

## **ERRADICAÇÃO DE VÍRUS LATENTES DE MACIEIRA POR MEIO DA TÉCNICA DE CRIOTERAPIA POR VITRIFICAÇÃO EM GOTAS**

Matheus Correa Borba<sup>2</sup>, Amauri Bogo<sup>3</sup>, Suzana De Carli<sup>2</sup>, Juliana Aparecida de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Erradicação de vírus latentes de macieira por meio da técnica de crioterapia por vitrificação em gotas”

<sup>2</sup> Acadêmico(a) do Curso de Agronomia, CAV-UDESC - bolsista PIBIC/CNPq

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Agronomia– amauri.bogo@udesc.br.

<sup>4</sup> Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, CAV-UDESC

No Brasil a produção de maçãs representa grande importância para o setor agrícola, sendo uma das fruteiras mais produzidas, atualmente ocupa a quinta posição entre os frutos produzidos nacionalmente e é a sexta fruta mais exportada.

O uso de material propagativo de origem e sanidade duvidosos provocou aumento na disseminação de espécies de vírus que não costumam apresentar sintomas visíveis a muitas espécies de plantas hortícolas, incluindo a macieira. As principais espécies de vírus que apresentam sintomas latente e que são mais frequentes com riscos a pomicultura são *Apple stem pitting virus*, *Apple stem grooving virus* e *Apple chlorotic leafspot vírus*.

A única maneira para obter material sadio é pelo controle da sanidade desses materiais, em geral são utilizados métodos biotecnológicos para o monitoramento e obtenção de plantas saudáveis. Para realizar a limpeza desse material contaminado, utiliza-se principalmente os métodos de cultura de tecidos ou cultura de tecido em associação com a termoterapia e mais recente estão sendo usadas a quimioterapia e a crioterapia como alternativas para aprimorar os métodos de limpeza de vírus em maçãs.

A crioterapia consiste no tratamento em tecidos vegetativos regenerantes (meristemas) em temperaturas ultrabaixas, no qual os propágulos são tratados em nitrogênio líquido (-196°C) e as células infectadas são eliminadas seletivamente pelo efeito do congelamento, associado com o tratamento que esse meristema recebe. Sua principal característica é a praticidade em comparação com outros métodos de eliminação de vírus de plantas, bem como proporciona altas taxas de regeneração de plantas livres de espécies virais, com baixo custo operacional, agilidade e facilidade de tratamentos em grande número de amostras.

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 no porta-enxerto de macieira Marubakaido (*Malus prunifolia*).

Plantas do porta-enxerto Marubakaido comprovadamente infectadas por ASGV e ASPV foram previamente selecionadas por 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*.

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 no escuro 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: 30 % de glicerol (m/v), 15% de etileno glicol (m/v), 15% de

dimetilsulfóxido (m/v) e 0,4 M de sacarose) por 0, 20, 40, 50, 60 e 80 min à 22°C seguido de tratamento em nitrogênio líquido (NL) por 1 h. 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 culturas foram mantidas por 7 dias a  $25 \pm 2$ °C no escuro e então transferidas para as mesmas condições das culturas estoque.

As taxas de sobrevivência e regeneração foram avaliadas com 4 e 8 semanas após a etapa de crioterapia, respectivamente. 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). As plantas foram mantidas em sala de crescimento, em condições saturadas de umidade relativa do ar, com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup> e intensidade luminosa de 150 mMol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. As culturas in vitro foram mantidas por 30 dias em meio de indução de enraizamento. 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  $25 \pm 2$ °C, e fotoperíodo de 16 h luz dia<sup>-1</sup> pelo período de 30 dias.

Independente do tempo de exposição a solução vitrificante PVS2 a 0°C, as taxas de sobrevivência foram maiores do que as taxas de regeneração. 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. 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%.

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 RT-PCR 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*, mudas de qualidade.