

Identidade do *Apple stem pitting virus* em São Paulo, Brasil, Confirmada por Meio de RT-PCR

Juliana Freitas-Astua¹, Quelmo S. de Novaes², Juarez A. Betti³, Jorge A. M. Rezende², Hugo Kuniyuki³ & Valdir A. Yuki³

¹Embrapa Milho e Sorgo / Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira', CEP 13490-970, Cordeirópolis, SP, ²Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ, USP, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, ³Centro de Fitossanidade, Instituto Agrônômico (IAC), CEP 13020-902, Campinas, SP, e-mail: jabetti@iac.sp.gov.br

(Aceito para publicação em 31/03/2004)

Autor para correspondência: Juarez Antonio Betti

ABSTRACT

Identity of *Apple stem pitting virus* in São Paulo, Brazil, confirmed by RT-PCR

Biological indexing of apple (*Malus domestica*) clones Anna-EF 263/2 and Ohio Beauty 270/6B, collected in Angatuba and Paranapanema counties, Brazil, where shown to be infected by *Apple stem pitting virus* (ASPV). Thermotherapy associated with tip culture,

produced clones Anna-EF T-711 and Ohio Beauty T-597, and biological indexing showed that clones were virus free. The RT-PCR with total RNAs extracted from clones using the primers that amplified a region within the coat protein gene of ASPV, confirmed the biological assays. Partial nucleotide and deduced amino acid sequences of the coat protein gene showed high similarity with sequences of ASPV in GenBank.

O vírus do estriamento do lenho da macieira (*Apple stem pitting virus* - ASPV), gênero *Foveavirus*, descrito em Virginia crab, causa sintomas em outras indicadoras (Acta Horticult. 386:72. 1995). No Brasil, a sua detecção biológica em macieira (*Malus domestica* Borkh.) envolveu as indicadoras *M. platycarpa* Rehd. (Summa Phytopathol. 5:29. 1979), Spy 227 (Fitopatol. bras. 8:620. 1983), *Pyronia veitchii* (Trabut) Guill. e Virginia crab (*M. pumila* Mill.) (Summa Phytopathol. 21:49. 1995). A mancha anelar do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) (O Biológico 25:64. 1959), semelhante à doença "Quince sooty ringspot" atribuída ao ASPV (Acta Horticult. 386:148. 1995), provavelmente constitui o primeiro relato envolvendo esse vírus no Brasil.

Para confirmar a identidade do ASPV, foram utilizados quatro clones de macieira mantidos em casa de vegetação no IAC, em Campinas, SP e testados com as quatro indicadoras já citadas. Os clones infetados 263/2 (Anna-EF) e 270/6B (Ohio Beauty) foram coletados respectivamente em Angatuba e Paranapanema, SP. Os clones sadios T-711 e T-597 resultaram de termoterapia e propagação de ápices (Summa Phytopathol. 10:128. 1984) dos clones 263/2 e 270/6B, respectivamente.

Na ESALQ/USP, Piracicaba, SP, RNAs totais foram extraídos de tecidos foliares seguindo protocolo de Gibbs & Mackenzie (J. Virol. Meth. 63:9. 1997) e utilizados em análise

de RT-PCR para ASPV com os iniciadores específicos ASP-C: (5'-CTCTTGAACCAGCTGATGGC-3') e ASP-A (5'-ATAGCCGCCCCGGTTAGGTT-3') (J. Phytopathol. 145:499. 1997). Fragmentos de 244-pb, correspondentes a uma região do gene que codifica a proteína da capa protéica (CP) do vírus, foram amplificados apenas a partir de RNAs extraídos dos clones de campo (263/2 e 270/6B) e não dos de termoterapia, confirmando os resultados dos testes biológicos.

O produto da RT-PCR obtido do clone 270/6B foi clonado, sequenciado e gerou dois consensos de 158 nucleotídeos: um deles, com dois clones e o outro, com quatro. As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos da CP do consenso 1 apresentaram 85% e 96% de similaridade, respectivamente, com as seqüências do ASPV disponíveis no GenBank (acesso AF345892). Para o consenso 2, os valores de similaridade foram de 84% e 98%, respectivamente, quando comparados com os do acesso AF438522 do ASPV depositado no GenBank. Quando comparados entre si, os dois consensos apresentam 87% de identidade de nucleotídeos e 100% de aminoácidos deduzidos, indicando uma aparente variabilidade na seqüência de DNA, sem que haja implicações na tradução de proteína (Figura 1). Esses resultados confirmam a identidade de isolados do ASPV que ocorrem em macieira em São Paulo.

```
Consenso 1 001 AGTGATGGTCTGATTAGACTGCCAACTCAAGCAGAAAGAGTGGCAAACGCCACCAGCAAA 060
Consenso 2 001          CT A C T A          T          T          060
          S D G L I R L P T Q A E R V A N A T S K
Consenso 1 061 GAAATTCAGATGTATCGTATCCGCTCTATGGAGGGTACCCAAGCTGTCAATTTGGTGAA 120
Consenso 2 061          A          C          A          T          G C          C          120
          E I Q M Y R I R S M E G T Q A V N F G E
Consenso 1 121 GTCAC TGGGGTAAGATTGGACCCAAGCCTGTGTATCAATTAGGAAG 158
Consenso 2 121          A          A C C T C
          V T G G K I G P K P V L S I R K
```

FIG. 1 - Seqüências parciais de nucleotídeos dos consensos 1 e 2 (parte superior, com as variações dos dois consensos em itálico) e aminoácidos deduzidos (inferior, em negrito) do gene da capa protéica do *Apple stem pitting virus*