessário para a eletroforese. A eletroforese horizontal em gel de poliacrilamida 5% ocorreu em câmara fria (4 °C) com diferença de potencial mantida ao redor de 10 V/cm, pelo tempo necessário para a migração do marcador azul de bromofenol atingir 9cm de distância do ponto aplicado.

### 3.2.6. Análise epidemiológica

Os dados de incidência e severidade foram ajustados aos modelos epidemiológicos de monomolecular e linear. Segundo Neher et al. (1997) a seleção do melhor modelo é determinada examinando-se o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ), o quadrado médio do erro e o gráfico do valor do resíduo vs predito. Os valores de  $R^2$  preferencialmente devem ser  $\geq 80\%$ , se forem  $\leq 50\%$  o modelo testado é pouco adequado aos dados utilizados. Através dos modelos compararam-se os tratamentos quanto a quantidade de inóculo inicial (intercepto ou  $y_0$ ), taxa de aumento da doença (taxa ou  $r$ ) e intensidade máxima ( $y_{m\acute{a}x}$ ).

Utilizou-se também, para comparar os tratamentos, a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para incidência, número de manchas por folha:

$$AACPD = \sum_{i=0}^{n-1} ((y_i + y_{i+1})/2) \times (t_{i+1} - t_i)$$

(Shaner & Finney, 1977; citado por Campbell & Madden, 1990).

### 3.2.7. Delineamento e análise estatística

O delineamento fatorial com modelo misto através de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para avaliar incidência, número de manchas e teor de fenóis. O teste *t* foi utilizado para  $y_{máx}$ , intercepto, 50% incidência, taxa de progresso da doença, área necrosada, PO e PFO. Utilizou-se regressão entre número de manchas e incidência e correlação com significância pelo coeficiente de Pearson entre número de manchas e ImageJ, avaliação subjetiva e incidência. Os testes foram executados no software SAS 8.1.

## 3.3. Resultados e Discussão

### 3.3.1. Predisposição de mudas de ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com ASGV a *C. gloeosporioides*

O modelo epidemiológico que mais se ajustou ao progresso da incidência, nas duas épocas, foi o monomolecular, enquanto o linear se ajustou mais ao número de manchas por folha (Figura 5 e Tabela 6). Os resultados com a inoculação de  $10^4$  conídios/mL indicaram maior incidência e número de manchas/ folha (dados não apresentados), mas devido a baixa infecção o tratamento não se repetiu no experimento II. Entretanto, Cesa (2005) em experimento de campo sobre MFG e Cesa et al. (2006), sobre a sarna (*Venturia inaequalis*), encontraram melhor ajuste nos dados utilizando o modelo logístico, possivelmente devido às doenças serem policíclicas.

Neste experimento garantiram-se as condições necessárias para o desenvolvimento da doença apenas para o inóculo aspergido (primário), enquanto o inóculo proveniente das lesões foliares não encontrou condições necessárias à germinação. A condição de alta umidade necessária à germinação do inóculo primário ocorreu apenas logo após a aspersão inicial (60 horas), na seqüência a umidade ficou em torno de 60%

(dados não apresentados). Em condições de ambiente natural, ou seja, em plantas de pomares poderiam ocorrer ciclos secundários.

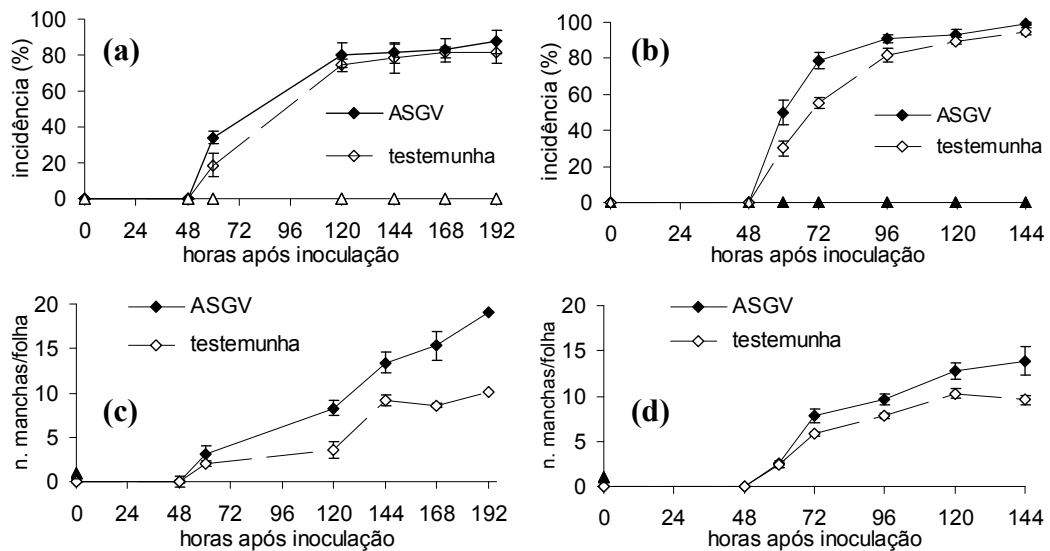


FIGURA 5 - Incidência e número de manchas por folha em macieiras 'Maxi Gala' com e sem pré-infecção de *Apple stem grooving virus* (ASGV) inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* no experimento I (a,c): avaliadas de 0 a 192 horas após inoculação e no experimento II (b,d): avaliadas de 0 a 144 horas após inoculação, 2007. Barras indicam o desvio padrão em cada data. Aspersão de  $10^6$  conídios/mL.

Segundo Nutter & Parker (1997) o modelo monomolecular pode ser aplicado a epidemias que têm o crescimento resultante de inóculo primário, nas quais o inóculo secundário não contribui para o desenvolvimento da doença. O modelo monomolecular também foi proposto para descrever o progresso de doenças com período latente (Bergamim Filho & Amorin, 2002). Deste modo, o momento de infecção não pode ser inferido a partir da visualização dos sintomas.

A incidência máxima ( $y_{m\acute{a}x}$ ) e a taxa de progresso não demonstraram diferenças nas duas épocas de avaliação (Tabela 6). Foi mais apropriado, para diferenciar os tratamentos, usar a AACPD ou a quantidade de h.a.i necessárias para atingir 50% de incidência. As plantas com infecção de ASGV apresentaram maior incidência nas duas épocas avaliadas pela AACPD (Tabela 6). A análise de AACPD e  $y_{m\acute{a}x}$  com medidas

repetidas não requer o uso de algum modelo e pode ser usado para comparar epidemias quando a curva de progresso tem um formato não usual (Reynolds & Neher, 1997).

TABELA 6 - Incidência, número de manchas, modelo epidemiológico (Mod) e coeficiente de determinação ajustado –  $R^2$ , intercepto do eixo y (Int.), taxa de progresso da doença (taxa), valor máximo ( $y_{\text{máx}}$ ), horas após a inoculação para atingir 50% de incidência (50%) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com *Apple stem grooving vírus* (ASGV), inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* em duas épocas de avaliação, 2007.

Incidência (% folhas infectadas)					Número de manchas/ folha infectada				
Experimento I									
Vírus	Mod/ $R^2$	Int.	taxa	$y_{\text{máx}}$	50%	Mod/ $R^2$	Int.	Taxa	$y_{\text{máx}}$
ASGV	Mon/0,94	-0,74 <sup>ns</sup>	0,017 <sup>ns</sup>	87,33 <sup>ns</sup>	81,0b*	Lin/0,98	-0,29 <sup>ns</sup>	0,007 <sup>ns</sup>	19,13 <sup>a*</sup>
Teste	Mon/0,88	-0,51	0,014	81,35	92,2a	Lin/0,90	-0,28	0,007	10,01b
Experimento II									
Vírus	Mod/ $R^2$	Int.	taxa	$y_{\text{máx}}$	50%	Mod/ $R^2$	Int.	Taxa	$y_{\text{máx}}$
ASGV	Mon/0,86	-2,33b*	0,051 <sup>ns</sup>	99,07 <sup>ns</sup>	58,0b*	Lin/0,87	-0,35 <sup>ns</sup>	0,010 <sup>ns</sup>	13,95 <sup>a*</sup>
teste	Mon/0,84	-2,95a	0,056	94,92	69,1a	Lin/0,84	-0,31	0,010	9,75b
AACPD (médias dos experimentos)									
ASGV	8576,5 a**				1115,05 a***				
teste	7657,4 b				736,28 b				

Modelo epidemiológico (Mon: Monomolecular; Lin: Linear); \*teste t (5%); \*\*ANOVA (Pr < 0,05); \*\*\*ANOVA (Pr < 0,01).

O número de manchas ocasionado pela inoculação de MFG apresentou um modelo de crescimento linear nas duas épocas avaliadas com uma taxa constante sem diferença entre os tratamentos (Tabela 6). Pela interação entre as duas épocas as plantas com infecção de ASGV apresentaram maior número de manchas por folha (Tabela 6).

Segundo Spósito et al. (2004) na epidemia comparativa, o parâmetro utilizado para diferenciar a suscetibilidade das variedades é a taxa de progresso da doença. Neste caso as plantas com infecção viral apresentam o mesmo grau de suscetibilidade a MFG do que plantas sem a inoculação viral, pois apresentam a mesma taxa de progresso.

As plantas com infecção viral apresentaram um menor período de incubação da doença - tempo compreendido entre a deposição do patógeno sobre o hospedeiro e o aparecimento do sintoma (Bergamin Filho & Amorin, 2002), o que potencialmente diminui o período para a produção de inóculo secundário. Apesar de não haver diferenças na taxa

de progresso, foram necessárias aproximadamente 81 e 58 h.a.i., experimento I e II respectivamente, para se atingir 50% de incidência nas plantas com ASGV (Tabela 6). Enquanto, para as plantas sem a presença do vírus são necessárias 92 e 62 horas, respectivamente no experimento I e II.

As plantas com infecção de ASGV potencialmente favorecem um número maior de ciclos do patógeno. Devido ao menor o tempo de incubação, causando assim maiores danos às plantas e aumentando a fonte de inóculo durante a fase de crescimento como também para as próximas safras (Sutton & Sanhueza, 1998). O tempo de incubação é normalmente afetado pelas condições ambientes como a temperatura, conforme verificado para “mancha angular do feijoeiro”, ocasionada por *Phaeoisariopsis griseola* (Pria et al., 2003).

O valor do intercepto, que indica a quantidade inicial de infecções, foi maior nas plantas com ASGV na 2ª época, isto pode sinalizar que as plantas com a presença viral poderiam favorecer maior germinação dos conídios ou então maior sucesso na colonização das células da planta, entretanto necessitando maiores estudos para confirmar estas hipóteses (Tabela 6).

Na mesma linha de raciocínio, Campbell (1969) observou o efeito de interação entre vírus e fungo com a maior incidência de *Phytophthora cactorum* em porta-enxertos de macieira MM104. Em macieiras ‘Cox’s Orange Pippin’ e ‘Tydeman’s Early’ infectadas com ACLSV e ASPV ocorre aumento da suscetibilidade a cancos causados por *Nectria galligena* (Campbell & Jetzer, 1970). Em coqueiros infectados com *Cocoa swollen shoot virus* (CSSV) também ocorre aumento do tamanho de cancos causados por *P. palmivora* (Opoku et al., 2006). Em plantas como pepino isto ocorre também entre *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Pythium ultimum* (Nitzany, 1966), enquanto na beterraba há forte interação entre *Beet mild yellowing virus* e *Alternaria* spp., com o aumento da severidade desta.

Entretanto, a interação entre *Beet yellows virus* (BYV) e *Erysiphe beta*, chamada de “oídio da beterraba”, ou *Alternaria* spp. provoca a diminuição da severidade destas doenças (Russel, 1966b; Russel, 1966c).

Em arroz o aumento da severidade se expressa em maiores lesões foliares causadas por *Cochliobolus miyabeanus* em plantas com *Hoja blanca virus* (HBV) (Lamey & Everett, 1967). A maior severidade também é constatada na elevada mortalidade de plantas de pepino inoculadas com *Pythium ultimum* infectadas por CMV (Nitzany, 1966). Em pereiras ou macieiras o aumento da severidade em infecções virais múltiplas acarreta a diminuição do crescimento do tronco (Campbell & Sparks, 1977).

A literatura traz outros casos em que pode não haver aumento de doenças pela presença de viroses nas plantas. Costa (1985) não observou interação entre 2 isolados do “Vírus do mosaico comum do feijoeiro” (VMCF) e a “ferrugem foliar do feijoeiro” (*Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth.). Campbell (1969) não observou aumento da incidência de *P. catorum* em porta-enxertos MM106 infectados com ASPV, ACLSV, *Rubbery wood virus* (lenho mole) e *Epinasty and decline virus* (EDV). Nitzany (1966) não verificou aumento de plântulas, com CMV ou *Melon mosaic virus*, mortas devido a *Fusarium* spp em pepino. Russel (1966c) encontrou ainda a diminuição de oídio na beterraba ocasionado por *Erysiphe betae* em plantas com a presença de BYV. Em plantas infectadas com *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), não ocorre aumento de “oídio da cevada”, ocasionado por *Erysiphe graminis* (Potter & Jones, 1981).

No presente estudo, observou-se diferenças no progresso da doença entre os experimentos I e II, principalmente na incidência (Tabela 6). Apesar dos valores das variáveis epidemiológicas  $y_{máx}$ , taxa de progresso, 50% e intercepto serem diferentes, entre os experimentos I e II, o comportamento entre plantas com e sem infecção viral manteve-se o mesmo, mesmo com o experimento realizado em condições controladas. Isto pode

estar relacionado à idade das folhas. No experimento I eram mais velhas e podem ter brotado em condições de temperatura e insolação diferente do experimento II, deste modo diminuindo a incidência, a taxa de progresso da doença e o número de horas para 50% de incidência (Tabela 6).

Os modelos de previsão para mancha foliar levam em conta a temperatura do ar, precipitação, período de molhamento foliar, umidade relativa, insolação entre outras (Becker, 2007). O presente estudo permite concluir que fatores bióticos, como a presença de ASGV, podem influir nos resultados dos modelos para a MFG, pois afetam o período de incubação, o número de manchas por folha e a área foliar necrosada (Tabela 6 e Figura 6).

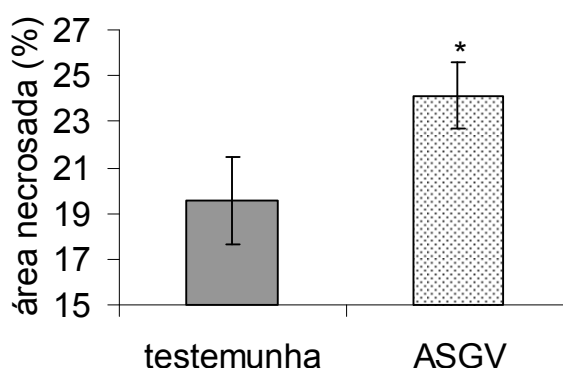


FIGURA 6 – Porcentagem da área de folha necrosada em macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com *Apple stem grooving virus* (ASGV) e sem infecção viral (testemunha), medida pelo programa ImageJ as 144 horas após inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*, 2007. \*: difere os tratamentos pelo teste *t* (5% probabilidade)

As avaliações de área necrosada possibilitaram demonstrar que as plantas com ASGV além de ter maior número de manchas por folha possuem também maior área necrosada (Figura 6 e Tabela 7). Deste modo a severidade da MFG nas folhas de plantas da ‘Maxi Gala’ infectadas com ASGV é maior. Da mesma forma que ocorre com as ferrugens, causadas por *Puccinia psidii* em rosa mosqueta (Tessmann et al, 2001) e de cafeeiros por *Hemileia vastatrix* (Acuña et al., 1999) o maior número de manchas por folha

provoca também a maior área necrosada.

TABELA 7 - Correlação e significância pelo coeficiente de Pearson (Prob>F) entre o número de manchas por folha, Software ImageJ (144 h.a.i.) e incidência (exp. I e II) 60, 72, 96, 120, 144 horas após a inoculação de macieiras ‘Maxi Gala’ pré-infectadas com *Apple stem grooving virus* (ASGV), inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* no experimento II, 2007.

	ImageJ*		Inc. ASGV		Inc. teste	
	Cor.	Pr > F	Cor.	Pr>F	Cor.	Pr>F
Manc./folha	0,460	0,0227	0,875	<0,001	0,930	<0,001

\* área medida apenas às 144 horas após inoculação (h.a.i.).

Neste experimento observou-se a correlação entre incidência e número de manchas (Figura 6). As plantas que apresentavam maior número de manchas também possuíam maior área necrosada (Tabela 7). A utilização de incidência para estimar a severidade é uma grande vantagem, pois, possibilita maior rapidez na predição da área necrosada na folhas (Acuña et al., 1999). Deste modo, pode-se utilizar a incidência para estimar a severidade em plantas com e sem infecção de ASGV. Como o número de manchas é maior em plantas com a infecção de ASGV é conveniente utilizar para cada tratamento uma regressão diferente (Figura 7).

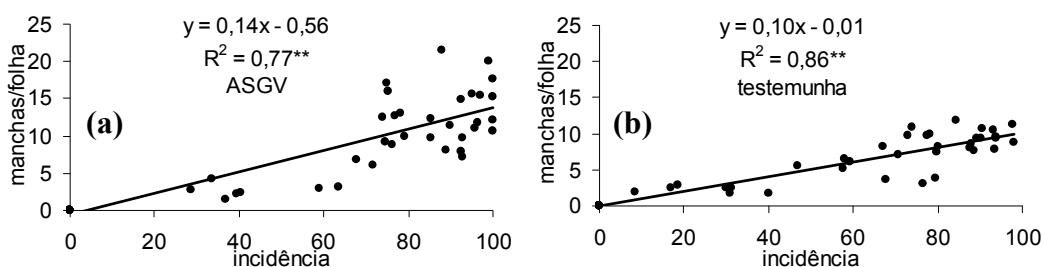


FIGURA 7 - Regressão linear entre incidência e número de manchas por folha em macieiras ‘Maxi Gala’ com (a) e sem pré-infecção (b) de *Apple stem grooving virus* (ASGV) inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* no experimento I e II, 2007. \*\*: regressão linear com  $Pr > F: <0,01$ .



Pela Figura 7, observa-se menor correlação entre o número de manchas e a incidência nas plantas com ASGV. Isto pode ter ocorrido, segundo Knapp et al. (1998), devido as viroses latentes serem irregularmente distribuídas ou altamente localizadas.

Segundo Knapp et al. (1995a) pode ocorrer a presença de gemas não infectadas em ramos infectados por este vírus. Isto, segundo os autores, ocorre devido à distribuição irregular do vírus no ramo, sendo que ainda o ASGV se concentra mais em ramos do que em folhas. Assim neste experimento, mesmo nas plantas que tiveram identificada a presença de infecção de ASGV podem existir folhas não infectadas, diminuindo a uniformidade dos dados coletados. Isto poderia explicar a menor correlação entre a incidência e o número de manchas das plantas com infecção de ASGV,  $R^2$  de 0,77 ante 0,86 nas plantas sem infecção. Em infecções por ACLSV a distribuição também foi verificada, com maior concentração viral na base dos ramos (Knapp et al., 1995b), sendo que em ramos longos, com 20 a 40 gemas, ocorre a presença de gemas não infectadas (Fridlund, 1983). Knapp et al. (1998) verificaram que plântulas em estado ativo de crescimento, apesar da menor titulação viral, apresentam a distribuição viral menos localizada ao contrário das plântulas em fase estacionária que tem maior concentração viral, mas alta variabilidade entre os órgãos da planta.

Neste experimento, as plantas utilizadas estavam em ativo crescimento, pois era fundamental a presença de folhas novas, que são as mais suscetíveis a *C. gloeosporioides*. Entretanto, até que ponto poderia ter influenciado nos resultados é uma incógnita. Pode ter ocorrido a presença de folhas com baixíssima titulação viral em plântulas com ASGV.

As plantas com infecção de ASGV, por possuírem maior área foliar necrosada, devem apresentar também menor fotossíntese. Segundo Ferree & Greene (1990) macieiras das cvs. Jonathan e Golden Delicious com ApMV que apresentam folhas com área de clorose acima de 50% tem redução na fotossíntese e transpiração. Em outras culturas,

como o milho, há redução da eficiência fotossintética, não apenas no tecido necrosado, mas também em parte do tecido verde remanescente, não afetado, de folhas infectadas por *Phaeosphaeria maydis* (Godoy et al., 2001). As folhas infectadas pelo ASGV e *C. gloeosporioides* devem produzir menos fotossíntese não apenas na maior área necrosada constatada, como também, possivelmente, no restante do tecido não necrosado.

### **3.3.2. Alterações na atividade da peroxidase, das isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidase, polifenol oxidase e teor de fenóis**

Não houve alterações da concentração de fenóis nas plantas com ASGV comparadas às plantas não pré-infectadas, mas observou-se maior concentração dos fenóis extraíveis em metanol 50% e metanol puro (Figura 8). Segundo Leser & Treutter (2005) o alto suprimento de nitrogênio diminui a acumulação de compostos fenólicos nas folhas de ‘Golden Delicious’ aumentando assim a predisposição a *Venturia inaequalis*. Os autores constataram que na cultivar resistente, ‘Renewa’ a pronunciada redução dos compostos fenólicos não diminui a sua resistência a *V. inaequalis*. Segundo Rivero et al. (2001) a diminuição da atividade de PO e PPO pode levar ao aumento da concentração de compostos fenólicos solúveis, fato este que não ocorreu neste experimento, pois houve apenas a diminuição da atividade da PPO sem alteração da PO, que pode não ter sido suficiente para provocar o acúmulo de fenóis (Figura 8). Estes dados corroboram os resultados do trabalho de Hernández et al. (2004) em que a infecção de *Plum pox virus* em pessegueiros não diminui a atividade de peroxidase em folhas, mas diminui a de outras enzimas como a superóxido dismutase (SOD).

As PPO agem na degradação oxidativa de compostos fenólicos próximo ao local de descompartimentalização celular provocada por patógenos e na geração de espécies de oxigênio reativos (ROS) (Campos et al., 2004; Mayer, 2006). Em plantas

observou-se correlação positiva entre os níveis de PPO e a resistência a patógenos (Mayer, 2006). A redução da oxidação de compostos fenólicos pode resultar na redução de resistência a patógenos. Esta possibilidade é considerada plausível, para explicar os resultados obtidos no presente estudo.

A atividade da PPO em folhas de macieiras é dependente do pH celular, e este também depende da cultivar estudada, pois na literatura encontram-se vários relatos com resultados conflitantes sobre o pH ideal para alta atividade da enzima (Broothaerts et al., 2000). A atividade da PPO diminui durante o amadurecimento dos frutos, mas após a colheita permanece estável durante o armazenamento em câmara fria (Murata et al., 1995; Hisaminato et al., 2001; Nishimura et al., 2003). Este efeito também é observado em folhas com idades diferentes, folhas jovens apresentam atividade muito maior do que folhas maduras (Broothaerts et al., 2000). Esta diminuição na atividade com a idade do tecido pode ser atribuída a mudanças em rotas metabólicas, degradações de proteases, ao declínio na concentração de enzimas latentes ou à biossíntese de substratos fenólicos (Yoruk & Marshall, 2003). A indução e acúmulo de mRNA de PPO é uma evidência que o controle da expressão desta enzima é transcricional (Boss et al., 1995). Segundo Murata et al (2000) plantas com gene anti-senso de PPO reprimem a sua atividade.

A revisão bibliográfica não permitiu esclarecer se as infecções de ASGV em macieiras ocasionam modificações citológicas, alteram ou interferem em rotas metabólicas ou no pH celular, com conseqüentes modificações fisiológicas, como o envelhecimento mais precoce dos ramos, que viessem a alterar a atividade da PPO. Até o momento sabe-se que as PPOs em rosáceas são similares estruturalmente e enzimaticamente, principalmente entre pêras asiáticas e maçãs (Haruta et al., 1999; Tsurutani et al., 2000). Entretanto, cada patossistema deve ser estudado isoladamente, pois a replicação é diferente para cada gênero viral, e com isso a influência na atividade da PPO possa a vir também ser

diferenciada. Um exemplo disso é a replicação de ASPV, que ocasiona severa desorganização da citologia das células infectadas, não com específicas estruturas citopatológicas ou corpos de inclusão, mas sim pela acumulação de partículas virais em “pacotes” no citoplasma (Klerks et al., 2001).

Segundo Becker et al. (2003) o aumento de quitinases que diminui a severidade de *C. lagenarium* como também restringe o movimento de *Cucumber mosaic virus* em plantas de melão, deve-se considerar que há várias enzimas envolvidas na resistência a *Colletotrichum*.

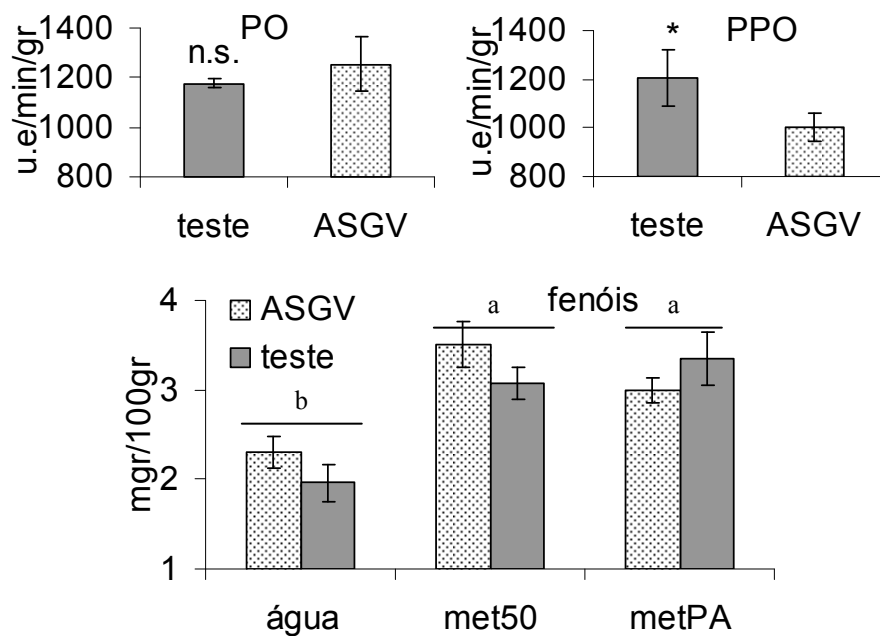


FIGURA 8 - Atividade das enzimas peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO) (u.e./min/gr tecido) e teor de compostos fenólicos (mgr/100gr) extraíveis em água, metanol 50% e metanol puro (P.A.) em plantas pré-infectadas com *Apple stem grooving virus* (ASGV) e sem infecção viral (teste), 2007. \*: difere os tratamentos pelo teste *t* 10%; fenóis: ANOVA: 5% de significância; n.s.: não significativo.

Observa-se também em cvs. de soja resistentes a *Soybean mosaic virus* que há grande redução da atividade de PO e PPO após a inoculação enquanto em cvs. suscetíveis ocorre uma pequena elevação deste teor (Cuiming et al., 1999), demonstrando que há

especificidade de reação entre patógeno e hospedeiro. Com isso não é possível assumir que a presença de vírus nas plantas altere a atividade das enzimas da mesma maneira em todas as cultivares de macieiras.

Radwan et al. (2007) demonstraram que em abóbora com sintomas severos em folhas, deformações e necroses causadas por *Zucchini yellow mosaic virus* ocorre alta atividade de PO. Neste estudo a ‘Maxi Gala’ se comporta como um cv. tolerante a ASGV pois não há elevação da PO, e há decréscimo estatisticamente significativo da PPO e não há sintomas da infecção viral nas plantas. Em outros trabalhos, em tecidos que apresentam reação de hipersensibilidade ou necroses foliares há uma grande atividade de peroxidases (Burbridge et al., 2007; Sudhakar et al., 2007).

O aumento da atividade de PO, PPO e compostos fenólicos, por agentes de biocontrole, são associados ao aumento da resistência a moléstias (Kagale et al., 2004, Wang et al., 2004; Karthikeyan et al., 2006). O aumento da atividade da PPO em maçãs também é relatado em distúrbios fisiológicos, como a escaldadura superficial (Boss et al., 1995). Deste modo pode ser correto deferir que a diminuição do período de incubação e o aumento da severidade de *C. gleosporioides* em plantas de ‘Maxi Gala’ com ASGV esteja relacionada à alteração da atividade da PPO promovida pela infecção viral. Infelizmente ainda há poucos trabalhos em macieiras sobre a atividade destas enzimas na resistência a patógenos. Recentemente Valentine et al. (2005) constataram que a PO, e não a PPO, é envolvida diretamente com a resistência de frutos a *Penicillium expansum*.

Não houve alteração da atividade de isoenzimas aniônicas e catiônicas de peroxidase em plantas com infecção viral (dados não apresentados). O vírus ASGV não modifica nem a atividade das peroxidases como também não das isoenzimas aniônicas e catiônicas da peroxidase, mas modifica a atividade da PPO. Em outros patossistemas alguns trabalhos demonstraram haver modificação da atividade das isoenzimas devido à interação

patógeno-hospedeiro. Em trigo nas cvs. resistentes a *Fusarium graminearum* e em feijão nas cvs de feijão resistentes a *C. lindemuthianum* houve indução de isoenzimas aniônicas de peroxidases (Mohammadi & Kasemi, 2002; Campos et al., 2004). Já Milavec et al. (2001) observaram uma diminuição de bandas covalentes e um aumento de outras em batatas com infecção pelo vírus Y.

Neste trabalho avaliaram-se alterações especificamente na atividade de PO e PPO, decorrentes da infecção de ASGV nas plantas. Para os próximos trabalhos é de suma importância estudar as possíveis alterações nos mecanismos de patogenicidade de *C. gloeosporioides* provocada por infecções virais. A patogenicidade de *C. gloeosporioides* é determinada pela sua capacidade de interagir com a superfície do hospedeiro durante a formação do apressório (Yakoby et al., 2002). O contato com a superfície da planta, ceras e também com etileno, induzem a calmodulina (CaM) que sinaliza ao conídio para germinar e formar o apressório (Kim et al., 1998). Mas, segundo Uhm et al. (2003), os modelos de sinalização para formação do apressório são diferentes entre as espécies de hospedeiro, possivelmente determinados pela complexa taxonomia do patógeno. Além disso, as espécies de *Colletotrichum* secretam amônia no tecido infectado com o intuito de aumentar a sua virulência e retirar dos tecidos a fonte de nitrogênio (Prusky et al., 2001).

#### 4. CONCLUSÕES

- Em macieiras ‘Maxi Gala’ ocorre aumento da predisposição de frutos a *Cryptosporiopsis perennans* em plantas com infecções virais simples de ACLSV e ASGV ou em complexos com ACLSV, ASGV, ASPV e ApMV;
- Folhas de plantas infectadas com ASGV contribuem para a predisposição a *Colletotrichum gloeosporioides*, apresentam maior severidade e menor tempo de incubação de “mancha foliar da gala”;
- Plantas infectadas com os vírus ACLSV+ASGV+ASPV+ApMV apresentam frutos com maior número de lenticelas necrosadas por infecções de *C. perennans* após o armazenamento em câmara fria por um período de 1 mês;
- Em plantas de ‘Maxi Gala’ com a infecção múltipla de ACLSV+ASGV+ASPV+ApMV ocorre antecipação da maturação dos frutos durante a colheita (estimada pelo maior teor de sólidos solúveis totais, menor firmeza e maior índice de iodo-amido) e maior número de lenticelas abertas durante a colheita e após o armazenamento em câmara fria por 2 meses;
- Macieiras ‘Maxi Gala’ com as infecções virais simples de ASGV e em complexo com ASGV+ACLSV+ASPV+ApMV apresentam menor atividade de peroxidase em frutos armazenados;
- Plantas da cv. Maxi Gala com a infecção de ASGV apresentam menor atividade da polifenol oxidase.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a influência de infecções virais em frutos e ramos de ‘Maxi Gala’ na atividade das enzimas peroxidase (PO) e polifenol oxidase (PPO) e a sua relação com a predisposição a *Cryptosporiopsis perennans* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Não é de conhecimento a existência de outros trabalhos que relatem uma correlação positiva entre infecções de ASGV, ACLSV, ASPV e ApMV, ou misturas destes agentes, e a predisposição de maçãs a infecções subsequentes causadas por *C. perennans*.

Trabalhos posteriores devem se conduzidos para avaliar a influência da infecção viral em outros fatores nos frutos, além daqueles estudados nestes experimentos, como o teor de lignina, quantidade de ceras na epiderme, produção de etileno e respiração como também na estrutura das células lenticelares. Assim, um estudo mais aprofundado poderá esclarecer possíveis modificações fisiológicas devido às infecções virais na fisiologia do fruto.

Para a maioria dos vírus que infectam plantas, a replicação requer a formação de RNA de fita dupla (dsRNA). O dsRNA é reconhecido pelos mecanismos de defesa da planta, já que plantas não o possuem, ocorrendo a degradação destes RNAs (Waterhouse et al., 2001). Assim, regulando a acumulação de RNA viral, processo chamado de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Os vírus contra-atacam as defesas da célula com supressores de PTGS, agindo com bloqueadores de PTGS, pela interferência direta no PTGS, ou pela interferência da translocação de sinalizadores de defesa entre as



células, localmente ou distantemente, contaminadas pelo vírus (Maule et al., 2002). Estudos futuros poderiam avaliar a interferência das infecções virais, em macieiras, nos processos de silenciamento gênico desenvolvidos pelas células das plantas.

O período de incubação (tempo entre a infecção e o aparecimento das manchas foliares) de *C. gloeosporioides* foi menor em plantas infectadas com o ASGV. Neste estudo não se avaliou o efeito decorrente no período de esporulação do fungo nas áreas necrosadas, a produção de conídios nas áreas necrosadas ou a taxa de expansão das lesões. Trabalhos posteriores sobre estes parâmetros elucidarão melhor a interação entre o vírus, a macieira 'Maxi Gala' e o fungo *C. gloeosporioides*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, R.S.; MAFFIA, L.A.; ZAMBOLIM, L.; BERGER, R.D. Incidence-severity relationships in the pathosystem *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n.2, p. 186-188, 1999.

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 assesment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, New York, v. 149, p. 1045-1060, 2004.

AHN, I.P.; KIM, S.; CHOI, W.B.; LEE, Y.H. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by polyamines in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting red pepper. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 227, p. 237-241, 2003.

AKBAS, B.; ILHAN, D. Widespread distribution of *Apple mosaic virus* on apple in Turkey. **Plant Disease**, St Paul, v. 89, p. 1010, 2005.

AMARANTE, C.; BANKS, N.H.; GANESH, S. Relationship between character of skin cover of coated pears and permeance to water vapour and gases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 21, p. 291-301, 2001.

AMIRI, A.; BOMPEIX, A.G. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. On apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. **Plant Pathology**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 74–81, 2005.

ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. Isolation of High-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 5227-5229, 2006.

BALLESTER, A.R.; LAFUENTE, M.T.; CANDELAS, L.G. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit- *Penicillium digitatum* interaction. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 115-124, 2006.

BECKER, J.S.; KEEN, N.T.; BECKER, J.O. Acibenzolar-S-methyl induces resistance to *Colletotrichum lagenarium* and cucumber mosaic virus in cantaloupe. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 769-774, 2003.

BECKER, W. F. Doenças da Pereira. In: EPAGRI. **Nashi, a pêra japonesa**. Florianópolis:

Epagri/Jica, 2001. 341 p.

BECKER, W.F. Validação de um sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cv Royal Gala. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 10., 2007, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri, 2007. p. 267-274.

BELKENGREN, R.O. Western x-Little Cherry Virus effects on respiration of host tree. **Plant Physiology**, Minneapolis, p. 824-828, 1961.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIN, L. Doenças com período de incubação variável em função da fenologia do hospedeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 561-565, 2002.

BERTAMINI, M.; MUTHUCHELIAN, K.; NEDUNCHEZHIAN, N. Effect of Grapevine Leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, p. 145-152, 2004.

BONETI, J. I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira**. São Paulo, 1998. 85 p.

BOSS, P.K.; GARDNER, R.C.; JANSSEN, B.-J.; ROSS, G.S. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 27, n. 2, p. 429-433. 1995.

BOWEN, K.L. Analytical models of disease progression. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. **Exercises in Plant Disease Epidemiology**. St Paul, 1997. 125 p.

BROOHAERTS, W.; McPHERSON, J.; LI, B.; RANDALL, E.; LANE, W.D., WIERSMA, P.A. Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5924-5928, 2000.

BROWNE, G.T.; MIRECETICH, S.M. Relative resistance of thirteen apple rootstocks to three species of *Phytophthora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 7, p. 744-749, 1993.

BURBRIDGE, E.; DIAMOND, M.; DIX, P.J.; McCABE, P.F. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. **Plant Science**, Amsterdam, v. 172, p. 853-860, 2007.

CAI, C.; XU, C.; LI, X.; FERGUSON, I.; CHEN, K. Accumulation of lignin in relation to change in activities of lignification enzymes in loquat fruit flesh after harvest. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 163-169, 2006.

CAMARGO, J.T. **Níveis de bioreguladores e atividade de peroxidase em macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Imperial Gala e Fuji durante a endodormência**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2000. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2000.

CAMERON, H.R. Effects of viruses on deciduous fruit trees. **Hortscience**, Amsterdam, V.

12, n. 5, p. 484-487, 1977.

CAMPBELL, A.I. The effect of some apple viruses on the susceptibility of two clonal rootstocks to collar rot caused by *Phytophthora cactorum*. **Journal Horticultural Science**, v. 44, p. 69-73, 1969.

CAMPBELL, A.I.; JETZER, P. **Effects of virus on the growth cropping**. Bristol: Long Ashton Research Station, 1970. p. 21. (Comunicado Técnico, 1970).

CAMPBELL, A.I.; SPARKS, T.R. Virus induced changes in the growth of pome fruit trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 75, p. 123-132, 1977.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532 p.

CAMPOS, A.D.; SILVEIRA, E.M. da L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas : Embrapa Clima Temperado, 2003. 3p. (Comunicado Técnico, 87).

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; SILVA, J.B.da; OSÓRIO, V.A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenol oxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

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, v. 386, p. 136-147, 1995.

CASTELLARNAU, I.I. Situación mundial e perspectivas de las principales variedades de manzano. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 7., 2004, Fraiburgo. **Anais...** Caçador. SC: Epagri, 2004. p. 103-119.

CASTRO, L. A. S.; LESSA, A. O. Principais resultados obtidos na detecção de viroses de pomáceas. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2001, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: Epagri, 2001. p. 157.

CAVALCANTI, F.R.; LIMA, J.P.M.S.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 591-600, 2007.

CEMBALI, T. FOLWELL, R.J.; WANDSCHNEIDER, P.; EASTWELL, C.; HOWELL, W.E. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the

US. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 22, p. 1149-1156, 2003.

CESA, L.P.; JESUS, W.C.Jr.; BOGO, A.; LAZAROTO, A.; SILVA, A.; AMARANTE, C.V.T. Análise temporal da sarna da macieira nas cultivares Royal Gala e Fuji sob os sistemas convencional e orgânico de produção. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 585-591, 2006.

CESA, P.L. **Dinâmica temporal da sarna e da mancha foliar da gala em sistemas de produção convencional e orgânico na cultura da macieira**. 2005. 62f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2005.

CLARK, M. F. Immunosorbent assays in plant pathology. **Annual Review Phytopathology**, Local, v. 19, p. 83 – 106, 1981.

CLEMENTS, H.F. Morphology and Physiology of the pome lenticels of pyrus malus. **Botanical Gazette**, Chicago.v. 97, n.1, p. 101-117, 1935.

CLOVER, G.R.G.; PEARSON, M.N.; ELLIOTT, D.R.; TANG, Z.; SMALES, T.E.; ALEXANDER, B.J.R. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 371-378, 2003.

COSTA, H. **Efeito da infecção individual ou conjunta do vírus do mosaico comum do feijoeiro e de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. Rm *Phaseolus vulgaris* L.** Viçosa : UFV, 1985. 42f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

CRUSIUS, L.U.; FORCELINI, C.A.; SANHUEZA, R.M.V.; FERNANDES, J.M.C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n.1, p. 65-69, 2002.

CUIMING, Z.; BING, T.; FENGLAN, G.; ZONGPU, W. Studies on the changes os superoxide dismutase & peroxidase and polyphenoloxidase in seed coat of soybeans after infected with soybean mosaic virus. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 32, n. 1, p. 99-101, 1999.

CURRY, E.; KOPFERMANN, E. **Predicting susceptibility of ‘Gala’ apples to lenticel breakdown disorder: guidelines for using the dye uptake test**. Disponível em: [www.postharvest.tfrec.wsm.edu/aniline-blue.pdf](http://www.postharvest.tfrec.wsm.edu/aniline-blue.pdf). Acesso em: 20/10/06.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA, E.N.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. da. Indutores de resistência na proteção do mamão contra produções pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 30, p. 314-319, 2004.

DENARDI, F. Porta enxertos. In: EPAGRI. **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, 2002. p. 169-227.

DESVIGNES, J.C.; BOYÉ, R. Different diseases caused by the chlorotic leaf spot virus on the fruits trees. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 235, p. 31-38, 1988.

DOLJA, V. V.; KARASEV, A. V.; KOONIN, E. V. Molecular biology and evolution of closteroviruses: sophisticated build-up of large RNA genomes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 261-285, 1994.

DOVAS, C.I.; KATIS, N.I. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 170, p. 99-106, 2003.

DOVAS, C.I.; KATIS, N.I. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 109, p. 217-226, 2003.

DUAN, X.; SU, X.; YOU, Y.; QU, H.; LI, Y.; JIANG, Y. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. **Food Chemistry**, London, v. 104, p. 571-576, 2007.

DUGAN, F.M. Anthracnose, perennial canker and bull's eye rot of apple and pear. **Tree Fruit Postharvest Journal**, Wenatchee, v. 4, n.1, p. 5-6, 1993.

EDNEY, K.L. The rotting of apples by *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs. **Annals Applied Biology**, Warwick, v. 44, n.1, p. 113-128, 1956.

EDNEY, K.L. Observations on the infection of Cox's Orange Pippin apples by *Gloeosporium perennans* Zeller & Childs. **Annals Applied Biology**, Warwick, v. 46, n. 4, p. 622-629, 1958.

EDNEY, K.L. Some experiments with thiabendazole and benomyl as post-harvest treatments for the control of storage rots of apples. **Plant Pathology**, Oxford, v. 19, p. 189-193, 1970.

FAGGIOLI, F.; RAGOZZINO, E. Detection of pome fruit viroids by RT-PCR using a single primer pair. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 84, n. 2, p. 125-128, 2002

FAJARDO, T. V. M.; EIRAS, M.; SANTOS, H.P.; NICKEL, O.; KUHN, G.B. Detecção e caracterização biológica e molecular de *Rupestris stemmiting associated virus* e o seu efeito na fotossíntese de videiras. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 209-214. 2004.

FAO. [Informações...] Disponível em: [www.fao.org/es/ess/](http://www.fao.org/es/ess/). Acesso em: 20/09/2007.

FERREE, D.C.; GREENE, K.C. Influence of levels of leaf expression of apple mosaic on net photosynthesis and transpiration of leaves of four apple cultivars. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v. 44, n. 1, p. 45-47, 1990.

FRIDLUND, P.R. Distribution of chlorotic leafspot virus on various lengths of apple budsticks in successive years. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 130, p. 85-87, 1983.

FRIDLUND, P.R.; AICHELE, M.D. Reactions of Crab apples considered as potencial apple pollinizers to latent virus infection. **Fruit Varieties Journal**, University Park, v. 41, n. 1, p.

17–18, 1987.

FULTON, R. W. *Apple mosaic virus*. Disponível em: [www.dpvweb.net](http://www.dpvweb.net). Acesso em: 17/09/2004.

GABOVA, R.N. Virus free pome fruits through meristem tip culture. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 235, p. 69-76, 1988.

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S.S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 22, p. 1 – 7, 2004.

GILLES, G.L.; BORMANS, H. Improvement of greenhouse and field indexing techniques for fruit tree viruses. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 235, p. 159-168, 1988.

GIRARDI, C.L.; SANHUEZA, R.M.V.; BENDER, R.J. **Manejo pós-colheita e rastreabilidade na produção integrada de maçãs**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002. 23p. (Circular Técnica, 31)

GODOY, C.V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e a transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n.2, p. 209-215, 2001.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T.B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing glomerella leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 12, p. 1335-1340, 2004.

GUO, D.P.; GUO, Y.P.; ZHAO, J.P.; LIU, H.; PENG, Y.; WANG, Q.M.; CHEN, J.S.; RAO, G.Z. Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatai*) after turnip mosaic virus infection. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 57-63, 2005.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHANG, Y.H. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. **Colloid and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 57, p. 182-188, 2007.

GYÖRGY, B. Biochemical changes of plums caused by *Plum pox virus*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 67, p. 77- 82, 1976.

HARUTA, M.; MURATA, M.; KADOKURA, H.; HOMMA, S. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. **Phytochemistry**, New York, v. 50, p. 1021-1025, 1999.

HASSAN, M.; MYRTA, A.; POLAK, J. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 133, p. 124-129, 2006.

HAUAGGE, R. Variedades de macieira para o Brasil: novas cultivares, e estratégias do melhoramento genético para o seu desenvolvimento futuro. In: ENCONTRO NACIONAL

SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri. 2003. p. 254.

HENRIQUEZ, J.L.; SUGAR, D.; SPOTTS, R.A. Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington and California. **Plant Disease**, St Paul, v. 88, n. 10, p. 1134-1138, 2004.

HENRIQUEZ, J.L. First report of apple rot caused by *Neofabraea alba* in Chile. **Plant Disease**, St Paul, v. 89, n.12, p. 1360, 2005.

HERNÁNDEZ, J.; TALAVERA, J.M.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; DICENTA, F.; SEVILLA, F. Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 111, p. 313-321, 2001.

HERNÁNDEZ, J.A.; RUBIO, M.; OLMOS, E.; ROS-BARCELÓ, A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, p. 486-495, 2004.

HIRATA, H.; LU, X.; YAMAJI, Y.; KAGIWADA, S.; UGAKI, M.; NAMBA, S. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* (ASGV) causes symptom attenuation. **Journal of General Virology**, London, v. 84, p. 2579-2583, 2003.

HISAMINATO, H.; MURATA, M.; HOMMA, S. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut Lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 5, p. 1016-1021, 2001.

HOWELL, W. E.; PARISH, C. L. MINK, G. I. Apple Mosaic. In: JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. **Compendium of apple and pear diseases**. 3 ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1997. 100p.

IBGE. [Informações]. Disponível em: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em: 10/08/2007.

ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K. Simultaneous detection of six citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 106, p. 235 – 239, 2002.

JAMES, D. A simple and reliable protocol for the detection of *apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 83, p. 1 – 9, 1999.

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**, London, v. 75, n. 7, p. 1535–1542, 1994.

JOUILI, H.; FERJANI, E. E. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. **C.R. Biologies**, Paris, v. 326, p. 639-644, 2003.



KAGALE, S.; MARIMUTHU, T.; THAYUMANAVAM, B.; NANDAKUMAR, R.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, p. 91-100, 2004.

KARTHIKEYAN, M.; RADHIKA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; BHASKARAN, R.; SAMIYAPPAN, R.; VELAZHAHAN, R. Induction of phenolics and defence related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 3, p. 367-377, 2006.

KATSURAYAMA, Y; BONETI, J.I. da S.; BECKER, W.F.; OZAWA, T.; TSUCHIYA, S. Epidemiologia das doenças da macieira no subtropical e perspectivas de manejo integrado: caso da mancha foliar da gala (*Colletotrichum* spp.). In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental, 2001, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: Epagri, 2001. p. 125-139.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. Influência da temperatura e do período de molhamento foliar na etiologia da mancha da gala (*Colletotrichum* spp.). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri, 2003. p. 15-26.

KIENHOLZ, J. R. Control of bull's-eye rot on apple and pear fruits. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 40, n. 10, p. 872-877, 1956.

KIM, Y.K.; DAOXIN, L.I.; KOLATTUKUDY, P.E. Induction of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin signaling by Hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 19, p. 5144-5150, 1998.

KIRBY, M. J.; GUISE, C. M.; ADAMS, A. N. Comparison of bioassays and laboratory assays for *apple stem grooving virus*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 93, p. 167 – 173, 2001.

KLERKS, M.M.; LEONE, G.; LINDNER, J.L.; SCHOEN, C.D.; HEUVEL, J.F.J.M.van den. Rapid and sensitive detection of *Apple stem pitting virus* in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 11, p. 1085 – 1091, 2001.

KNAPP, E.; HANZER, V.; MENDONÇA, D.; MACHADO, A. da C.; KATINGER, H.; MACHADO, M.L. da C. Improved virus detection in rosaceous fruit trees *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 52, p. 3-6, 1998.

KNAPP, E.; HANZER, V.; WEISS, H.; MACHADO, A. da C.; WANG, Q.; WEISS, B.; KATINGER, H.; MACHADO, M.L. da C. Distribution of Apple chlorotic leafspot virus in apple shoots cultivated *in vitro*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v 386, p. 187-191, 1995b.

KNAPP, E.; MACHADO, A. da C.; PÜHRINGER, H.; WANG, Q.; HANZER, V.; WEISS, H.; WEISS, B.; KATINGER, H.; MACHADO, M.L. da C. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. And *Prunus* sp. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 55, p. 157-173, 1995a.

KREUZ, C.L.; PETRI, J.L.; MONDARDO, M. Capacidade produtiva de macieiras cv. Fuji em diversos espaçamentos, com uso de mudas livres de viroses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 121-127, 1996.

KRISTENSEN, H.R.; THOMSEN, A. Apple mosaic virus – host plant and strains. **Phitopathologia Mediterrânea**, Bologna, v. 2, p. 97-102, 1963.

KUHN, G.B.; PROTAS, J.F.da S. **Perdas acumulativas pela virose do enrolamento da folha na cultivar Cabernet Franc**. Brasília: Embrapa CNPUV, 1988. 3p. (Comunicado Técnico, 7)

KUHN, G.B. **Vírus do intumescimento dos ramos associado à morte das plantas de cultivares *Vitis vinifera***. Brasília: Embrapa CNPUV, 1999. 4p. (Comunicado Técnico, 32).

KUNDU, J.K.; SVOBODA, J.; POLÁK, J. Detection of *Apple stem grooving virus* in different tissues of apple trees throughout the year. **Plant Protect Science**, Praga, v. 39, n. 3, p. 93-96, 2003.

LAMEY, H.A.; EVERETT, T.R. Increased susceptibility of hoja blanca virus-infected rice leaves to *Cochliobolus miyabeanus*. **Phytopatology**, St Paul, v. 57, p. 227, 1967.

LANDFALD,R. Fruit Rot in the Apple Cultivar "Aroma". **Plant Diseases**, St Paul, v. 60, n. 25, p. 1-8. 1981.

LARA, C. Del R.A. **Desarrollo de lenticellosis em manzanas cv. Royal Gala**. Talca : Facultad de Ciências Agrárias, 2004. 53f. Dissertação (Mestrado) – Facultad de Ciências Agrárias, Escuela de Agronomía, Talca, 2004.

LEITE, R.P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A.Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná**. Londrina: Iapar. 1988. 6p. (Informe de Pesquisa, 81).

LEMOINE, J. Les maladies de dégénérescence. **L'Arboriculture fruitière**, Paris, n. 434, p. 38-48, 1990.

LESSER, C.; TREUTTER, D. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 123, p. 49-56, 2005.

LIBERTI, D.; MARAIS, A. DUMAS, L.-S, DULUCQ, M.J.; ALIOTO, D. RAGOZZINO, A.; RODONI, B. CANDRESSE, T. Characterization of *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, a novel Trichovirus isolated from stone fruit trees. **Phytopathology**, St. Paul. v. 95, n. 4, p. 420-426, 2005.

- LISTER, R. M. *Apple stem grooving virus*. Disponível em: [www.dpvweb.net](http://www.dpvweb.net); Acesso em: 17/09/2004.
- LOLAS, M. **Enfermedades de verano em manzanas Pink Lady**. Talca: Centro de Pomáceas da Universidade de Talca, 2005. 4p. (Boletim Técnico, v. 5, n. 2).
- LOPEZ, M. M.; BERTOLINI, E.; OLMOS, A.; CARUSO, P.; GORRIS, M.T.; LLOP, P.; PENYALVER, R.; CAMBRA, M.. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Barcelona, v. 6, p. 233 – 243, 2003.
- MACIEL, S. da C. **Detecção de Prune dwarf e Prunus necrotic ringspot Ilarvirus em pessegueiros nas principais Regiões produtoras do estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas : UFPel, 2003. 50f. Dissertação (Mestrado) – Fitopatologia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.
- MAGOME, H. YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T.; ITO, T.; MIYAKAWA, T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear and citrus trees. **Phytopathology**, St Paul, v. 87, n. 4, p. 389-396. 1997.
- MAGOME, H.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T. Single-strand conformation polymorphism analysis of *Apple stem grooving virus* capillovirus sequence variants. **Phytopathology**, St Paul, v. 89, n. 2, p. 136 – 140. 1999.
- MARI, M.; ROSSI, A.; BRIGATI, S.; PRATELLA, G.C. **Il marciume lenticellare nelle mele tardive**. Notiziario Tecnico. 2002. Disponível em: [www.agrimodena.it/biblioteca/qualita%20e%20conservabilita%20frutta%20testo.pdf](http://www.agrimodena.it/biblioteca/qualita%20e%20conservabilita%20frutta%20testo.pdf). Acesso em: 26/11/2007.
- MARINHO, V.L.A.; KUMMERT, J.; RUFFLARD, D.C.; COLINET, D.; LEPOIVRE, P. Detection of *Apple stem grooving virus* in dormant apple trees with crude extracts as templates for one-step RT-PCR. **Plant Disease**, St Paul, v. 82, n. 7, p. 785-790, 1998.
- MARINHO, V.L.A.; DANIELS, J.; KUMMERT, J. CHANDELIER, A.; LEPOIVRE, P. RT-PCR-ELISA for detection of *Apple stem grooving virus* in apple trees. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 28, n. 4, p. 374-379, 2003.
- MARTELLI, G. P.; JELKMANN, W. *Foveavirus*, a new plant virus genes. **Archives of Virology**, New York, v. 143, n. 6, p. 1245-1249, 1998.
- MAULE, A.; LEH, V.; LEDERER, C. The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 5, p. 1-6, 2002.
- MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, New York, v. 67, p. 2318-2331, 2006.
- MEKURIA, G.; RAMESH, S.A.; ALBERTS, E.; BERTOZZI, T.; WIRTHENSOHN, M.; COLLINS, G.; SEDGLEY, M. Comparation of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulci*). **Journal of**

**Virological Methods**, Amsterdam, v. 114, p. 65-69, 2003.

MELLO, L.M.R. de. **Produção e Mercado da maçã brasileira – panorama 2005**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2006. 5p. (Circular Técnica, 64)

MENZEL, W.; JELKMANN, W.; MAISS, E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays coamplification of plant mRNA as internal control. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 99, p. 81 – 92, 2002.

MENZEL, W.; ZAHN, V.; MAISS, E. Multiplex RT-PCR-ELISA compared with bioassay for the detection of four apple viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 110, p. 153 – 157, 2003.

MILAVEC, M.; RAVNIKAR, M.; KOVAC, M. Peroxidases and photosynthetic in susceptible potato infected with potato virus Y<sup>NTN</sup>. **Plant Physiology Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 891-898, 2001.

MOGGIA, C.; PEREIRA, M. **Manzanas Pink Lady**. Talca: Centro de Pomáceas da Universidade de Talca, 2003. 4p. (Boletim Técnico, v. 3, n. 4).

MOGGIA, C.; YURI, J.A.; ACEVEDO, C.; PEREIRA, M. **Desarrollo de lenticelosis em manzanas cv. Royal Gala**. Talca: Centro de Pomáceas da Universidade de Talca, 2004. 4p. (Boletim Técnico, v. 4, n. 6).

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Limerick, v. 162, p. 491-498, 2002.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 233-247, 1987.

MURATA, M.; HARUTA, M.; MURAI, N.; TANIKAWA, N.; NISHIMURA, M.; HOMMA, S.; ITOH, Y. Transgenic apple (*Malus x domestica*) shoot showing low browning potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5243-5248, 2000.

MURATA, M.; TSURUTANI, M.; TOMITA, M.; HOMMA, S.; KANEKO, K. Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 5, p. 1115-1121, 1995.

NASCIMENTO, A.R.P.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R.; GOMES, A.M.A. Elaboração e validação de escala diagramática para cancro bacteriano da videira. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 2007. No prelo.

NASSUTH, A.; POLLARI, E.; HELMECZY, K.; STEWART, S.; KOFALVI, S.A. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. **Journal of Virological Methods**,

Amsterdam, v. 90. n. 1, p. 37 – 49, 2000.

NAVARRO, J. A. S.; APARICIO, F.; HERRANZ, M.C.; MINAFRA, A.; MYRTA, A.; PALLÁS, V. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viruses by one-step RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, p. 1-9, 2004.

NEHER, D.A.; REYNOLDS, K.L.; CAMPBELL, C.L. Analysis of disease progress curves using linear models. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. **Exercises in Plant Disease Epidemiology**. St Paul : editora, 1997. 125 p.

NICKEL, O. FAJARDO, T.V.M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n.3, p. 655-659, 2001.

NICKEL, O. JELKMANN, W.; KUHN, G. Occurrence of *Apple stem grooving* capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 444-446, 1999.

NICKEL, O. Viroses em frutíferas de clima temperado: potencial e quantificação de danos à produção e qualidade dos frutos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri, 2003. p. 173-183.

NISHIMURA, M.; FUKUDA, C.; MURATA, M.; HOMMA, S. Cloning and some properties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase, and changes in browning potential during fruit maturation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 83, n.11, p. 1156-1162, 2003.

NITZANY, F.E. Synergism between *Pythium ultimum* and *Cucumber Mosaic Virus*. **Phytopathology**, St Paul, v. 56, p. 1386-1389, 1966.

NOLASCO, G. Diagnosis: recent developments and routine implementation. In: INTERNATIONAL COUNCIL OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASE OF THE GRAPEVINE, 14., 2003, Locorotondo. **Anais...** Locorotondo, 2003. p. 184-186.

NUTTER, F.W.Jr; PARKER, S.K. Fitting disease progress curves using EPIMODEL. In: FRANCL, L.; NEHER, D.A. **Exercises in Plant Disease Epidemiology**, St. Paul, 1997. p. 24-28.

NUTTER, F.W.Jr.; ESKER, P.D.; NETTO, R.A.C. Disease assessment concepts and the advancements made in improving the accuracy and precision of plant disease data. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, p. 95-103, 2006.

OPOKU, I.Y.; DAKWA, J.T.; OLLENNU, L.A.A. The development of *Phytophthora* canker on different cocoa genotypes infected and uninfected with *Cocoa swollen shoot virus*. **Tropical Science**, London, v. 45, n. 1, p. 50-53, 2006.

PEREZ, L.H. Produção e comércio internacional de maçã, 2003 a 2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 53-61, 2006.

- PETRZIK, K. Capsid protein sequence gene analysis of *Apple mosaic virus* infecting pears. **European Journal Plant Pathology**, Dordrecht, v. 111, p. 355-360, 2003.
- PETRZIK, K.; LENZ, O. Remarkable variability of *apple mosaic virus* capsid protein gene after nucleotide position 141. **Archives of Virology**, New York, v. 147. p. 1275–1285. 2002.
- POTTER, L.R.; JONES, I.T. Interaction between *Barley yellow dwarf virus* and powdery mildew in four barley genotypes. **Plant Pathology**, Oxford, v. 30, n. 3, 133-139, 1981.
- PRIA, M.D., AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da mancha angular do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.4, p. 394-400, 2003.
- PRUSKY, D.; McEVOY, J.; LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 14, n. 9, p. 1106-1113, 2001.
- RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F.J.L.; FAJARDO, T.V.M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do *Apple stem pitting virus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 51-56, 2006.
- RADWAN, D.E.; FAYEZ, K.A.; MAHMOUD, S.Y; HAMAD, A.; LU, G. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. **Plant, Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, p. 480-489, 2007.
- RAGOZZINO, E.; FAGGIOLI, F.; BARBA, M. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection os seven viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. **Journal of General Virology Methods**, London, v. 121, p. 25 – 29. 2004.
- RAY, H.; DOUGHES, D.S.; HAMMERSCHMIDT, R. Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 53, p. 93-103, 1998.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n.2, p. 123-130, 2003.
- REYNOLDS, K.L.; NEHER, D.A. Statistical Comparison of Epidemics. In: FRANCL, L.J.; NEHER, D.A. **Exercises in Plant Disease Epidemiology**, St. Paul, 1997, p. 34-37.
- RIBEIRO, L.F.C.; BEDENDO, I.P.; SANHUEZA, R.M.V. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 30-33, 2007.
- RIBOLDI, J. Análise estatística. **Cadernos de Matemática e Estatística**, Porto Alegre,

Série B, n. 56, p. 12-14, 2001.

RICH, A.E. Influence of apple dapple and stem pitting viruses of tree growth and fruit yield over fourteen year period. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 51, n. 4, p. 293-296, 1967.

RIEDLE-BAUER, M. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 148, p. 297-302, 2000.

RIVERO, R.M.; RUIZ, J.M.; GARCÍA, P.C.; LEFEBRE, L.R.L.; SÁNCHEZ, E.; ROMERO, L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 315-321, 2001.

RUSSEL, G.E. Breeding for resistance to infection with yellowing viruses in sugar beet. **Annals Applied Biology**, Warwick, v. 57, p. 311-320. 1966a.

RUSSEL, G.E. Some effects of inoculation with yellowing viruses on the susceptibility of sugar beet to fungal pathogens, II. Susceptibility to *Erysiphe* species. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 49, n. 4, p. 621-628, 1966c.

RUSSEL, G.E. The control of *Alternaria* species on leaves of sugar beet infected with yellowing viruses. **Annals Applied Biology**, Warwick, v. 57, p. 425-434. 1966b.

RWAHNIH, M. Al.; TURTURO, C.; MINAFRA, A.; SALDARELLI, P.; MYRTA, A.; PALLÁS, V.; SAVINO, V. Molecular variability of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus in different hosts and Geographical regions. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 86, n. 2, p.117 – 122, 2004.

SAADE, M. APARICIO, F.; NAVARRO, J.A.S.; HERRANZ, M.C.; MYRTA, A.; TERLIZZI, B.di; PALLÁS, V. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotonic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St Paul, v. 90, n. 12, p. 1330 – 1336, 2000.

SABANADZOVIC, N. A. G. et al. Multiplex RT-PCR detection of grapevine fleck virus-like viruses in grapevine with co-amplification of control plant mRNA. In: INTERNATIONAL COUNCIL OF VIRUSES AND VIRUS-LIKE DISEASE OF THE GRAPEVINE, 14., 2003, Locorotondo. **Anais...** Local, 2003. p. 195.

SAMARRAI, T.H.A.; SULLIVAN, P.A.; TEMPLETON, M.D.; FARLEY, P.C. Peptide inhibitors of appressorium development in *Glomerella cingulata*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, p. 203-207, 2002.

SANHUEZA, R.M.V. **Características e controle de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 1999. 16 p. (Circular Técnica, 25).

SANHUEZA, R.M.V. Ocorrência de *Cryptosporiopsis perennans* em macieiras ‘Fuji’ no Sul do Brasil. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 28, n. 2, p. 204-206, 2002.

SANHUEZA, R.M.V.; AMORIM, L. Avanços no manejo das doenças de verão. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 6., 2003, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri, 2003. p. 244-249.

SANHUEZA, R.M.V.; MAFFIOLETTI, M.; COMPARIN, C.C.; KRASNIAK, J.; BOGO, A.; ARCARI, R. **Características e controle da podridão “olho de boi” nas maçãs do Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2006. 13p. (Circular Técnica, 66)

SANHUEZA, R.M.V. Características e controle da podridão “olho de boi” nas maçãs do Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 10., 2007, Fraiburgo. **Anais...** Caçador, SC: Epagri, 2007. p. 223-233.

SATO, K.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *apple chlorotic leaf spot virus*. **Journal of General Virology**, London, v. 74, n. 9, p. 1927 – 1931, 1993.

SATOH, H.; MATSUDA, H.; KAWAMURA, T.; ISOGAI, M.; YOSHIKAWA, N.; TAKAHASHI, T. Intracellular distribution, cell-to-cell trafficking and tubule-inducing activity of the 50 kDa movement protein of *apple chlorotic leaf spot virus* fused to green fluorescent protein. **Journal of General Virology**, London, V. 81, p. 2085 – 2093, 2000.

SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. **Review Biochemical Genetics**, New York, V. 3, p. 32-39, 1969.

SEYHAN, F.; OZAY, G.; SAKLAR, S.; ERTAS, E.; SATIR, G.; ALASALVAR, C. Chemical changes of three native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) during fruit development. **Food Chemistry**, London, 2007. No prelo.

SHAMLOUL, A.M.; FAGGIOLI, F.; KEITH, J.M.; HADIDI, A. A novel multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: *Apscaviroid*, *Hostuviroid*, *Pelamoviroid* and *Pospiviroid*. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 105, p. 115-121, 2002.

SHIEL, P. J.; ALREFAI, R.H.; DOMIER, L.L.; KORBAN, S.S.; BERGER, P.H. The complete nucleotide sequence of *apple mosaic virus* RNA 3. **Archives of Virology**, New York, v. 140, n. 7, p. 1247 – 1256, 1995.

SHIEL, P. J.; BERGER, P. H. The complete nucleotide sequence of *apple mosaic virus* (ApMV) RNA 1 and RNA 2: ApMV is more closely related to *alfafa mosaic virus* than to other ilarviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 273 – 278, 2000.

SHIH, J.; WEI, Y.D.; GOODWIN, P.H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotricum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, Amsterdam, v. 243, p. 139-150, 2000.

SIEGEL, B.Z. Plant peroxidases – an organismic perspective. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 12, p. 303-312, 1993.



SITTON, J.W.; PATTERSON, M.E. Effect of high-carbon dioxide and low-oxygen controlled atmospheres on postharvest decays of apples. **Plant Disease**, St Paul, v. 76, n. 10, p. 992-995, 1992.

SPÓSITO, M.B.; BASSANEZI, R.B.; AMORIM, L. Resistência à mancha preta dos citros avaliada por curvas de progresso da doença. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 532-537, 2004.

STANGARLIN, J.R. Compostos pré-formados, espécies reativas de oxigênio e fitoalexinas nas interações de resistência planta patógeno. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, supl., p. 152-154, 2007.

SUDHAKAR, N.; NAGENDRA-PRASAD, D.; MOHAN, N.; MURUGESAN, K. Induction of systemic resistance in *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 (tomato) against *Cucumber mosaic virus* by using ozone. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 2007, p. 71-77, 2007.

SUN, B.; JING, Y.; CHEN, K.; SONG, L.; CHEN, F.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, p. 536-543, 2007.

SUTTON, T.B.; SANHUEZA, R.M.V. Necrotic leaf blotch of Golden Delicious – Glomerlla leaf spot: a resolution of common names. **Plant Disease**, St Paul, v. 82, n. 3, p. 267-268, 1998.

SWIECH, R.; BROWNING, S.; MOLSSEN, D.; STENGER, D.C.; HOLBROOK, G.P. Photosynthetic responses of sugar beet and *Nicotiana benthaminiana* Domin. Infected with beet curly top virus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 58, p. 43-52, 2001.

TAHIR, I.I.; JOHANSSON, E.; OLSSON, M.E. Improvement of quality and storability of apple cv. Aroma by adjustment of some pre-harvest conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 112, p. 164-171, 2007.

TESSMANN, D.J.; DIANESE, J.C.; MIRANDA, A.C.; CASTRO, L.H.R. Epidemiology of a Neotropical rust (*Puccinia psidii*): periodical analysis of the temporal progress is a perennial host (*Syzygium jambos*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 50, p. 725-731, 2001.

TOWNSEND, G.R.; HEUBERGER, J.W. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. **Plant Disease**, St Paul, v. 27, p. 340-343, 1943.

TSURUTANI, M.; MURATA, M. HOMMA, S. Comparison of enzymatic browning of japanese pear and apple. **Food Science Technology Research**, Tokyo, v. 6, n. 4, p. 344-347, 2000.

UHM, K.H.; AHN, I.P.; KIM, S.; LEE, Y.H. Calcium/calmodulin-dependent signaling for prepenetration development in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, St Paul, v. 93, n. 1, p. 82-87, 2003.

ULUBAŞ, Ç.; ERTUNÇ, F. *Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)* status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 29, p. 251-257, 2005.

VALENTINES, M.C.; VILAPLANA, R.; TORRES, R.; USALL, J.; LARRIGAUDIÈRE, C. Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 36, p. 227-234, 2005.

VERAVERBEKE, E.A.; VERBOVEN, P. OOSTVELDT, P.V.; NICOLAI, B.M. Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* subsp. *mitis* (Wallr.)) during storage: Part 1. Model development and determination of diffusion coefficients. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 75-88, 2003a.

VERAVERBEKE, E.A.; VERBOVEN, P. OOSTVELDT, P.V.; NICOLAI, B.M. Prediction of moisture loss across the cuticle of apple (*Malus sylvestris* subsp. *mitis* (Wallr.)) during storage: Part 2. Model simulations and practical applications. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 30, p. 89-97, 2003b.

WANG, Y.S.; TIAN, S.P.; XU, Y.; QIN, G.Z.; YAO, H. Changes in the activities of pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit inoculated with *Cryptococcus laurentii* or *penicillium expansum* at 0 or 20 °C. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 34, p. 21-28, 2004.

WATERHOUSE, P.M.; WANG, M.B., LOUGH, T. T: gene silencing as an adaptive defence against viruses. **Nature**, London, v. 411, p. 834-842, 2001.

WAY, R. D. et al. Apple (*Malus*). In: MOORE, J. N.; BALLINGTON, J. R. Jr. **Genetics Resources of Temperate Fruit and Nut Crops**. Meppel, 1990. v. 1, p. 1-62.

WEI, Y.D.; BYER, K.N.; GOODWIN, P.H. Hemibiotrophic infection of round-leaved mallow by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Malvae* in relation to leaf senescence and reducing reagents. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 357-364, 1997.

WELSH, M.F.; van der MEER, F.A. *Apple stem grooving*. In: FRIDLUND, P. (ed.) **Virus and viruslike diseases of pome fruits and no infections disorders**. Prosser: Washington State University, Irrigated Agriculture Research and Extension Center, 1989. p. 127-137.

WILKINSON, E.H. Bitter rot of apples caused by *Gloeosporium album* Osterw, with special reference to the variety Allington pippin. **Annual Reporter Agriculture Horticultural Research Station Long Ashton Briston**, Bristol, p. 81-89, 1944.

WILKINSON, E.H. Observations on the perennial canker fungus. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v. 28, p. 79-85, 1945.

XU, L.G.; BO, S.Y.; MIN, G.Y.; CHAO, L.X.; HUA, G.S.; JUN, W.J.; JUN, S.L. Study on the relationship between lenticel tissue structure and density and the occurrence of apple rough bark disease. **Journal of Fruit Science**, Binghamton, v. 21, n. 4, p. 350-353, 2004.

YAKOBY, N.; MOUALEM, D.B.; KOBILER, I.; PRUSKY, D. The analysis of fruit protection mechanisms provided by reduced-pathogenicity mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* obtained by restriction enzyme mediated integration. **Phytopathology**, St Paul, v. 92, n. 11, p. 1196-1201, 2002.

YANASE, H. Studies on apple latent viruses in Japan. **Bulletin Fruit Tree Research Station**, Tokyo, n. 1, p. 47-109, 1974.

YANASE, H. et al. Apple Topworking Disease. In: JONES, A. L.; ALDWINCKLE, H. S. **Compendium of apple and pear diseases**, St. Paul: The American Phytopathological Society, 3 ed. 1997. 100 p.

YORUK, R.; MARSHALL, M.R. Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 27, p. 361-422, 2003.

YOSHIKAWA, N. *Apple chlorotic leaf spot virus*. Disponível em: [www.dpvweb.net](http://www.dpvweb.net); Acessado em: 17/09/2004.

YOSHIKAWA, N.; SASAKI, E.; KATO, M.; TAKAHASHI, T. The nucleotide sequence of *apple stem grooving virus* capillovirus genome. **Virology**, New York, v. 191, n. 1, p. 98 – 105, 1992.

YOSHIKAWA, N.; OOGAKE, S.; TERADA, M.; MIYABAYASHI, S.; IKEDA, Y.; TAKAHASHI, T.; OGAWA, K. *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa protein is targeted to plasmodesmata and accumulates in sieve elements in transgenic plant leaves. **Archives of Virology**, New York, v. 144. p. 2475 – 2483, 1999.

ZANUZ, M. C.; RIZZON, L. A.; KUHN, G. B. **efeito da virose do enrolamento da folha na composição química do vinho ‘Cabernet Franc’**. Brasília: Embrapa – CNPUV, 1993. 2p. (Comunicado Técnico, 11).

ZAWADZKA, B. The influence of virus and mycoplasma diseases on frost damage of apple tree. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 235, p. 59-67, 1988.

ZOTTO, A. dal; NOME, S.F.; RIENZO, J.A. di; DOCAMPO, D.M. Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phonological stages in peach cultivars. **Plant Disease**, St Paul, v. 83, n. 11, p. 1055-1057, 1999.

## ANEXOS

ANEXO 1 - ANOVA para incidência de *Cryptosporiopsis perennans* inoculados em frutos de 'Maxi Gala' com as infecções virais *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) e sem inoculação viral, 2007.

Causas de Variação	erro	Pr > F	Pr > F trans*.
Tratamentos	Tratamento x repetição	0,0135	0,0077
Época de inoculação	Resíduo	0,3251	0,4271
Tratamento x época	Resíduo	0,7960	0,7831

\*Trans.: dados transformados por raiz de x

ANEXO 2 - ANOVA para número de lenticelas necrosadas por fruto devido à inoculação de *Cryptosporiopsis perennans* em 'Maxi Gala' pré-infectadas com *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) e sem inoculação viral, 2007.

Causas de Variação	Erro	Pr > F
Tratamentos	Tratamento x repetição	0,3735
Época de inoculação	Resíduo	0,3301
Tratamento x época	Resíduo	0,6234

#### Análise por contrastes ortogonais

Colheita		Pr > F
	Virose vs testemunha	0,2844
Armazenagem		Pr > F
	Virose vs testemunha	0,0201
	C e CPM vs G, GP, GCP e GCPM	0,8506
	G vs GP, GCP e GCPM	0,0683
	G e GCPM vs testemunha	0,0149

ANEXO 3 – Análise de variância (ANOVA) para incidência, número de manchas por folha infectada e Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença de macieiras ‘Maxi Gala’ com e sem pré-infecção de *Apple Stem Grooving Vírus* (ASGV) inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides* em duas épocas de avaliação.

Incidência (porcentagem de folhas infectadas)			
		1ª Época	2ª Época
Tratamento	Erro	Pr > F	
Vírus	Vírus x repetição	0,4888	0,0291
h.a.i.	Resíduo	<0,0001	<0,0001
Vírus x h.a.i.	Resíduo	0,4568	0,0012
Número de manchas por folha infectada			
		1ª Época	2ª Época
Tratamento	Erro	Pr > F	
Vírus	Vírus x repetição	0,0438	0,0352
h.a.i.	Resíduo	<0,0001	<0,0001
Vírus x h.a.i.	Resíduo	<0,0001	0,0048
Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença			
Incidência (% de folhas com lesões / planta)			
Causas de Variação	Erro	Pr > F	
Tratamento	Tratamento x repetição	0,0467	
Época de avaliação	resíduo	0,0220	
Tratamento x época	resíduo	0,8609	
número de manchas / folha infectada			
Causas de Variação	Erro	Pr > F	
Tratamento	Tratamento x repetição	0,0017	
Época	resíduo	0,0147	
Tratamento x época	resíduo	0,2116	

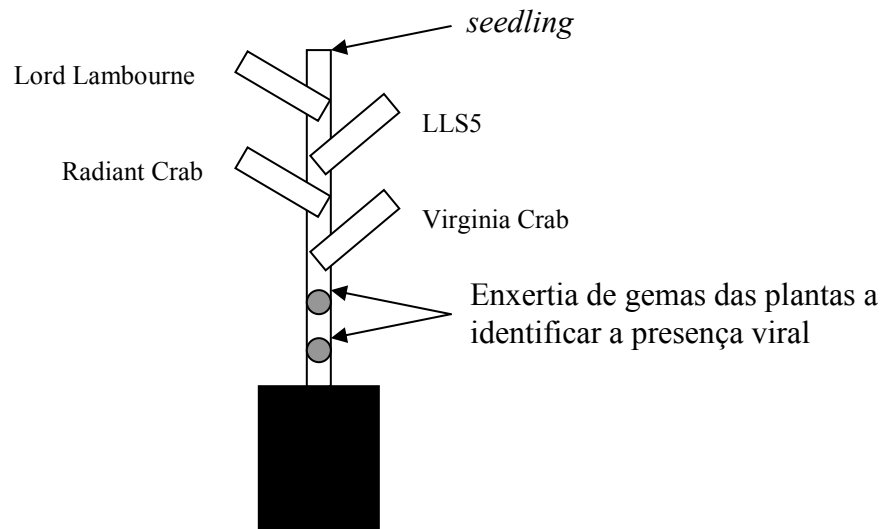
h.a.i.: horas após inoculação

ANEXO 4 – Gel de poliacrilamida 5% da atividade de isoenzimas de peroxidases de ramos de ‘Maxi Gala’ com e sem pré-infecção infecção de *Apple Stem Grooving Virus* (ASGV).



ANEXO 5 - Metodologia empregada para a indexagem múltipla em macieiras ‘Maxi Gala’ utilizadas nos experimentos, inoculadas com os vírus *Apple stem grooving vírus* (ASGV), *Apple stem pitting vírus* (ASPV), *Apple chlorotic spot vírus* (ACLSV) e *Apple mosaic vírus* (ApMV).

Vírus	Espécies indicadoras
ASGV	<i>Malus sylvestris</i> cv. Virginia Crab
ASPV	<i>M. sylvestris</i> Radiant Crab
ACLSV	<i>M. sylvestris</i> LLS5
ApMV	<i>M. sylvestris</i> cv. Lord Lambourne



- Cronograma da indexagem múltipla
  1. 29/06/06 coleta dos ramos das indicadoras e armazenagem em câmara fria;
  2. 13/07/06 coleta dos ramos das plantas de ‘Maxi Gala’;
  3. 17/07/06 enxertia das gemas de ‘Maxi Gala’ nos *seedlings*;
  4. 28/08/06 enxertia das indicadoras nos *seedlings*;
  5. 20/09/06 início da brotação das indicadoras;
  6. avaliações semanais, sem modificações dos sintomas após 31/10/06.



ANEXO 6 – Resultados dos sintomas da múltipla indexagem realizada em julho de 2006, RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) e ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) realizados em 2005 e 2006 de macieiras ‘Maxi Gala’, da área experimental no município de Vacaria, RS, inoculadas com as infecções virais *Apple chlorotic leaf spot virus* (C), *Apple stem grooving virus* (G), *Apple stem pitting virus* (P) e *Apple mosaic virus* (M) em julho de 2004, 2007.

Maxi Gala		sintomas até 31/10/06				RT-PCR e ELISA					
planta	rep	V.C.	Radiant	LLS5	L.L.	C	P	G	M		
2A	1	ss	ss	Ss	ss	+					
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	sb	ss	Ss	ss						
2B	1	ss	ss	Ss	ss	-					
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
2C	1	sb	sb	Sb	ss	-					
	2	ss	sb	Sb	ss						
	3	sb	ss	Ss	ss						
2D	1	ss	ss	Ss	ss	-					
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
3A	1	sb	sb	Ss	ss		-				
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
3B	1	ss	ss	Ss	ss		-				
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
3C	1	ss	sb	Ss	ss		-				
	2	ss	sb	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
3D	1	ss	ss	Ss	ss		-				
	2	ss	sb	Ss	ss						
	3	ss	sb	Sb	ss						
4A	1	sb	sb	Ss	ss			-			
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	sb	Sb	ss						
4B	1	ss	ss	Ss	ss			-			
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	sb	Ss	ss						
4C	1	ss	ss	Ss	ss			+			
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	sb	ss	Ss	ss						
4D	1	ss	ss	Ss	ss			+			
	2	ss	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
5A	1	ss	ss	Sb	ss	-	+	+			
	2	ss	mv	Ss	ss						
	3	ss	ss	ncel	ss						
5B	1	ss	ss	Ss	ss	+	+	+			
	2	ncel	ss	Ss	ss						
	3	ss	ss	Ss	ss						
5C	1	sb	ss	melo	ss	-	+	+			
	2	sb	sb	Sb	sb						

	3	sb	ss	mclo;fpeq;fdef	ss				
5D	1	ss	ss	lb	ss	+	+	+	
	2	ss	sb	mclo	ss				
	3	ss	epin;mv	mclo	ss				
6A	1	sb	ss	Sb	ss	+	+	-	+
	2	sb	sb	mclo;fdef	ss				
	3	ss	sb	fdef;mclo	ncel				
6B	1	ss	sb	fdef;bif;mclo	ss	+	+	-	+
	2	ss	ss	Ss	ss				
	3	ss	ss	mclo;fdef;efol	fpeq;mclo;fdef				
6C	1	ss	mv	Sb	ss	+	-	-	+
	2	ss	ss	fdef;mclo	ss				
	3	ss	mv;epin	Sb	ss				
6D	1	ss	sb	ncel;mclo	ss	+	-	-	+
	2	ss	fpeq;mv	fdef;ncel;mclo	Mclo;fdef				
	3	ss	ss	fdef;ncel	fdef;ncel;mclo				
7A	1	sb	sb	Ss	ss				
	2	sb	sb	Sb	ss				
	3	ss	ss	Ss	ss				
7B	1	ss	ss	Ss	ss	-	-	-	
	2	ss	ss	Ss	Ss				
	3	ss	ss	Ss	Ss				
7C	1	ss	ss	Ss	Ss	-	-	-	
	2	ss	ss	Ss	Ss				
	3	ss	sb	Sb	Sb				
7D	1	ss	ss	Ss	Ss				
	2	sb	ss	Sb	Ss				
	3	Ss	ss	Ss	Ss				
9A	1	Ss	epin	fdef;mclo	mclo;ncel;efol;fpeq	+	+	+	+
	2	Sb	sb	Sb	Ss				
	3	Ss	ss	Ss	Ss				
9B	1	Sb	sb	Sb	ss	+	+	+	+
	2	Ss	mv	fdef;mclo;efol	efol;mclo;fpeq				
	3	Sb	mv	Sb	ss				
9C	1	Ss	ss	mclo;ncel;fdef	mclo;efol;eflo	+	+	+	+
	2	Ss	ss	mclo;fedf;bif	mclo;efol;fdef				
	3	Sb	ss	fdef;ncel;mclo	efol;mclo;fpeq				
9D	1	Ss	mv;epin	fdef;mclo;efol	Ss	+	+	+	?
	2	Ss	ss	Mclo	Ss				
	3	Ss	epin	Mclo	Sb				

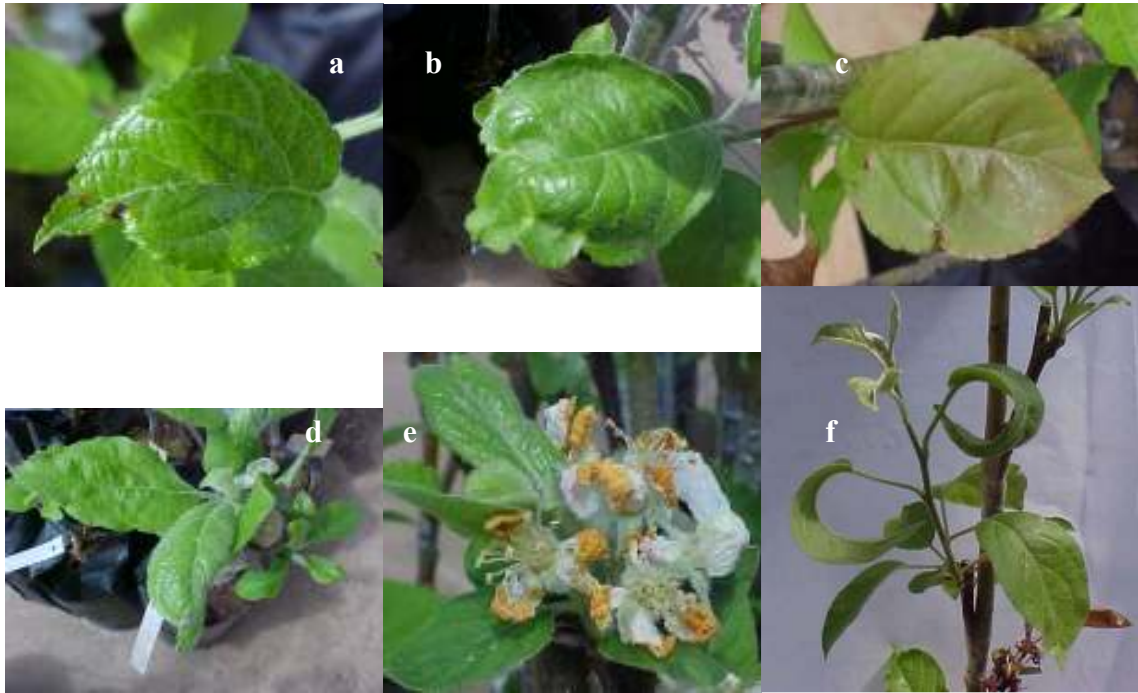
Legendas: encrestamento de flores (Eflo), encrestamento de folhas (Efol), necrose de células da nervura (Ncel), manchas cloróticas (Mclo), folhas pequenas (Fpeq), brotação fraca (Bfra), epinastia (Epin), sem brotação(sb), sem sintomas (ss), manchas vermelhas (mv), folhas deformadas (fdef) início de brotação (ib)

*Malus sylvestris* cv. Virginia Crab (V.C.), *M. sylvestris* cv. Radiant Crab (Radiant), *M. sylvestris* cv. (LLS5) e *M. sylvestris* cv. Lord Lambourne (LL)

Metodologia de enxertia: as gemas foram enxertadas no tronco de mudas da cv Maxi Gala/EM9 em pomar recém implantado, na altura de 10 a 15 cm acima do solo. Os tratamentos foram T2: 5 gemas de 'Maruba' (ACLSV), T3: 5 gemas de 'Imperial Gala' R1 (ASPV); T4: 5 gemas de 'Imperial Gala' R7 (ASGV); T5: 3 gemas de 'Mondial Gala' R5 (ACLSV+ASPV) + 3 gemas do T4 (ASGV); T6: 3 gemas de 'Mondial Gala' R5 (ACLSV+ASPV) + 3 gemas de 'Imperial Gala' R7 (ASGV) + 3 gemas de 'Golden Delicious' (ASGV+ACLSV+ASPV+ApMV); T7: sem enxerto de inóculo viral e T9: 5 gemas de 'Golden Delicious' (ASGV+ACLSV+ASPV+ApMV).

Cronograma da indexagem múltipla: 29/06/06 coleta dos ramos das indicadoras e armazenagem em câmara fria; 13/07/06 coleta dos ramos das plantas de 'Maxi Gala'; 17/07/06 enxertia das gemas de 'Maxi Gala' nos *seedlings*; 28/08/06 enxertia das indicadoras nos *seedlings*; 20/09/06 início da brotação das indicadoras; após ocorreram avaliações semanais, sem modificações dos sintomas após 31/10/06.

ANEXO 7- Sintomas em folhas e flores de plantas indicadoras utilizadas na indexagem múltipla para detecção de infecções virais em macieiras 'Maxi Gala' inoculadas com vírus através de enxertia de gemas, realizada em agosto de 2004, em área experimental no município de Vacaria, RS. Necrose em *Malus sylvestris* cv. Virginia Crab (a), necrose e clorose em *M. sylvestris* cv. (b), manchas vermelhas (c) e epinastia (f) em *M. sylvestris* cv. Radiant Crab e deformação e encrestamento de folhas (d, e) e flores (e) em *M. sylvestris* cv. Lord Lambourne.



ANEXO 8 – Escala utilizada para avaliação de abertura lenticelar e avaliação da abertura lenticelar em frutos de 'Maxi Gala' com as infecções virais GCPM e GCP e não inoculados (Teste).

5 (>75%)      4 (51-75%)      3 (26-50%)      2 (6-25%)      1 (0-5%)



ANEXO 9 – Sintomas de *Cryptosporiopsis perennans* em frutos inoculados, cv. Maxi Gala, e ramos inoculados por ferimento, cv. Fuji Suprema, isolado n. 5 do Banco de Isolados de *C. perennans* da Embrapa CNPUV, e de frutos não inoculados, cv. Fuji, coletados na época da colheita em pomar comercial na região de Vacaria, RS.



Necroses lenticelares

cancros com 270 dias

podridão “olho de boi”



cv. Fuji