

Apple stem grooving virus (ASGV) e apple stem pitting virus (ASPV) estão entre as espécies virais mais frequentes e responsáveis por substanciais danos na indústria mundial da maçã. ASGV e ASPV em *Malus* são disseminadas apenas por material propagativo infectado e, portanto, o controle se dá por meio de medidas preventivas com materiais propagativos de qualidade. Ferramentas biotecnológicas podem ser utilizadas para a produção de matrizes com qualidade fitossanitária. No cenário atual, a crioterapia vem se destacando como uma eficiente alternativa para a eliminação de vírus em espécies vegetais. Os resultados apresentados nessa dissertação evidenciam a efetividade da crioterapia para produção de plantas de macieira livres de vírus contribuindo para a obtenção de matrizes sadias que serão fornecedoras de propágulos para a formação de pomares.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Bogo

Lages, 2019

ANO
2019

JULIANA APARECIDA SOUZA | CRIPTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS NA
ERRADICAÇÃO DAS ESPÉCIES VIRAIS apple stem grooving virus e apple stem
pitting virus EM PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CRIPTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO
EM GOTAS NA ERRADICAÇÃO DAS
ESPÉCIES VIRAIS apple stem
grooving virus e apple stem pitting
virus EM PLANTAS DO PORTA-
ENXERTO DE MACIEIRA
'MARUBAKAIDO'**

JULIANA APARECIDA SOUZA

LAGES, 2019

JULIANA APARECIDA SOUZA

**CRIOTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS NA ERRADICAÇÃO DAS
ESPÉCIES VIRAIS *apple stem grooving virus* e *apple stem pitting virus* EM
PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Bogo

LAGES, 2019

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Souza, Juliana Aparecida

Crioterapia por vitrificação em gotas na erradicação das espécies virais apple stem grooving virus e apple stem pitting virus no porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' / Juliana Aparecida Souza. -- 2019.

95 p.

Orientador: Amauri Bogo

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

1. Criopreservação. 2. *Malus prunifolia*. 3. ASGV. 4. ASPV.

5. Mudas de qualidade. I. Bogo, Amauri. II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. III. Título.

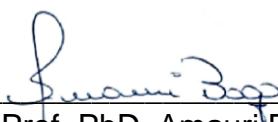
JULIANA APARECIDA SOUZA

**CRIOTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS NA ERRADICAÇÃO DAS
ESPÉCIES VIRAIS *apple stem grooving virus* e *apple stem pitting virus* NO
PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Banca Examinadora:

Orientador:



Prof. Ph.D. Amauri Bogo

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:



Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC



Dra. Jocleita Peruzzo Ferrareze

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina - IFSC

Lages, 09 de abril de 2019.

Dedico essa dissertação de mestrado a toda
minha família e amigos, em especial a meu
marido Jean Carlos Betttoni, que foi um grande
colaborador e incentivador para os resultados
aqui obtidos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que sempre tem sido bom comigo e me guiado para as melhores escolhas, me dando força e sabedoria.

À minha família, em especial a minha mãe Julita por ter se esforçado tanto e ter me ensinado tudo o que sou hoje, exemplo de mulher guerreira, forte e determinada; meu irmão Ederson e minha irmã Julia, que apesar da distância procuravam suprir as necessidades, pela serenidade e amor.

Aos meus segundos pais, Carlos e Ivanir, por estarem sempre incentivando e dando o melhor apoio com amor incondicional, encorajamento e sabedoria e principalmente por terem gerado um filho tão especial, hoje meu marido.

Ao meu marido Jean, meu melhor amigo, companheiro de todos os meus melhores momentos da vida e dos mais difíceis também, minha melhor inspiração, você é meu porto seguro em todos os momentos. Te amo.

Ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal do CAV – UDESC, pela oportunidade de crescimento profissional e humano.

À meu orientador Professor Dr. Amauri Bogo pelo aceite na orientação, paciência e confiança para a realização dos trabalhos.

Aos meus supervisores, Professor Dr. Fabio Nascimento da Silva; Pesquisador Dr. Murilo Dalla Costa; e em especial ao Dr. Jean Carlos Bettoni por me dar a oportunidade de aprender muito com você diariamente. Obrigada por todo o seu apoio e conselhos para o desenvolvimento desta pesquisa.

A unidade da Epagri/Lages pelo suporte para realização dessa dissertação, confiança e oportunidade ao permitir o desenvolvimento da pesquisa, proporcionando assim um grande ensinamento profissional que vou carregar comigo para sempre.

Aos colaboradores da Epagri, unidade de Lages, em especial aos meus amigos Maria Aparecida, Rech, Franciele e Suelen por todo o auxílio e acolhimento.

Ao colega acadêmico Lucas Stempkowski por ter dedicado seu tempo em auxiliar com as análises de RT-PCR para obtenção dos resultados desta pesquisa.

A Pesquisadora Dra. Fernanda Vidigal e sua equipe (Embrapa Mandioca e Fruticultura) pelos conhecimentos de cultura de tecidos e criopreservação repassados.

Aos amigos que ganhei ao longo dessa caminhada, em especial a minha amiga Cleizi Karvat que conheci enquanto estive trabalhando na Epagri, pelos incentivos, auxílios e amizade, uma pessoa a quem me identifico muito.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do CAV, em especial ao prof. Fabio Nascimento da Silva, pela paciência e conhecimentos repassados, confiança e suporte para o desenvolvimento dos trabalhos na área de virologia.

Ao suporte financeiro oferecido pela bolsa de monitoria da Udesc (PROMOP) e a bolsa Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC).

A todos que aqui não foram citados mas ajudaram de alguma forma com o incentivo e apoio para essa conquista, meu muito obrigada.

“Na vida tudo está mudando e a mudança é belíssima, ela lhe proporciona mais e mais experiência, mais e mais maturidade, mais e mais consciência”.
(Osho)

RESUMO

SOUZA, Juliana Aparecida. **Crioterapia por vitrificação em gotas na erradicação das espécies virais apple stem grooving virus e apple stem pitting virus no porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'**. 2019. 95 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, 2019.

A maçã representa a terceira fruta mais produzida no mundo, atrás apenas da produção de banana e melancia. No Brasil, a produção é concentrada nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná com uma produção de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas ao ano. Devido as condições climáticas dessas áreas, a macieira constantemente está suceptível a patógenos e pragas. Os vírus estão entre os principais patógenos que afetam a produção de maçãs no mundo em função da degenerescência das plantas, especialmente porque algumas das principais espécies de vírus possui características latentes, e, portanto, não induzem sintomas perspectíveis. O apple stem grooving virus (ASGV) e o apple stem pitting virus (ASPV) estão entre as espécies de vírus mais frequentes em áreas produtivas e são conhecidos por provocarem impactos negativos sobre a produtividade e qualidade dos frutos. Esses vírus são transmitidos por material propagativo infectado e o controle somente acontece por meio do plantio de material vegetal isento de patógenos dessa etiologia. A crioterapia por vitrificação em gotas representa uma técnica de erradicação de espécies de vírus em materiais propagativos. O objetivo do trabalho foi utilizar a técnica de vitrificação em gotas na erradicação dos vírus ASGV e ASPV em plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. Explantes do porta-enxerto Marubakaido infectados por ASGV e ASPV foram introduzidos *in vitro* para uso nos ensaios de crioterapia. Após a uniformização das culturas estoque *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido, meristemas com 1 mm (contendo 2-3 primórdios foliares) foram excisados, cultivados por um dia em meio basal (MB; formulação salina MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,25 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP) e 0,01 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico (AIB) e 2,6 g L⁻¹ de PhytagelTM, pH 5,8) para a estabilização, seguido de pré-cultivo por um dia em meio contendo 2 M de glicerol e 0,8 M de sacarose e, exposição à solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) por 0, 20, 40, 50, 60 e 80 min à 22°C. Em experimento adicional foi testado a exposição dos meristemas à PVS2 a 0°C, nos mesmos tempos de exposição mencionados acima. Dois minutos antes do final de cada tratamento em PVS2 os meristemas foram individualmente transferidos para gotículas contendo 5 µL de PVS2 sobre tiras de papel alumínio e mergulhadas em nitrogênio líquido (NL) por 1 h e, então descongelados em solução de descarregamento. As taxas de sobrevivência e regeneração foram avaliadas após 4 e 8 semanas da etapa de crioterapia, respectivamente. Os ensaios foram avaliados por triplicatas, com 30 amostras para cada tratamento. As médias foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Meristemas expostos em PVS2 a 22°C seguidos de tratamento em NL apresentaram as maiores taxas de sobrevivência (75 e 65%) e regeneração (53 e 58%) após 20 e 40 min de exposição em PVS2, respectivamente. Quando a exposição ao PVS2 foi a 0°C seguido de tratamento em NL, houve considerável redução da toxicidade provocada pela solução vitrificante aos meristemas; após 80 min de exposição ao PVS2 porcentagens de sobrevivência e regeneração foram 48% e 23%, respectivamente. A eficiência da crioterapia para a erradicação de ASGV e ASPV foi determinada em plantas provenientes do processo de crioterapia e

que foram mantidas em casa de vegetação por seis meses em crescimento *ex vitro*. A detecção dos vírus foi realizada utilizando o método de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction) para 20 plantas aleatoriamente selecionadas que passaram pela crioterapia. A crioterapia por vitrificação em gotas mostrou frequência de 70% e 100% de erradicação dos vírus ASGV e ASPV, respectivamente. As elevadas taxas de erradicação de ASGV e ASPV demonstram que a crioterapia por vitrificação em gotas é uma ferramenta eficaz para a produção de material vegetativo de *Malus prunifolia* livre de vírus.

Palavras-chave: Criopreservação. *Malus prunifolia*. ASGV. ASPV. Mudas de qualidade.

ABSTRACT

SOUZA, Juliana Aparecida. **Cryotherapy by droplet vitrification in the eradication of viral species apple stem grooving virus and apple stem pitting virus in 'Marubakaido' apple tree rootstock.** 2019. 95 p. Dissertation (Master's Degree in Plant Production). Center of Agroveterinaries Sciences. Santa Catarina State University. Lages, 2019.

The apple represents the third most produced fruit in the world, behind only the production of banana and watermelon. In Brazil, production is concentrated in the Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Paraná states, with a production of approximately 1.2 million tons per year. Due to the climatic conditions of these areas, the apple tree is constantly susceptible to pathogens and pests. Viruses are among the major pathogens affecting apple production worldwide due to plant degeneration, especially since some of the major virus species have latent features, and thus do not induce prospect symptoms. Apple stem grooving virus (ASGV) and apple stem pitting virus (ASPV) are among the most frequent virus species to apple trees in productive areas and are known to cause negative impacts on fruit productivity and quality. There are spread only through infected propagative material and control only occurs through the planting of plant material free of pathogens of this etiology. Cryotherapy by droplet vitrification represents a technical to eradication of virus species in propagative materials. The objective of this work was to use the technique of droplet vitrification for the eradication of ASGV and ASPV viruses in plants of the Marubakaido apple tree rootstock. Marubakaido rootstock explants ASGV and ASPV infected were introduced in vitro for use in cryotherapy assays. After standardization of in vitro stock cultures of the Marubakaido rootstock, shoot tips with 1 mm (containing 2-3 leaf primordia) were excised, cultivated for one day on the basal medium (MB; MS salt formulation supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.25 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP) and 0.01 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) and 2.6 g L⁻¹ of Phytagel TM, pH 5.8) for stabilization, followed by pre-culture for one day on medium containing 2 M glycerol and 0.8 M sucrose, and plant vitrification solution 2 (PVS2) exposure by 0, 20, 40, 50, 60 and 80 min at 22°C. In an additional experiment, the PVS2 exposure of meristems at 0°C at the same exposure times mentioned above was tested. Two minutes before the end of each treatment, PVS2-treated shoot tips were placed into 5 µL PVS2 droplets on sterile aluminum foil strips, plunged into liquid nitrogen (LN) for 1 h and then thawed in unloading solution. Shoot tip survival and regrowth were recorded 4 and 8 weeks after cryotherapy treatment, respectively. Each experiment was performed with three replicates of 30 shoot tips for each treatment. The means were submitted to analysis of variance and compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$). Shoot tips exposed to PVS2 at 22°C followed by treatment in LN presented the highest survival rates (75 and 65%) and regrowth (53 and 58%) after 20 and 40 min PVS2 exposure, respectively. When the PVS2 exposure was at 0°C followed by treatment in LN, there was a considerable toxicity reduction caused by the vitrificant solution to shoot tips; survival and regrowth percentages were 48% and 23%, after 80 min of PVS2 exposure, respectively. The efficiency of cryotherapy for the eradication of ASGV and ASPV was determined in plants tried from the cryotherapy process and were kept in greenhouse for six months in ex vitro growth. Virus detection was performed using the reverse transcription method followed by the polymerase chain reaction (RT- PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction) for 20 randomly selected plants that underwent cryotherapy. The droplet vitrification cryotherapy showed 70% and 100% of eradication

frequency to ASGV and ASPV, respectively. The high rates of ASGV and ASPV eradication demonstrate that cryotherapy by droplet vitrification is an effective tool for the production of virus-free *Malus prunifolia* vegetative material.

Keywords: Criopreservation. *Malus prunifolia*. ASGV. ASPV. Quality seedlings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de um meristema em relação a porcentagem de regeneração e frequência de plantas livres de vírus.....	40
Figura 2 – Esquema representativo demonstrando os métodos e etapas utilizadas para a produção de plantas matrizes livres de vírus.....	41
Figura 3 – Esquema representativo da atuação do método de crioterapia na remoção de células vegetais infectadas por vírus.....	50
Figura 4 – Principais etapas do protocolo de crioterapia por vitrificação em gotas.....	57
Figura 5 – Efeito do tempo de exposição a solução vitrificante PVS2 mantidas em temperatura ambiente (22°C) na sobrevivência (A) e regeneração (B) de meristemas criopreservados (tratados em nitrogênio líquido) e controles (sem o tratamento em nitrogênio líquido) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido.....	67
Figura 6 – Efeito do tempo de exposição em solução vitrificante PVS2 mantidas com temperatura a 0°C para dados de sobrevivência e regeneração de culturas criopreservadas (tratadas em nitrogênio líquido) do porta-enxerto de macieira Marubakaido.....	68
Figura 7 – Detecção de ASGV (A) e ASPV (B) por RT-PCR a partir de plantas do porta-enxerto Marubakaido infectadas e tratadas pela técnica de crioterapia por vitrificação em gotas.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Erradicação de vírus por crioterapia em espécies de plantas.....	52
Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para detecção dos vírus de macieira ASGV e ASPV.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACLSV	Apple chlorotic leaf spot virus
AIB	Ácido indol-3-butírico
ApMV	Apple mosaic virus
ASGV	Apple stem grooving virus
ASPV	Apple stem pitting virus
BAP	6-Benzilaminopurina
BM	Meio basal
C-	Controle branco-negativo
C+	Controle geral positivo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CI	culturas estoque <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
nt	Nucleotídeo
-LN	Não exposto em nitrogênio líquido
+LN	Tratamento com nitrogênio líquido
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
NL	Nitrogênio líquido
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPV	Plum pox virus
PVS2	Solução de vitrificação de plantas número 2
PVS3	Solução de vitrificação de plantas número 3
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
>	Maior
±	Margem de erro
cm	Centímetro
g L ⁻¹	Gramas por litro
h dia ⁻¹	Horas por dia
h	Hora
L	Litro
M	Molar
m/v	massa por volume
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mMol m ⁻² s ⁻¹	Milimol por metro quadrado por segundo
mMol	Milimol
°C	Graus Celsius
s	Segundo
v/v	Volume por volume
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA MACIEIRA	29
2.2	PRINCIPAIS VIROSES QUE ACOMETEM A CULTURA DA MACIEIRA	30
2.2.1	Apple mosaic virus (ApMV).....	33
2.2.2	Apple stem pitting virus (ASPV)	35
2.2.3	Apple stem grooving virus (ASGV).....	36
2.2.4	Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV).....	37
2.3	FERRAMENTAS BIOTECNOLOGICAS PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL PROPAGATIVO LIVRE DE VÍRUS.....	38
2.3.1	Termoterapia.....	42
2.3.2	Cultura de meristemas.....	44
2.3.3	Quimioterapia	46
2.3.4	Crioterapia	48
2.4	PROTOCOLOS DE CRIOTERAPIA.....	54
2.4.1	Vitrificação em gotas	55
3	CRIOTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS NA ERRADICAÇÃO DAS ESPÉCIES VIRAIS <i>apple stem grooving virus</i> e <i>apple stem pitting virus</i> EM PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'..	59
3.1	RESUMO.....	59
3.2	INTRODUÇÃO	60
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	62
3.3.1	Material vegetal	62
3.3.2	Introdução dos materiais <i>in vitro</i> e manutenção das culturas estoque	62
3.3.3	Crioterapia por vitrificação em gotas	63
3.3.4	Avaliação da sobrevivência e regeneração	64
3.3.5	Enraizamento <i>in vitro</i> e aclimatização.....	64
3.3.6	Indexação por RT-PCR.....	65
3.4	RESULTADOS	66
3.4.1	Sobrevivência e regeneração de meristemas criopreservados pela técnica de vitrificação em gotas utilizando solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) a temperatura de 22°C	66
3.4.2	Sobrevivência e regeneração de meristemas criopreservados pela técnica de vitrificação em gotas utilizando solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) a temperatura de 0°C.	68
3.4.3	Efeito da crioterapia para erradicação viral	69

3.5	DISCUSSÃO	70
4	CONCLUSÃO	75
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região sul do Brasil possui as características climáticas ideais para a produção de fruteiras de clima temperado, entre as fruteiras, a macieira representa a quinta cultura mais produzida no país, responsável por 2,7% do volume de produção de frutas nacional (ANDRADE, 2017). Os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná são os maiores produtores, sendo Santa Catarina o estado que possui a maior representatividade quanto a produção (51%) e área de plantio (16.423 ha), seguido do Rio Grande do Sul (46%, 14.517 ha) e Paraná (2,5%, 1.503 ha) (ANDRADE, 2017; EPAGRI/CEPA, 2017; ABPM, 2018). A extensa área territorial e as condições climáticas distintas proporcionadas pelas regiões produtoras possibilitam que o Brasil assuma a décima colocação no ranking mundial de países produtores da fruta (KVITSCHAL; DENARDI, 2014; RECH; CARIO; AUGUSTO, 2014; EPAGRI/CEPA, 2017; ABPM, 2018).

A qualidade fitossanitária das plantas de macieira representa um dos principais obstáculos para a produção altamente rentável de maçã no mundo. Os vírus estão entre os patógenos que mais afetam e preocupam a cadeia produtiva da maçã. Os principais vírus que acometem plantações de *Malus* muitas vezes não induzem sintomas perceptíveis, levando a degenerescência tanto da longevidade quanto da qualidade de produção. As espécies de vírus mais nocivos e frequentes na pomicultura são apple chlorotic leaf spot vírus, apple stem pitting virus e apple stem grooving virus (NICKEL; FAJARDO, 2009; ARAUJO et al., 2016).

Os vírus podem ser facilmente transmitidos por propagação vegetativa. Em culturas perenes, a identificação, sobretudo em vírus que não apresentam sintomas perceptíveis, torna-se ainda mais difícil em decorrência do tardio aparecimento dos danos provocados pela infecção viral nas plantas. Dessa forma, para a implantação de um pomar é imprescindível a utilização de material propagativo de qualidade e livre de vírus (HADIDI; BARBA, 2011; WANG et al., 2016). Durante as últimas décadas, a frequência na identificação de doenças virais aumentou em todo o mundo e as espécies de vírus assintomáticos são as mais frequentes nas regiões produtoras de maçãs (NICKEL et al., 2001; SILVA et al., 2008; HADIDI; BARBA, 2011; PÜPOLA et al., 2011; JI et al., 2013).

De modo geral, os vírus além de diminuírem a produtividade e a qualidade dos frutos, provocam principalmente a redução da viabilidade do pomar e, as plantas

tornam-se mais susceptíveis a ataques de outros patógenos (GUERRA et al., 2012). Quando identificada a presença de vírus, não há medida de controle a ser adotada e a eliminação do vírus acontece somente mediante a eliminação total das plantas afetadas (SILVA et al., 2008; JI et al., 2013). Pesquisas que buscam ferramentas eficientes para a produção de plantas matrizes de boa qualidade fitossanitária têm sido mais frequentes nos últimos anos, com o intuito de desenvolver estratégias que facilitem a produção de material propagativo de boa qualidade, essencial para o sucesso na atividade agrícola (DE SOUZA et al., 2012; WANG et al., 2014; KAYA; GOKDOGAN, 2015; BETTONI et al., 2016).

A termoterapia e a cultura de meristemas são estratégias tradicionais que há muitos anos são utilizadas com o objetivo de produção de plantas livres de vírus (LAIMER; BARBA, 2011). Protocolos de termoterapia e cultura de meristemas normalmente são utilizados em associação; exigem elevados custos operacionais e de manutenção como consequência do longo tempo de tratamento das culturas. Para algumas espécies de vírus que acometem plantas de macieira, essas técnicas quando aplicadas isoladamente não produzem plantas livres de vírus, portanto tornam-se limitadas principalmente porque as infecções virais normalmente são mistas (WANG et al., 2018a; ZHAO et al., 2018). Tecnologias recentes para limpeza de vírus em material vegetal estão sendo estudadas afim de melhorar o desempenho na erradicação de espécies de vírus de difícil controle. A crioterapia tem se mostrado uma ferramenta interessante pela eficiência e o custo reduzido quando comparado com os métodos tradicionais (BETTONI et al., 2016). Protocolos de crioterapia demandam menos horas de trabalho e são mais práticos em relação a termoterapia e cultura de meristemas (WANG; VOLKNEM, 2009a; b; PATHIRANA et al., 2015; KAYA; GOKDOGAN, 2015; BETTONI et al., 2016; GAURAV et al., 2017).

A crioterapia tem potencial para se tornar uma técnica emergente principalmente porque baseia-se em protocolos de criopreservação. Atualmente, a ferramenta de criopreservação está disponível para as mais variadas espécies de plantas, incluindo a macieira (LI et al., 2015; VOLK; JENDEREK; CHAO, 2015; VOLK et al, 2015). Assim, protocolos de criopreservação podem ser otimizados de acordo com a espécie de interesse e aplicados para a erradicação de vírus (ENGELMANN, 2004; BENELLI et al., 2013; PATHIRANA et al., 2015; BI et al., 2017; 2018; BETTONI et al., 2018; BETTONI, 2018). O sucesso da crioterapia por protocolos de criopreservação na erradicação de vírus tem sido relatado em diferentes espécies de

plantas (PATHIRANA et al., 2015; BI et al., 2018; BETTONI et al., 2016; VIEIRA et al., 2015), incluindo *Malus* (LI et al., 2016; ROMADANOVA et al., 2016; BETTONI et al., 2018; 2019; ZHAO et al., 2018).

A crioterapia consiste no tratamento dos explantes em nitrogênio líquido (NL) (-196°C) por um curto período de tempo para remover seletivamente porção de células infectadas por vírus em virtude das diferenças fisi-anatômicas entre porção de células meristemáticas e tecidos adjacentes. Os vírus são seres intracelulares obrigatórios, agem de forma sistêmica no tecido vegetativo utilizando de constituintes celulares para a replicação e movimento, são irregularmente distribuídos dentro das plantas. Essas características variam de acordo com cada espécie, conforme a capacidade de virulência do isolado viral e da suscetibilidade do tecido afetado (NICKEL e FAJARDO, 2009; CRESTANI, 2018). Em áreas vegetativas do domo meristemático as porções celulares geralmente encontram-se livre de vírus em função das características distintas destas células, bem como, pela intensa divisão celular do tecido meristemático. Após a crioterapia as células sobreviventes se localizam no domo meristemático, região que não possui vascularização, ou seja, há o movimento viral, sendo então livre de vírus (BETTONI; SOUZA, 2018).

Quando os meristemas são tratados em NL, somente essas porções de células menos diferenciadas e que contém uma alta relação núcleo citoplasma e vacúolos pequenos são capazes de sobreviver. Assim, a crioterapia gera plantas matrizes com qualidade fitossanitária eliminando as células diferenciadas e infectadas enquanto uma porção de células sadias são regeneradas e produzem plantas livres de vírus (BRISON et al., 1997; WANG; VALKONEN, 2009a; PATHIRANA et al., 2015; VIEIRA et al., 2015; ZHAO et al., 2018).

Atualmente, a crioterapia é considerada uma técnica promissora para produção de plantas livres de vírus, pela eficiência na erradicação das mais variadas espécies de vírus e pela praticidade em executar os procedimentos em espaço de tempo reduzido (WANG; VALKONEN, 2009b).

A produção e manutenção de plantas matrizes com alta qualidade fitossanitária, principalmente em espécies propagadas vegetativamente, é necessário para o fornecimento de material vegetal sadio para a produção de mudas de qualidade, afim de garantir uma produção rentável e estável, além de limitar a disseminação de doenças virais (LAIMER; BARBA, 2011; PEREIRA-LORENZO et al., 2018; LI et al., 2016; WANG et al., 2016). O objetivo deste trabalho foi avaliar e validar a tecnologia

da crioterapia por vitrificação em gotas como ferramenta para erradicação dos vírus apple stem grooving virus e apple stem pitting virus em plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA MACIEIRA

A macieira está entre as principais fruteiras produzidas e consumidas no mundo, típica de clima temperado, sua produção sofre direta interferência das circunstâncias ambientais, sendo a planta dependente de baixas temperaturas para completarem seu ciclo fisiológico (VOLK et al., 2015). Os mais recentes levantamentos mundiais obtidos para a cultura da maçã registram uma produção global de 84.630 mil toneladas em uma área total de 5052 mil hectares. Os principais países que dominam a pomicultura mundial abrangem a China, Estados Unidos, Polônia, Índia e Turquia (EPAGRI/CEPA, 2017; FAO, 2018). Apesar de pomares brasileiros representarem apenas 1,38% da produção mundial, o país está classificado entre os dez maiores produtores, sendo que a produção nacional está fortemente concentrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (LAZZAROTTO, 2018).

O cultivo da macieira é caracterizado por representar uma atividade com relevante retorno econômico, isso por sua vez gera maior demanda por alternativas que visam buscar melhores desempenhos da pomicultura em regiões de plantio (AUGUSTIN; DA CRUZ, 2015). Este sucesso econômico está ligado principalmente aos avanços tecnológicos que ocorreram ao longo dos anos, mediante as inovações para otimizar sistemas de plantio, desenvolvimento de cultivares mais adaptadas as condições ambientais, além de melhorar a oferta de materiais propagativos com qualidade fitossanitária por meio do uso de técnicas biotecnológicas (PETRI et al., 2011; WANG et al., 2014; WANG et al., 2016; PEREIRA-LORENZO et al., 2018).

A produção comercial de mudas de macieiras muitas vezes esbarra em problemas fitossanitários que impactam negativamente na qualidade e na sanidade dos materiais a campo (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). Dentre eles, as viroses tem sido um dos grandes agentes do processo de degenerescência e baixa qualidade de frutos. O principal agravante é que muitas espécies de vírus não produzem sintomas visíveis, tornando o diagnóstico difícil e enganoso que muitas vezes acabam ficando despercebidas para presença de vírus, o que facilita ainda mais a disseminação dessas viroses em novos pomares de macieira (WANG et al., 2014; ROMADANOVA et al., 2016; GAURAV et al., 2017).

A obtenção de materiais com garantia genética e fitossanitária é importante para o estabelecimento e sucesso produtivo em pomares de maçã. Entretanto, em levantamentos realizados por Nickel et al. (2001) e, recentemente por Crestani (2018) foram observados que em pomares situados nas principais regiões produtoras de macieira do sul do Brasil haviam elevados índices de infecção por complexos virais, em especial espécies que normalmente são assintomáticas. Uma vez que o plantio é realizado com material propagativo contaminado, é impossível tomar medidas de controle, pois não existem procedimentos eficientes para a remoção do vírus em plantas já introduzidas a campo. O correto é utilizar técnicas de prevenção antes do plantio, ou a eliminação de plantas infectadas quando detectada a contaminação (NICKEL; FAJARDO, 2009). Assim, as plantas devem estar isentas de vírus como caráter preventivo (WANG et al., 2014; BETTONI et al., 2016; NICKEL; FAJARDO, 2011).

Os vírus, de modo geral, interferem no funcionamento celular comprometendo rotas metabólicas, utilizam constituintes das células do hospedeiro para replicação, tradução e movimento. Como resultado, ocorrem desordens nas células vegetais, tais como, alterações na expressão gênica, no acúmulo de proteínas e de hormônios e na atividade fotossintética (HULL, 2002). Embora, não haja informações detalhadas sobre os efeitos isolados de cada vírus, macieiras infectadas apresentam menor vigor (degenerescência), redução da produtividade e de qualidade dos frutos, além de estarem suscetíveis a ataques por outros agentes fitopatogênicos (GUERRA et al., 2012; HADIDI; BARBA, 2011; ROMADANOVA et al., 2016).

A remoção viral de materiais propagativos de macieira possui grande importância para a pomicultura. Essa preocupação atinge todos os setores envolvidos, uma vez que os danos às plantas geram prejuízos, tanto de produção como também na qualidade das maçãs, acarretando em perdas econômicas para a economia do setor agrícola (NICKEL; FAJARDO, 2011).

2.2 PRINCIPAIS VIROSES QUE ACOMETEM A CULTURA DA MACIEIRA

Os vírus em plantas são agentes intracelulares obrigatórios, que colonizam somente o interior de células vivas do hospedeiro, são facilmente transmissíveis por propagação vegetativa de forma generalizada e/ou disseminado por vetores que conseguem transmitir partículas virais de plantas infectadas para outras plantas que

se apresentavam sadias. Portanto, áreas livres desses agentes virais passam a tornar-se contaminadas por meio da introdução de materiais infectados e/ou disseminação descontrolada das espécies virais (HULL, 2002; PETRI et al., 2011; NICKEL; FAJARDO, 2014). No caso específico de viroses em macieira, até o presente não há registro da transmissão via vetores, desse modo a disseminação das espécies de vírus se da principalmente pela propagação vegetativa de materiais infectados (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

Em geral, quando há ocorrência de vírus em áreas de plantio, a infecção normalmente está associada a complexos virais, ou seja, quando o material é acometido por mais que uma espécie de vírus, sendo muito comum principalmente para espécies perenes, como é o caso da macieira (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; BETTONI et al., 2018; ZHAO et al., 2018).

Macieiras podem ser infectadas por mais de 12 tipos de espécies de vírus (BETTONI, 2018; VIVEK; MODGIL, 2018). Geralmente aparecem em infecção mista, fator que aumenta os efeitos dos distúrbios provocados durante o desenvolvimento vegetativo, uma vez que a diminuição no crescimento e a produtividade de plantas podem ser intensificados em consequência da presença de mais de uma espécie de vírus. Plantas infectadas por vírus ou complexos virais tornam-se mais propensas ao ataque de outros patógenos que afetam a qualidade do pomar além de tornar-las mais vulneráveis aos efeitos dos fatores adversos de estresses (SILVA et al., 2008; GUERRA et al., 2012; BRAKTA et al., 2015; FUCHS, 2016).

A identificação desses vírus em pomares de macieira pode ser determinada pela forma como eles se pronunciam nas plantas. Quando os vírus manifestam sintomas visíveis, em geral a diagnose torna-se mais fácil, uma vez que sendo reconhecido a presença de vírus em plantas de macieiras, estas podem facilmente ser eliminadas. No entanto, alguns dos principais vírus que afetam a macieira são classificados como latentes, ou seja, não há sintomas aparente, fator que muitas vezes dificultam no diagnóstico das plantas infectadas, e facilita a distribuição do material vegetativo contaminado, ou mesmo pela manutenção destas plantas infectadas que poderão ser doadoras de propágulos para formação de novos pomares (PETRI et al., 2011; WANG et al., 2014; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

Danos devido a incidência de vírus em pomares de macieiras são muitas vezes insidiosos, frequentemente despercebidos no momento da implantação do pomar, principalmente em espécies de vírus que não induzem sintomas perceptíveis em

cultivares e ou porta-enxertos de macieiras (NICKEL; FAJARDO, 2014; SOUZA et al., 2017). É consenso na literatura mundial que as viroses, especialmente em infecções mistas representam um importante obstáculo ao desenvolvimento sustentável da fruticultura, sobretudo em culturas perenes, como em macieiras (CIESLINKA; RUTKOWSKI, 2008).

Vários trabalhos relatam os efeitos das infecções virais em macieiras, em sua maioria, plantas acometidas pela presença de vírus apresentam diminuição gradativa da produtividade, diminuição da qualidade dos frutos e promovem deformidades durante o ciclo vegetativo (NICKEL; FAJARDO, 2014). Dentre os principais sintomas abordados destacam-se a incompatibilidade causada na enxertia, redução do tamanho e peso do fruto, em consequência, redução da produtividade e perdas dependendo do tipo de vírus e do cultivar, podendo variar de 15 – 50%, além de provocar o declínio e morte precoce das plantas (SILVA et al., 2008; HADIDI; BARBA, 2011; PEREIRA-LORENZO et al., 2018).

A presença de vírus assintomáticos em pomares de macieira geralmente é mais agravante por serem facilmente despercebidos durante a introdução da planta no pomar, o que possibilita a ampla disseminação. São vírus que se manifestam tarde com implicações pelo desenvolvimento irregular das plantas em formação e consequentemente manifestam desuniformidade no desenvolvimento produtivo do pomar, sendo frequentemente percebidos tarde (HADIDI; BARBA, 2011; BRAKTA et al., 2015; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

A ocorrência e as características dos vírus em plantas de interesse agronômico mudam frequentemente devido principalmente a instabilidade genética dos vírus; que são favorecidos em grande parte pela expansão territorial, ampla disponibilidade de plantas hospedeiras e estimulado pelos grandes avanços na estruturação agronômica que tem ocorrido ao longo dos anos, para gerar aumento na produção agroindustrial (KUMAR et al., 2014; HU et al., 2017).

A decorrência de moléstias causadas por vírus em plantas de maçã resulta na obrigação de medidas de controle que inicialmente dependem da identificação das doenças e seus efeitos sobre as plantas (SOUZA et al., 2017). O diagnóstico é o aspecto mais importante para o controle dos vírus em culturas perenes, a detecção precoce de vírus em plantas matrizes que serão fornecedoras de propágulos ou no material propagativo é uma condição necessária para garantir o controle e reduzir a disseminação de vírus nos pomares (SILVA et al., 2008; BARBA; ILARDI; PASQUINI,

2015). Muitas vezes os sintomas associados a doenças virais, especialmente por vírus que não induzem sintomas, são frequentemente confundidos com deficiências ou outros distúrbios, razão pela qual é difícil e incerto diagnosticar apenas com base em sintomas visuais para determinar a presença de certos vírus (FUCHS, 2016).

Entre os vírus já detectados em macieiras, o apple mosaic virus (ApMV), o apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem pitting virus (ASPV) e o apple stem grooving virus (ASGV) são os principais, tanto pela frequência nos pomares como pelos prejuízos que causam, sendo a maioria destas espécies de características latente ao hospedeiro (NICKEL et al., 2001).

2.2.1 Apple mosaic virus (ApMV)

O ApMV pertence ao gênero *Ilarvirus* (família *Bromoviridae*) e foi descrito em macieiras pela primeira vez em 1933 (GRIMOVÁ et al, 2016). O ApMV possui partículas isométricas de 25 a 26 nm, um genoma tripartitulado e quatro tipos de RNA (3544 nucleotídeos (nt), 2493 nt, 1.753 nt e 877 nt) e subunidades da capa protéica com massa molecular de cerca de 27 a 28,8 kDa (NICKEL, 2004). Representa uma das espécies de vírus que possui alta capacidade de infecção em plantas herbáceas e lenhosas. Plantas hospedeiras infectadas por este vírus incluem maçã (*Malus domestica L.*) (THOKCHOM et al., 2009), pêra (*Pyrus communis*) (PETRZIK, 2005), damasco (*Prunus armeniaca*) (PETRZIK, 2005), pêssego (*Prunus persica*) (GÜMÜS et al., 2007), cereja (*Prunus avium*) (GÜMÜS et al., 2007), ameixa (*Prunus domestica*) (PETRZIK, 2005), amêndoas (*Prunus amygdalus*) (SWEET, 1979), morango (*Fragaria spp.*) (TZANETAKIS; MARTIN, 2005), framboesa (*Rubus idaeus*) (MARTIN et al., 2013) amora (*Rubus occidentalis*) (MARTIN et al., 2013), groselha (*Rubus rubrum*) (MARTIN et al., 2013) e avelã (*Corylus avellana*) (ARAMBURU; ROVIRA, 1998).

A distribuição do vírus acontece em âmbito mundial, onde há presença de plantas hospedeiras. Frequentemente a presença do vírus em macieiras, está associada a infecções mistas com outros vírus também agressivos, em geral formando complexos com os vírus ACLSV, ASPV e/ou ASGV (PETRZIK; LENZ, 2011; PAUNOVIC; PASQUINI; BARBA, 2011).

As características sintomáticas relacionadas a presença do vírus em plantas de macieira são bastante variáveis, pois depende da estirpe do vírus, da espécie

hospedeira e do cultivar e fatores ambientais; especialmente temperaturas elevadas que podem interferir e até mesmo intensificar os sintomas característicos do vírus (GRIMOVÁ et. al., 2016; MATSUI et al., 2017). Estudos demonstram que os sintomas causados por ApMV em plantas de macieira são variáveis, ou seja, algumas espécies de macieira podem ser assintomáticas e outras sintomáticas, nesta última os sintomas são expressos principalmente nas folhas (SILVA et al., 2008; PAUNOVIC; PASQUINI; BARBA, 2011; GRIMOVÁ et al, 2016; MATSUI et al., 2017).

A presença do vírus ApMV em plantas induz a formação de manchas cloróticas irregulares que lembra formas de mosaico (PAUNOVIC; PASQUINI; BARBA, 2011). As manchas provocadas pela presença do vírus promovem redução do potencial fotossintético, tais sintomas podem ainda ser agravados conforme a incidência de calor e de radiação solar; em folhas sintomáticas ocorre a queda prematura, em alguns casos, estão presentes apenas em um número limitado de folhas distribuídas aleatoriamente nas plantas. Esses sintomas podem ser leves ou graves dependendo do nível de título viral ou da estirpe presente em plantas infectadas (SVOBODA et al., 2010; PAUNOVIC; PASQUINI; BARBA, 2011; KORKMAZ et al., 2013; GRIMOVÁ et al, 2016).

A transmissão e distribuição do vírus ApMV em plantas de macieira acontecem principalmente por intermédio de atividades agrícolas, por meio da propagação vegetativa via enxertia ou clonagem, prática essa muito comum em culturas propagadas vegetativamente; mesmo que ainda não esteja evidenciado a contaminação do vírus ApMV por outras maneiras em macieiras, existem trabalhos que comprovam a transmissão do vírus ApMV em plantas de ameixa (*Prunus spp*) via pólen (PETHYBRIDGE et al, 2002).

Apesar de haver poucos estudos sobre a propagação do vírus no campo, o que vem sendo observado por pesquisadores é um crescente aumento na presença desta espécie de vírus em pomares, isso pode inclusive ser explicado por meio de contaminações de vetores que ainda não estejam identificados (PETHYBRIDGE et al, 2002; MALIAUSKAITĖ, 2013; GRIMOVÁ et al, 2016; MATSUI et al., 2017).

2.2.2 Apple stem pitting virus (ASPV)

O ASPV pertence ao gênero *Foveavirus* (família *Betaflexividae*), é um vírus de ocorrência generalizada em todo o mundo. O ASPV é um vírus com partículas filamentosas e flexíveis, de 800 nm x 12 a 15 nm, seu genoma consiste de RNA de fita simples, senso positivo e 9.474 nucleotídeos, com massa molecular das subunidades da capa protéica estimada em cerca de 44 kDa (NICKEL, 2004). A maioria das infecções por ASPV ocorre de forma assintomática, portanto, é um vírus de difícil identificação, o que faz com que sua incidência aconteça de forma despercebida e com frequência ainda mais acentuada. O ASPV constantemente se apresenta estável nas culturas (MARTELLI; JELKMANN, 1998). O primeiro registro desta espécie de vírus foi em 1954 em plantas de *Malus sylvestris* na região centro-oeste dos Estados Unidos (LAIMER, 2010; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; BRAKTA et al., 2015).

O ASPV possui característica latente para as principais cultivares comerciais de maçãs, no entanto, provoca sintomas em espécies indicadoras ou suscetíveis (*Malus sylvestris*, *Prunus domestica*, *Chenopodium quinoa*, 'Virginia Crab'), do qual podem variar de discretos a severos, dependendo da suscetibilidade da planta hospedeira (CIENIEWICZ; FUCHS, 2016a; HU et al., 2017). A principal manifestação de ASPV quando há sintoma de infecção se caracteriza pela formação de depressões na estrutura do caule, geralmente ocorridas em culturas suscetíveis, prejudicando as funções do tecido vascular; outros sintomas descritos são decorrentes desta manifestação principal, induzindo a maturação antecipada e/ou promovem a queda dos frutos, além de gerar frutos com deformação e consequentemente a redução na produção do pomar; alguns autores citam a incompatibilidade de enxertia gerada entre determinadas espécies de maçãs quando contaminada por ASPV (SILVA et al., 2008; NICKEL; FAJARDO, 2009; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; CIENIEWICZ; FUCHS, 2016a). Infecções promovidas por ASPV podem causar nanismo em plantas de macieira e gerar danos de produtividade que chegam até 30% (FAJARDO; NICKEL, 2014; BRAKTA et al., 2015; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

O ASPV é um vírus que pode infectar uma ampla gama de hospedeiros (MARTELLI; JELKMANN, 1998; YAO et al., 2014; FAJARDO; NICKEL, 2014). Até o presente nenhum vetor capaz de transmissão do vírus foi relatado, sendo a principal

forma de transmissão por meio de propagação vegetativa (GAURAV et al., 2017; CIENIEWICZ; FUCHS, 2016a).

O ASPV é um dos principais agentes virais responsáveis por perdas econômicas substanciais na produção de maçãs e a única forma para o controle da doença acontece mediante a implantação de material propagativo isento do vírus. Normalmente a ocorrência desta espécie de vírus está associada a co-infecções com outras espécies de vírus assintomáticos como ASGV e ACLSV (SILVA et al., 2008; NICKEL; FAJARDO, 2009; HAO et al., 2016; HU et al.; 2017).

2.2.3 Apple stem grooving virus (ASGV)

O vírus ASGV possui ocorrência em todas as regiões produtoras e representa um dos principais vírus que afetam a pomicultura. O ASGV pertence ao gênero *Capillovirus* (família *Betaflexividae*), tem partículas filamentosas, flexíveis, com estrias transversais, de 600 a 700 nm de comprimento, que contêm um RNA genômico poliadenilado, de fita simples e senso positivo com 6496 nucleotídeos, excluída a extremidade não-codificante 3' poli (A) e as subunidades da capa protéica têm massa molecular de 27 kDa (NICKEL, 2004). Sua ocorrência tem sido descrita como vírus de características assintomáticas em produção comercial de maçã, com exceção para espécies sensíveis a infecção (LAIMER, 2010; WANG et al., 2010; DAR, 2013). Essa espécie de vírus costuma afetar plantas da família *Rosaceae*, especialmente as que pertencem aos gêneros *Malus* (incluindo a maioria dos cultivares comerciais, sem produzir nestas reações visualmente perceptíveis) *Pyrus*, *Prunus*, *Citrus* e plantas de kiwi (MASSART et al., 2011; DAR, 2013). Altos títulos virais ou a associação com outras espécies de vírus causam grandes danos em áreas produtivas (KUMAR et al., 2014; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; ROMADANOVA et al., 2016; FUCHS, 2016; ZHAO et al., 2018).

A primeira identificação do vírus ASGV em *Malus* se deu na década de 1960, nos Estados Unidos, em plantas de *Malus sylvestris* e 'Virginia Crab'; e até hoje são consideradas as principais espécies indicadoras para essa espécie de vírus por serem suscetíveis a presença de ASGV (LAIMER, 2010; DAR, 2013; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). A infecção afeta a maioria das espécies comerciais de macieira, no entanto, os sintomas são assintomáticos para vários genótipos hospedeiros (WANG et al., 2010).

Em plantas sensíveis a doença, os sintomas são caracterizados por gerar necrose na união da enxertia, em decorrência da necrose a degradação generalizada causa o declínio e morte de plantas. Em espécies indicadoras como *Malus micromalus* (SILVA et al., 2008), *Malus yunnanensis* (HOWELL; MINK, 1996) e *Malus tschonoskii* (HOWELL; MINK, 1996), os sintomas são facilmente observados expressando rapidamente as características da presença do vírus, por meio de clorose ou necrose foliar (HOWELL; MINK, 1996; NICKELE; FAJARDO, 2009; FUCHS, 2016; ARAUJO et al., 2016)

A transmissão acontece apenas por material propagativo infectado (WANG et al., 2010). A única forma eficiente e prática de controle do vírus em plantas é por meio da utilização de material propagativo livre de vírus (NICKELE; FAJARDO, 2011). A presença do ASGV em áreas de produção acarreta na redução da produtividade e na diminuição da qualidade dos frutos, além de aumentar a suscetibilidade à infecção por outros patógenos (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; ROMADANOVA et al., 2016; FUCHS, 2016).

2.2.4 Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

Na macieira o ACLSV foi isolado pela primeira vez em 1959, nos Estados Unidos, em plantas da espécie *Malus platycarpa* (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). O ACLSV pertencente ao gênero *Trichovirus* (família *Betaflexividae*), possui partículas filamentosas e flexíveis de 720 x 12 nm, contendo subunidades da capa protéica com massa molecular de cerca de 22 kDa que encapsidam um RNA genômico de fita simples, senso positivo com 7555 nucleotídeos de comprimento, excluindo a extremidade não-codificante 3' poli (A) (NICKELE, 2004). O ACLSV é uma das espécies de vírus que causa danos a várias famílias botânicas em todas as partes do mundo, afeta praticamente todas as espécies dentro da família *Rosaceae*, incluindo plantas de macieira (LESSA, 1998; NICKELE, 2004; NICKELE; FAJARDO, 2009; CIENIEWICZ; FUCHS, 2016b).

Algumas plantas são indicadoras para ACLSV, como plantas de *Prunus armeniaca* 'A 863', *Prunus domestica* 'GF 707', *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Malus domestica* 'R12740.A', *Pyronia veitchii*, *Malus platycarpa*, *Malus prunifolia* 'Mo84', *Malus communis*, *Malus domestica* 'LL-S5', *Malus adstringens* 'Hopa', *Malus domestica* 'Spy 227' (NICKELE; FAJARDO, 2009). O ACLSV, quando

presente em pomares de maçã, manifesta os sintomas somente em porta-enxerto sensível e costuma ser latente nas copas, o que tende a dificultar a identificação viral (LESSA, 1998; NICKEL, 2004; NICKEL; FAJARDO, 2009; ARAUJO et al., 2016; CIENIEWICZ; FUCHS, 2016b). Em espécies de plantas susceptíveis, o ACLSV pode provocar sintomas aparentes somente com a percepção a longo prazo (CIENIEWICZ; FUCHS, 2016b). São sintomas comuns a incompatibilidade de enxertia entre algumas combinações de copa e porta-enxerto, crescimento anormal de ramos, manchas amarelas nas folhas e/ou necrose, deformidades foliares, acarretando principalmente redução de produtividade e declínio das plantas (LESSA, 1998; NICKEL; NICKEL, 2004; FAJARDO, 2009; CIENIEWICZ; FUCHS, 2016b; ARAUJO et al., 2016; FUCHS, 2016).

O ACLSV, até o presente, não há relatos de disseminação via vetores, sendo principalmente distribuído por meio do uso de materiais propagativos contaminados (WANG et al., 2010; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; FUCHS, 2016).

2.3 FERRAMENTAS BIOTECNOLOGICAS PARA A PRODUÇÃO DE MATERIAL PROPAGATIVO LIVRE DE VÍRUS.

As doenças de etiologia viral representam um dos maiores desafios para a fruticultura mundial e estão relacionadas com reduções de produtividade e qualidade dos frutos. Assim, é primordial que plantas matrizes estejam isentas de doenças dessa etiologia para o fornecimento de material propagativo de boa qualidade fitossanitária. Como já relatado anteriormente, a disseminação de viroses em macieira se dá principalmente por meio de material infectado tendo em vista que até agora não há registro de transmissão por vetores (WANG et al., 2014; GAURAV et al., 2017). Por meio de ferramentas biotecnológicas é possível erradicar doenças de etiologia viral. O investimento em pesquisas que visam a produção de plantas base de qualidade devem ser mantidas em conjunto com outros parâmetros de controle, como por meio de implementação de legislações rigorosas para a fiscalização de viveiros para a oferta de material propagativo certificado com comprovação genética e garantia de boa qualidade fitossanitária (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; WANG et al., 2016; BETTONI, 2018).

O tema “material propagativo de qualidade” gera discussões e debates há muitos anos e teve início na década de 60 onde a União Europeia emitia procedimentos a serem seguidos exigindo os requisitos fitossanitários necessários a fim de atender a padrões de qualidade para culturas frutíferas que são propagadas vegetativamente (WANG et al., 2018b). Após quatro décadas, esse tema ainda continua atual e é considerado um fator limitante para a produção rentável em culturas propagadas vegetativamente (PREVIATI et al., 2008; REED; FOSTER, 2011; WANG et al., 2011; VIEIRA et al., 2015; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; WANG et al., 2018a; b).

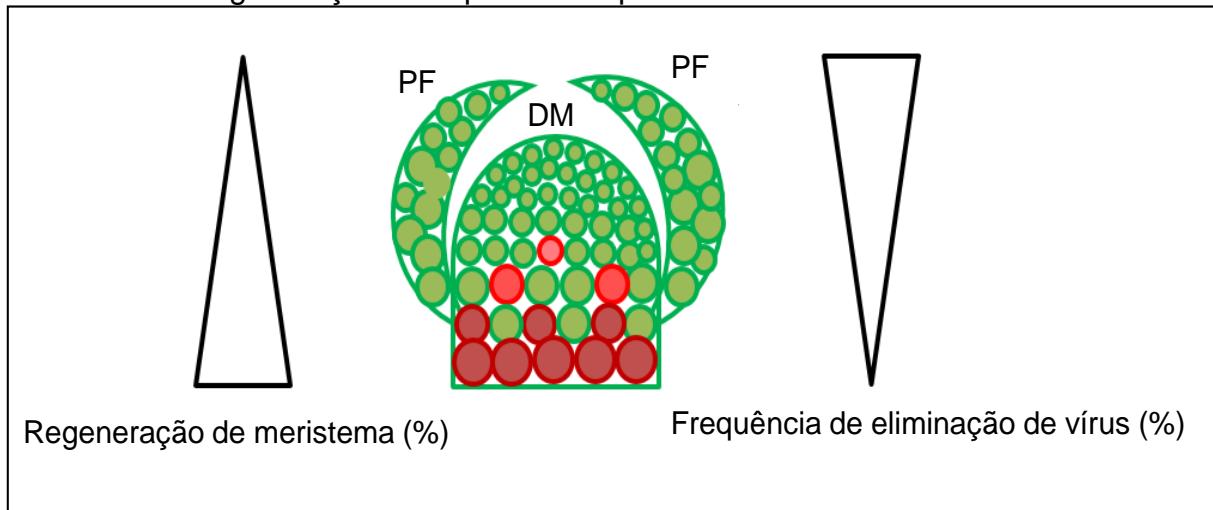
A principal maneira de controlar as doenças de etiologia viral se da por meio da seleção inicial de plantas matrizas que serão fornecedoras de propágulos para a formação de mudas, ou seja, o controle mais efetivo é preventivo, por meio do plantio de material livre de vírus. A partir do momento que o pomar é plantado com mudas infectadas com vírus o único controle é por meio da erradicação (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

Métodos biotecnológicos vêm sendo usados como estratégias para a obtenção de plantas livres de vírus. Por meio de técnicas de cultura de tecidos *in vitro* é possível a produção de plantas livres de vírus (WANG et al., 2014; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; VIEIRA et al., 2015; BETTONI et al., 2016; BETTONI; SOUZA, 2018). Independente da técnica utilizada, a erradicação de vírus nas plantas é baseada na distribuição desigual que os vírus ocorrem nas plantas, assim muitas técnicas se beneficiam dessas características (WANG; VALKONEN, 2009a).

Em geral, plantas possuem a região meristemática livre de vírus e a medida que os tecidos se distanciam do domo meristemático maior é a concentração viral em plantas infectadas, assim as técnicas aplicadas buscam preservar essas porções de células visando a regeneração dessa porção de células para a formação de uma planta livre de vírus (KAYA; GOKDOGAN, 2015; WANG et al., 2018b). Na Figura 1, essa assertiva é muito bem apresentada; é possível verificar que o título viral é maior conforme aumenta a distância dos demais tecidos em relação ao domo meristemático (WANG et al., 2018a). Portanto, nesse esquema proposto por Wang et al. (2018a) a erradicação do vírus está relacionada ao tamanho da estrutura meristemática que permanece viável após a técnica ser aplicada, ou mesmo, ao nível de regeneração obtidos durante os procedimentos. Os triângulos representam a relação da porcentagem de regeneração dos meristemas e a frequência de eliminação de vírus.

Baixas taxas de regeneração, representadas pelo ápice do triângulo, podem representar um sucesso na obtenção de plantas livres de vírus, quando que inversamente, alta porcentagem de regeneração das plantas, representadas pela base do triângulo, pode não representar a erradicação viral (Figura 1). Essa característica normalmente define o sucesso da técnica de cultura de meristemas, onde a dimensão do meristema excisado é proporcional a erradicação de vírus e inversamente proporcional a taxa de regeneração (FACCIOLI; MARANI, 1998; CUI et al., 2015; WANG et al., 2018a).

Figura 1 – Representação esquemática de um meristema em relação a porcentagem de regeneração e frequência de plantas livres de vírus.



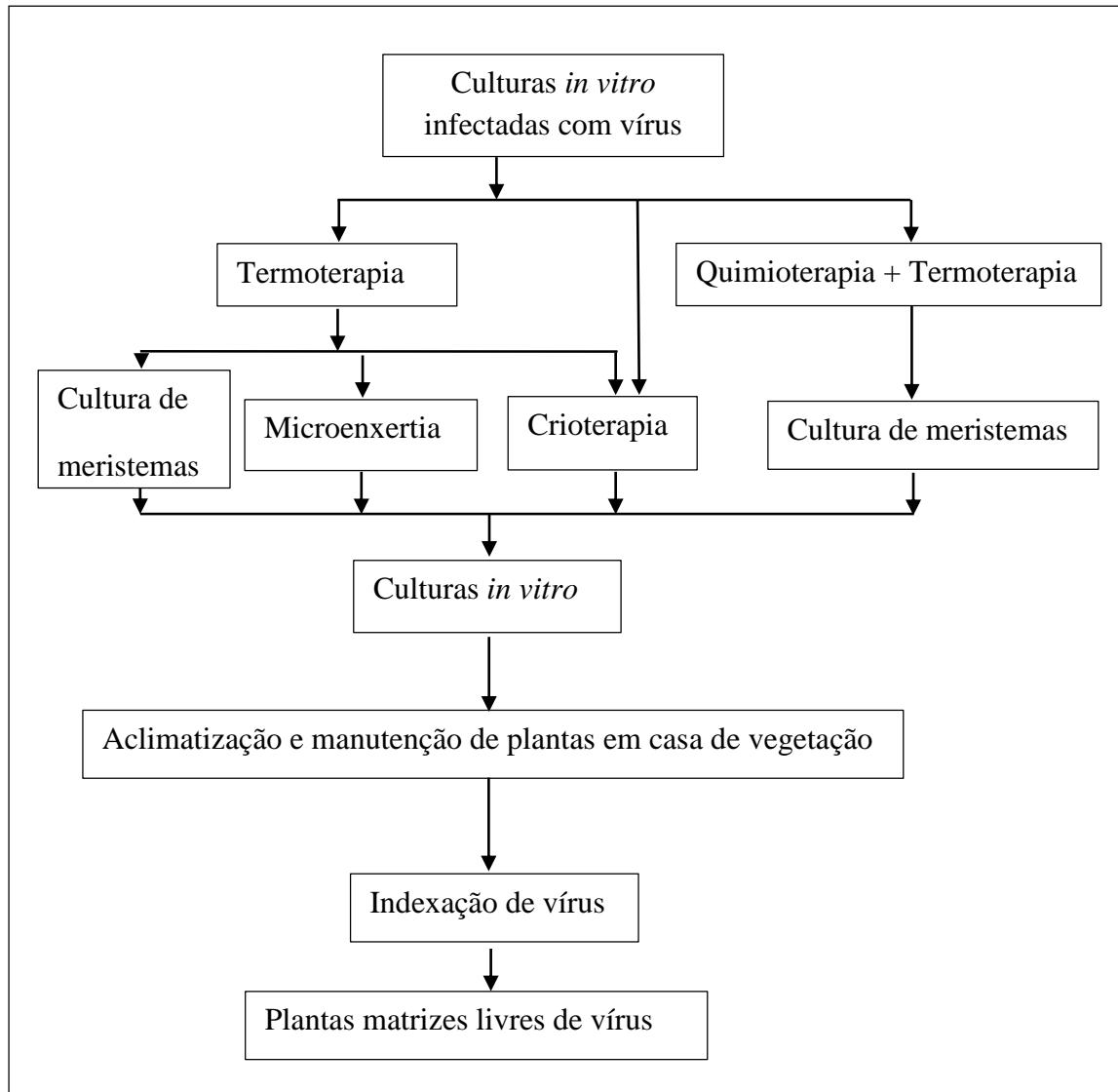
Fonte: Wang et al. (2018a).

PF, primórdio foliar; DM, domo meristemático. Círculos verdes são representados por células livres de vírus enquanto os vermelhos são células infectadas por vírus. Triângulos representam a relação entre a taxa de regeneração e a frequência de eliminação de vírus.

Atualmente, duas principais técnicas são utilizadas a nível comercial. A cultura de meristemas e termoterapia, ou a associação de ambas. Essa combinação, especialmente para espécies lenhosas, é utilizada com mais frequência (WANG et al., 2018b; ZHAO et al., 2018). Recentemente, outras técnicas têm sido investigadas, e trabalhos como a quimioterapia e a crioterapia estão sendo amplamente estudadas com o interesse em simplificar os métodos para remoção de vírus (HU et al., 2012; WANG et al., 2014; VIEIRA et al., 2015; HU et al., 2015; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015; LI et al., 2016; BETTONI et al., 2018).

Na Figura 2 são apresentados os principais métodos utilizados para erradicação de vírus em plantas.

Figura 2 – Esquema representativo demonstrando os métodos e etapas utilizadas para a produção de plantas matrizes livres de vírus.



Fonte: Adaptada de Wang et al. (2018a)

Independentemente do método utilizado para erradicação de vírus é fundamental que plantas que passaram pela terapia sejam monitoradas por um tempo considerável para evitar problema de ocorrência de falsos negativos. Isso normalmente ocorre em diagnoses precoces, que são realizadas logo após a aplicação da terapia, nesse caso pode ocorrer a redução do título de vírus, mas não a erradicação do vírus; dessa forma, para maior confiabilidade, as plantas que passaram pela terapia devem ser mantidas por um tempo mínimo de 6 a 10 meses em pleno crescimento em casa de vegetação para monitoramento das possíveis infecções residuais de vírus em plantas matrizes (BETTONI, 2018; WANG et al., 2018a).

O desenvolvimento constante de métodos que busquem protocolos mais práticos e eficientes para a obtenção de plantas livres de vírus é fundamental e, aprimoramento de técnicas têm sido observados com frequência. Atualmente as técnicas de termoterapia, cultura de meristemas, quimioterapia e crioterapia são as técnicas biotecnológicas mais utilizadas para limpeza de vírus em materiais propagativos. Neste cenário atual, a crioterapia vem se destacando como uma eficiente alternativa para a eliminação de vírus em espécies de plantas (BETTONI; SOUZA, 2018). A seguir são descritas as principais técnicas utilizadas para erradicação de vírus em plantas.

2.3.1 Termoterapia

Desde o final dos anos cinquenta a termoterapia surge como medida de controle desenvolvida a fim de remover vírus em plantas frutíferas (LAIMER; BARBA, 2011). A termoterapia consiste em submeter plantas infectadas por vírus que estejam acondicionadas em vasos ou *in vitro*, a temperatura constante entre 35 e 38°C, por um período que varia em relação ao tipo de vírus, condição de tratamento e a espécie trabalhada (LAIMER; BARBA, 2011). A combinação da temperatura e do tempo de tratamento inibem a replicação viral e o movimento do vírus em direção às células meristemáticas, diminuindo o título viral em plantas infectadas, como consequência as brotações apicais e laterais novas, que surgem após o tratamento, possuem alta probabilidade de estarem livres de vírus (LAIMER; BARBA, 2011; HU et al., 2012; LIU et al., 2015; HU et al., 2015; WANG et al., 2018a).

O sucesso da termoterapia depende da duração do tratamento térmico e da resistência que as plantas irão possuir à altas temperaturas. Temperaturas elevadas em plantas, induzem estresses fisiológicos que se intensificam conforme aumentado o tempo de exposição (LAIMER; BARBA, 2011; WANG et al., 2018a).

Geralmente temperatura mais elevada em um período prolongado é útil para a eliminação de vírus, porém, cada espécie e/ou tipo de vírus demanda uma variação no processo de limpeza viral em condições de altas temperaturas, ou seja, o tempo de tratamento é variável, conforme a especificidade exigida pelo vírus; de modo geral, ACLSV e ApMV são mais termossensíveis em relação a ASGV, portanto esses dois são mais facilmente erradicados com a termoterapia. Estudos relatam que o vírus ASGV é menos termossensível, dessa forma a erradicação do ASGV depende de um

período mais prolongado de tratamento (WANG et al., 2010; LAIMER; BARBA, 2011; HU et al., 2012; WANG et al., 2018a).

Trabalhos demonstram resultados interessantes quando as ferramentas de termoterapia e cultura de meristemas foram utilizadas em associação (WANG et al., 2006; PAPRSTEIN et al., 2008; TAN et al., 2010; VIVEK; MODGIL, 2018). Muitas vezes esses êxitos estão relacionados às plantas contaminadas com somente uma espécie viral, no entanto, materiais contaminados, especificamente em plantas perenes como a macieira, dificilmente apenas um vírus está presente, o que se encontram são infecções múltiplas onde dois ou mais vírus estão presentes, nesses casos essas técnicas quando aplicadas individualmente mostram-se ineficientes e, portanto, limitantes (WANG et al., 2018a). Nesse sentido, faz-se necessário a associação dessas duas técnicas, a termoterapia e a cultura de meristemas, onde que após o tratamento térmico a região livre de vírus no meristema é maior, em decorrência da diminuição da replicação viral e movimento, em consequência maior facilidade de excisão dessa região pela técnica de cultura de meristemas (TAN et al., 2010; LAIMER; BARBA, 2011; HU et al., 2015; WANG et al., 2018a; VIVEK; MODGIL, 2018).

Resultados que caracterizam essa assertiva puderam ser observados por Vivek e Modgil (2018) em macieiras do cultivar 'Oregon Spur-II' contaminadas pelos vírus ACLSV, ApMV, ASGV e ASPV. A associação das técnicas resultou na erradicação da infecção mista, entretanto, quando meristemas foram excisados com 0,5 - 0,6 mm, mesmo em associação com termoterapia, plantas do cultivar 'Oregon Spur-II' ainda estavam infectadas por ACLSV; dessa forma, é evidente que a dimensão do tecido excisado é um fator limitante para a produção de plantas livres de vírus.

A termoterapia seguida de cultura de meristemas foi até hoje o método mais usado para erradicação do vírus de plantas, especialmente para espécies lenhosas como a macieira. Paprstein et al. (2008), no entanto, trabalhando com 4 clones de macieira do cultivar Sampion e 6 clones do cultivar de macieira Idared, contaminados com infecção mista de ACLSV, ASGV e ASPV observaram que após a termoterapia poucas plantas sobreviveram e as que formaram parte aérea do cultivar Sampion estavam todas contaminadas, enquanto que 1 entre os 6 clones do cultivar Idared avaliados estava livre da infecção mista. Além do sucesso limitado na erradicação de infecções virais mistas, a redução da taxa de regeneração pode ser relacionada à termossensibilidade de algumas espécies de plantas (WANG et al., 2018a).

A termoterapia combinada com a quimioterapia também está sendo aplicada afim de aumentar a eficiência na erradicação de vírus em plantas; nesta combinação, culturas *in vitro* infectadas são cultivadas em um meio contendo um agente químico antiviral (ribavirina) e, em seguida, submetidos a tratamentos térmicos e coleta dos ápices e regeneração das culturas, sendo que a ordem de tratamento pode ser variável entre quimioterapia e termoterapia (LAIMER; BARBA, 2011; HU et al., 2012; 2015). Utilizando a combinação de termoterapia e quimioterapia, Hu et al. (2015), alcançaram uma eficiência de 95% de erradicação da infecção mista de ASPV, ACLSV e ASGV.

Recentemente a técnica de termoterapia está sendo testada em associação com técnicas de crioterapia para melhorar a frequência de eliminação de vírus, especialmente em espécie de vírus considerado de difícil controle. Em macieira, Zhao et al. (2018) relataram o sucesso dessa combinação para erradicação do vírus ASGV em plantas de macieira; de acordo com os autores quando a crioterapia foi utilizada isolada não foi possível a erradicação de ASGV, sendo necessária a utilização da combinação de técnicas para produção de plantas livres de ASGV (ZHAO et al., 2018).

2.3.2 Cultura de meristemas

A aplicação de métodos de cultura de tecidos para a eliminação das infecções virais em plantas de interesse foi relatada com sucesso pela primeira vez nos anos de 1952 (LAIMER; BARBA, 2011). Em espécies frutíferas lenhosas, as primeiras tentativas em eliminar vírus com o uso da cultura de meristemas foram em 1983, embora já houvessem estudos anteriores envolvendo a multiplicação *in vitro* com outras espécies de plantas de origem herbácea (SIM; GOLINO, 2010; ISAC et al., 2010; LAIMER; BARBA, 2011). A partir desses trabalhos iniciais desenvolveram-se uma série de pesquisas buscando a remoção viral em espécies de interesse por meio da cultura de tecidos (LAIMER; BARBA, 2011; NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014; LI et al., 2016; WANG et al., 2016).

Em muitos casos, os vírus não possuem capacidade de invadir o meristema vegetal, várias teorias buscam explicar essa afirmação; até o presente momento, a mais aceita, é decorrente da baixa formação vascular e, portanto, pouco fluxo de seiva, essa característica impede que grande parte dos vírus invadam o tecido meristemático (LAIMER; BARBA, 2011).

O meristema é um tecido ainda não diferenciado com aproximadamente 0,15 a 0,20 mm de diâmetro, quando aplicada a cultura de meristemas, em condições assépticas, essa porção de tecido é removida da planta com o auxílio de uma lupa e inoculada em meio de cultura próprio para a regeneração, permitindo a propagação clonal e o desenvolvimento de uma nova planta (NICKEL; FAJARDO, 2009; YIN et al., 2011; WANG et al., 2014).

O método de cultura de meristema é geralmente o mais empregado para erradicação de vírus em plantas para fins comerciais e, apesar de relatos positivos dessa técnica para a produção de plantas livres de vírus, frequentemente está associado a outros métodos de limpeza viral, como relatado na seção anterior (NICKEL; FAJARDO, 2009; ISAC et al., 2010; NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014; LIZÁRRAGA; ASCASÍBAR; GONZÁLEZ, 2017; WANG et al., 2018a). Nos procedimentos de cultura de meristemas, a frequência de plantas livres de vírus é inversamente proporcional à dimensão do meristema excisado, enquanto que a habilidade de uma planta regenerar é proporcional ao tamanho do tecido excisado (Figura 1). Dessa forma, para obter êxito em protocolos de cultura de meristemas a excisão deve ser “cirúrgica”, compreendendo somente a região livre de vírus, para a maioria das espécies recomenda-se a excisão de tecidos minúsculos, que variam de 0,1 – 0,3 mm, essa dimensão inclui somente a região do domo meristemático e alguns primórdios foliares iniciais (ISAC et al., 2010; LAIMER; BARBA, 2011; YAMAGA; MUNAKATA, 1991).

Uma estratégia que pode ser utilizada vizando a otimização de protocolos de cultura de meristema é a realização do procedimento de retirada dos meristemas por mais de uma vez em uma mesma cultura *in vitro*, ou seja, após realizar o primeiro cultivo de meristemas excisados deve-se realizar uma nova aplicação da técnica, dessa forma, o título viral irá reduzir entre os subcultivos (ISAC et al., 2010).

A excisão de tecidos minúsculos torna o processo dificultoso, necessitando de pessoas treinadas para executar o procedimento; por algum descuido lesões podem ser feitas nos tecidos e assim inviabilizar a regeneração do material; além da dificuldade de excisão, esses tecidos quando minúsculos podem não ter capacidade para regenerar, isso foi observado por Li et al. (2016) em porta-enxertos de *Malus* M9 e M26, infectados por ASPV e ASGV, meristemas com 0,2 mm morreram após a excisão, quando excisados com 1 mm praticamente todo o material regenerou, porém culturas permaneceram contaminados pela infecção mista. Em culturas de videira,

Wang et al. (2003) trabalhando com a cultivar Bruti, contaminada por grapevine virus A (GVA), observaram elevada sobrevivência quando os meristemas foram excisados com 0,2 mm, no entanto somente 12% são capazes de regenerar, sendo que quando os meristemas foram excisados com 0,4 mm, apesar do aumento da frequência de regeneração, todas as plantas permaneceram contamindas por GVA. Dessa forma, além da dificuldade de excisão de tecidos minúsculos, após a técnica a porcentagem de regeneração muitas vezes pode ser baixa em decorrência da pequena porção de tecido excisado e, principalmente, baixa taxa de erradicação de vírus pode ser encontrada (YAMAGA; MUNAKATA, 1991; FACCIOLO, 2001; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013; BETTONI et al., 2016).

2.3.3 Quimioterapia

A quimioterapia é uma técnica relativamente nova comparado as técnicas tradicionais de cultura de meristemas e termoterapia; busca limitar a replicação de vírus em plantas mediante o uso de compostos antivirais. As aplicações de compostos antivirais para erradicação de vírus em plantas são baseadas em estudos prévios realizados pela medicina clínica, do qual, serviu como base para estabelecer a aplicação desses compostos para o campo botânico (KUMMER; SEMAL, 1970).

Estudos com quimioterapia em plantas tiveram início nas décadas de 70 e 80, com trabalhos que relataram a possibilidade de remoção de espécies de vírus usando componentes antivirais (PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). Embora há relatos do sucesso do uso de produtos antivirais para a erradicação de vírus em plantas, essa estratégia tem sido considerada ainda incerta, pela exigência de maiores estudos sobre os efeitos nas plantas (SINGH; KOCHÉ; QURAISHI, 2018; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013; LAIMER; BARBA, 2011).

Protocolos de quimioterapia utilizam componentes químicos que inibem a replicação dos vírus; estes compostos antivirais podem ser pulverizados diretamente na cultura infectada ou então adicionados juntamente com o meio nutritivo onde a planta será introduzida no processo de cultura de tecido (NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014); esses agentes serão absorvidos pelas plantas durante o desenvolvimento *in vitro* e em sequência ocorre a inibição da replicação viral (PARKER, 2004; JAMES et al., 2010; NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014). Não há ainda grandes avanços em pesquisas para remoção de vírus utilizando a

quimioterapia, em comparação com as técnicas mencionadas anteriormente de termoterapia e cultura de meristemas, entretanto, os procedimentos quimeoterapicos são descritos como promessas para obtenção de material livre de vírus (NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014; HU et al., 2012).

Dentre os compostos antivirais mais utilizados em procedimentos de quimioterapia está o agente antiviral virosole ou ribavirina, esse agente químico é também indicado para o tratamento de hepatite C em humanos (PARKER, 2004). Em ensaios de quimioterapia as plantas são cultivadas em meio de cultura suplementado com antivirais nas concentrações que variam de $10 - 20 \mu\text{g mL}^{-1}$ por um período de cultivo variável, estando relacionado com a cultura em questão (PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). Frequentemente a ribavirina é citada como um composto antiviral eficaz para a erradicação de vírus em plantas; até o presente, esse sucesso foi relatado em aproximadamente nove famílias botânicas, dentre elas para espécies de *Malus* (JAMES et al., 1997; FACCIOLO, 2001; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013; NEELAMATHI; MANUEL; GEORGE, 2014; HU et al., 2015; SINGH; KOCHÉ; QURAISHI, 2018).

Em macieira, James et al. (1997) relataram a eficiência da quimioterapia para erradicação de ASGV em *Malus domestica*, utilizando a combinação de dois compostos antivirias, a queracetina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a ribavirina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) onde as culturas de macieira foram cultivadas por 12 semanas em meio contendo os compostos antivirais. Em plantas de pereira, cultivares Alexander Lucas, Bohemica, Elektra e Rote Williams, a quimioterapia foi eficiente na erradicação de ASPV (SEDLAK; PAPRSTEIN; TALACKO, 2011); as culturas foram cultivadas por quatro semanas em meio suplementado com ribavirina na concentração de 20 mg L^{-1} , após esse período os ápices das culturas foram inoculadas em meio de regeneração, com esse procedimento os autores observaram uma taxa de erradicação de ASPV variando de 73,7% a 90% (SEDLAK; PAPRSTEIN; TALACKO, 2011).

Trabalhos mais recentes também demonstram a eficiência de protocolos de quimioterapia em combinação com outras técnicas na eliminação de infecções múltiplas dos vírus ACLSV, ASGV e ASPV em plantas de macieira, por meio de associação com a termoterapia (CIEŚLIŃSKA, 2007; HU et al., 2015) ou a crioterapia (ŞEKER et al., 2015; KUSHNARENKO et al., 2017).

Concentrações adequadas para cada cultivar são o ponto chave para o sucesso de protocolos de quimioterapia, quando a concentração não é adequada para o

tratamento pode ser ineficiente na limpeza viral (LAIMER; BARBA, 2011; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). No entanto, o efeito positivo em resposta ao tratamento para a eliminação dos vírus em plantas pode ocasionalmente gerar redução no desenvolvimento das plantas e clorose acarretada pela fitotoxicidez (PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013; WANG et al., 2018b). Em adicional, existe ainda uma ampla discussão sobre os efeitos que os compostos antivirais podem causar sobre as características genéticas das plantas, no entanto, até o presente momento não há um embasamento contundente para esses efeitos adversos (PARKER, 2005; CIEŚLIŃSKA, 2007; JAMES et al., 2010; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015).

Determinados grupos quimioterápicos além da alta fitotoxicidade podem ocasionar variação somaclonal, o que faz com que a técnica de quimioterapia ainda seja bastante questionada quanto sua aplicação em larga escala e os riscos que podem surgir com a inclusão desses agentes químicos (PARKER, 2005; LAIMER; BARBA, 2011; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). Entretanto, até o presente, os resultados encontrados são promissores quanto a remoção viral em plantas, porém exigem maiores estudos (PARKER, 2005; KUSHNARENKO et al., 2017; HU et al., 2015).

2.3.4 Crioterapia

Resultados de décadas de pesquisas demonstram que a crioterapia muitas vezes é mais eficiente que os métodos tradicionais de termoterapia e cultura de meristemas para erradicar vírus em plantas, tanto na frequência de produção de plantas livres de vírus quanto nos protocolos mais rápidos e práticos (CUI et al., 2015; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). A primeira evidência do uso de criogenia para erradicação de vírus foi descrita por Brison et al. (1997), em porta-enxerto de *Prunus*. O estudo constatou a eliminação do plum pox virus (PPV), com uma frequência de 50% de plantas livres de vírus.

A crioterapia além de apresentar elevada frequência de plantas livres de vírus, é uma técnica relativamente fácil de ser executada depois de estabelecido o protocolo. Possui baixo custo operacional, uma vez que não há necessidade de grandes investimentos com equipamentos presentes em um laboratório normal de cultura de tecidos. Demanda menores esforços operacionais para as práticas laboratoriais, o que

proporciona agilidade para tratar um grande número de amostras ao mesmo tempo (WANG et al., 2009; WANG et al., 2014; BETTONI et al., 2016; BI et al., 2018; BETTONI et al., 2019).

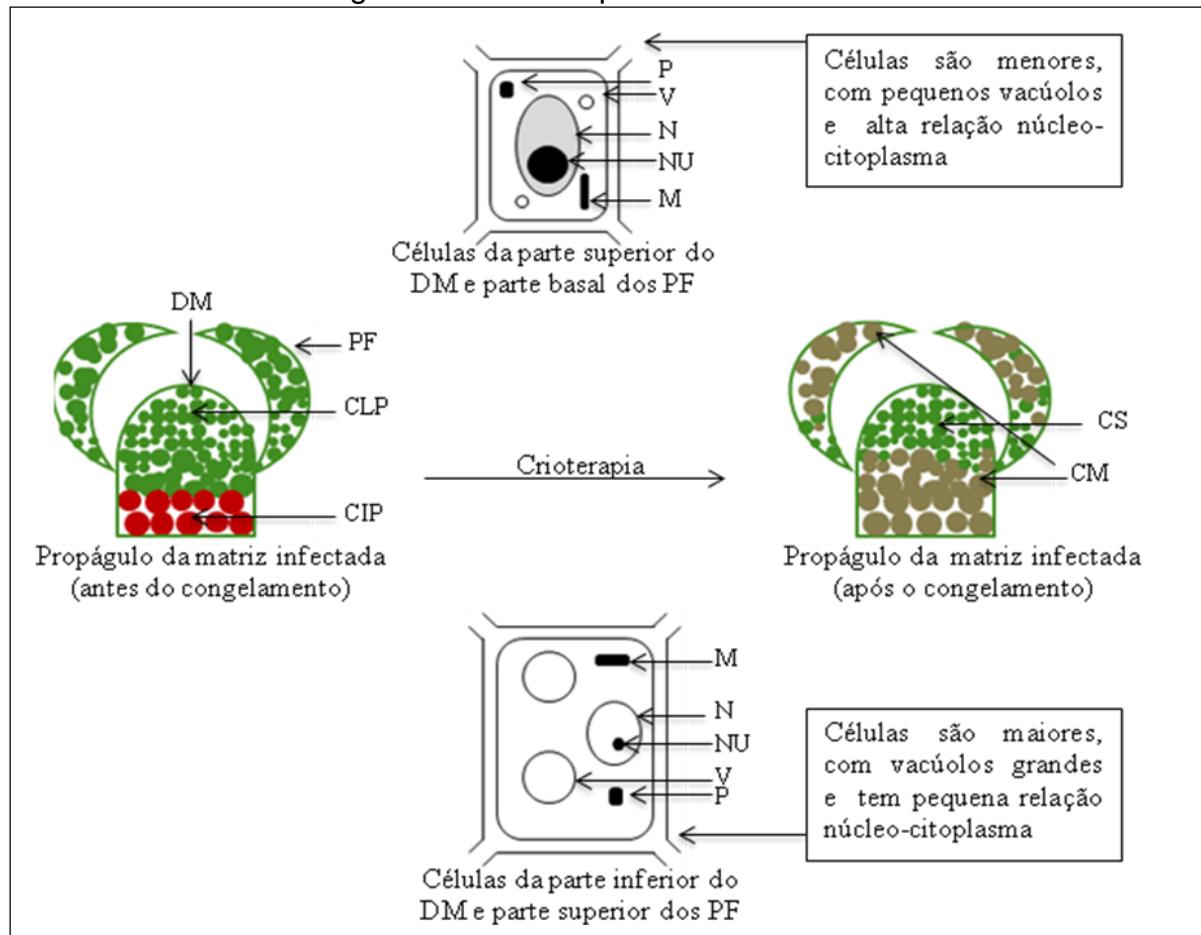
Em relação a outros métodos, os protocolos de crioterapia são consideravelmente rápidos para o desenvolvimento das plantas (WANG et al., 2018b). Em média, um protocolo longo de crioterapia pode durar até 15 dias entre preparação de meios e soluções e aplicação do protocolo. Esse tempo é muito relativo as espécies trabalhadas e ao protocolo de criopreservação que irá seguir para obter plantas livres de vírus, podendo ser reduzido a um espaço de tempo ainda menor. Após os procedimentos de crioterapia, o desenvolvimento das plantas é exclusivamente dependente de um meio de cultura estabelecido para a manutenção das culturas *in vitro* (WANG et al., 2018b; BETTONI et al., 2016).

Para procedimentos de crioterapia os tecidos ou células são preparados para tolerar o efeito do congelamento. O método baseia-se em protocolos de criopreservação, no entanto a criopreservação tem como objetivo principal o armazenamento de amostras biológicas vivas, que podem ser células, tecidos ou órgãos sob o efeito de temperaturas extremamente baixas (-196°C). A crioterapia, refere-se a um tratamento de curta duração, pelo qual os procedimentos são executados em tecidos vegetais em contato direto com o nitrogênio líquido (NL) (BETTONI et al., 2016; 2018; BETTONI; SOUZA, 2018). O nitrogênio líquido atua como a principal ferramenta para a erradicação do patógeno através do congelamento, onde explantes *in vitro*, que consistem em segmentos apicais ou laterais contendo a região meristemática, são parcialmente desidratados e expostos em nitrogênio líquido, eliminando seletivamente porções de células já diferenciadas infectadas por vírus; as células vacuoladas e infectadas por vírus são eliminadas pelo efeito letal do congelamento, permitindo que somente a porção de células localizadas no domo meristemático e algumas células nos primórdios foliares mais jovens sejam capazes de sobreviver e subsequentemente regenerar plantas livres de vírus (WANG et al., 2003; CUI et al., 2015; PATHIRANA et al., 2015; BETTONI et al., 2016; BETTONI; SOUZA, 2018; BI et al., 2018).

A crioterapia é beneficiada pelas diferenças fisiológicas e anatômicas entre células meristemáticas e os demais tecidos vegetais. Em razão de células meristemáticas serem pequenas, altamente adensadas, possuirem vacúolos menores e maior relação núcleo/citoplasma do que células que estão fora da região

meristemática (WANG; VALKONEN, 2009a). A distribuição desigual dos vírus nos tecidos de plantas associada com as características distintas das células localizadas no meristema e tecidos adjacentes auxiliam o mecanismo pelo qual a crioterapia elimina seletivamente tecidos infectados por vírus (BETTONI; SOUZA, 2018) (Figura 3).

Figura 3 – Esquema representativo da atuação do método de crioterapia na remoção de células vegetais infectadas por vírus.



Fonte: Adaptada de Wang e Valkonen (2009a).

DM, domo meristemático; PF, primórdio foliar; CLP, células livres de patógeno; CIP, células infectadas por patógeno; CS, células sobrevidentes; CM, células mortas; M, mitocôndria; V, vacúolo; N, núcleo; NU, nucléolo; P, proplastídio

Mesmo que os procedimentos para a eliminação de vírus pela crioterapia sejam baseadas em técnicas de criopreservação, o principal objetivo é produzir plantas livres de vírus. Altos níveis de regeneração exigidos em protocolos de criopreservação, não são necessários para protocolos de crioterapia, pois se apenas uma planta regenerar e confirmar que é livre de vírus, indica que o protocolo foi aplicado com sucesso. Com

isso procedimentos de multiplicação poderão ser aplicados após o material saudável ser regenerado (BETTONI, 2018; BETTONI; SOUZA, 2018).

Uma vez que a crioterapia é baseada em técnicas de criopreservação fica evidente o potencial dessa ferramenta em práticas de limpeza viral de material vegetativo, tendo em vista que protocolos de criopreservação já estão estabelecidos para várias espécies vegetais. A macieira é uma das plantas mais estudadas em relação a criopreservação e, protocolos eficientes para as mais variadas espécies e técnicas tem sido relatado, entretanto, pesquisas utilizando técnicas de crioterapia em *Malus* para erradicação de vírus são escassas e têm sido aplicados para um número limitado de espécies (VOLK; JENDEREK; CHAO, 2015; ROMADANOVA et al., 2016; BETTONI; SOUZA, 2018; ZHAO et al., 2018; BETTONI et al., 2018).

A técnica de crioterapia é relativamente nova quando comparada com outros protocolos já estabelecidos para eliminação de vírus, porém são crescentes os estudos que buscam o melhor desempenho para a erradicação de vírus em plantas (ENGELMANN, 2004; WANG et al., 2014; MOHAMMED; GHOSH; MARUTHI, 2017).

O sucesso da crioterapia para a erradicação de vírus em plantas têm sido relatado para diversas espécies de importância econômica (Tabela 1) (BETTONI; SOUZA, 2018). Recentemente Zhao et al. (2018), Bettoni et al. (2018), Romadanova et al. (2016) e Li et al. (2016) utilizando a crioterapia baseada em protocolos de criopreservação de *Malus* demonstraram a eficiência da crioterapia para erradicação das espécies de vírus ACLSV, ASPV, ASGV e ApMV.

Tabela 1 – Erradicação de vírus por crioterapia em espécies de plantas.

Vírus		Espécie	Referência
plum pox virus	PPV	<i>Prunus</i> sp.	Brison et al. (1997)
banana streak virus	BSV	<i>Musa</i> sp.	Helliott et al. (2002)
cucumber mosaic virus	CMV	<i>Musa</i> sp.	Helliott et al. (2002)
grapevine virus A	GVA	<i>Vitis vinífera</i>	Wang et al. (2003); Bayati et al. (2011)
potato virus Y	PVY	<i>Solanum tuberosum</i>	Wang et al. (2006a)
potato leafroll virus	PLRV	<i>Solanum tuberosum</i>	Wang et al. (2006a)
strawberry mild yellow-edge virus	SMYEV	<i>Fragaria ananassa</i>	Cai et al. (2008)
sweet potato feathery mottle virus	SPFMV	<i>Ipomoea batatas</i>	Wang; Valkonen (2008a)
sweet potato chlorotic stunt virus	SPCSV	<i>Ipomoea batatas</i>	Wang; Valkonen (2008a)
raspberry bushy dwarf virus*	RBDV	<i>Rubus idaeus</i>	Wang et al. (2008)
potato virus X	PVX	<i>Solanum tuberosum</i>	Bai et al. (2010; 2012)
yam mosaic virus	YMV	<i>Dioscorea opposita</i>	Hee et al. (2013)
potato leafroll virus	PLRV	<i>Solanum tuberosum</i>	Yi et al. (2014)
potato virus Y	PVY	<i>Solanum tuberosum</i>	Yi et al. (2014)

(Continua na próxima página)

Continuação Tabela 1...

Vírus		Espécie	Referência
leek yellow strip virus	LYSV	<i>Allium sativum</i>	Vieira et al. (2015)
onion yellow dwarf virus	OYDV	<i>Allium sativum</i>	Vieira et al. (2015)
garlic common latent virus	GarCLV	<i>Allium sativum</i>	Vieira et al. (2015)
grapevine associated virus 1	GLRaV-1	<i>Vitis vinífera</i>	Pathirana et al. (2013; 2015)
grapevine associated virus 2	GLRaV-2	<i>Vitis vinífera</i>	Pathirana et al. (2013; 2015)
grapevine associated virus 3	GLRaV-3	<i>Vitis vinífera</i>	Pathirana et al. (2013; 2015); Bi et al. (2018)
grapevine fanleaf virus	GFLV	<i>Vitis vinífera</i>	Marković et al. (2015)
apple chlorotic leaf spot virus	ACLSV	<i>Malus</i> sp.	Romadanova et al. (2016); Bettoni et al. (2018); Bettoni et al. (2019)
apple stem pitting virus	ASPV	<i>Malus</i> sp.	Romadanova et al. (2016); Li et al. (2016); Bettoni et al. (2018); Bettoni et al. (2019)
apple stem grooving virus	ASGV	<i>Malus</i> sp.	Romadanova et al. (2016); Bettoni et al. (2018); Bettoni et al. (2019)
apple stem grooving virus*	ASGV	<i>Malus</i> sp.	Zhao et al. (2018)*
apple mosaic virus	ApMV	<i>Malus</i> sp.	Romadanova et al. (2016)

Fonte: Bettoni; Souza, 2018.

* Termoterapia seguida por crioterapia

Mesmo com o sucesso alcançado em procedimentos de crioterapia em favor da remoção viral em plantas, ainda são necessários mais estudos que buscam uma

padronização para os protocolos de erradicação viral que já estejam estabelecidos, tornando-os aplicáveis para diferentes genótipos, uma vez que plantas podem expressar diferentes resultados dentro de uma mesma espécie com o uso de um determinado protocolo (ENGELMANN, 2011; 2014; BENSON, 2008; VOLK et al., 2015; BETTONI et al., 2016; WANG et al., 2018b; BETTONI; SOUZA, 2018).

2.4 PROTOCOLOS DE CRIOTERAPIA

Protocolos de crioterapia buscam preservar porções de células localizadas no domo meristemático e eliminar os tecidos diferenciados e infectados por vírus por meio de lesões causadas pela exposição dos explantes ao NL. Em sua totalidade, os protocolos de crioterapia, independente da espécie utilizada, são baseados em técnicas de criopreservação e dessa forma, estão disponíveis, principalmente para macieira (WANG et al., 2018b). Métodos utilizados com sucesso para a criopreservação de *Malus* variam de encapsulamento-desidratação (ZHAO et al., 1999; WU et al., 1999; PAUL et al., 2000; HAO et al., 2001; FENG et al., 2013; 2014; LI et al., 2014; 2015; BETTONI et al., 2018), vitrificação (NIINO et al., 1992; WU et al., 1999), encapsulamento-vitrificação (PAUL et al., 2000) e vitrificação em gotas (HALMAGYI et al., 2010; CONDELO et al., 2011; FENG et al., 2014; LI et al., 2015; 2016; BETTONI et al., 2019).

Independente do protocolo utilizado, a etapa de resfriamento e a etapa de aquecimento são os principais passos para obtenção de resultados relevantes em procedimentos criogênicos, principalmente porque a maioria das células vegetais contém grandes volumes de água, assim são extremamente sensíveis ao congelamento. Dessa forma, os métodos utilizam mecanismos para reduzir/evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula que seriam a causa da morte dos explantes, em virtude da ruptura da membrana celular ocasionada pela formação dos cristais de gelo (TEIXEIRA et al., 2014; TEIXEIRA; GONZÁLEZ-BENITO; MOLINA-GARCÍA, 2014).

Até o presente, existem apenas cinco estudos que demonstram a eficiência de protocolos de crioterapia baseados em técnicas de criopreservação para eliminação de vírus em macieira (ROMADANOVA et al., 2016; LI et al., 2016; BETTONI et al., 2018; 2019; ZHAO et al., 2018). Entre esses estudos que demonstram o efeito positivo da crioterapia para eliminação de vírus em macieira, está um trabalho que

previamente relatamos, utilizando o método de encapsulamento-desidratação (BETTONI et al., 2018); apesar do resultado positivo para a erradicação de vírus em *Malus prunifolia*, o método de crioterapia que previamente foi utilizado é trabalhoso e longo, tornando-o mais difícil de ser implementado. Nas duas últimas décadas, uma ampla gama de métodos de criopreservação foi desenvolvida para *Malus*, entre os que utilizam explantes *in vitro*, a vitrificação em gotas tem sido demonstrado como um dos mais efetivos, em relação a praticidade, taxa de regeneração e rapidez; com esse método taxas ultrarrápidas de resfriamento e aquecimento de explantes são encontradas, sendo esse um requisito importante para protocolos de criopreservação bem-sucedidos (PANIS et al., 2011; WANG et al., 2018b). Além do uso de protocolos de vitrificação em gotas para preservação de recurso genético, estes têm sido apresentados como ferramentas para erradicação de vírus em plantas (PATHIRANA et al., 2015); dessa forma, o método de vitrificação em gotas pode ser um candidato para ensaios de crioterapia com *Malus*.

Existem na literatura uma série de artigos que apresentam em detalhes os principais métodos de criopreservação acima citados (BETTONI et al., 2016; BI et al., 2017; MATSUMOTO, 2017); contudo, aqui nesse documento será apresentado a técnica de vitrificação em gotas a qual foi utilizado no ensaio de crioterapia.

2.4.1 Vitrificação em gotas

Os protocolos de vitrificação passaram a ser estabelecidos a partir do desenvolvimento de soluções vitrificantes altamente concentradas criadas por Sakai et al. (1990). Vitrificação é um estado físico que ocorre na planta quando o material biológico é exposto a altas concentrações de soluções crioprotetoras a base de glicerol, frequentemente o PVS2 (solução de vitrificação de plantas 2) e PVS3 (solução de vitrificação de plantas 3). A solução vitrificante PVS2 é composta por 30% glicerol, 15% etíleno glicol, 15% dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,4 M de sacarose (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990); para a solução de PVS3 os componentes são 50% de sacarose e 50% de glicerol (NISHIZAWA et al., 1993).

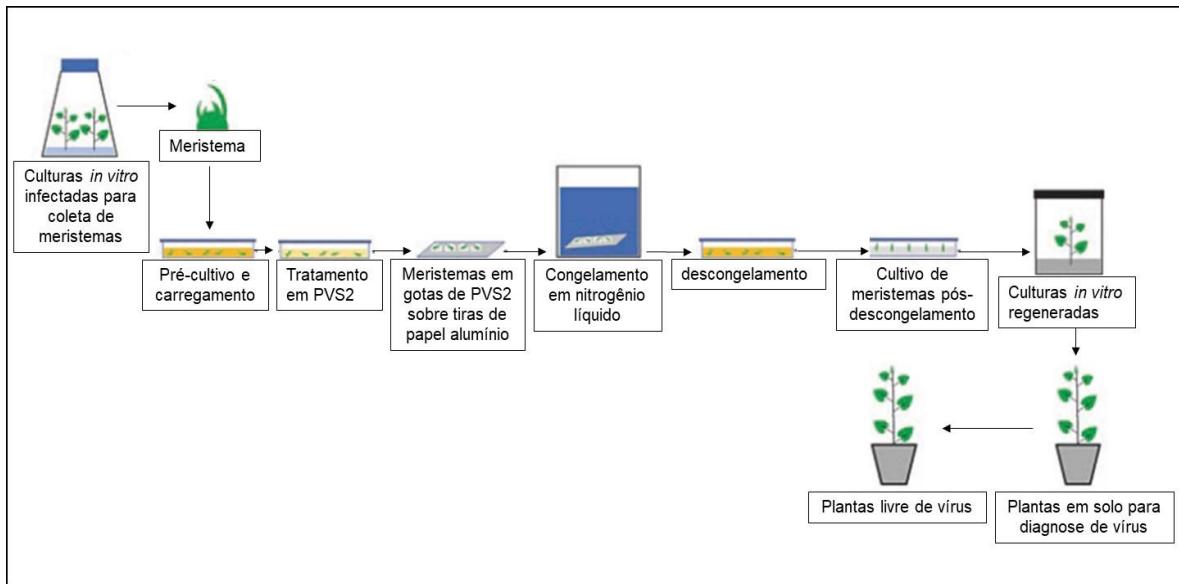
Estas soluções em procedimentos criogênicos são capazes de promover a desidratação do material biológico e auxiliar na conversão da água para uma fase amorfa, com a elevação da viscosidade da mesma (OZUDOGRU et al., 2011). O uso dessas soluções combinado com congelamento e descongelamentos rápidos,

passaram a auxiliar no controle da formação de cristais de gelo intra e extracelulares por meio de vitrificação em segmentos vegetais, atuando de uma forma “nova” e simplificada em comparação a outros métodos de criopreservação, como encapsulamento desidratação (REED et al., 2004; PANIS et al., 2011; MATSUMOTO, 2017).

O método de vitrificação em gotas foi desenvolvido inicialmente por Kartha et al. (1982), e mais tarde modificado por outros autores (PANIS et al., 2011; LI et al., 2015; MATSUMOTO, 2017). A técnica de vitrificação em gotas se difere de outros métodos de criopreservação, como a tradicional vitrificação e encapsulamento; dentre as vantagens está a facilidade e menor tempo de execução, não há necessidade de formação de capsula sintética envolto do explante, como nos métodos de encapsulamento; proporciona alcançar ultrarrápidas taxas de resfriamento e aquecimento, pois os explantes previamente acondicionados em soluções a base de sacarose, glicerol e solução de vitrificação e, em seguida, são diretamente imersos em NL, características essenciais para uma criopreservação bem-sucedida (KACZMARCZYK et al., 2012; MATSUMOTO, 2017). O contato direto com o nitrogênio líquido, por meio da técnica de vitrificação em gotas, permite o congelamento em imediato, diminuindo assim possíveis riscos de danos nas células meristemáticas; métodos de vitrificação em gotas são capazes de oferecer elevados níveis de regeneração e têm sido descrito como aplicável a várias espécies de plantas, de clima tropical e subtropical (LI et al., 2015; PATHIRANA et al., 2016; MATSUMOTO, 2017); de forma geral, as principais etapas de um protocolo de vitrificação em gotas estão representadas na Figura 4.

No método tradicional de vitrificação os meristemas após o acondicionamento em soluções a base de glicerol e sacarose são transferidos para criotubos com solução de vitrificação e, em seguida, são tratados em nitrogênio líquido; dessa forma, as taxas de congelamento e descongelamento são mais lentas em relação ao método de vitrificação em gotas, pois além de um volume maior de solução de vitrificação existe o criotubo entre o nitrogênio líquido e os meristemas (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; LI et al., 2015; BETTONI et al., 2016; PATHIRANA et al., 2016; BETTONI et al., 2018).

Figura 4 – Principais etapas do protocolo de crioterapia por vitrificação em gotas.



Fonte: Adaptada de Wang et al. (2018c).

Para a aplicação com sucesso de protocolos de vitrificação em gotas vários parâmetros devem ser estabelecidos; dentre os pontos determinantes estão o tempo de contato dos meristemas com a solução de vitrificação, bem como as condições durante o tratamento (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; PANIS et al., 2011; VOLK; SHEPHERD; BONNART, 2014b).

Quando os meristemas permanecem por um tempo prolongado em contato com a solução de vitrificação, ocorrem danos nas células por toxicidade ou estresse osmótico, tornando-os inviáveis; já a temperatura da solução de vitrificação está relacionada principalmente a velocidade de permeabilidade para o tecido vegetal (KACZMARCZYK et al., 2012; BETTONI, 2018). Portanto, esses parâmetros devem ser otimizados para o bom funcionamento do protocolo; em geral estão relacionadas com a espécie e/ou genótipo utilizado; essa característica de espécie ou genótipo especificidade, tendem a limitar a utilização generalizada de protocolos para uma diversidade de recursos genéticos (WANG et al., 2014; BI et al., 2017; BETTONI, 2018).

Os primeiros relatos de crioterapia usando a técnica de vitrificação em gotas foi descrita por Wang et al. (2006), em culturas de batatas, onde a técnica mostrou-se eficiente para limpeza de 95% das plantas infectadas por potato virus Y (PVY) e 86% de plantas infectadas por potato leafroll virus (PLRV); posterior a esse, outros trabalhos foram descritos usando protocolos de vitrificação em gotas para eliminação

de vírus de importância que afetam as culturas da batata (BAI et al., 2010; YI et al., 2014), videira (PATHIRANA et al., 2015; 2013; MARKOVIĆ et al. 2015); e macieira (ZHAO et al., 2018; BETTONI, 2018).

Atualmente os protocolos de vitrificação em gotas já estão bem estabelecidos para diferentes espécies de plantas e visam principalmente a preservação dos recursos genéticos (SOUZA et al., 2016; VOLK; SHEPHERD; BONNART, 2018; MATHEW et al., 2018). No entanto, estudos usando a técnica de vitrificação em gotas com intuito de remover vírus ainda são restritos a poucas publicações, geralmente são realizados no âmbito de estudos acadêmicos e com a utilização de um número limitado de acessos dentro de uma determinada espécie (PATHIRANA et al., 2015). Com base nos resultados encontrados até o presente com ensaios de crioterapia é evidente que em um futuro breve esses estejam presentes em laboratórios de cultura de tecidos para auxiliar e ou substituir os tradicionais métodos de erradicação de vírus em plantas.

3 CRIOTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS NA ERRADICAÇÃO DAS ESPÉCIES VIRAIS *apple stem grooving virus* e *apple stem pitting virus* EM PLANTAS DO PORTA-ENXERTO DE MACIEIRA 'MARUBAKAIDO'.

3.1 RESUMO

Apple stem grooving virus (ASGV) e apple stem pitting virus (ASPV) estão entre as espécies virais mais frequentes e responsáveis por substanciais danos na indústria mundial da maçã. ASGV e ASPV em *Malus* são disseminadas apenas por material propagativo infectado e, portanto, o controle se dá por meio de medidas preventivas com materiais propagativos de qualidade. Ferramentas biotecnológicas podem ser utilizadas para a produção de matrizes com qualidade fitossanitária. O objetivo do trabalho foi avaliar a efetividade da crioterapia por vitrificação em gotas na erradicação dos vírus ASGV e ASPV em plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. Meristemas com 1 mm (contendo 2-3 primórdios foliares) foram excisados de culturas estoque *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido infectado por ASGV e ASPV e cultivados por um dia em meio basal para a estabilização, seguido de pré-cultivo por um dia em meio contendo 2 M de glicerol e 0,8 M de sacarose e, exposição à solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) por 0, 20, 40, 50, 60 e 80 min à 22°C seguido de tratamento em nitrogênio líquido (NL) por 1 h. Em experimento adicional foi testado a exposição dos meristemas à PVS2 a 0°C, nos mesmos tempos de exposição mencionados acima. Após o tratamento em NL, os meristemas foram descongelados por 20 min em solução de descarregamento composta de 1,2 M de sacarose e inoculados em meio de regeneração. As taxas de sobrevivência e regeneração foram avaliadas com 4 e 8 semanas após a etapa de crioterapia, respectivamente. Meristemas expostos em PVS2 a 22°C seguidos de tratamento em NL apresentaram as maiores taxas de sobrevivência (75 e 65%) e regeneração (53 e 58%) após 20 e 40 min de exposição em PVS2, respectivamente. Quando a exposição ao PVS2 foi a 0°C seguido de tratamento em NL, houve considerável redução da toxicidade provocada pela solução vitrificante aos meristemas; após 80 min de exposição ao PVS2 porcentagens de sobrevivência e regeneração foram 48% e 23%, respectivamente. A eficiência da crioterapia para a erradicação de ASGV e ASPV foi determinada em plantas provenientes do processo de crioterapia e que foram mantidas em casa de vegetação por seis meses em crescimento *ex vitro*. A detecção dos vírus foi realizada utilizando o método de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction) para 20 plantas aleatoriamente selecionadas que passaram pela crioterapia. A crioterapia por vitrificação em gotas mostrou frequência de 70% e 100% de erradicação dos vírus ASGV e ASPV, respectivamente. As elevadas taxas de erradicação de ASGV e ASPV demonstram que a crioterapia por vitrificação em gotas é uma ferramenta eficaz para a produção de material vegetativo de *Malus prunifolia* livre de vírus.

Palavras-chave: Criopreservação. *Malus prunifolia*. ASGV. ASPV. Mudas de qualidade.

3.2 INTRODUÇÃO

A macieira (*Malus* spp.) representa uma das principais fruteiras produzidas e consumidas no mundo (VOLK et al., 2015). Em 2014, a produção global foi de 84,6 milhões de toneladas em uma área total de 5052 mil hectares (FAO, 2017). Em geral, o sucesso da maleicultura está ligado principalmente aos avanços tecnológicos que ocorreram ao longo dos anos, como a introdução de cultivares adaptadas às condições ambientais e materiais propagativos de qualidade (KVITSCHAL; DENARDI, 2014; PETRI et al., 2011; WANG et al., 2018b). O porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*) representa um dos materiais de enxertia mais utilizados nas regiões brasileiras produtoras de maçã devido suas características morfológicas do sistema radicular, adaptação aos mais variados tipos de solo e à resistência a pragas, porém suscetível a algumas viroses de relativa importância (SILVA, 2015; DENARDI et al., 2015).

Os vírus em sua maioria são conhecidos por causar impactos diretos sobre a produtividade e qualidade dos frutos, bem como aumentar a suscetibilidade a outros agentes fitopatogênicos (HADIDI; BARBA, 2011; GUERRA et al., 2012; WANG et al., 2016). Em macieiras cultivadas comercialmente as espécies apple stem pitting virus (*Foveavirus*) e apple stem grooving virus (*Capillivirus*), apple chlorotic leaf spot virus (*Trichovirus*) estão entre as mais frequentes em áreas de plantio com danos substanciais nos sistemas produtivos (HU et al., 2017; NICKEL; FAJARDO, 2014).

A utilização de materiais propagativos livres de vírus é a forma mais eficaz na manutenção da sanidade dos pomares, pois uma vez introduzidas plantas infectadas, não há medida de controle efetiva que não seja a erradicação (WANG et al., 2014; BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). Deste modo, a inserção de materiais a campo livres de vírus é fundamental para o controle de viroses e, ferramentas biotecnológicas têm sido utilizadas para produção de plantas matriz com boa qualidade fitossanitária (ZHAO et al., 2018; WANG et al., 2018a; b; c; WANG et al., 2008; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013; BI et al., 2018; BETTONI et al., 2018).

Os métodos que visam a eliminação de vírus em plantas se beneficiam da distribuição desigual que os vírus possuem no interior das plantas, ou seja, à medida que aumenta a distância dos tecidos em relação ao domo meristemático ocorre um aumento na concentração viral; o domo meristemático, por suas características fisiobiológicas aliadas a rápida multiplicação celular, contém baixa ou nula concentração

viral (WANG et al., 2010; YIN, et al., 2011; WANG et al., 2018a; MALIOGKA et al., 2018). Dentre os métodos considerados tradicionais para a obtenção de plantas livres de vírus estão a cultura de meristemas (WANG et al., 2016; VIVEK; MODGIL, 2018), termoterapia (LIZÁRRAGA; ASCASÍBAR; GONZÁLEZ, 2017; ZHAO et al., 2018), quimioterapia (GUȚĂ; BUCIUMEANU, 2011; SEDLAK; PAPRSTEIN; TALACKO, 2011; HU et al., 2018) e crioterapia (WANG et al., 2009; WANG et al., 2014; CUI et al., 2015; PATHIRANA et al., 2015; BI et al., 2018; BETTONI et al., 2018). Trabalhos recentes demonstram que quando se utilizam mais que uma técnica, ou seja, a associação de técnicas, os resultados na produção de plantas livres de vírus são mais satisfatórios, principalmente para espécies de vírus considerados de difícil controle (VIEIRA et al., 2015; ŞEKER et al., 2015; KUSHNARENKO et al., 2017; ZHAO et al., 2018; WANG et al., 2018a).

Dentre os métodos já estudados para a produção de plantas livres de vírus a crioterapia sozinha e ou em associação com outras técnicas tem se mostrado eficiente para eliminação de vírus em diversas espécies de importância econômica, incluindo a macieira (ZHAO et al., 2018; BETTONI et al., 2018; ROMADANOVA et al., 2016; LI et al., 2016). Possui vantagem em relação a outros métodos de limpeza viral em plantas, dentre os quais a obtenção de protocolos mais rápidos e com custos reduzidos, não necessitam de equipamentos sofisticados ou grandes espaços laboratoriais para execução dos procedimentos (ROMADANOVA et al., 2016; PATHIRANA et al., 2015; LI et al., 2016; BETTONI et al., 2018; BETTONI; SOUZA, 2018; WANG et al. 2018b; ZHAO et al., 2018).

Métodos de crioterapia, se baseiam em protocolos de criopreservação, no entanto, explantes são submetidos ao tratamento em nitrogênio líquido (NL) a -196°C por curto período de tempo, normalmente 1 h, para remover seletivamente porção de células infectadas por vírus (WANG et al., 2006; WANG; VALKONEN, 2009; BETTONI et al., 2016). Até agora, vários protocolos de criopreservação de meristemas foram descritos para *Malus* (NIINO et al., 1992; PAUL et al., 2000; FENG et al., 2014; LI et al., 2014; 2015) Entre estes, a vitrificação em gotas tem sido demonstrada como a mais eficaz em relação a porcentagem de regeneração e a praticidade do método. A técnica de vitrificação em gotas faz uso de taxas ultrarrápidas de resfriamento e aquecimento do meristema, um requisito importante para os protocolos de criopreservação bem-sucedidos baseados em vitrificação (SOUZA et al., 2016).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência do método de vitrificação em gotas baseado em protocolo de criopreservação para erradicação dos vírus ASGV e ASPV em culturas *in vitro* porta-enxerto de macieira Marubakaido.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

Plantas do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) comprovadamente infectadas por apple stem grooving virus (ASGV) e apple stem pitting virus (ASPV) foram identificadas pelo método de transcrição reversa, seguida de reação de cadeira polimerase (RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction) e então, mantidas em casa de vegetação para o fornecimento de explantes para o estabelecimento de culturas *in vitro*.

3.3.2 Introdução dos materiais *in vitro* e manutenção das culturas estoque

Culturas *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido infectado com ASGV e ASPV foram estabelecidos conforme recomendações descritas por Bettoni et al. (2015). Para a iniciação das culturas axênicas foram usados segmentos nodais (~2 cm) coletados dos ápices das plantas matriz do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) infectadas por ASGV e ASPV. Para os procedimentos de assepsia os explantes foram esterilizados superficialmente em solução de álcool 70% (v/v) por 15 s, lavados duas vezes por 1 min em água destilada autoclavada; seguido de tratamento por 15 min em solução de hipoclorito de sódio a 80% (alvejante doméstico a 2,5% de cloro ativo, v/v) e 0,1% de Tween 20 (v/v), seguido por 3 lavagens em água destilada autoclavada. Os explantes do porta-enxerto Marubakaido infectadas com ASGV e ASPV foram mantidas em um estado de crescimento ativo em meio de cultura de manutenção e multibrotação composto pela formulação salina de Murashige e Skoog (1962, MS) suplementado com 40 g L⁻¹ de sacarose, 1 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP) e 2,6 g L⁻¹ PhytagelTM. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C durante 15 min. As culturas de macieira *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, e fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹ e intensidade luminosa de 50 mMol m⁻² s⁻¹, para fornecimento contínuo de explantes

necessários para os ensaios criogênicos, estes foram subcultivadas a cada 4 semanas, e transferidas para o meio fresco, a fim de obter a uniformidade dos meristemas para cada tratamento.

3.3.3 Crioterapia por vitrificação em gotas

Os procedimentos experimentais de vitrificação em gotas foram realizados de acordo com Li et al. (2015), com as seguintes modificações: meristemas axilares com aproximadamente 1,0 mm de comprimento e 2-3 primórdios foliares foram excisados de culturas estoque *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido com 4 semanas de cultivo e inoculados em meio basal (MB) (MB=formulação salina MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 0,25 mg L⁻¹ BAP e 0,01 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico (AIB) e 2,6 g L⁻¹ de PhytigelTM, pH 5,8) por 1 dia à 25 ± 2°C no escuro para estabilização. Os meristemas axilares foram incubados em meio de pré-cultivo composto pela formulação salina MS, 2 M glicerol, 0,8 M sacarose em pH 5,8, por 1 dia à 25 ± 2°C no escuro, seguido pela exposição à solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) à 22°C por 0, 20, 40, 50, 60 e 80 minutos. Em um experimento adicional, meristemas pré-cultivados foram expostos em solução vitrificante PVS2 nos tempos acima mencionados, porém, a incubação foi realizada com a solução mantidas a 0°C, seguido de tratamento em NL, descongelamento e cultivo em meio de regeneração. A solução vitrificante PVS2 é composta por 30 % de glicerol (m/v), 15% de etileno glicol (m/v), 15% de dimetilsulfóxido (m/v) e 0,4 M de sacarose dissolvidos no meio MS líquido, pH 5,8. Dois minutos antes do final de cada tratamento em solução vitrificante PVS2 os meristemas foram individualmente transferidos para gotículas contendo 5 µL de solução vitrificante PVS2 sobre tiras de papel alumínio (5 x 25 mm, 5 meristemas por tira). Então, as tiras de papel alumínio contendo os meristemas em gotas de solução vitrificante PVS2 foram diretamente mergulhadas em NL (-196°C), por 1 h. O controle foi representado pelos meristemas que foram pré-cultivados, expostos nos diferentes tempos ao PVS2 sem o tratamento em NL.

As tiras de papel alumínio contendo os meristemas que foram congelados em NL foram rapidamente tratadas em solução de descarregamento (formulação salina MS, 1,2 M de sacarose à pH 5,8) em condições de temperatura ambiente por 20 minutos. Os meristemas que passaram pela solução de descarregamento foram pós-

cultivados em MB por 1 dia no escuro, e então transferidos para MB fresco. As culturas foram mantidas por 7 dias a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro e então transferidas para as mesmas condições das culturas estoque.

3.3.4 Avaliação da sobrevivência e regeneração

Os dados de sobrevivência e de regeneração foram obtidos após 4 e 8 semanas, respectivamente, em que os meristemas de Marubakaido que passaram pela crioterapia foram introduzidas em meio de regeneração. As avaliações foram caracterizadas mediante contagem e identificação de tecidos meristemáticos em desenvolvimento, considerando sobrevivência os meristemas que exibiram crescimento de massa celular (esverdeadas) e regeneração foram as culturas que exibiram crescimento de tecidos organizados (presença de estruturas foliares).

O delineamento experimental foi usado em blocos ao acaso com esquema fatorial de 6 X 2, representados por 6 tempos de exposição a PVS2 à temperatura ambiente (22°C) e duas condições de tratamento em NL, com e sem a exposição. Em experimento adicional, foram avaliados os 6 tempos de exposição a PVS2 à 0°C com um fator de tratamento em NL, todos os explantes foram expostos em NL. Os experimentos foram repetidos três vezes, sendo cada repetição composta por 30 meristemas por tratamento. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos a transformação arco-seno e análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% utilizando o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3.3.5 Enraizamento *in vitro* e aclimatização

As fases de enraizamento *in vitro* e a aclimatização das culturas de Marubakaido regeneradas da crioterapia e controles foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Bettoni (2018). As culturas *in vitro* foram mantidas por 30 dias em meio de indução de enraizamento (formulação salina MS suplementado com 30 g L^{-1} sacarose, 1 mg L^{-1} ácido indolacético e $2,6 \text{ g L}^{-1}$ de PhytagelTM, pH 5,8) nas mesmas condições que foram mantidas as culturas estoque. Plantas *in vitro* enraizadas provenientes das culturas de Marubakaido foram podadas, conservando

de 2 a 3 folhas basais e 2 cm de comprimento de raízes para aclimatização em substrato particularizado esterilizado a 121 °C por 1 hora, composto da mistura de substrato comercial Tecnomax® e areia (3:2 v/v). As plantas foram mantidas em sala de crescimento, em condições saturadas de umidade relativa do ar, com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹ e intensidade luminosa de 150 mMol m⁻² s⁻¹. Após 30 dias, com a emissão de folhas novas as plantas foram transferidas para vasos plásticos de 1,5 L contendo substrato comercial Tecnomax® e mantidas em casa de vegetação com temperatura de 25 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16 h luz dia⁻¹.

3.3.6 Indexação por RT-PCR

Plantas provenientes do processo de crioterapia e mantidas em casa de vegetação por 6 meses foram avaliadas para a presença dos vírus ASGV e ASPV utilizando o método de transcrição reversa, seguida de reação de cadeira polimerase (RT-PCR). Controles positivos para ASGV e ASPV foram representados por culturas *in vitro* do porta-enxerto Marubakaido, que passaram pelas fases de enraizamento *in vitro*, aclimatização e crescimento em casa de vegetação por 6 meses (controle 1) e por plantas regeneradas a partir de meristemas excisados das culturas estoque que passaram pela técnica de vitrificação em gotas e processo de regeneração mas não foram expostas ao NL, seguidas das fases de enraizamento *in vitro*, aclimatização e crescimento em casa de vegetação por 6 meses (controle 2), além de um controle geral (C+) representado pelas plantas fornecedoras de segmentos nodais para a introdução *in vitro*. A frequência de erradicação de vírus foi estimada a partir de plantas regeneradas após o crio-tratamento (+NL) provenientes de todos os tempos de exposição a solução PVS2, onde 20 dessas foram aleatoriamente selecionadas para diagnose.

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de folhas jovens usando kit RNA plant mini kit (Quiagen, Hilden, Germany). Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 1 µL de RNA total, 1 µL do iniciador oligo-dT (10 µM), 1 µL de dNTP 10 µL (2,5 mM cada nt) e 12 µL de água livre de RNase. As misturas dos componentes foram tratadas por 5 min a 70 °C seguido por 5 min a 0 °C. Foram adicionados 4 µL de tampão da enzima transcriptase reversa (RT) 5X e 1 µL da enzima MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase – 200 U/µL, Invitrogen). Essa mistura de 20 µL foi incubada por 5 min 25 °C, 60 min a 42 °C

e 10 min a 70°C, em termociclador (MJ Research). A RT-PCR foi realizado em um volume de reação de 25 µL, composto de 1 µL de cDNA, 19 µL de água livre de RNase, 2,5 µL de tampão da Taq polimerase 10X, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP 10 µL (2,5 mM cada nt), 0,25 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/ µL), 0,5 µL de cada iniciador complementar e homólogo (10 µM) (Tabela 2).

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados para detecção dos vírus de macieira ASGV e ASPV.

Vírus	Sequência 5' - 3'	Orientação	Tamanho do fragmento
ASGV	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	Complementar	755pb
	ATGAGTTTGGAAAGACGTGCTTC	Homólogo	
ASPV	ATAGCCGCCCGGTTAGGTT	Complementar	269pb
	CTCTTGAACCAGCTGATGGC	Homólogo	

As reações de PCR foram conduzidas com as seguintes ciclagens: ASGV - 94 °C for 2 min, 94 °C por 40 s, 54 °C por 40 s, 72°C por 1 min; ASPV - 94 °C por 10 min, 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min, 72°C por 1 min; seguidas por 34 ciclos de amplificação e uma extensão final de 5 e 10 min, respectivamente. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 % em tampão Tris-borato-EDTA, corados com GelRedTM, visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

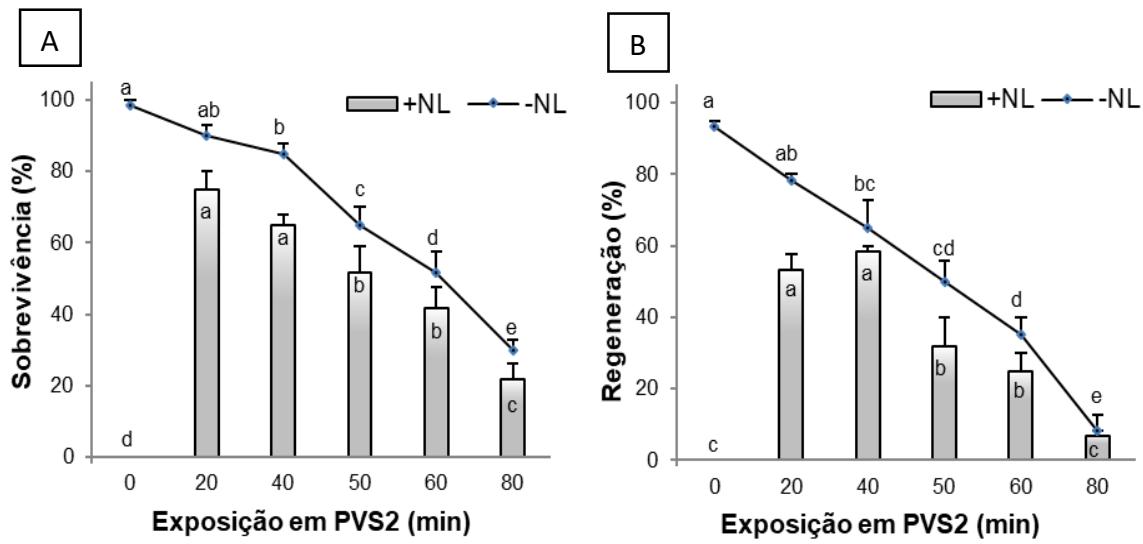
3.4 RESULTADOS

3.4.1 Sobrevivência e regeneração de meristemas criopreservados pela técnica de vitrificação em gotas utilizando solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) a temperatura de 22°C

Explantes de Marubakaido que passaram pelo processo de vitrificação em gotas e foram cultivados em meio de regeneração por 4 (avaliação da sobrevivência) e 8 (avaliação da regeneração) semanas mostraram taxas de 0-75% e 0-58% para sobrevivência e regeneração, respectivamente, entre os 6 tratamentos de exposição a solução PVS2, quando tratados com NL (+NL) e, 30-98% e 8-93% de taxas de

sobrevida e regeneração, respectivamente sem o tratamento em NL (-NL) (Figura 5).

Figura 5 - Efeito do tempo de exposição a solução vitrificante PVS2 mantidas em temperatura ambiente (22°C) na sobrevida (A) e regeneração (B) de meristemas criopreservados (tratados em nitrogênio líquido) e controles (sem o tratamento em nitrogênio líquido) de plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Independentemente se explantes foram tratados (+NL) ou não (-NL) em NL, a exposição ao PVS2 em tempos superiores a 40 min reduziram a viabilidade dos meristemas do porta-enxerto Marubakaido (Figura 5). Em meristemas que não foram expostos em PVS2 e sem o tratamento em NL, as porcentagens de sobrevida e regeneração foram 98% e 93%, respectivamente. Conforme os meristemas permaneceram em contato com o PVS2, mesmo sem o tratamento em NL, as taxas de sobrevida e de regeneração foram reduzidas, até atingirem 30% e 8%, respectivamente, após 80 min de exposição ao PVS2. As porcentagens encontradas indicam a toxicidade do PVS2 conforme aumenta o tempo de contato dos meristemas com a solução vitrificante (Figura 5A, B).

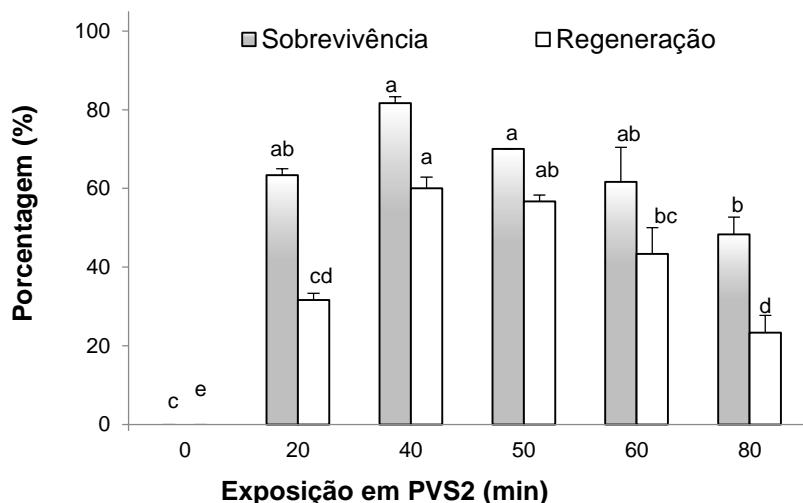
Meristemas que não foram expostos ao PVS2 não toleraram o tratamento em NL (Figura 5A, B). Explantes que foram expostos em PVS2 e que passaram pela etapa de congelamento em NL (+NL) obtiveram as maiores taxas de sobrevida e regeneração após 20 e 40 min de exposição ao PVS2, no qual, as taxas de sobrevida foram de 75% e 65%, respectivamente, e de regeneração 53% e 58%,

respectivamente. Tempos superiores a 40 mim de exposição e PVS2 diminuem a viabilidade dos explantes, mesmo sem o tratamento em NL (Figura 5A, B).

3.4.2 Sobrevivência e regeneração de meristemas criopreservados pela técnica de vitrificação em gotas utilizando solução de vitrificação de plantas 2 (PVS2) a temperatura de 0°C.

Independente do tempo de exposição a solução vitrificante PVS2, as taxas de sobrevivência foram maiores do que as taxas de regeneração (Figura 6). Os valores de sobrevivência de explantes criopreservados variou de 63%, 82%, 70%, 62%, 48% após 20, 40, 50, 60 e 80 min, respectivamente. Não houveram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre os tempos de exposição de 20 e 60 min que se mantiveram em contato com a solução PVS2 (Figura 6). As maiores taxas de regeneração foram encontradas nos explantes que foram expostos por 40 e 50 min ao PVS2, variando de 60% e 57%, respectivamente. Tempos inferiores a 40 min de exposição ao PVS2, bem como superiores a 50 min diminuem a taxa de regeneração, aos 20 min de exposição ao PVS2 foi de 32%, aos 60 min foi de 43% e aos 80 min 23% (Figura 6).

Figura 6 – Efeito do tempo de exposição em solução vitrificante PVS2 mantidas com temperatura a 0°C para dados de sobrevivência e regeneração de culturas criopreservadas (tratadas em nitrogênio líquido) do porta-enxerto de macieira Marubakaido.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Quando os explantes foram expostos a solução vitrificante PVS2 com temperatura a 0°C, houve considerável redução da toxicidade provocada pela solução vitrificante em relação as condições da solução vitrificante PVS2 em temperatura ambiente (22°C) (Figura 5 e 6).

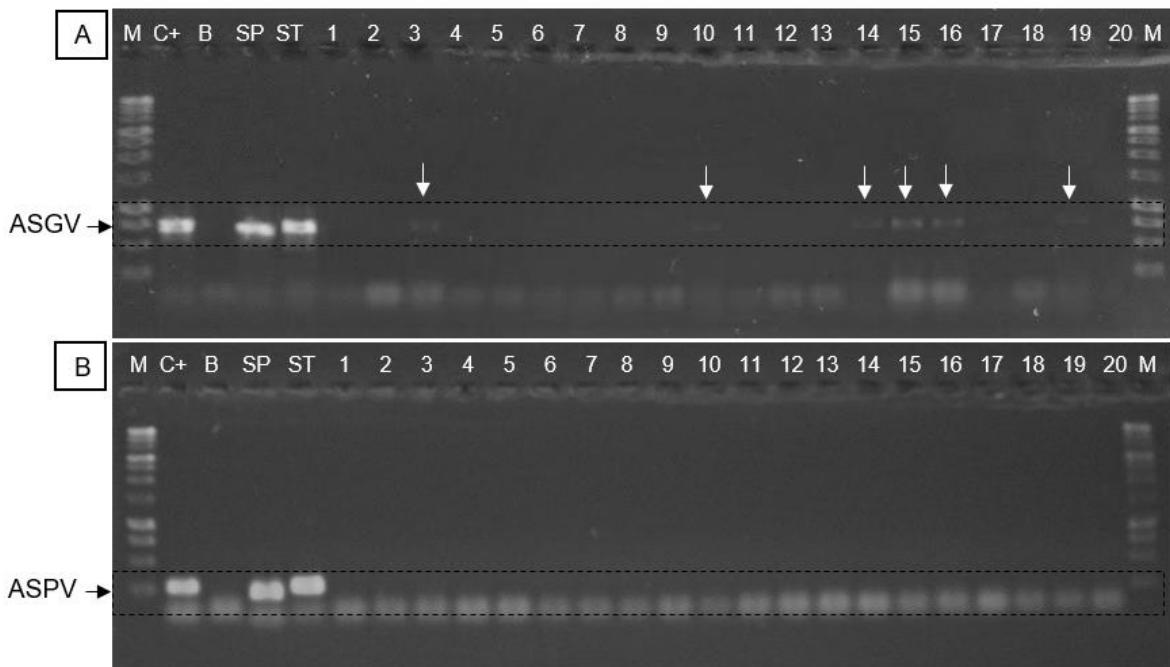
3.4.3 Efeito da crioterapia para erradicação viral

Plantas mantidas em casa de vegetação por 6 meses provenientes de explantes que passaram pela crioterapia por vitrificação em gotas (+NL) e os controles foram testadas quanto a presença de ASGV e ASPV por RT-PCR (Figura 7). As amostras foram consideradas infectadas por ASGV e ASPV quando bandas específicas de 755 e 269 pb foram amplificadas por PCR e, enquanto que as amostras sem a detecção de bandas específicas de 755 e 269 pb para ASGV e ASPV, respectivamente, foram julgadas livres de vírus. Todos os tratamentos do controle positivo apresentaram amplificação de bandas específicas para os vírus ASGV e ASPV (Figura 7A, B).

A crioterapia por vitrificação em gotas mostrou-se eficiente na erradicação das espécies de vírus ASGV e ASPV e, a eficiência na eliminação de vírus variou entre as espécies avaliadas (Figura 7). O ASPV foi mais frequentemente erradicado em relação ao ASGV. Para o ASGV, a taxa de erradicação foi de 70%, representando 14 plantas livres de vírus em um montante analisado de 20 plantas (Figura 7A). Para o ASPV todas as plantas testadas mostraram-se livres de vírus (Figura 7B).

A amplificação dos tratamentos controles para ASGV e ASPV e a erradicação parcial de ASGV (70%) e total de ASPV (100%) indicam que o tratamento em NL foi crucial para a eliminação de espécies de vírus. Os controles experimentais, que se apresentaram infectados com ASGV e ASPV, comprovam que a introdução *in vitro*, bem como os explantes (~1,0 mm de comprimento e 2-3 primórdios foliares) e as soluções utilizadas no procedimento de vitrificação em gotas não são suficientes para a erradicação de vírus.

Figura 7 – Detecção de ASGV (A) e ASPV (B) por RT-PCR a partir de plantas do porta-enxerto Marubakaido infectadas e tratadas pela técnica de crioterapia por vitrificação em gotas.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Marcador molecular (M); controle positivo (C+) (plantas de Marubakaido infectadas por ASGV em A e ASPV em B); controle branco (B); material *in vitro* infectado obtido pelas plantas infectadas em casa de vegetação (SP); explantes que passaram pelo procedimento de vitrificação em gotas sem congelamento em NL (ST); plantas após regeneração que passaram pela crioterapia por vitrificação em gotas (1-20). Setas brancas indicam a amplificação de vírus em amostras que passaram por crioterapia.

3.5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi verificado o potencial da técnica de crioterapia por vitrificação em gotas, baseada em protocolo de criopreservação publicado por Li et al. (2015), para a erradicação das espécies virais ASGV e ASPV em *Malus prunifolia*. Plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido que passaram pela crioterapia por vitrificação em gotas e permaneceram em crescimento ativo em casa de vegetação por 6 meses foram completamente livres de ASPV e 70% livres de ASGV. ASPV foi mais facilmente eliminado do que ASGV e, na média, 70% das plantas avaliadas por RT-PCR estavam livres da infecção mista de ASGV e ASPV. A elevada frequência de erradicação de ASGV e ASPV associada com a praticidade da técnica de crioterapia por vitrificação em gotas, evidenciam o potencial da crioterapia para a formação de plantas base de *Malus* com qualidade fitossanitária.

O desenvolvimento de protocolos eficientes para a produção de matrizes de *Malus* livres de vírus é um requisito para a formação de pomares saudáveis, uma vez que

não há relatos em *Malus* da disseminação de vírus por vetores, sendo exclusivamente via propagação vegetativa de materiais infectados (BARBA; ILARDI; PASQUINI, 2015). Dessa forma, a crioterapia por vitrificação em gotas é uma ferramenta que poderia auxiliar a produção de matrizes de *Malus* livres de vírus.

A viabilidade dos meristemas após o tratamento em NL está diretamente associada a duração da exposição ao PVS2 e as condições durante o tratamento (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006; PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; BENSON, 2008; VOLK; SHEPHERD; BONNART, 2014; YIN et al., 2014; BETTONI et al., 2018). Quando os meristemas foram expostos ao PVS2 a temperatura ambiente (22°C) a viabilidade foi reduzida após 40 min de exposição, mesmo sem o tratamento em NL; já quando a exposição foi a 0°C, mesmo com o tratamento em NL, tempos prolongados de exposição (80 min) ainda apresentaram uma considerável capacidade de regeneração. A exposição ao PVS2 a 0°C reduz a velocidade de permeabilidade da solução vitrificante para o interior do meristema e componentes presentes na solução vitrificante, tais como DMSO tornam-se menos tóxicos ao material vegetal, aumentando, portanto, a capacidade dos explantes em tolerar tempos prolongados de exposição (VOLK; HARRIS; ROTINDO, 2006; CONDELLA et al., 2011; GANINO et al., 2012; VOLK; SHEPHERD; BONNART, 2014).

As condições durante o tratamento, bem como o tempo de exposição são fatores determinantes nos procedimentos de criopreservação, quando o objetivo é obter uma alta taxa de regeneração (CONDELLA et al. 2011; LI et al., 2015; WANG et al., 2017; KIM, 2009, 2018; BETTONI, 2018; GANINO et al., 2012; VOLK et al., 2014). Entretanto, em ensaios de crioterapia, a taxa de regeneração não é um fator determinante para mensurar a efetividade do protocolo, se existir alguma cultura regenerada livre de vírus o protocolo é considerado eficiente e, então, clones adicionais podem ser propagados por práticas de cultura de tecidos vegetais convencionais (ROMADANOVA et al., 2016; BETTONI et al., 2019).

Protocolos de crioterapia em *Malus* spp. têm sido publicados utilizando as técnicas baseadas em encapsulamento (BETTONI et al., 2018; LI et al., 2016) e vitrificação (ROMADANOVA et al., 2016, BETTONI et al., 2019) ou ainda, associação de técnica de vitrificação e termoterapia (ZHAO et al., 2018). Previamente foi demonstrado a eficiência da técnica de encapsulamento-desidratação na erradicação de ASGV, ASPV e ACLSV do porta-enxerto de macieira Marubakaido (BETTONI et al., 2018); no entanto, protocolos de encapsulamento-desidratação são mais longos e

trabalhosos em relação ao de vitrificação em gotas, portanto, mais difícil de ser implementado. Para o protocolo de vitrificação aqui utilizado, depois que as culturas foram estabelecidas *in vitro*, os procedimentos de crioterapia por vitrificação em gotas foram realizados em três dias e então, meristemas foram inoculados em meio de regeneração. Por outro lado, para o mesmo genótipo, Bettoni et al. (2018) utilizando a crioterapia por encapsulamento-desidratação foram necessários oito dias para realizarem os procedimentos experimentais, para então, os meristemas serem recuperados em meio de regeneração. Em adicional, no protocolo de encapsulamento-desidratação os meristemas são encapsulados e os procedimentos de desidratação demandam horas de trabalho, já no protocolo aqui testado, os meristemas não são encapsulados e a desidratação é realizada em minutos, tornando os procedimentos mais rápidos e práticos, assim, facilmente aplicáveis em um laboratório de rotina.

Em ensaios de crioterapia, o tratamento com NL é o principal fator para remoção de tecidos infectados por vírus (PATHIRANA et al., 2015; WANG et al., 2014; WANG; VALKONEN, 2009a; BETTONI; SOUZA, 2018). Essa resposta foi aqui evidenciada uma vez que os controles que passaram pela fase de desidratação em PVS2 e que não foram submetidas à etapa de congelamento em NL mostraram-se infectados por ASGV e ASPV; enquanto que amostras tratadas em NL revelaram elevados níveis de erradicação da infecção mista de ASPV e ASGV.

Relatos anteriores utilizando técnicas de erradicação de vírus demonstram que a porcentagem de recuperação de plantas livres de vírus varia de acordo com o tipo de vírus e o genótipo utilizado (TAN et al., 2010; YOUSSEF et al., 2011; PUPOLA et al., 2011; DHIR et al., 2015; LI et al., 2016; HU et al., 2015; VIVEK; MODGIL, 2018). Essa característica pode estar relacionada a proteína de movimento específica de cada espécie de vírus e/ou o padrão de infecção celular (SAREILA et al., 2004). Aqui nesse trabalho foi demonstrado que o ASPV foi mais fácil de ser erradicado em relação ao ASGV. Para o ASGV, mesmo após o tratamento em NL, 6 das 20 amostras avaliadas, ainda estavam infectadas, demonstrando que o ASGV pode ser considerado um vírus difícil de ser erradicado. Em estudo anterior com crioterapia por encapsulamento-desidratação, Li et al. (2016) relataram a efetividade do protocolo para a erradicação de ASPV em 85% das plantas regeneradas dos porta-enxertos de macieira M9 e M26, entretanto não encontraram plantas livres de ASGV. Já Bettoni et al. (2019) utilizando protocolo de vitrificação em gotas, similar ao utilizado nesse

manuscrito, relataram a eficiência na erradicação da infecção mista de ASPV, ACLSV e ASGV no cultivar de macieira SC417 Monalisa (*Gala* × *Malus* 4), onde 35% das culturas regeneraram livres da infecção mista. Recentemente, Zhao et al. (2018) demonstraram a eficiência da crioterapia por vitrificação em gotas associada com a termoterapia na erradicação de ASGV em macieira cultivar Gala; em adicional, os autores observaram que quando a crioterapia foi utilizada sozinha não foi possível erradicar o ASGV. O protocolo utilizado por Zhao et al. (2018) foi similar ao que aplicamos para o porta-enxerto Marubakaido e, eficientemente foi erradicado o ASGV em 70% das culturas tratadas. Uma justificativa para a falha na erradicação de ASGV por Zhao et al. (2018) pode estar relacionada ao tempo de exposição ao PVS2 que os autores utilizaram, sendo este baseado em um protocolo previamente publicado para a criopreservação de macieira que resultou em uma elevada taxa de regeneração. A elevada taxa de regeneração está diretamente relacionada com a quantidade de tecidos preservados após a criopreservação, assim se há sobrevivência de tecido diferenciado e infectado não é possível a regeneração de uma cultura livre de vírus, portanto, tempos de exposição ao PVS2 que são melhores para criopreservação nem sempre são os ideais para crioterapia. Apesar da crioterapia ser baseada em protocolos de criopreservação, as altas taxas de regeneração não são necessárias, se apenas uma planta regenerar e estar livre de vírus o protocolo foi aplicado com sucesso (BETTONI et al., 2019). Outra hipótese poderia estar relacionada ao título viral de ASGV nas plantas de macieira utilizadas no trabalho de Zhao et al. (2018); dessa forma, quando os autores submeteram as plantas à termoterapia ocorreu uma redução da replicação do vírus e, consequentemente, diminuiu o movimento viral em direção ao meristema, assim, uma maior área livre de vírus estava presente na região do meristema, facilitando a erradicação por crioterapia.

Nesse estudo, foram avaliados vários tempos de exposição ao PVS2, em consequência, foram obtidas diferentes taxas de regeneração, isso por sua vez está diretamente relacionado a porção de células do meristema que sobreviveram após o tratamento em NL, o que pode justificar a erradicação de ASGV nas plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. Futuras pesquisas devem ser realizadas para determinar os efeitos de diferentes tempos de exposição dos meristemas ao PVS2 na sobrevivência e localização de células infectadas por vírus após a exposição em NL, principalmente para o ASGV que foi demonstrado ser um vírus difícil de ser erradicado. Em ensaios de crioterapia as estratégias de ação devem estar relacionadas a espécie

de planta trabalhada, bem como o vírus presente, afim de otimizar o protocolo na recuperação de plantas livres de vírus. Em espécies de plantas infectadas por vírus de difícil controle, como o ASGV, os protocolos de crioterapia devem buscar eliminar o máximo a porção de células diferenciadas e infectadas (BETTONI et al., 2019) e/ou, utilizar ferramentas para erradicação de vírus em associação, como por exemplo a termoterapia seguida de crioterapia, como demonstrado em macieira (ZHAO et al., 2018), em alho (VIEIRA et al. 2015) e em framboesa (WANG et al., 2008) ou ainda quimioterapia seguido de crioterapia como demonstrado em damasco (ŞEKER et al., 2015) e batata (KUSHNARENKO et al., 2017).

Aqui foi demonstrado que a metodologia proposta anteriormente por Li et al. (2015) para criopreservação do cultivar de macieira Gala pode ser utilizada como ferramenta para a erradicação de ASGV e ASPV em porta-enxerto de macieira Marubakaido. Plantas que passaram pela crioterapia por vitrificação em gotas e permaneceram em crescimento ativo em casa de vegetação por 6 meses mostraram-se 70% livres da infecção mista de ASGV e ASPV, esses resultados evidenciam a efetividade da crioterapia como ferramenta para produção de plantas de macieira livres de vírus. Em adicional, é fundamental que as plantas que foram consideradas livres da infecção mista de ASGV e ASPV sejam indexadas por outros métodos de diagnose, assim a possibilidade de escapes por falsos negativo é reduzida (SILVA et al., 2008) e contribui na seleção de matrizes sadias que deverão passar por avaliação à campo antes de fornecerem material propagativo para a formação de pomares comerciais.

4 CONCLUSÃO

Nesse trabalho de dissertação foram apresentados resultados relevantes em relação a aplicação de técnica de crioterapia, baseada em protocolo de criopreservação, para erradicação de infecções mistas das espécies virais ASGV e ASPV em porta-enxerto de macieira Marubakaido. A crioterapia por vitrificação em gotas mostrou frequência de 70% e 100% de erradicação dos vírus ASGV e ASPV, respectivamente. As elevadas taxas de erradicação de ASGV e ASPV demonstram que a crioterapia por vitrificação em gotas é uma ferramenta eficaz para a produção de material vegetativo de *Malus prunifolia* livre de vírus.

O ASGV demonstrou ser mais difícil de ser erradicado por crioterapia em relação ao ASPV. Assim é evidente que existe uma resposta variável na erradicação das espécies virais.

É fundamental que as plantas consideradas livres da infecção mista de ASGV e ASPV nessa dissertação sejam indexadas por outros métodos de diagnose para reduzir o escape de falsos negativo, bem como sejam avaliadas à campo antes do fornecimento de material propagativo para a distribuição em viveiros.

As viabilidades dos meristemas diminuem proporcionalmente ao incremento de exposição à solução vitrificante PVS2, sendo que a toxicidade é reduzida quando a exposição é realizada a 0°C.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Dentre os fatores determinantes para a manutenção da produtividade e qualidade de pomares está a qualidade do material propagativo e, as doenças de etiologia viral representam uma grande barreira para a produção sustentável de macieira. A garantia de qualidade genética e fitossanitária muitas vezes é limitada, em termos de fiscalização e produção de material propagativo de qualidade; isso por vezes está ligado a dificuldade em indexação de espécies de vírus, custos para obtenção de laudos e a disponibilidade de material vegetal de qualidade.

A otimização de um protocolo de crioterapia para a erradicação de espécies de vírus que afetam as espécies de macieira poderiam auxiliar na produção de matrizes livres de vírus, gerando assim maior lucratividade e estabilidade de produtores envolvidos com a cadeia produtiva da macieira. Os resultados apresentados nesse documento demonstram a efetividade dessa técnica para a erradicação dos dois principais vírus, ASGV e ASPV, que afetam a produção de maçã.

Vale destacar que as plantas que se mostraram livres de ASPV e ASGV permaneceram por 6 meses em crescimento ativo em casa de vegetação, após a transferência das culturas regeneradas para condições *ex vitro*. Assim, é fundamental que seja realizado o monitoramento dessas plantas, principalmente por se tratar de uma cultura perene, isso significa evitar o aparecimento de falsos negativos e comprometer a sanidade para a formação de uma planta matriz.

É importante que esse trabalho seja contínuo, para o avanço de pesquisas com crioterapia em espécies de macieira e, sejam estendidos para outros genótipos da espécie, visto que já foram apresentadas respostas diferenciadas em relação a erradicação de vírus, a fim do desenvolvimento de um protocolo robusto de crioterapia. Com base nos resultados que encontramos é evidente o potencial da crioterapia por vitrificação em gotas para erradicação de vírus, entretanto, pesquisas futuras devem ser realizadas para determinar os efeitos de diferentes tempos de exposição dos meristemas ao PVS2 na sobrevivência e localização de células infectadas por vírus após a exposição em NL, principalmente para o ASGV que foi demonstrado ser um vírus difícil de ser erradicado.

Em adicional, é importante frisar que a crioterapia deve ser considerada além do tratamento em NL, em outras palavras, é importante que independente da espécie um protocolo de introdução e manutenção *in vitro* deve estar estabelecido,

principalmente em espécies lenhosas, como a macieira, que apresenta problemas de oxidação e contaminação de explantes.

Desde 1997, onde ocorreu o primeiro relato da eficiência da crioterapia para a erradicação de vírus em *Prunus* (BRISON et al., 1997), até o presente há uma série de relatos que demonstram a efetividade de técnicas de crioterapia na recuperação de espécies de plantas infectadas por vírus, isso representa uma comprovação que essa ferramenta pode ser considerada para auxiliar e ou substituir os métodos tradicionais de erradicação de vírus em plantas.

A pesquisa apresentada nesta dissertação fornece informações importantes a respeito da capacidade que a crioterapia por vitrificação em gotas possui para erradicar os vírus ASGV e ASPV em plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido, que são considerados as principais viroses que afetam plantas de macieira e são responsáveis por substanciais perdas. As informações descritas neste trabalho possuem significativos encadeamentos práticos e, fornecem uma base contundente para a otimização de protocolos de crioterapia para a erradicação de vírus em espécies de macieiras.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, P.F.S. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2016/17–Fruticultura.** Disponível em:

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/Fruticultura_2016_17.pdf>. 2017. Acesso em 11 de fevereiro de 2019.

ARAMBURU, J.; ROVIRA, M. The effects of apple mosaic ilarvirus (ApMV) on hazelnut (*Corylus avellana* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 73, p. 97-101, 1998.

ARAUJO, L. et al. Doenças da macieira e da pereira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 37, p. 61-74, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira.** Disponível em: <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em: janeiro de 2019.

AUGUSTIN, B.; DA CRUZ, C. T. Custos de produção e expectativas de retorno associados a produção de um hectare de maçã no planalto norte catarinense. **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 20, p. 105-121, 2015.

BAI, J. M. et al. Can Cryopreservation Eliminate the *Potato Virus X* (PVX) and *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd)? **Bioscience Methods**, v. 3, p. 34-40, 2012.

BAI, J. M. et al. Elimination of *Potato virus X Potato spindle tuber viroid* by cryopreservation. **Molecular Plant Breeding**, v. 8, p. 605-611, 2010.

BARBA, M.; ILARDI, V.; PASQUINI, G. Control of Pome and Stone Fruit Virus Diseases. In: LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N. (eds.). **Advances in Virus Research**, v. 91, Elsevier, 2015, p. 48-72.

BAYATI, S.; SHAMS-BAKHSH, M; MOIENI, A. Elimination of *Grapevine Virus A* (GVA) Cryotherapy and Electrotherapy. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, p. 443-450, 2011.

BENELLI, C.; DE CARLO, A.; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Mallus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 175-185, 2013.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p. 141-219, 2008.

BETTONI, J. C.; SOUZA, J. A. Crioterapia: uma potencial ferramenta para erradicação de vírus em plantas. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 2, p. 1-3, 2018.

BETTONI, J. C. **Criopreservação para formação de banco de segurança em videira e crioterapia para erradicação de vírus em macieira**. 2018. 195p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

BETTONI, J. C. et al. Eradication of latent viruses from apple cultivar 'Monalisa'shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. **Scientia Horticulturae**, v. 250, p. 12-18, 2019.

BETTONI, J. C. et al. Cryotherapy by encapsulation-dehydration is effective for *in vitro* eradication of latent viruses from 'Marubakaido' apple rootstock. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 1-7, 2018.

BETTONI, J. C. et al. Cryotherapy: a new technique to obtain grapevine plants free of viruses. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, p. 1-13: e-883, 2016.

BETTONI, J. C. et al. *In Vitro* Propagation of Grapevine Cultivars with Potential for Soth of Brazil. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1806-1815, 2015.

BI, E.L. et al. Shoot tip cryotherapy for efficient eradication of *grapevine leafroll-associated virus-3* from diseased grapevine in vitro plants. **Annals of Applied Biology**, v. 173, p. 261-270, 2018.

BI, W. L. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) – a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 53, p. 449-460, 2017.

BRAKTA, A. et al. *Malus pumila* 'Spy 227'and *Apple stem pitting virus*: graft incompatibility and epinasty. **Virus Disease**, v. 26, p. 92-96, 2015.

BRISON, M. et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with *Plum pox potyvirus*. **Plant Science**, v. 123, p. 189–196, 1997.

CAI, B. H. et al. Preliminary study on the elimination of *Strawberry mild yellow-edge virus* from *in vitro* shoot tips of strawberry cv. Meihou by vitrification cryopreservation. **Journal Fruit Science**, v. 25, p. 872-876, 2008.

CIENIEWICZ, E.; FUCHS, M. *Apple stem pitting virus*. **Tree Fruit**. Cornell university, 2016a.

CIENIEWICZ, E.; FUCHS, M. *Apple chlorotic leaf spot virus*. **Tree Fruit**. Cornell university, 2016b.

CIEŚLIŃSKA, M. Application of thermo-and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 15, p. 117-124, 2007.

CONDELLO, E. et al. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. **CryoLetters**, v. 32, p. 175-185, 2011.

CRESTANI, O. A. **Determinação da incidência de viroses e caracterização molecular de apple stem grooving virus em matrizes de macieiras utilizadas na produção de mudas no sul do Brasil**. 2018. 59p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

CRUZ-CRUZ, C.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, v. 2, p. 73-95, 2013.

CUI, Z. H. et al. Plant Pathogen Eradication by Cryotherapy of Shoot Tips: Development, Achievements and Prospective. **Acta Horticultae**, v. 1083, p.35-41, 2015.

DAR, N. A. *Apple stem grooving virus-a review article*. **Int J Modern Plant Anim Sci**, v. 1, p. 28-42, 2013.

DENARDI, F. et al. Desempenho agronômico de porta-enxertos de macieira da série americana 'Geneva' no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 104-111, 2015.

DE SOUZA, E. H. et al. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 1357-1376, 2012.

DHIR, S. et al. A simplified strategy for studying the etiology of viral diseases: *Apple stem grooving virus* as a case study. **Journal of virological methods**, v. 213, p. 106-110, 2015.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of Clonal Crops: a Review of Key Parameters. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p. 31-39, 2014.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Columbia, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, p. 5-16, 2011.

EPAGRI/CEPA. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2016-2017. Florianópolis: **Epagri/Cepa**, V. 1, p. 200, 2017.

FACCIOLI, G.; MARANI, F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: HADID, A.; DHETARPAL, A. R. K.; KOGANEZAWA, H. (eds.). **Plant Virus Diseases Control**, American Phytopathological Society, St. Paul, Mn, 1998, p. 436-380.

FACCIOLI, G. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: **Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes**. Springer, Dordrecht, 2001. p. 365-390.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 413-426, 1984.

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, p. 1711-1714, 2014.

FAOSTAT, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 08 de novembro de 2018.

FENG, C. et al. A comparison of two cryogenic protocols in cryopreservation of Apple shoot tips. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p. 161-166, 2014.

FENG, C. H. et al. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of in vitro-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 112, p. 369–378, 2013.

FUCHS, M. Virus transmission and grafting practices. **NY Fruit Quart**, v. 24, p. 25-27, 2016.

GUERRA, D. S. et al. Development of *Glomerella* leaf spot is enhanced in virus-infected maxi gala apples. **Journal of Plant Pathology**, v. 94, p. 237-241, 2012.

GANINO, T. et al. Anatomy and osmotic potential of the *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 78-82, 2012.

GAURAV, A. K. et al. Cryotherapy for pathogen free planting material in vegetatively propagated crops: a review. **Progressive Research – An International Journal**, v.12, p.763-766, 2017.

GRIMOVA, L. et al. *Apple mosaic virus*. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 55, p. 1-19, 2016.

GÜMÜŞ, M. et al. Occurrence and distribution of stone fruit viruses and viroids in commercial plantings of *Prunus* species in western Anatolia, Turkey. **Journal of Plant Pathology**, p. 265-268, 2007.

GUȚĂ, I. C.; BUCIUMEANU, E-C. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, 2011.

HADIDI, A.; BARBA, M. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In: HADIDI, A., BARBA, M., CANDRESSE, T., JELKMANN, W. (eds.), **Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits**, St. Paul: American Phytopathological Society, Mn., 2011, p. 1-7.

HALMAGYI, A.; DELIU, C.; ISAC, V. Cryopreservation of *Malus* cultivars: Comparison of two droplet protocols. **Scientia Horticulturae**, v. 124; p. 387-392, 2010.

HAO, Y. J.; LIU, Q. L.; DENG, X. X. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. **Cryobiology**, v. 43, p. 46-53, 2001.

HAO, L. et al. A multiple RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of latent viruses and apsacarviroids in apple trees. **Journal of virological methods**, v. 234, p. 16-21, 2016.

HELLIOT, B. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1117-1122, 2002.

HOWELL, W. E.; MINK, G. I. Select Malus Clones for Rapid Detection of Apple Stem Grooving Virus. **Plant Disease**, v. 80, p.1200-1202, 1996

HU, G. J. et al. Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. **Crop protection**, v. 37, p. 20-25, 2012.

HU, G. et al. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 121, p. 435-443, 2015.

HU, G. J. et al. Occurrence and genetic diversity analysis of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in China. **Archives of Virology**, v. 162, p. 2397–2402, 2017.

HU, G.J. et al. Elimination of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from *Vitis vinifera* 'Kyoho'by an antiviral agent combined with shoot tip culture. **Scientia Horticulturae**, v. 229, p. 99-106, 2018.

HULL, R. Induction of Disease 1" Virus Movement through the Plant and Effects on Plant Metabolism. In: HULL, R. **Matthew's Plant Virology**, v. 4, p. 373-436, 2002.

ISAC, V. et al. Achievements and trends in the use of tissue culture for the mass propagation of fruit plants and germplasm preservation at the research institute for fruit growing, Pitesti, Romania. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, p. 92, 2010.

JAMES, D. Confirmation of the elimination of *Apple stem grooving virus* from apple trees by in vitro chemotherapy. **Julius-Kuhn-Archiv**, v. 427, p. 47-50, 2010.

JAMES, D. et al. Elimination of *Apple stem grooving virus* by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. **Annals of applied biology**, v. 131, p. 459-470, 1997.

JI, Z. et al. Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. **Acta virologica**, v. 57, p. 435-441, 2013.

KACZMARCZYK, A. et al. Current issues in plant cryopreservation. In: KATKOV, I (eds). **Current frontiers in cryobiology**. Intech, 2012. p.417-438.

KARTHA, K. K.; LEUNG, N. L.; MROGINSKI, L. A. In vitro growth responses and plant regeneration from cryopreserved meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 107, p. 133-140, 1982.

KAYA, E.; GOKDOGAN, E. Y. Virus eradication from plants via novel biotechnological processes: one step freezing methods based on vitrification of cryotherapy techniques. **Mugla Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 34-40, 2015.

KINOTI, W. M. et al. The Incidence and Genetic Diversity of *Apple Mosaic Virus* (ApMV) and *Prune Dwarf Virus* (PDV) in *Prunus* Species in Australia. **Viruses**, v. 10, p. 136, 2018.

KIM, H. H. A Systematic Approach to Develop Droplet-vitrification Procedure. **Cryobiology**, v. 80, p. 171-171, 2018.

KIM, H. H. et al. Development of alternative plant vitrification solution in droplet-vitrification procedures. **CryoLetters**, v. 30, p. 320-334, 2009.

KORKMAZ, G.; SİPAHİOĞLU, H. M.; USTA, M. Survey of *Apple mosaic virus* in apple-growing provinces of East Anatolia (Malatya and Van) by RNA probe hybridization assay and RT-PCR. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 37, p. 711-718, 2013.

KUMAR, S. et al. Simultaneous Detection of Major Pome Fruit Viruses and a Viroid. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 203-210, 2014.

KUMMER, J.; SEMAL, J. Considérations sur les possibilités de la lutte chimiothérapeutique en virologie végétale. Table ronde sur la thermothérapie des espèces ligneuses. **Gembloux. Stat. Cultures Fruit**, p. 113-123, 1970.

KUSHNARENKO, S. et al. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient *Potato virus M* and *Potato virus S* eradication in potato (*Solanum tuberosum L.*) in

vitro shoots. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, p. 425-432, 2017.

KVITSCHAL, M. V.; DENARDI, F. Programa de melhoramento genético da macieira na epagri, Santa Catarina–Brazil. **INIA Las Brujas, Seminario de Actualización Técnica en Frutales de Pepita**, N. 739, p. 9-16, 2014.

LAIMER, M. Detection and Elimination of Viruses and Phytoplasmas from Pome and Stone Fruit Trees. In: JANICK, J. **Horticultural Reviews**, v. 28, p. 187, 2010.

LAIMER, M.; BARBA, M. Elimination of systemic pathogens by thermotherapy, tissue culture, or in vitro micrografting. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, M. (eds). **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2011. p. 389–93

LAZZAROTTO, J. J. Indicadores econômicos e financeiros em sistemas típicos de produção de maçã no Brasil. **Embrapa Uva e Vinho-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.

LESSA, A. O. **Utilização de microenxertia para a obtenção de plantas de *Malus domestica* Borkh livres do vírus da mancha clorótica das folhas da macieira (ACLSV)**. 1998. p.78. Tese de Doutorado (Doutorado em Fitotecnia) -Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1998.

LI, B. Q. et al. Recovery patterns, histological observations and genetic integrity in *Malus* shoot tips cryopreserved using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration procedures. **Journal of Biotechnology**, v. 214, p. 182-191, 2015.

LI, B. Q. et al. Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation-dehydration. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 50, p. 357-368, 2014.

LI, B. Q. et al. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks 'M9' and 'M26'. **Annals of Applied Biology**, v. 168, p. 142–150, 2016.

LIU, J et al. Identification and characterization of microRNAs from in vitro-grown pear shoots infected with Apple stem grooving virus in response to high temperature using small RNA sequencing. **BMC genomics**, v. 16, p. 945, 2015.

LIZÁRRAGA, A.; ASCASÍBAR, J.; GONZÁLEZ, M. L. Fast and Effective Thermotherapy Treatment for In Vitro Virus Eradication in Apple and Pear Trees. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 2474, 2017.

MALIAUSKAITĖ, D. **Obelų veislių virusologinė būklė ir devirusavimas in vitro**. 2013. 44 p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agrobiotecnologia). Aleksandras Stulginskis University, akademija (kaunas), 2013.

MALIOGKA, V. et al. Recent advances on detection and characterization of fruit tree viruses using high-throughput sequencing technologies. **Viruses**, v. 10, p. 436, 2018.

MARKOVIĆ, Z. et al. Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Vitis**, v. 54, p. 247-251, 2015.

MARTELLI, G. P.; JELKMANN, W. *Foveavirus*, a new plant virus genus. **Archives of virology**, v. 143, p. 1245-1249, 1998.

MARTIN, R. R. et al. Viruses and virus diseases of Rubus. **Plant disease**, v. 97, p. 168-182, 2013.

MASSART, S.; JIJAKLI, M.H.; KUMMERT, J. *Apple stem grooving virus*. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, W.; JELKMAN, W. (eds) **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**. APS Press, St. Paul: American Phytopathological Society, 2011. p 29–33.

MATHEW, L. et al. Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips. **Protoplasma**, v. 255, p. 1-13, 2018.

MATSUI, H. et al. Influence of Apple Mosaic Virus on the Growth, Yield, and Qualities of Saaz Hop. **Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 152-159, 2017.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of plant genetic resources: conventional and new methods. **Reviews in Agricultural Science**, v. 5, p.13-20, 2017.

MOHAMMED, I. U.; GHOSH, S.; MARUTHI, M. N. Generating virus-free cassava plants by in vitro propagation with chemical and heat treatment. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 1551-1560, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NEELAMATHI, D.; MANUEL, J.; GEORGE, P. Influence of apical meristem and chemotherapy on production of virus free sugarcane plants. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 2277, p. 2502, 2014.

NICKEL, O. Doenças causadas por vírus. In: KOVALESKI, A.; NICKEL, O.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. **Maçã: Fitossanidade**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Frutas do Brasil, v. 38, 2004. p. 61-66.

NICKEL, O. et al. Sequences analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 655-659, 2001.

NICKEL, O. FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. In: **Análises e testes de avaliação de sanidade**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009.

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, p. 207-213, 2014.

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Produção de material básico livre de vírus para viveiros de macieiras. In: Gilmar Ribeiro Nachtigall. (Org.). **Inovações tecnológicas para o setor da Maçã**. 1ed. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, v. 1, p. 181-198, 2011.

NISHIZAWA, S. et al. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis L.*) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. **Plant Science**, v. 91, p. 67-73, 1993.

NIINO, T.; SAKAI, A. Cryopreservation of alginate-coated in vitro grown shoot tips of apple, pear and mulberry. **Plant Science**, v. 87, p. 199-206, 1992.

OZUDOGRU, E. A.; KAYA, E.; KIRDOK, Lambardi M. Comparison of different PVS2-based procedures for cryopreservation of *Thymus* spp. European Cooperation in Science and Technology. **Food and Agriculture**, Cryoplanet, COST Action, v. 871, p. 86-92, 2011.

PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, p. 173-188, 2013.

PANIS, B. et al. Droplet vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? **Acta Horticulturae**, 908, p. 157-163, 2011.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v. 168, p. 45-55, 2005.

PAPRSTEIN, F. et al. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 347-352, 2008.

PARKER, W. B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. **Virus research**, v. 107, p. 165-171, 2005.

PATHIRANA, R. et al. Cryotherapy of grapevine (*Vitis* spp.) to remove leafroll viruses from infected plants. **20 a Reunião Bienal da linhagem**. Nova Zelândia, da Associação International de Biotecnologia Vegetal. Waiheke Island, New Zealand, 25-28 de fev. 2013.

PATHIRANA, R. et al. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 1-11, 2016.

PATHIRANA, R. et al. Removal of Leafroll Viruses from Infected Grapevine Plants by Droplet Vitrification. **Acta Horticulture**, v. 1083, p. 491-498, 2015.

PAUL, H.; DAIGNY, G.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Cryopreservation of apple (*Malus × domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. **Plant Cell Reports**, v.19, p.768-774, 2000.

PAUNOVIC, S.; PASQUINI, G.; BARBA, M. *Apple mosaic virus* in stone fruits. In: **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**, p. 91-95, 2011.

PEREIRA-LORENZO, S. et al. Apple (*Malus* spp.) breeding: present and future. In: Al-Khayri, J. M.; Jain, S. M.; Johnson, D. V. (eds). **Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits**. Springer, v.3, 2018. p. 3-29.

PETHYBRIDGE, S. J. et al. Mechanical transmission of Apple mosaic virus in Australian hop (*Humulus lupulus*) gardens. **Annals of Applied Biology**, v. 141, p. 77-85, 2002.

PETRI, J. L. et al. Advances of the Apple crop in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 48-56, 2011.

PETRZIK, K.; LENZ, O. *Apple mosaic virus* in pome fruits. **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**, p. 25-28, 2011.

PETRZIK, K. Capsid protein sequence gene analysis of Apple mosaic virus infecting pears. **European journal of plant pathology**, v. 111, p. 355-360, 2005.

PREVIATI, A. et al. *In vitro* production of virus-free chrysanthemum stock plants for cut flowers. **Propag. Ornam. Plants**, v. 8, p. 167-169, 2008.

PŪPOLA, N. et al. Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. **Journal of Phytopathology**, v. 159, p. 597-605, 2011.

REED, B. M. et al. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. **CryoLetters**, v. 25, p. 341-352, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2014. <https://www.r-project.org/>

REED, P. J.; FOSTER, J. A. Exclusion of pome and stone fruit viruses, viroids and phytoplasmas by certification and quarantine. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. (eds). **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**. St. Paul: American Phytopathological Society; 2011. p. 381-8.

RECH, S.; CARIO, S. A. F.; AUGUSTO, C. A. Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 42, p. 89-106, 2014.

ROMADANOVA, N. V. et al. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Mallus* sp.). **CryoLetters**, v. 37, p. 1-9, 2016.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. Var. *Brasiliensis tanaka*). **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAREILA, O. et al. Role of Viral Movement and Coat Proteins and RNA in Phloem-dependent Movement and Phloem Unloading of Tobamoviruses. **Journal of Phytopathology**, v. 152, p. 622-629, 2004.

SEDLAK, J., PAPRSTEIN, F.; TALACKO, L. Elimination of *Apple stem pitting virus* from pear cultivars by in vitro chemotherapy. **Acta Hortic.** v. 923, p. 111-115, 2011.

ŞEKER, M. G. et al. In vitro elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 17, 2015.

SILVA, C. D. S. **Aspectos morfológicos e de produção de plantas de macieiras cultivadas em diferentes altitudes no sul do Brasil**. 2015. 89p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

SILVA, F. N. et al. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, p. 157-161, 2008.

SIM, S. T.; GOLINO, D. Micro-vs. Macroshoot Tip Tissue Culture Therapy for Disease Elimination in Grapevines. **Foundation Plant Services**, FPS Grape Program Newsletter, p. 137-144, 2010.

SINGH, V.; KOCHE, V.; QURAISHI, A. Viral Elimination Strategies for *Musa spp.* **Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology**, v. 8, p. 7-14, 2018.

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 *Alfalfa mosaic virus* than to other *lilarviruses*. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 273-278, 2000.

SOUZA, E. B. et al. Biological and molecular characterization of two Brazilian isolates of *Apple stem grooving virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 391-396, 2017.

SOUZA, F. V. D. et al. Droplet-vitrification and morphohistologicas studies of cryopreserved shoo tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, p. 351-360, 2016.

SVOBODA, J. et al. Relative concentration of *Apple mosaic virus* coat protein in different parts of apple tree. **Horticultural Science (Prague)**, v. 37, p. 22-26, 2010.

SWEET, J. B. Fruit tree virus infections of woody exotic and indigenous plants in Britain. In: XI International Symposium on Fruit Tree Virus Diseases, v.94, p. 231-238, 1979.

TAN, R et al. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 101, p. 229-235, 2010.

TEIXEIRA, A. S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MOLINA-GARCÍA, A. D. Measurement of cooling and warming rates in vitrification-based plant cryopreservation protocols. **Biotechnology progress**, v. 30, p. 1177-1184, 2014.

TEIXEIRA, A. S. et al. Glass transition and heat capacity behaviors of plant vitrification solutions. **Thermochimic'a Acta**, v. 593, p. 43-49, 2014.

THOKCHOM, T. et al. Molecular characterization of the Indian strain of Apple mosaic virus isolated from apple (*Malus domestica*). **Phytoparasitica**, v. 37, p. 375-379, 2009.

TZANETAKIS, I. E.; MARTIN, R. R. First report of strawberry as a natural host of Apple mosaic virus. **Plant Disease**, v. 89, p. 431-431, 2005.

VERMA, N.; RAM, R.; ZAIDI, A. A. In vitro production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo-and thermotherapy. **Scientia Horticulturae**, v. 103, p. 239-247, 2005.

VIEIRA, R. L. et al. Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. **Acta Physiologae Plantarum**, v. 37, p. 1-11, 2015.

VIVEK, M.; MODGIL, M. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar 'Oregon Spur-II'. **VirusDisease**, v. 29, p. 75-82, 2018.

VOLK, G. M. et al. Plant Shoot Tip Response to Treatment with Plant Vitrification Solution 2. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p.81-84, 2014b.

VOLK, G. M. et al. The vulnerability of US apple (*Malus*) genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 62, 765–794, 2015.

VOLK, G. M.; JENDEREK, M.; CHAO, C. T. Prioritization of *Malus* accessions for collection cryopreservation at the USDA-ARS National Center for Genetic Resources Preservation. **Acta Hortic.** V. 1172, p. 267-272, 2015.

VOLK, G. M.; CASPERSEN, A. M.; Cryoprotectants and components induce plasmolytic responses in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) suspension cells, **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 53, p. 363-371, 2017.

VOLK, G. M.; HARRIS, J. J.; ROTINDO, K. E. Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. **Cryobiology**, v. 52, p. 305-308, 2006.

VOLK, G. M.; SHEPHERD, A.; BONNART, R. M. Strategies for Improved Efficiency when Implementing Plant Vitrification Techniques. **Acta Horticulturae**, v. 1039, p. 85-90, 2014a.

VOLK, G.M.; SHEPHERD, A.; BONNART, R. Successful cryopreservation of *Vitis* shoot tips: Novel pretreatment combinations applied to nine species. **CryoLetters**, v. 39, p. 322-330, 2018.

WANG, M.R. et al. In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. **Plant Methods**, v. 14, p. 1-18, 2018a.

WANG, M. R. et al. Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects. **Plant Cell Reports**, v. 37, p. 1-21, 2018b.

WANG, M. R. et al. Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species. In: Loyola-Vargas, V. M.; Ochoa-Alejo, N. (eds.). **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815, Springer Science+Business Media, New York, 2018c. p. 257-268.

WANG, L. Y. et al. An efficient droplet-vitrification cryopreservation for valuable blueberry germplasm. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 60-69, 2017.

WANG, M. R. et al. Culture of shoot tips from adventitious shoots can eradicate *Apple stem pitting virus* but fails in *Apple stem grooving virus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 125, p. 283-291, 2016.

WANG, B. et al. Potential applications of cryogenic technologies to plant genetic improvement and pathogen eradication. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 583-595, 2014.

WANG, B. et al. Potato viruses in China. **Crop protection**, v. 30, p. 1117-1123, 2011.

WANG, L. P. et al. Distribution of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected in vitro pear shoots. **Crop protection**, v. 29, p. 1447-1451, 2010.

WANG, Q. C. et al. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. **Annals of Applied Biology**, v. 154, p. 351-363, 2009.

WANG, Q. C; VALKONEN, J. P. T. Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.). **CryoLetters**, v. 30, p. 171-182, 2009a.

WANG, Q. C; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 119-122, 2009b.

WANG, Q. et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, p. 237-250, 2008.

WANG, Q. C.; VALKONEN, J. P. T. Elimination of two synergistically interacting viruses from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy. **Journal of Virological Methods**, v. 154, p. 135-145, 2008.

WANG, Q. C. et al. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY). **Potato Research**, v. 49, p. 119-129, 2006.

WANG, Q. C. et al. Elimination of *Grapevine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. **Plant Science**, v. 165, p. 321-327, 2003.

WU, Y. J. et al. Cryopreservation of apple shoot tips: importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. **CryoLetters**, v. 20, p. 121-130, 1999.

YAMAGA, H.; MUNAKATA, T. Production of virus-free apple planting stock by meristem culture. **Techn Bull Food Fertil Technol Cent**, v. 126, p. 10-17, 1991.

YANG, L. et al. A Reexamination of the Effectiveness of Ribavirin on Eradication of Viruses in Potato Plantlets *in vitro* Using ELISA and Quantitative RT-PCR. **American journal of potato research**, v. 91, p. 304-311, 2014.

YAO, B. et al. Simultaneous detection and differentiation of three viruses in pear plants by a multiplex RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 196, p. 113-119, 2014.

YI, J. Y. et al. *Elimination Potato Virus Y (PVY) and Potato Leaf Roll Virus (PLRV) Using Cryotherapy of in vitro grown Potato Shoot Tips*. **The Korean Journal of Crop Science**, v. 59, p. 498-504, 2014.

YIN, Z., FENG, C., WANG, B., WANG, Q., ENGELMANN, F., LAMBARDI, M., PANIS, B. Cryotherapy of shoot tips: a newly emerging technique for efficient elimination of plant pathogens. **Acta Horticulturae**, v. 908, 373–384, 2011.

YOUSSEF, F. et al. Strategies to facilitate the development of uncloned or cloned infectious full-length viral cDNAs: *Apple chlorotic leaf spot virus* as a case study. **Virology journal**, v. 8, p. 488, 2011.

ZHAO, L. et al. Combining Thermotherapy with Cryotherapy for Efficient Eradication of *Apple stem grooving virus* from Infected In-vitro-cultured Apple Shoots. **Plant Disease**, v. 102, p. 1-7, 2018.

ZHAO, Y. et al. Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: effect of preculture, dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. **CryoLetters**, v. 20, p. 103-108, 1999.