

69

**Circular
Técnica**

Pelotas, RS
Outubro, 2008

Autor

Luis A. Suita de Castro
Eng. Agrôn., MSc.
Embrapa Clima Temperado
CP. 403 Pelotas, RS 96001-
970 (suita@cpact.embrapa.
br)

Bonifácio H. Nakasu
Eng. Agrôn., PhD.
Pesquisador aposentado
Embrapa Clima Temperado
CP. 403 Pelotas, RS 96001-
970
(boni@cpact.embrapa.br)

Carlos A. P. Silveira
Eng. Agrôn., Dr.
Embrapa Clima Temperado
CP. 403 Pelotas, RS 96001-
970
(posser@cpact.embrapa.br)

Valter Lopes Abrantes
Eng. Agrôn., BSc.
Técnico de laboratório
Embrapa Clima Temperado
CP. 403 Pelotas, RS 96001-
970
(valter@cpact.embrapa.br)

Nara E. M. Rocha
Eng. Agrôn.,
Bsc. Técnico de laboratório
Embrapa Clima Temperado
CP. 403 Pelotas, RS 96001-
970
(nara@cpact.embrapa.br)

STANLEY C21: Cultivar de Ameixeira Testada (*Prunus domestica*)

Introdução

O Programa de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado contempla, entre outras atividades, a seleção de plantas matrizes de ameixeira com alta sanidade. O trabalho envolve a implantação de duas ações prioritárias ao processo de desenvolvimento da fruticultura, ou seja, a produção integrada de frutas (PIF) e a produção de mudas certificadas.

As Normas Técnicas Gerais para a Produção Integrada de Frutas (NTGPIF), com relação à legislação vigente sobre mudas, indica como obrigatório “utilizar material sadio, adaptado à região, com registro de procedência credenciada e com certificado fitossanitário” e refere como proibido “utilizar material propagativo sem o devido registro de procedência e sem o certificado fitossanitário e transitar portando material propagativo sem a competente autorização” (NAKA, 2002).

Várias enfermidades causam prejuízos e representam ameaça à produção de frutas no Brasil. Entre estas, encontram-se as viroses, bacterioses e outros microrganismos, cujos efeitos refletem-se diretamente sobre a produtividade, principalmente por ocasionar redução no desenvolvimento das plantas e no tamanho dos frutos (CARVALHO, 1983; BETTI e KITAJIMA, 1972). A literatura internacional apresenta vários estudos relacionados a doenças ocasionadas por vírus que infectam prunóideas; entretanto, as pesquisas desenvolvidas no Brasil são insuficientes, tendo-se apenas poucos relatos de ocorrência.

Os materiais vegetais somente podem ser considerados isentos de enfermidades a partir da realização de testes de indexação. Os métodos são amplamente estabelecidos e incluem sorologia, indexação biológica, molecular, histológica e bioquímica, segundo a conveniência, adequação e necessidade (STOUFER e FRIDLUNG, 1989; SANTOS FILHO e NICKEL, 1993).

Para o desenvolvimento de um sistema de produção e distribuição de material básico certificado como sadio, países onde a fruticultura tem longa tradição há muito estabeleceram sistemas de limpeza e distribuição de material propagativo (MEIJNEKE et al., 1982). Atualmente, a maioria dos produtores de frutas e viveiristas estão conscientes do risco que as doenças transmitidas vegetativamente representam para suas plantas e para toda a atividade econômica. Mudanças produzidas a partir de material propagativo livre de vírus apresentam melhor desenvolvimento. Material propagativo obtido por seleção e checagem, cultura de meristemas, termoterapia e indexação, pode ser mantido sadio, desde que sejam seguidas normas específicas que evitem contaminações futuras. Esse material básico deve ser confinado de forma a impedir a recontaminação por meio de vetores.

Dentro do sistema proposto por Chiarappa (1992), devem ser criadas as seguintes classes de material: 1. estoque básico (plantas livres de vírus, confinadas em casa de vegetação); 2. plantas matrizes (plantas livres de vírus, mantidas em local isolado, para produção de gemas para as matrizes de aumento); 3. matrizes de aumento (plantas fornecedoras de gemas para viveiros de produtores credenciados); 4. matriz de viveiro (plantas matrizes livres de vírus, estabelecidas em viveiros, certificadas, produtoras de gemas para produção de mudas). Seguindo este esquema, a Embrapa Clima Temperado está atuando diretamente nas duas primeiras etapas do processo e, indiretamente, sobre as demais. Portanto, várias etapas do processo estão sendo desenvolvidas em sua base física, utilizando infra-estrutura de laboratórios, casas-de-vegetação e telados. Neste processo, estão envolvidos os Laboratórios de Imunologia e Microscopia Eletrônica, Laboratório de Cultura de Tecidos, Laboratório de Eletroforese, Laboratório de Nutrição Vegetal e Laboratório de Fitopatologia, utilizando equipamentos e técnicas de alto nível tecnológico. As atividades têm por objetivos produzir borbulhas com identidade genética e com alta sanidade e dispor de um pacote tecnológico com normas de produção de mudas matrizes visando possibilitar aos viveiristas, melhorar a qualidade das mudas comerciais produzidas.

Nos últimos oito anos, várias ações de pesquisa foram realizadas no sentido da obter

plantas matrizes de ameixeira isentas de organismos patogênicos, por meio da seleção de plantas isentas de enfermidades (plantas escapes) obtidas após a realização periódica de baterias de testes de sanidade.

Entre as ameixeiras do grupo europeu (*Prunus domestica*), destaca-se a cultivar Stanley. No Brasil, encontra-se apenas nas regiões frias do Sul, embora com grande potencial de produção (Figura 1). Dentre os produtos derivados desta fruta, a ameixa seca é o mais conhecido, sendo que tudo que é consumido no Brasil é importa (10.000 t/ano). Nos locais onde tradicionalmente são produzidos, os frutos são destinados ao consumo "in natura" e apenas o excedente é submetido à secagem. No Brasil, a falta de tradição do processamento por secagem e consumo "in natura", são os grandes entraves para a exploração dessa fruta. Testes realizados na Embrapa Clima Temperado mostraram ser possível produzir ameixas secas com qualidade superior ao produto importado. A região serrana (nordeste do Rio Grande do Sul) tem condições para cultivo da ameixeira européia. A utilização de tecnologia adequada e matéria-prima nacional poderão acarretar reduções das importações e tornar o produto mais acessível ao mercado consumidor. Alguns fruticultores brasileiros começam a investir nesta espécie, necessitando, portanto, utilizar mudas produzidas sob padrões técnicos que atribuam segurança aos investimentos realizados.

Foto: Luis Antônio Castro



Figura 1. Plantas originais da cultivar Stanley, localizadas na Estação Experimental de Vacaria/RS.

O objetivo do trabalho realizado foi obter clones testados da cultivar de ameixeira Stanley, disponibilizando material propagativo com alta sanidade para as entidades de pesquisa e aos viveiristas regionais. A planta inicialmente obtida, correspondente ao clone número 21, selecionado como planta padrão da cultivar, foi denominada Stanley C21 para diferenciar do material propagado que vem sendo utilizado pelos viveiristas, resultante de sucessivas multiplicações vegetativas sem controle de qualidade fitossanitária.

Características botânicas da cultivar Stanley

Duas espécies principais estruturam a maioria das cultivares de ameixeira atualmente cultivadas. *Prunus salicina* Lindl, conhecida como ameixa japonesa, originária do Extremo Oriente e *Prunus domestica* (L) conhecida como ameixa européia, originária do Cáucaso, da Turquia e da Pérsia, sendo que vários botânicos acreditam ser originária de uma região compreendida entre o sul do Cáucaso e o norte da Pérsia. Entretanto, por ser cultivada há mais de dois mil anos, é difícil determinar o local exato onde originou-se essa espécie (CASTRO et al., 2008).

Stanley é uma cultivar de ameixeira do grupo europeu. São árvores que deixadas crescer livremente apresentam forma piramidal e podem atingir até 8,0 m de altura. Possuem raízes compridas e pouco profundas. O tronco pode medir até 40 cm de diâmetro.

As gemas são grandes, cônicas, pontiagudas e pubescentes. As folhas são pecioladas, ovaladas ou elípticas, agudas, grossas, com face inferior pubescente, com nervuras muito salientes e com um tom verde mais claro do que a tonalidade da face superior, apresentando bordos serrilhados, pecíolo curto, grosso e pubescente. As estípulas são pequenas e lanceoladas. Apresenta uma ou duas flores em cada gema, com pedicelo de 1 cm de comprimento, pétalas brancas ou branco-esverdeadas, ovaladas. Possui aproximadamente 30 estames por flor, e o pistilo é tão alto quanto os estames. A planta entra em produção no terceiro ano. Produz, em média, 14 toneladas por hectare, dependendo das condições climáticas.

Como características das frutas, Stanley apresenta epiderme 100% azulada pruinosa e muito atrativa. Polpa amarelo-esverdeada, firme, massuda, de regular sabor. O fruto apresenta forma oval com sutura que o divide em duas metades assimétricas com peso médio de 40 gramas (Figura 2). Tem aproximadamente 17 graus Brix de açúcar e elevada acidez. A plena floração ocorre na primeira quinzena de outubro e a maturação em meados de fevereiro. O caroço é rugoso e a amêndoa é amarga. É muito exigente em frio hibernal, necessitando aproximadamente 1.000 horas, com temperatura igual ou inferior a 7,2° C. É autocompatível, porém com a utilização de polinizadora há maior produção. Boas polinizadoras são a President e a Bluefree.



Foto: Antônio Roberto M. de Medeiros

Figura 2. Frutos da cultivar Stanley, clone 21 (Stanley C21), obtidos de plantas mantidas sob telados cobertos na Embrapa Clima Temperado.

A cultivar Stanley foi desenvolvida em Nova York, por Richard Wellington, sendo cultivada comercialmente a partir de 1926. Resultou do cruzamento entre Agen x Grand Duk, feito em 1912, sendo que a semente germinou em 1913 (BROOKS & OLMO, 1972). O clone "Stanley C21" corresponde a uma seleção de plantas de campo existentes na antiga Estação Experimental de Pelotas, atual Estação Experimental de Cascata e difundida a partir de 1972 pelas regiões mais frias dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, foi selecionado pela resistência às principais enfermidades viróticas e bacterianas que ocorrem na ameixeira em avaliações realizadas durante sete anos consecutivos (2000 a 2007) sob condições de campo e de telados cobertos.

Seleção de Plantas Matrizes

Foram selecionadas plantas de campo da cultivar Stanley em coleções de cultivares existentes nos municípios de Pelotas e Vacaria, no estado do Rio Grande do Sul, durante o ano de 2001. Os critérios utilizados na definição das plantas levou em consideração o vigor, padrão genético, resistência a pragas e doenças, aspectos qualitativos dos frutos e ausência de deformações morfológicas, entre outros. Foi realizada a enxertia de gema sobre porta enxertos de pessegueiro obtidos a partir de sementes da cultivar capdeboscq. As mudas obtidas foram novamente selecionadas levando-se em consideração suas características visuais, sendo plantadas posteriormente sob condições de telados cobertos. Foram inicialmente mantidas em vasos plásticos individuais com capacidade de 25 litros. Como substrato ao desenvolvimento das mudas, foi utilizada, uma mistura estruturada na proporção de cinco partes de terra vegetal, três partes de areia grossa lavada e duas partes de esterco bovino curtido. A adição de calcário e nutrientes foi administrada de acordo com a análise de laboratório. O aspecto final do substrato, após homogeneizado, apresentou textura grossa, coloração escura, fácil permeabilidade à água e baixa capacidade de compactação. Após 60 dias da mistura em repouso, foi realizada análise laboratorial das características nutricionais. Foram obtidos os seguintes valores: pH em água 5,9, matéria orgânica 2,5,

Potássio (K) 138 mg/dm³, Fósforo (P) 19,8 mg/dm³, Alumínio 0,0 cmol/dm³, Cálcio 2,8 cmol/dm³, Magnésio 1,5 cmol/dm³ e 21% de argila.

Durante o primeiro ano de desenvolvimento, as mudas foram indexadas em relação às principais doenças transmitidas vegetativamente, selecionando-se duas plantas "escapes", ou seja, plantas cujos resultados de todos os testes apresentaram resposta negativa à presença dos principais organismos patogênicos que infectam a ameixeira.

Os dois clones obtidos, identificados como de alta sanidade, foram multiplicados para a formação inicial do estoque de mudas básicas, sendo utilizados três métodos de propagação, ou seja, enxertia de gema ativa (SIQUEIRA, 1998; CASTRO et al., 2003) e alporquia (CASTRO e SILVEIRA, 2003; CASTRO e MEDEIROS, 2007). Estes dois últimos processos de propagação visaram obter plantas isentas da interferência do porta-enxerto. O clone que apresentou melhor desenvolvimento durante o período 2002-2008 (Stanley C21) está sendo multiplicado para formação do estoque básico de plantas matrizes.

Enfermidades Indexadas

Embora a literatura internacional descreva várias bactérias e aproximadamente 60 vírus infectando *Prunus*, apenas uma doença bacteriana (escaldadura das folhas da ameixeira) e quatro viroses destacam-se como problemas de importância econômica para a cultura da ameixeira no Brasil.

A bactéria *Xylella fastidiosa* não tem sido relatada infectando *Prunus domestica*, entretanto, devido à agressividade do patógeno em muitas espécies, incluindo *Prunus salicina* (ameixa japonesa) as plantas de Stanley foram indexadas em relação a esta enfermidade.

Três viroses principais têm sido diagnosticadas em nossas regiões produtoras (Prune Dwarf Virus, Prunus Necrotic Ringspot Virus e Plum Line Pattern Ilarvirus,) justificando suas indexação neste trabalho. Outra enfermidade virótica que será enfocada é denominada Sharca (Plum Pox Virus) que

embora ainda não esteja relatada em nosso país, ocasiona sérios prejuízos nas regiões onde ocorre, constituindo-se em risco potencial para os pomares de ameixeira, principalmente devido à introdução de material vegetal sem acompanhamento técnico adequado.

1. Doenças causadas por bactérias

- Escaldadura das Folhas da Ameixeira (*Xylella fastidiosa*)

Inicialmente, essa doença foi relatada como ocasionada por vírus sendo constatada na região do Delta do Rio Paraná, na Argentina, e observada pela primeira vez em 1935, evoluindo com maior intensidade a partir de 1940. Posteriormente, foi constatada a presença de estruturas com o aspecto típico de bactérias em ameixeiras doentes. Em 1978, foi relatada a ocorrência da escaldadura das folhas da ameixeira no Brasil e Paraguai.

Essa doença ocorre na Argentina, Brasil, Paraguai e Sul dos Estados Unidos da América; entretanto, a escaldadura das folhas da ameixeira pode ser nativa dos EUA, tendo sido introduzida na América do Sul em ocasiões isoladas, com a remessa de mudas infectadas.

Desde a constatação da existência da escaldadura das folhas da ameixeira no Brasil, houve acentuado declínio dos pomares das regiões produtoras do Sul do País. Suspeita-se que a doença esteja presente no Rio Grande do Sul desde a década de 50.

As primeiras observações mostraram microrganismos em forma de bastonetes medindo de 1,0 a 3,0 mm de comprimento por 0,5 mm de largura, com proeminente parede celular ondulada, com muitas fibrilas, sendo encontradas no xilema. O isolamento dessas bactérias em 1982, utilizando o meio de cultura BCYE permitiu observar bastonetes medindo 0,35 m de diâmetro e comprimento variável entre 2,0 e 5,0 mm, com parede celular ondulada.

A difusão da enfermidade dentro do pomar é completamente irregular, havendo casos em que plantas enfermas permanecem longo tempo sem contagiar as sadias, sendo que o

contágio geralmente ocorre entre plantações vizinhas, entretanto alguns pomares, mesmo nessas condições, não manifestam sintomas.

Os insetos são raros em ameixeira e entre os poucos presentes encontra-se um membro da família Flatidae, *Ormenis cestri* BERG, que pode ser um vetor. No Brasil, sete gêneros de cigarrinhas pertencentes às tribos Cicadellini e Proconini, podem ser vetores potenciais de EFA. Nos Estados Unidos da América, são vetores conhecidos desse patógeno as cigarrinhas *Homalodisca coagulata* e *Homalodisca insolita*.

A transmissão por materiais propagativos constitui o principal modo de transmissão. Estacas, borbulhas e garfos disseminam a doença a curtas distâncias, enquanto que mudas produzidas de matrizes infectadas disseminam a doença a longas distâncias. É de extrema importância o uso de mudas sadias, provenientes de matrizes indexadas.

Os modos de diagnose incluem a sintomatologia, a microscopia e os testes sorológicos. O sintoma inicial de enfermidade é uma leve clorose irregular nos bordos das folhas, posteriormente a clorose inicial se intensifica, produzindo no final do ciclo vegetativo um dessecamento dos bordos, que penetra de forma irregular no limbo, rodeada por uma clorose fraca, que invade a lâmina foliar. Os sintomas aparecem em qualquer lugar da copa, com exceção das folhas novas e ramos da última brotação. Nas plantas muito atacadas, ocorre queda antecipada de folhas, o crescimento geral diminui, os ramos superiores se tornam quebradiços e seu ângulo de inserção é mais aberto, os frutos e a produção diminuem; conseqüentemente, ocorre a morte da planta. Sintomas típicos normalmente são visíveis em plantas com três anos ou mais: os primeiros sintomas foliares aparecem nos meses de janeiro e fevereiro. As plantas atacadas há vários anos apresentam seca de ponteiros e pouco enfolhamento, os sintomas aparecem inicialmente nas folhas da base, progredindo para as mais novas, podendo ocorrer ramos ladrões sem sintomas e haver casos de plantas sem sintomas entre plantas doentes. Existem plantas que aparentemente estas bactérias não são transmitidas para as brotações novas, explicando porque alguns

ramos podem ter folhas com escaldadura e outros não. A bactéria, por microscopia, pode ser observada em secções ultra finas de ramos tendo o auxílio de sistema de contraste de fase e aumento de 400 vezes. A indexação sorológica corresponde ao teste ELISA que, de uma forma simplificada, envolvem uma reação entre antígeno e anticorpo, utilizando-se o plasma sanguíneo de um animal, e se constituem em um valioso instrumento de pesquisa, por serem altamente específicas e sensíveis.

Os métodos de controle estão relacionados principalmente a utilização de mudas comprovadamente sadias. O material propagativo se constitui no principal modo de disseminação do patógeno, constitui-se também no principal modo de controle. Mudanças produzidas de matrizes infectadas disseminam a doenças a longas distâncias. Plantas que apresentam sintomas da enfermidade já no primeiro ano de plantio, provavelmente foram produzidas a partir de matrizes contaminadas.

Na avaliação das plantas matrizes de Stanley, para esta enfermidade, foi utilizado o teste imunológico ELISA e microscopia eletrônica.

2. Doenças causadas por vírus

- Prune Dwarf Virus

O PDV está associado a várias doenças economicamente importantes em frutas de caroço. Ameixeiras infectadas por este vírus desenvolvem folhas estreitas e mais espessas que as normais. Os internós ficam dispostos em forma de roseta no início da primavera, adquirindo a forma normal no final desta estação. O agente causal dessa enfermidade pertence ao grupo ilarvirus, com partículas isométricas ou na forma de pequenos bacilos. Trabalhos de pesquisa desenvolvidos na Embrapa Clima Temperado indicaram a presença do Prune Dwarf Virus em uma planta de ameixeira; entretanto, ocorre com mais frequência em amostras coletadas em diferentes cultivares de pessegueiro. Este vírus infecta um grande número de espécies de prunus e pode ser transmitido, por inoculação, para várias espécies de plantas herbáceas. A disseminação ocorre através do

pólen, da semente e, principalmente, através do uso de material vegetal contaminado, durante a produção de mudas. Uma estratégia de controle consiste em evitar a introdução de materiais provenientes de locais onde o problema ocorre. As medidas de controle envolvem principalmente os programas de certificação de mudas. Para esta virose, na avaliação das plantas matrizes de Stanley, foram utilizados testes em plantas indicadoras, o teste imunológico ELISA e a microscopia eletrônica.

- Prunus Necrotic Ringspot Virus

Várias espécies de *Prunus* podem ser hospedeiras desse vírus. Alguns *strains* não induzem sintomas aparentes, entretanto, podem ser diagnosticados com o uso de plantas indicadoras, como por exemplo, a cerejeira Shirofugen ou através de testes sorológicos, principalmente o teste de ELISA. Outras variações desse vírus podem ocasionar lesões necróticas no primeiro ano, seguindo clorose crônica das folhas com necrose, deformações e maturação tardia de frutos. O agente causal inclui um complexo de vírus. Este nome é utilizado para designar todos os membros sorologicamente relacionados do grupo Ilarvirus subgrupo III, cujas partículas podem ser isométricas ou na forma de pequenos bacilos. É transmitido através do pólen, podendo infectar sementes. Apresenta instabilidade em extratos de tecidos vegetais, mas pode ser purificado após inoculado em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) ou *Chenopodium quinoa* Willd. As medidas de controle envolvem programas de certificação de mudas. Uma estratégia de controle consiste em evitar a introdução de materiais provenientes de locais onde o problema ocorre. Plantas enfermas devem ser imediatamente retiradas do pomar. Na avaliação das plantas matrizes de Stanley, para esta virose, foi utilizando o teste imunológico ELISA, a microscopia eletrônica e testes em plantas indicadoras.

- Plum Line Pattern Ilarvirus

De acordo com dados de literatura, o Plum Line Pattern Virus tem sido descrito em países europeus e nos Estados Unidos da América, sendo normalmente transmitido mecanicamente entre cultivares de ameixeira.

As características do agente causal dessa doença ainda não estão bem definidas, embora saiba-se que pertence ao grupo ilarvirus, apresentando genoma tripartido de RNA. Em algumas cultivares a sintomatologia inicia por linhas amarelas ou amarelo-esverdeado na primavera, evoluindo para o branco durante o verão. Muitas cultivares podem não apresentar sintomas aparentes. A sintomatologia é variável com a estirpe do vírus, com a cultivar e com o meio ambiente. Embora muitos ilarvirus sejam transmitidos pelo pólen e pela semente, até o momento, o único modo de transmissão conhecido é através da enxertia de material de propagação infectado. As medidas de controle envolvem programas de certificação de mudas. Uma estratégia de controle consiste em evitar a introdução de materiais provenientes de locais onde o problema ocorre. Sintomas de Plum Line Pattern Virus têm sido observados em pomares de ameixeira da cultivar Golden Japan localizados na região de Pelotas, Rio Grande do Sul. Para esta virose, a avaliação das plantas matrizes de Stanley foi realizada utilizando microscopia eletrônica e testes em plantas indicadoras.

- Plum Pox Virus

Esta virose foi inicialmente relatada na Bulgária em 1918. Bastante conhecida pela denominação de "Sharca". Constituiu-se em um problema de extrema seriedade, principalmente para as culturas da ameixeira e do pessegueiro. Até o presente sua introdução não foi relatada nas regiões produtoras brasileiras. Devido à severidade com que esta doença ocorre, há necessidade da apresentação de algumas informações que têm como objetivo evitar que vírus seja introduzido, devido ao desconhecimento do assunto por produtores que recebem materiais vegetais de outros países, sem sejam respeitadas normas de fiscalização. O Plum Pox Virus tem causado sérias perdas em pomares de ameixeira (principalmente *Prunus domestica*), pessegueiro e nectarineira. Os sintomas foliares em ameixeira consistem em manchas cloróticas verde-pálido, anéis e linhas irregulares podem ser visíveis a partir do início do verão. Frequentemente os sintomas são restritos a algumas poucas folhas por ramos. Plantas infectadas geralmente não apresentam redução no

desenvolvimento e são difíceis de identificar. Os sintomas em frutos verdes podem ser observados pela ocorrência de manchas escuras espalhadas irregularmente sobre a superfície. Em frutos maduros se caracterizam pela presença de anéis de coloração contrastante com a da epiderme. O agente causal dessa enfermidade se constitui em um Potyvirus, caracterizado por partículas longas e flexíveis, transmitido por afídeos (pulgões). O diagnóstico pode ser realizado através do uso de plantas indicadoras como *Nicotiana clevelandii* Gray, *Pisum sativum* L. e *Zinnia elegans* Jacq, entre outras. Em países onde o problema ocorre, as medidas de controle envolvem programas de certificação de mudas, inspeção e remoção de plantas infectadas, cultivares tolerantes e rigoroso programa de controle de afídeos. No Brasil, devido a não detecção dessa enfermidade, o principal modo de controle consiste em evitar a introdução de materiais não certificados e utilização de sistemas quarentenários, mantidos por entidades governamentais. Para esta virose, a avaliação das plantas matrizes de Stanley foi realizada utilizando o teste imunológico ELISA, microscopia eletrônica e testes em plantas indicadoras.

- Outras viroses

A literatura internacional apresenta vários estudos relacionados a doenças ocasionadas por vírus que infectam prunóideas, entretanto, as atividades desenvolvidas no Brasil são insuficientes, tendo-se apenas poucos relatos e ocorrência. Embora a literatura internacional descreva aproximadamente 60 vírus infectando *Prunus*, sendo que alguns estão associados formando complexos, apenas cinco ou seis viroses destacam-se como problemas de importância econômica. Na avaliação da presença de viroses latentes presentes nas plantas matrizes de Stanley foram realizadas avaliações por microscopia eletrônica e testes em plantas indicadoras.

Metodologias Utilizadas nos Testes de Indexação para Avaliação Fitossanitária das Matrizes de Stanley

Metodologias Utilizadas nos Testes de Indexação para Avaliação Fitossanitárias das Matrizes de Stanley

Vários métodos têm sido rotineiramente utilizados na diagnose de doenças transmitidas vegetativamente. Na indexação das principais viroses e bacterioses, cujo agente causal é amplamente conhecido, o teste mais recomendado constitui-se no teste ELISA (CLARK e ADAMS, 1977), pois permite diagnosticar a ocorrência dessas enfermidades com precisão e rapidez, inclusive em algumas viroses latentes, onde os sintomas não são visíveis na planta hospedeira (SUTULA, 1986). Para viroses em que não se dispõe de testes sorológicos, podem ser utilizadas técnicas de microscopia eletrônica e plantas indicadoras que são processos mais demorados, mas permitem avaliar um número maior de agentes infecciosos.

- Sorologia

Na diagnose de *Xylella fastidiosa*, as amostras (segmentos de ramos medindo 6-8 mm de diâmetro por 50-70 mm de comprimento) foram coletadas durante o período de dormência, retirando-se quatro segmentos de ramos de cada planta. Para os testes de viroses foram utilizadas flores e brotações novas. O processo básico consistiu no método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), seguindo-se o procedimento determinado por Clark & Adams (1977), acrescido de modificações estabelecidas por Paiva et al. (1984). Durante o desenvolvimento dos testes, seguiram-se as seguintes etapas:

- a) adição de 200 microlitros de gama globulina, diluída em tampão carbonato, a cada orifício das placas de microtitulação, sendo incubadas a 37°C, durante quatro horas. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-Tween, em intervalos de três minutos, para retirada do excesso do material de cobertura (processo normal de lavagem);
- b) adição de 200 microlitros do extrato da amostra a testar em cada orifício das placas de microtitulação, incubando-as sob refrigeração (4°C), durante o período de 18 horas, seguindo-se o processo normal de lavagem, para retirada do excesso de material acrescentado.
- c) adição de 200 microlitros do conjugado diluído em tampão PBS-Tween + PVP/40 + albumina de ovo a cada orifício das placas,

incubando-as durante quatro horas, à temperatura de 37°C. O excesso do material foi lavado, seguindo-se o processo normal;

- d) adição de 200 microlitros do substrato p-nitrofenol fosfato a cada orifício das placas mantendo-as em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), no escuro, durante 90 minutos, para desenvolvimento da cor característica das reações.
- e) avaliação dos resultados em leitora de placas de microtitulação.

Os anti-soros utilizados foram adquiridos da Loewe Biochemical (Alemanha), com as seguintes especificações:

- *Xylella fastidiosa*: Anticorpos policlonais obtidos em coelhos. Cat. n° 07119
- Plum Pox Vírus: Anticorpos policlonais obtidos em coelhos. Cat. n° 07050
- Prune Dwarf Vírus: Anticorpos policlonais obtidos em coelhos. Cat. n°07051
- Prunus Necrotic Ringspot Vírus: Anticorpos policlonais obtidos em cabras. Cat. n° 07052

- Microscopia Eletrônica

Foram utilizados pequenos fragmentos do tecido foliar, com aproximadamente 1,0 mm de largura e 2,0 mm de comprimento. As amostras foram estabilizadas por fixação química, visando torná-las ao mesmo tempo, eletricamente condutoras. Na formulação do fixador de Karnovsk (DAWES, 1971), ajustam-se as condições ideais de concentração do cacodilato de sódio, paraformaldeído e glutaraldeído, pH, molaridade, etc. O fixador foi utilizado à temperatura ambiente, por imersão. A dificuldade de penetração do fixador na amostra, o que foi contornada utilizando vácuo (LOURO et al., 1987).

O tempo de ação do fixador correspondeu a 24 horas. Posteriormente, foram feitas várias lavagens com solução tampão de cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,2 e realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio tamponado a 1% (1ml de OsO₄ 2% + 1 ml cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2), durante 2,0 h. A seguir, as amostras passaram por banhos de água bidestilada. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados com álcool a concentrações crescentes e em seguida com acetona.

Posteriormente, o material foi embebido em solução de EPON AB–DMP30 e acetona na proporção de 1:1 durante 60 minutos, sendo mantido sob agitação constante a temperatura ambiente. Após a impregnação final dos fragmentos em EPON AB-DMP30, as peças foram incluídas em resina polimerizada em estufa regulada à temperatura de 60°C por cinco dias (SILVEIRA, 1989).

Após a polimerização, os blocos foram preparados para ultramicrotomia para obtenção de cortes semi-fino. Os cortes foram corados com solução a 1% de azul de metileno e bórax e avaliados através de microscopia ótica para seleção do ponto ideal para realização de cortes ultrafinos a serem observados no microscópio eletrônico de transmissão. Para observação da ultraestrutura celular, os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

A avaliação do material foi realizada em microscópio eletrônico ZEISS (EM900), com voltagem de aceleração de 80 KV.

- Plantas indicadoras

A diagnose meramente visual de muitas viroses que ocorrem na ameixeira é desaconselhável devido a ocorrerem infecções latentes, onde o vírus não mostra sintomas na planta hospedeira. Entretanto, muitas dessas viroses apresentam sintomas característicos que permitem suas identificações em outras plantas, denominadas indicadoras. Os sintomas mais evidentes são os foliares como mosaico (alternância de áreas verde-escuras e claras ou amareladas), necrose sistêmica, amarelecimento (clorose), clareamento das nervuras, manchas anulares, linhas necróticas, redução/encarquilhamento/enrolamento do limbo foliar. Manchas e lesões podem surgir nos ramos e em casos severos, induzem à sua morte pelo anelamento causada pela fusão de lesões. Na planta como um todo pode ocorrer nanismo, declínio e mesmo morte.

Para avaliar a presença de viroses de menor importância, foram utilizadas plantas indicadoras herbáceas cultivadas a partir de sementes em casa de vegetação. Mudas sadias no estágio de duas a quatro folhas,

foram inoculadas mecanicamente com extrato de folhas, flores e brotações das plantas Stanley de mudas previamente selecionadas. O inóculo foi preparado na presença de tampão de fosfato de sódio 0,01M pH 7,0 acrescido de 1% de sulfito de sódio. Em seguida, foi friccionado na superfície adaxial das folhas das plantas indicadoras polvilhadas com a substância abrasiva carborundum (600 mesh). As indicadoras inoculadas foram *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium murale* e *Cucumis sativum* L.. As plantas foram avaliadas visualmente após durante 45 dias após a inoculação.

Manutenção das Plantas Matrizes de Alta Sanidade da Cultivar Stanley C21

O clone selecionado foi multiplicado para obtenção de plantas matrizes, responsáveis pela produção de material propagativo de alta sanidade. As plantas são mantidas em sistema confinado, em telados cobertos, construídos de forma a respeitar rigorosamente normas técnicas pré-estabelecidas (Figura 3). A utilização de tela anti-afídeos impede a entrada de insetos vetores de viroses. Internamente foram construídos corredores concretados, com 1,5m de largura para circulação e afastamento das plantas da tela de proteção. Entre os corredores, formando a plataforma de apoio dos vasos, foi colocada uma camada de brita com aproximadamente sete centímetros de espessura para evitar a eventual possibilidade de contato das raízes das plantas com o solo e facilitar a manutenção do ambiente limpo. O acesso a cada subdivisão do telado é realizado através de uma ante-sala construída em alvenaria. Esta ante-sala possibilita o acompanhamento visual das atividades que são executadas dentro dos compartimentos por pessoas que não estão diretamente envolvidas nos trabalhos realizados, como, por exemplo, visitantes e produtores, durante a aquisição de material vegetal. Apresenta-se interligada a um vestuário para higienização e troca de vestimenta de funcionários e a um depósito onde são armazenadas todas as ferramentas e materiais utilizados nos tratamentos culturais das matrizes. A assepsia do local é realizada por meio de desinfecções rotineiras do piso dos corredores, com solução de hipoclorito de sódio, sendo mantido junto

às portas de entrada estrutura de pedilúvio. Periodicamente, são realizadas desinfestações gerais com produtos específicos visando prevenir contaminações locais por insetos e patógenos.

Foto: Luis Antônio Castro



Figura 3. Plantas matrizes da cultivar Stanley C21 mantidas em sistema confinado, sob condições de telados cobertos na Embrapa Clima Temperado.

A capacidade potencial de produção de material propagativo com alta sanidade corresponde a 1.500 borbulhas anuais, com finalidade de produção de plantas matrizes, em viveiros, que darão origem as mudas comercializadas.

Referências

- BETTI, J.A.; KITAJIMA, E.W. Presença de vírus latentes em macieira em São Paulo. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília, DF, v. 9, p. 125-127, 1972.
- BROOKS, M.R.; OLMO, H.P. Register of new fruit & nut varieties. 2. ed. Berkeley: University of California Press, 1972. 708 p.
- CARVALHO, M.G. Viroses vegetais e fitovirus. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 77 p.
- CASTRO, L.A.S. de.; MEDEIROS, A.R.M. de. Uso da alporquia na propagação da ameixeira européia cv. stanley (*Prunus domestica*). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 20 p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 60).
- CASTRO, L.A.S. de.; RASEIRA, A.; FORTES, G.R.L.; FINARDI, N.L. Produção de mudas. In: CASTRO, L.A.S. de. (Ed.). Ameixa: produção. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 34-45. (Frutas do Brasil, 43).
- CASTRO, L.A.S. de; SILVEIRA, C.A.P. Propagação vegetativa do pessegueiro por alporquia. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 368-370. 2003.
- CASTRO, L.A.S. de.; BARBOSA, W.; NAKASU, B.Y.; RASEIRA, M. do C.B. Ameixa. In: ALBUQUERQUE, A.C.S.; SILVA, A.F. de. (Ed.). Agricultura Tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008. v. 1, p. 485-491.
- CHIARAPPA, L. The need for a international certification scheme of improved tree fruit propagation material of developing countries. Acta Horticulturae, The Hague, n. 130, p. 273-284. 1992.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, Cambridge, v. 34, p. 475-483. 1977.
- DAWES, C.J. Biological techniques in electron microscopy. Flórida: Barnes e Noble, 1971. 193 p.
- LOURO, R.P.; MIGUENS, F.C.; MACHADO, R.D. Ontogenese dos tricomas da lâmina foliar de *Andradea floribunda*. Fr. Allem. In: COLÓQUIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, 11., 1987. Caxambu. Caxambu: SBME, 1987. p. 19-20.
- MEIJNEKE, C.A.R., OOSTEN, H.J.; PERRBOOM, H. Growth, yield and fruit quality of virus-infected and virus-free Golden Delicious apple trees. Acta Horticulturae. The Hague, v. 44, p. 209-212, 1982.

NAKA, J. Instrução normativa MAPA nº 20, de 27 de setembro de 2001. In: REUNIÃO PRODUÇÃO DE MUDAS E BORBULHAS, 2002, Brasília, DF. Anais. Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2002. 1 CD-ROM.

PAIVA, E.; FELICIANO, A.; ASSIS, M. de; CASTRO, L.A.S. de. Diagnose da bactéria causadora da escaldadura das folhas da ameixeira pelo método ELISA. Pelotas, EMBRAPA-CNPFT, 1984. 3 p. (Embrapa-CNPFT. Pesquisa em Andamento, 21)

RUFATO, L., KERSTEN, E. Enraizamento de estacas de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsch) cvs. Esmeralda e BR-2, submetidas à estratificação e ao ácido indolbutírico. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p.191-194, 2000.

SANTOS FILHO, H.P.; NICKEL, O. Microenxertia e indexação. Bases científicas para obtenção de clones de citrus livres de viroses. 1993, Brasília, DF. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE

BIOTECNOLOGIA VEGETAL, 1., 1993, Brasília, DF. Programas e resumos. Brasília, DF: Embrapa Cenargen, 1993. p.12-15.

SILVEIRA, M. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: SILVEIRA, M. Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. São Paulo: USP, 1989. v. 1, p. 71-79.

SIQUEIRA, D.L. de. Produção de mudas frutíferas. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 1998. 74 p.

STOUFER, R.F.; FRIDLUNG, P.R. Indexing using wood indicators. In: FRIDLUND, P. R. (Ed.). Virus and virus and viruslike diseases of pome fruits and simulating noninfectious disorders. Pullman: Washington State University. Cooperative Extension, 1989. p. 255-264.

SUTULA, C.L. Innovative testing products for food and agricultures. Mishawaka: AGDIA, 1986. 12 p.

Circular Técnica, 69

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
Endereço: BR 392, Km 78, Caixa Postal 403
Pelotas, RS - CEP 96001-970

Fone: (0xx53) 3275-8100

Fax: (0xx53) 3275-8221

E-mail: www.cpact.embrapa.br
sac@cpact.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2008): 100



Comitê de publicações

Presidente: *Walkyria Bueno Scivittaro*

Secretário-Executivo: *Joseane Mary L. Garcia*

Membros: *Cláudio Alberto Souza da Silva, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, Isabel Helena Vernet-ti Azambuja, Luís Antônio Suita de Castro, Sadi Macedo Sapper, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos*

Expediente

Supervisor editorial: *Sadi Macedo Sapper*

Revisão de texto: *Sadi Macedo Sapper*

Editoração eletrônica: *Oscar Castro*