

CIRCULAR TÉCNICA

161

Bento Gonçalves, RS
Julho, 2021

Novas viroses diagnosticadas em macieiras no Brasil por sequenciamento de alto desempenho (HTS)

Osmar Nickel
Thor Vinícius Martins Fajardo



Novas viroses diagnosticadas em macieiras no Brasil por sequenciamento de alto desempenho (HTS)¹

A partir dos anos 1960, com o estabelecimento da pomicultura no Brasil, ocorreu intensa experimentação fitotécnica por parte da iniciativa privada e instituições públicas. A maçã é uma planta exótica, originária da Ásia Central e disseminada em todo o Hemisfério Norte. No Hemisfério Sul o cultivo da maçã está restrito a países e regiões com clima favorável, como Nova Zelândia, Austrália, África do Sul, Chile, Argentina e sul do Brasil, caracterizado por uma quantidade cultivar-específica de horas/frio (< 7,2 °C) necessárias para uma brotação uniforme e eficaz.

Para o estabelecimento dos pomares nas zonas com clima frio no Brasil, todo o material propagativo (estacas, borbulhas) destinado à produção de mudas foi introduzido, predominantemente dos Estados Unidos da América (EUA) e Europa.

Contudo, inexistia no Brasil, à época, legislação para regulamentar a introdução de grande quantidade de material de plantio e de propagação de espécies vegetais exóticas, necessário para implantar os novos pomares. Devido a isso, com a introdução do material genético estrangeiro, também foram introduzidos agentes virais muito comuns em todas regiões produtoras do mundo. Entre esses, destacam-se os agentes virais *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) e *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), encontrados com facilidade em materiais em uso na pomicultura brasileira, caracterizando contaminação endêmica por vírus ainda na virada do século (Nickel et al., 2001).

Só pouco antes do início da pomicultura no Brasil, após um período de rápido crescimento no mundo do conhecimento experimental sobre viroses de fruteiras era criado, em 1955, o Projeto Interregional de Pesquisa IR-2 nos EUA.

¹ Osmar Nickel, engenheiro agrônomo, doutor em Patologia Vegetal, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS; Thor Vinícius Martins Fajardo, engenheiro agrônomo, doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS.

Este empreendimento objetivou a criação de um repositório de fruteiras livres de vírus, mantidas isoladas, destinadas à pesquisa e à pomicultura comercial.

A distribuição de materiais livres de vírus pelo IR-2, para outros países começaria somente em meados dos anos 1970. Mesmo assim, ainda no período 1987-1995, um estudo revelou a presença da doença *platycarpa scaly bark* e os vírus latentes ASGV, ACLSV e ASPV em viveiros de porta-enxertos na Nova Zelândia (Wood, 1996).

Somente com a lei 10.711/2003 a introdução de material de propagação e de plantio do exterior foi regulamentada no Brasil, exigindo-se para este tipo de importação a autorização prévia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Isso explica o porquê de agentes patogênicos de natureza viral latentes em combinações tolerantes (sem sintomas visíveis), transmissíveis pela enxertia, desconhecidos dos produtores e órgãos controladores, à época da sua introdução, terem sido introduzidos inadvertidamente e propagados amplamente nos pomares brasileiros.

Ao longo dos anos foram e continuam sendo recorrentes as constatações de infecções virais múltiplas em pomares, viveiros comerciais e bancos de germoplasma de instituições de pesquisa mundiais (Manenti et al., 2020), e de ocorrências episódicas de duração variável (surtos) de doenças já conhecidas, a exemplo de declínios de plantas causados por infecções mistas de vírus latentes (Nickel et al., 2001) ou cuja etiologia não tinha sido elucidada até então, como o surto de Lenho mole (LM) ocorrido no fim dos anos 1990 e começo de 2000 no Brasil. Na época da ocorrência, estimou-se que uma alta porcentagem das plantas em pomares do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) da cultivar Royal Gala poderia estar infectada, mas não há registros experimentais dessa estimativa.

A doença “Lenho mole da macieira” foi descrita há quase um século na Inglaterra na cv. Lord Lambourne. O nome da doença deve-se à flexibilidade anormal de ramos e galhos que os leva a se curvarem sob o próprio peso (Figura 1). Sua natureza infecciosa foi comprovada com a sua transmissão para *Pyronia veitchii* via enxertia (Waterworth; Fridlund, 1989).

É comum encontrar-se em material propagativo de macieiras na região Sul do Brasil um conjunto de infecções latentes múltiplas que causam sérios danos



Foto: Rosa Maria Valdebenito Sanhueza

Figura 1. Curvatura de ramos (cerca de 15 a 30 cm) em cv. Gala, com suspeição de infecção por Lenho Mole, 2016, Vacaria, RS.

econômicos, principalmente em combinações suscetíveis de copas e porta-enxertos (por exemplo: copa tolerante infectada em porta-enxerto sensível e vice-versa) (Nickel et al., 2001).

Este comprometimento da qualidade fitossanitária do material propagativo em uso situa-se na contramão de conceitos e critérios de sanidade viral reconhecidos por importantes organizações e países produtores de maçãs do Hemisfério Norte, a exemplo da União Europeia, e outros protocolos reconhecidos em nível internacional (exemplo: EPPO, NAPPO, respectivamente, organizações de proteção de plantas europeia e norte-americana). Expressando a relevância atribuída à sanidade viral de plantas, os EUA mantêm vinte centros da “Rede Nacional de Plantas Limpas” (NCPN) em quinze estados americanos, que produzem e mantêm jardins clonais de *specialty crops*, plantas exploradas comercialmente no país, checadas quanto à sua sanidade, e distribuem material limpo ao setor

produtivo. Estudos econômicos demonstram a relevância dos centros para a sustentabilidade das indústrias viti- e fruticultora com retornos documentados dos investimentos públicos flutuando de 10:1 a 150:1 (Fuchs et al., 2021; Cembali et al., 2003).

Diante do quadro complexo de infecções que afetam a produtividade, rentabilidade e longevidade dos pomares, em fins dos anos 1990 iniciou-se, no Brasil, a caracterização molecular desses agentes patogênicos envolvidos em infecções geralmente múltiplas (mais de um vírus) com os estudos baseados no diagnóstico molecular (Nickel et al., 2001). Seguiu-se a produção de anticorpos policlonais usando a expressão de genes virais recombinantes para o diagnóstico do ASGV (Nickel et al., 2004). Na sequência foi estabelecido o diagnóstico molecular do ACLSV (Silva et al., 2008), do ASPV (Radaelli et al., 2006) e do ApMV (Nickel et al., 2009; Fajardo et al., 2011). Na continuação, o diagnóstico dos vírus latentes em macieiras foi aprofundado com vários protocolos incluindo polissondas não radioativas (Fajardo; Nickel, 2014), RT-PCR em tempo real com sondas fluorescentes (Nickel; Fajardo, 2014) e IC (imunocaptura)-RT-PCR (Nickel; Fajardo, 2016).

Outras doenças de provável natureza viral já foram observadas nas regiões pomicultoras dos estados do sul do Brasil para as quais não existe ainda um protocolo de diagnóstico do(s) agente(s) etiológico(s) ou este protocolo (época ideal de coleta de material, tipo ideal de tecido, extração de ácidos nucleicos e inibição de nucleases, condições da transcrição reversa, sequências dos iniciadores de RT-PCR, e as condições de ciclagem, etc.) só foi desenvolvido recentemente. Estas doenças que representam ameaça à rentabilidade dos pomares e um desafio para a pesquisa incluem o “descascamento e nanismo da platycarpa” (inglês: *platycarpa scaly bark* e *platycarpa dwarf*), geralmente latente na maioria das cultivares comerciais, que, em algumas espécies de macieiras ornamentais (exemplo: *Malus platycarpa*), provocam descascamento de troncos e ramos, e distorção/deformação e/ou epinastia foliar e nanismo. O “descascamento da platycarpa” ocorre latente em variedades e porta-enxertos clonais (Wood, 1996). Material de macieiras indexado, isto é, diagnosticado biologicamente (Nickel; Fajardo, 2009) em *M. platycarpa* no âmbito do estudo financiado por Embrapa/CNPq (1997-1999), que executou uma abrangente varredura da sanidade viral de macieiras

em uso no país (Crestani, 1999) continua, na avaliação pós-execução do projeto, plantas com sintomas desta doença.

A “rachadura-estrela” de frutos é outra doença observada ocasionalmente em pomares comerciais no sul do país (Nickel, 2004). Sintomas similares à “depressão do lenho” (DL) da macieira (inglês: *apple flat limb*), doença descrita no Canadá em 1887 pelo pesquisador J.Fletcher, em macieiras, foram observados em pomares comerciais de Vacaria e Caxias do Sul, RS (Nickel, 2004).

A DL produz depressões lineares, longitudinais nos troncos e ramos (Figura 2), especialmente na cv. Gravenstein, podendo formar canaletas profundas e provocar necroses em ramos. Os sintomas levam, geralmente, vários anos até sua expressão, causando redução de vigor e de produtividade. Devido à latência em muitas cultivares, sintomas menos marcantes podem não ser reconhecidos. Secções de ramos com depressão indicam pouca produção de xilema nas partes afetadas. Esta característica aproxima a DL de outras



Foto: Osmar Nickel

Figura 2. Depressão do lenho; cv. Royal Gala, galhos (de aprox. 35 cm) de plantas com cerca de três anos de idade, Caxias do Sul, RS.

doenças que provocam redução da lignificação das fibras e dos dutos do xilema, como o Lenho mole da macieira e a “gomose côncava dos citros”. Estas doenças são caracterizadas por uma flexibilidade anormal de ramos e galhos finos devido à baixa síntese de lignina, sintoma que pode levar de um a três anos para se expressar.

Observou-se em plantas afetadas em pomares de Vacaria, RS que os sintomas de LM podem desaparecer, as plantas podem recuperar-se e voltar a crescer normalmente após alguns anos; algumas vezes a recuperação se deu após a remoção do líder afetado (O.Nickel, não publicado). Estas observações são corroboradas por relatos de que, após a infecção, a lignificação reduzida (Waterworth; Fridlund, 1989) é “dificilmente distinguida pelo observador inexperiente” (Rott et al., 2018).

Além destas disfunções de natureza ainda pouco caracterizada no Brasil, foram observadas outras ameaças em pomares brasileiros, como diversos mosaicos foliares (folhas com matizes de cor verde claro/escuro, amarelo e creme, com limites bem definidos) e variegações (listras, manchas de diferentes cores), e mosaicos do tipo necrótico (mesclados com necroses do limbo foliar), especialmente na cv. Fuji em pomares comerciais, ainda não elucidados (Nickel; Fajardo, 2009).

Outro mosaico necrótico foi observado em alguns híbridos de macieiras que não reagem aos iniciadores de RT-PCR convencional baseados em sequências do vírus do mosaico comum da macieira (*Apple mosaic virus*, ApMV). A doença conhecida como “ruga verde da macieira”, já relatada na região de Vacaria, RS (Nickel, 2004), foi associada, no Canadá (James et al., 2013), a um novo vírus, o *Apple green crinkle-associated virus* (AGCaV) gênero *Foveavirus*, parente muito próximo do ASPV.

O advento de tecnologias chamadas metagenômicas de sequenciamento de alto desempenho (*High-throughput sequencing*, HTS), também chamado *Next-generation sequencing* (NGS), tem permitido a identificação e caracterização de um grande número de novas espécies virais em macieiras, pereiras, damasqueiros e marmeleiros numa velocidade impressionante.

A versatilidade desta tecnologia reside em que a mesma não requer conhecimento molecular prévio dos agentes patogênicos, produzindo milhões

de pequenos fragmentos de DNA (*reads*, leituras paralelas) de cerca de 50 a 100 pares de bases, que, na sequência, são montados com base nas suas áreas de sobreposição, resultando em fragmentos maiores, os *contigs*, que são mapeados contra bases de dados. Esta estratégia de sequenciamento massal paralelo, ao acaso, permitiu a identificação de vírus e isolados virais e infecções mistas, e revelou características moleculares abrangentes de agentes patogênicos desconhecidos o que seria impossível usando-se o sequenciamento convencional (Fajardo et al., 2020).

As novas espécies virais, descobertas por HTS, associadas a doenças que ocorrem nos gêneros *Malus* spp. (macieira), *Pyrus* spp. (pereira) e *Cydonia* spp. (marmeleiro) e outras fruteiras, incluem os agentes causais de doenças conhecidas há longo tempo por seus sintomas e danos, cujos agentes causais eram desconhecidos. Na década de 2011 a 2020, o número de patógenos virais descritos em pomáceas mais que dobrou, passando para mais de 20 espécies virais (Martelli et al., 2011; Umer et al., 2019) e oito viroides caracterizados molecularmente no mundo graças ao sequenciamento de alto desempenho.

Os novos agentes virais recentemente descritos em macieiras e outras pomáceas foram detectados, majoritariamente, por HTS. Eles pertencem a inúmeros gêneros virais e espécies. Entre os gêneros, destacam-se *Foveavirus*, *Illavirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Alphapartitivirus*, *Phlebovirus*, *Rubodvirus* (gênero proposto), *Coguvirus* (gênero proposto) e *Nucleorhabdovirus*, além de *Geminivirus* e viroides dos gêneros *Apscaviroid* e *Pelamoviroid*. As novas espécies de vírus e viroides em macieiras e outras fruteiras incluem *Apricot latent virus* (Youssef et al., 2011), *Cherry leafroll virus* (Von Bargaen et al., 2012), *Apple green crinkle-associated virus* (James et al. 2013), dois novos geminivirus em macieiras, (além de pereiras e videiras), *Temperate fruit decay-associated virus* (Basso et al., 2015) e *Apple geminivirus* (Liang et al., 2015) (ambos nomes propostos), *Apple rootstock virus A* (Baek et al., 2019), *Apple necrotic mosaic virus* (Xing et al., 2018), *Apple-associated luteovirus* e *Apple luteovirus 1* (Liu et al., 2018; Shen et al., 2018), *Apple rubbery wood virus 1 e 2* (Rott et al., 2018), *Citrus concave gum-associated virus* (Navarro et al., 2018) e dois novos viroides, *Apple chlorotic fruit spot viroid* (Leichtfried et al., 2019) e *Apple hammerhead viroid* (Serra et al., 2018) que se somam aos já conhecidos seis viroides em pomáceas (Martelli et al., 2011).

Esta publicação visa informar o público de técnicos e pomicultores sobre avanços do conhecimento da sanidade viral de macieiras e novos vírus descobertos em macieiras no Sul do Brasil.

O experimento

Para o sequenciamento de alto desempenho (HTS) de três amostras de macieiras obtidas em Vacaria, RS, cada uma de uma cultivar diferente, a cultivar Braeburn foi analisada na plataforma Illumina HiSeq X Ten* (EUA), enquanto que as cvs. Royal Gala e Mishima foram analisadas na plataforma BGISEQ-500* (China). Ácido ribonucleico (RNA) de fita dupla foi enriquecido em extratos de ácidos nucleicos totais (ANT) por cromatografia de afinidade em colunas de celulose CF-11* (Valverde et al., 1990) para preparar bibliotecas de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit TrueSeq Stranded mRNA* (Illumina, EUA) para sequenciamento por HTS. O software CLC Genomics Workbench v. 8.5.1* (CLC Bio, Qiagen, EUA) foi usado para checagem de qualidade (remoção de *reads* de baixa qualidade e de adaptadores) e montagem *de novo* de *contigs* a partir dos *reads* obtidos. Todos *contigs* foram mapeados contra as bases de dados de nucleotídeos e proteínas do GenBank* usando os softwares BLASTn* e BLASTx* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Resultados

Neste estudo da Embrapa Uva e Vinho, numa tentativa de ampliar o conhecimento sobre o estado sanitário de macieiras no Sul do país, foram diagnosticados por HTS em duas amostras de Vacaria, RS) os vírus triparticulados do gênero *Rubodvirus* denominados *Apple rubbery wood virus 1* (ARWV 1) e *Apple rubbery wood virus 2* (ARWV 2), respectivamente, nas cvs. Mishima e Royal Gala e infecção mista de ambos os vírus na cv. Braeburn.

Os vírus ARWV 1 e ARWV 2, agora detectados no Brasil apresentam alta semelhança genética com os vírus anteriormente caracterizados e associados

* A menção de marcas, reagentes e softwares indicam o processo/método utilizado, não implicando, por parte da Embrapa e dos autores, qualquer conotação comercial ou recomendação de uso.

a plantas com sintomas do LM na Alemanha, EUA, Canadá e Japão (Rott et al., 2018).

Nas cvs. Mishima e Royal Gala foi detectado também um vírus biparticulado, recentemente caracterizado em citros (*Citrus concave gum-associated virus*, CCGaV) (gênero *Coguvirus*), filogeneticamente relacionado aos *Phlebovirus* (Navarro et al., 2018), e possivelmente associado a um declínio de macieiras descrito recentemente nos EUA (Wright et al., 2018). Os três agentes pertencem à família *Phenuiviridae* na ordem *Bunyavirales*. Nas três cultivares foram diagnosticados também numerosos *contigs*, com sequências completas ou quase completas dos vírus latentes, já conhecidos anteriormente.

Recentemente, o viroide *Apple hammerhead viroid* (AHVd) foi proposto como novo membro do gênero *Pelamoviroid* (família *Avsunviroidae*) (Serra et al., 2018). O isolado brasileiro de AHVd detectado na cv. Royal Gala (MK947213) apresenta identidades de nucleotídeos de 84,02 a 97,48% com sequências de AHVd no GenBank. Para validar as sequências desses vírus e um viroide obtidas por HTS de tecidos de macieiras, foram conduzidas análises de RT-PCR convencional de ANT extraídos das plantas originais que deram origem aos dados obtidos, usando-se iniciadores baseados em sequências dos *contigs* originais. As sequências de nucleotídeos dos três vírus e do viroide foram depositadas na base de dados GenBank (Tabela 1).

Adicionalmente, foram detectados nas cultivares Royal Gala e Mishima, além dos três vírus latentes já conhecidos, *contigs* do vírus AGCaV que divergem de típicos isolados de outro *Foveavirus*, o ASPV, agrupando-se com AGCaV na análise filogenética (Figura 3). Resta confirmar a presença deste vírus, por método independente, nesta região. Considerando-se haver um período de incubação (sem sintomas após a inoculação) de três a quatro anos desta doença, e a conseqüente longa duração da indexação biológica de AGCaV, a definição de um protocolo de diagnóstico precoce de AGCaV por RT-PCR, com base nas sequências de nucleotídeos obtidas, reveste-se de relevância para implementar o diagnóstico deste vírus e estimar sua eventual presença e disseminação na região.

A doença LM, agora associada a dois novos vírus (ARWV 1 e ARWV 2), já ocorreu anteriormente no Brasil, na região dos Campos de Cima da Serra, RS, onde são produzidas cultivares muito suscetíveis, como as do grupo Gala, as

Tabela 1. Sequências de vírus e um viroide da macieira obtidas por HTS presentes em macieiras no Brasil, depositadas no banco de dados GenBank.

Vírus	Gene sequenciado	Tamanho nt ⁽¹⁾	Amino-ácidos deduzidos	Acesso GenBank ⁽²⁾	Isolado/ nº acesso cv. hospedeira
ARWV 1	Genoma completo, segmento S	1392	290	MK936225	Isolado BR-Mishima, cv. Mishima M185
ARWV 1	Genoma completo, segmento M	1595	390	MK936226	Isolado BR-Mishima, cv. Mishima M185
ARWV 1	Genoma completo, segmento L	7171	2359	MK936227	Isolado BR-Mishima, cv. Mishima M185
ARWV 2	Genoma completo, segmento Sa	1450	288	MK936228	Isolado BR-Gala, cv. Gala M015
ARWV 2	Genoma completo, segmento Ma	1512	377	MK936229	Isolado BR-Gala, cv. Gala M015
ARWV 2	Genoma completo, segmento L	7349	2376	MK936230	Isolado BR-Gala, cv. Gala M015
CCGaV	Sequência completa, segmento RNA 1	6652	2184	MK940540	Isolado Gala, cv. Gala M015
CCGaV	Sequência completa, segmento RNA 2	2700	407, MP 350, CP	MK940542	Isolado Gala, cv. Gala M015
CCGaV	Sequência completa, segmento RNA 1	6647	2184	MK940541	Isolado Mishima, cv. Mishima M185
CCGaV	Sequência completa, segmento RNA 2	2700	407, MP 350, CP	MK940543	Isolado Mishima, cv. Mishima M185
ARWV 1	Proteína capsidial completa/ segmento S	312	103	MN652009	Isolado Braeburn1, cv. Braeburn M061
ARWV 2	Proteína capsidial completa/ segmento Sa	272	90	MN652010	Isolado Braeburn2, cv. Braeburn M061
CCGaV	Proteína capsidial parcial, RNA 2	327	108	MN631048	Isolado Royal Gala, cv. Royal Gala M015
AHVd	Genoma completo	436	--	MK947213	Isolado Gala, cv. Royal Gala M015

⁽¹⁾ nucleotídeos.

⁽²⁾ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

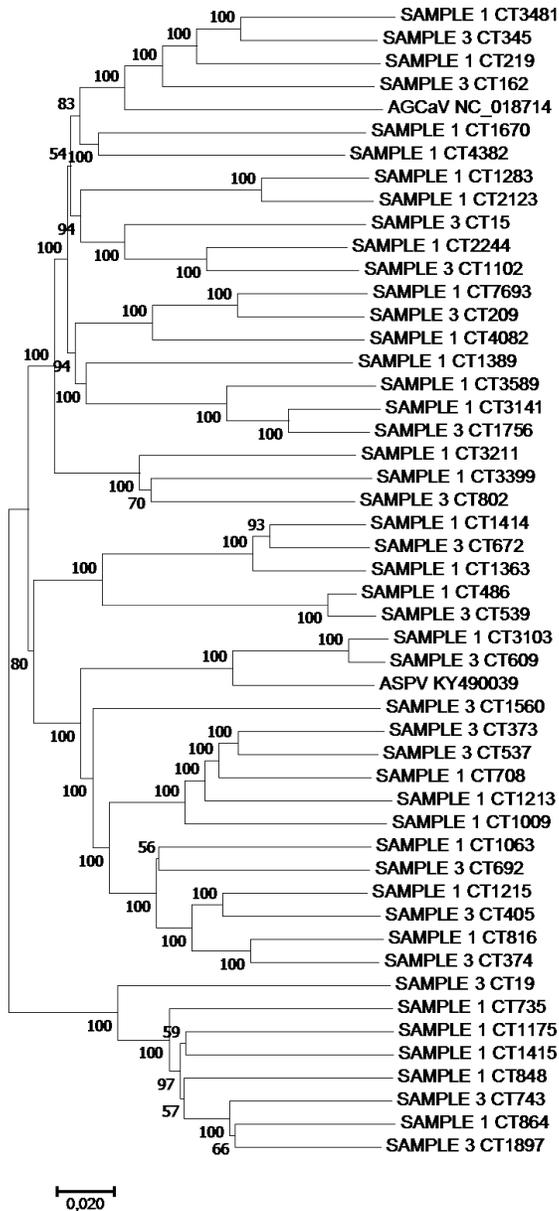


Figura 3. Árvore filogenética com as sequências de nucleotídeos das espécies-tipo dos vírus ASPV e AGCaV, além de vários *contigs* (CT) obtidos por HTS, numericamente identificados, por análise de bioinformática das amostras das cvs. Royal Gala (sample 1) e Mishima (sample 3).

quais podem sofrer reduções substanciais de produção, deformação de frutos e declínio de plantas. Os danos causados podem ser sutis e não-visíveis aos pomicultores, mesmo assim afetando a rentabilidade dos pomares (Fuchs et al., 2021). Os danos em copas podem ser causados indiretamente, via infecções por estes vírus presentes em porta-enxertos, como relatado em porta-enxertos clonais da série M12 infectados, adicionalmente, com outros vírus latentes (Wood, 1996).

O presente estudo resultou na caracterização de três novos vírus e um viroide em macieiras no Brasil. Suspeita-se ainda da presença, nas amostras aqui analisadas, de um potencial isolado de *Apple green crinkle-associated virus* e de *Apple luteovirus 1*, este, já relatado em associação com ARWV 1 em clones do porta-enxerto M9 na Coreia do Sul (Lim et al., 2019). A suspeita da presença destes outros dois agentes virais, no Brasil, demanda estudo adicional.

Uma análise de prevalência (frequência de ocorrência) por RT-PCR de outras 12 amostras de diferentes cultivares coletadas na região dos Campos de Cima da Serra, RS, demonstrou que estes vírus estavam presentes respectivamente em nove (ARWV 1), uma (ARWV 2) e duas amostras (CCGaV) das cultivares analisadas (Nickel et al., 2020) e podem ter uma disseminação significativa nos materiais propagativos de macieira em uso no país. Estudos sobre a frequência de ocorrência destes novos agentes em macieiras no sul do Brasil estão em curso.

Considerações finais

A detecção destes três novos vírus e um viroide em macieiras no Brasil tem várias implicações para a pomicultura brasileira. Este avanço de conhecimento altera o conceito de sanidade do material propagativo de macieiras em uso no país. O número de patógenos que requer atenção em termos de limpeza clonal passa dos quatro conhecidos para oito patógenos virais e um viroide. Isto reforça a relevância de investimentos em limpeza clonal, para prevenir os danos econômicos e garantir rentabilidade dessa atividade (Cembali et al., 2003; Fuchs et al., 2020).

Os protocolos de detecção de ARWV 1 e ARWV 2, CCGaV e AHVd por RT-PCR desenvolvidos poderão ser adicionados ao esquema de checagem de sanidade de macieiras por laboratórios credenciados pelo MAPA. Igualmente, a fiscalização da entrada de material propagativo no país poderá abranger os novos patógenos virais, uma vez que estes possuem um significativo potencial de dano para a economia nacional. Desta forma mantêm-se padrões de sanidade, do material destinado à propagação, alinhados aos padrões internacionais.

Os produtores de maçãs e viveiristas, em face de que o manejo de vírus é sempre preventivo, podem:

a) checar suas matrizes (no sentido da lei 10.711/2003) por laboratórios credenciados pelo MAPA;

b) indexar suas matrizes quanto à presença de ARWV 1 e ARWV 2, por enxertia de pedaços de casca ou borbulhas, nas indicadoras cvs. Lord Lambourne e Gravenstein (Nickel & Fajardo, 2009).

Referências

BAEK, D.; LIM, S.; JU, H.-J.; KIM, H.-R.; LEE, S.-H.; MOON, J.-S. The complete genome sequence of apple rootstock virus A, a novel nucleorhabdovirus identified in apple rootstocks. **Archives of Virology**, v. 164, n. 10, p. 2641-2644, Oct. 2019. DOI 10.1007/s00705-019-04348-0.

BASSO, M. F.; da SILVA, J. C. F.; FAJARDO, T. V. M.; FONTES, E. P. B.; ZERBINI, F. M. A novel highly divergent ssDNA virus identified in Brazil infecting apple, pear and grapevine. **Virus Research**, v. 210, p. 27-33, Dec. 2015. DOI 10.1016/j.virusres.2015.07.005.

CEMBALI, T.; FOLWELL, R. J.; WANDSCHNEIDER, P. R.; EASTWELL, K. C.; HOWELL, W. E. Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits. **Crop Protection**, v. 22, p. 1149-1156, 2003. DOI 10.1016/S0261-2194(03)00156-X.

CRESTANI, O. A. **Fomento à capacitação tecnológica para a produção de mudas frutíferas via métodos biotecnológicos**. Canoinhas: Embrapa/SPSB; Brasília: CNPq, 1999. 49 p. Relatório de projeto de Pesquisa. Projeto concluído.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.; EIRAS, M. Detecção e caracterização molecular dos genes da proteína capsial de ilarvírus e ampelovírus que infectam fruteiras temperadas. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 5-9, 2011. DOI 10.1590/S0103-84782011000100002.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Simultaneous detection of four viruses affecting apple and pear by molecular hybridization using a polyprobe. **Ciência Rural**, v. 44, n. 10, p. 1711-1714, Oct. 2014. DOI 10.1590/0103-8478cr20131629.

FAJARDO, T. V. M.; BERTOCCHI, A. A.; NICKEL, O. Determination of the grapevine virome by high-throughput sequencing and grapevine viruses detection in Serra Gaúcha, Brazil. *Revista Ceres*, v. 67, n. 2, p. 156-163, May 2020. DOI 10.1590/0034-737x202067020010.

FUCHS, M.; ALMEYDA, C. V.; AL RWAHNIH, M.; ATALLAH, S. S.; CIENIEWICZ, E. J.; FARRAR, K.; FOOTE, W. R.; GOLINO, D. A.; GÓMEZ, M. I.; HARPER, S. J.; KELLY, M. K.; MARTIN, R. R.; OSMAN, F. M.; PARK, K.; SCHARLAU, V.; SMITH, R.; TZANETAKIS, I. E.; VIDALAKIS, G.; WELLIVER, R. Economic studies reinforce efforts to safeguard specialty crops in the United States. **Plant Disease**, v. 105, n. 1, Jan. 2021. DOI 10.1094/PDIS-05-20-1061-FE.

JAMES, D.; VARGA, A.; JESPERSON, G. D.; NAVRATIL, M.; SAFAROVA, D.; CONSTABLE, F.; HORNER, M.; EASTWELL, K.; JELKMANN, W. Identification and complete genome analysis of a virus variant or putative new foveavirus associated with apple green crinkle disease. **Archives of Virology**, 158, p. 1877-1887, April 2013. DOI 10.1007/s00705-013-1678-7.

LEICHTFRIED, T.; DOBROVOLNY, S.; REISENZEIN, H.; STEINKELLNER, S.; GOTTSBERGER, R. A. Apple chlorotic fruit spot viroid: a putative new pathogenic viroid on apple characterized by next-generation sequencing. **Archives of Virology**, v. 164, n. 12, p. 3137-3140, Dec. 2019. DOI 10.1007/s00705-019-04420-9.

LIANG, P.; NAVARRO, B.; ZHANG, Z.; WANG, H.; LU, M.; XIAO, H.; WU, Q.; ZHOU, X.; DI SERIO, F.; LI, S. Identification and characterization of a novel geminivirus with a monopartite genome infecting apple trees. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 8, p. 2411-2420, Aug. 2015. DOI 10.1099/vir.0.000173

LIM, S.; BAEK, D.; MOON, J. S.; CHO, I. S.; CHOI, G. S.; DO, Y. S.; LEE, D. H.; LEE, S. H. First report of apple luteovirus 1 and apple rubbery wood virus 1 on apple tree rootstocks in Korea. **Plant Disease**, v. 103, n. 3, March 2019. DOI 10.1094/PDIS-08-18-1351-PDN

LIU, H.; WU, L.; NIKOLAEVA, E.; PETER, K.; LIU, Z.; MOLLOV, D.; CAO, M.; LI, R. Characterization of a new apple luteovirus identified by high-throughput sequencing. **Virology Journal**, v. 15, n. 85, May 2018. DOI 10.1186/s12985-018-0998-3.

MANENTI, D. C.; HAWERROTH, M. C.; BRANCHER, T. L.; SCHUH, F. S.; KVITSCHAL, M. V.; NICKEL, O.; SOUTO, E. R. Serological and molecular detection of latent viruses in the apple germplasm bank of Santa Catarina. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, e20190272, 2020. DOI 10.1590/1678-4324-2020190272 .

MARTELLI, G. P.; FLORES, R.; SCHNEIDER, B. Classification of pome and stone fruit viruses, viroids, and phytoplasmas. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. (Eds.). **Virus and viruslike diseases of pome and stone fruits**. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, 2011. Chap. 3, p. 13-16. DOI 10.1094/9780890545010.

NAVARRO, B.; MINUTOLO, M.; DE STRADIS, A.; PALMISANO, F.; ALIOTO, D.; DI SERIO, F. The first phlebovirus-like virus infecting plants: a case study on the adaptation of negative-stranded RNA viruses to new hosts. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 5, p. 1075-1089, May 2018. DOI 10.1111/mp.12587.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Detection of viruses in apples and pears by real time RT-PCR using 5'-hydrolysis probes. *Journal of Plant Pathology*, v. 96, n. 1, p. 207-213, 2014. DOI 10.4454/JPP.V9611.047

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Detecção de vírus de macieiras e pereiras por IC-RT-PCR usando anticorpos policlonais contra proteínas virais expressadas em *Escherichia coli***. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 182). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/170378/1/Comunicado-Tecnico-182.pdf>. Acesso em: 22 abril 2021.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60758/1/CNPUV-DOC.-69-09.pdf>. Acesso em: 22 abril 2021.

NICKEL, O. Doenças causadas por vírus. In: NACHTIGALL, G. R. (Ed.) **Maçã: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 655-659, Sept. 2001. DOI 10.1590/S0100-41582001000300014.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; CANDRESSE, T. First report on detection of three bunya-like viruses in apples in Brazil. **Plant Disease**, v. 104, n. 11, p. 3088, Sept. 2020. DOI 10.1094/pdis-02-20-0283-pdn.

NICKEL, O.; SILVA, S. W.; FAJARDO, T. V. M.; GIACOMINI, R.; ARAGÃO, F. J. L. Detecção e caracterização molecular do gene da proteína capsial de Apple mosaic virus em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, S267. 2009. DOI 10.1590/S0103-84782011000100002 .

NICKEL, O.; TARGON, M. L. P. N.; FAJARDO, T. V. M.; MACHADO, M. A.; TRIVILIN, A. P. Polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 558-562, sept./Oct. 2004. DOI 10.1590/S0100-41582004000500017.

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 capsial de um isolado do Apple stem pitting virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 51-56, Jan./Fev. 2006. DOI 10.1590/S0100-41582006000100009.

ROTT, M. E.; KESANAKURTI, P.; BERWARTH, C.; RAST, H.; BOYES, I.; PHELAN, J.; JELKMANN, W. Discovery of negative-sense RNA viruses in trees infected with Apple rubbery wood disease by next generation sequencing. **Plant Disease**, v. 102, n. 7, p. 1254-1263, Apr. 2018. DOI 10.1094/PDIS-06-17-0851-RE.

SERRA, P.; MESSMER, A.; SANDERSON, D.; JAMES, D.; FLORES, R. Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus Pelamoviroid. **Viruses**, v. 249, p. 8-15, April 2018. DOI 10.1016/j.virusres.2018.03.001.

SILVA, F. N.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Biological multiple indexing and RT-PCR detection of latent viruses in apple plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 157-161, 2008. DOI 10.1590/S1982-56762008000200011.

SHEN, P.; TIAN, X.; ZHANG, S.; REN, F.; LI, P.; YU, Y.-Q.; LI, R.; ZHOU, C.; CAO, M. Molecular characterization of a novel luteovirus infecting apple by next-generation sequencing. **Archives of Virology**, v. 163, n. 3, p. 761-765, Mar. 2018. DOI 10.1007/s00705-017-3633-5

UMER, M.; LIU, J.; YOU, H.; XU, C.; DONG, K.; LUO, N.; KONG, L.; LI, X.; HONG, N.; WANG, G.; FAN, X.; KOTTA-LOIZOU, I.; XU, W. Genomic, morphological and biological traits of the viruses infecting major fruit trees. **Viruses**, v. 11, n. 6, p. 515, June 2019. DOI 10.3390/v11060515.

VALVERDE, R. A.; NAMETA, S. T.; JORDAN, R.L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74, 255-258. 1990.

VON BARGEN, S.; LANGER, J.; ROBEL, J.; RUMBOU, A.; BÜTTNER, C. Complete nucleotide sequence of Cherry leaf roll virus, a subgroup C nepovirus. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 678-683, Feb. 2012. DOI 10.1016/j.virusres.2011.12.018.

XING, F.; ROBE, B. L.; ZHANG, Z.; WANG, H.; LI, S. Genomic analysis, sequence diversity and occurrence of apple necrotic mosaic virus, a novel ilarvirus associated with mosaic disease of apple trees in China. **Plant Disease**, v. 102, n. 9, p. 1841-1847, Sept. 2018. DOI 10.1094/PDIS-10-17-1580-RE

WATERWORTH, H. E.; FRIDLUND, P. R. Apple rubbery wood. In: *Virus and viruslike diseases* State University, Pullman, Washington, 118-126. 1989.

WOOD, G. A. Past and present status of virus and phytoplasma diseases in apple rootstocks in New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 24, n.2, p. 133-141, 1996. DOI 10.1080/01140671.1996.9513945.

WRIGHT, A. A.; SZOSTEK, S. A.; BEAVER-KANUYA, E.; HARPER, S. J. Diversity of three bunya-like viruses infecting apple. **Archives of Virology**, v. 163, n. 12, p. 3339-3343, Dec. 2018. DOI 10.1007/s00705-018-3999-z.

YOUSSEF, F.; MARAIS, A.; FAURE, C.; BARONE, M.; GENTIT, P.; CANDRESSE, T. Characterization of prunus-infecting apricot latent virus-like foveaviruses: evolutionary and taxonomic implications. **Virus Research**, v. 155, n. 2, p. 440-445, Feb. 2011. DOI 10.1016/j.virusres.2010.11.013.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Uva e Vinho

Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS

Fone: (0xx) 54 3455-8000

Fax: (0xx) 54 3451-2792

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Publicação digitalizada (2021)



Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

João Caetano Fioravanço

Secretário-Executivo

Edgardo Aquiles Prado Perez

Membros

João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge

Tonietto, Klecius Ellera Gomes, Luciana

Mendonça Prado, Nubia Poliana Vargas

Gerhardt, Rochelle Martins Alvorcem, Viviane

Maria Zanella Bello Fialho

Supervisão editorial

Klecius Ellera Gomes

Revisão de texto

Edgardo Aquiles Prado Perez

Normalização bibliográfica

Rochelle Martins Alvorcem CRB10/1810

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração Eletrônica

Cristiane Turchet e

Edgardo Aquiles Prado Perez

Foto da capa

Thor Vinicius Martins Fajardo