

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOTERAPIA DE ÁPICES
CAULINARES PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO
VIRAL ASSOCIADO A MURCHA (PMWAV) EM
VARIEDADES SILVESTRES DO GÊNERO *Ananas***

Patrícia Araújo Guerra

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

AGOSTO- 2017

**CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOTERAPIA DE ÁPICES
CAULINARES PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO VIRAL
ASSOCIADO A MURCHA (PMWAV) EM VARIEDADES
SILVESTRES DO GÊNERO *Ananas***

Patrícia Araújo Guerra

Bacharel em Biotecnologia

Universidade Federal da Bahia – 2015

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADORA: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza
COORIENTADOR: Dr. Everton Hilo de Souza

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

G934c

Guerra, Patrícia Araújo.

Criopreservação e crioterapia de ápices caulinares para erradicação do complexo viral associado a murcha (PMWaV) em variedades silvestres do gênero Ananás / Patrícia Araújo Guerra. _ Cruz das Almas, BA, 2017. 77f.; il.

Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Coorientador: Everton Hilo de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Abacaxi – Cultivo. 2.Abacaxi – Melhoramento genético. 3.Doenças e pragas – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 634.1

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOTERAPIA DE ÁPICES
CAULINARES PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO VIRAL
ASSOCIADO A MURCHA (PMWAV) EM VARIEDADES
SILVESTRES DO GÊNERO *Ananas***

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
PATRÍCIA ARAÚJO GUERRA

Aprovado em 18 de agosto de 2017

Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)

Dra. Ana da Silva Lédo
Embrapa Tabuleiros Costeiros
(Examinador externo)

Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Examinador interno)

DEDICATÓRIA

Tornar o simples complicado é lugar-comum; tornar o complicado simples, maravilhosamente simples, isso é criatividade.

Charles Mingus

Dedico a Deus a minha família e a todos que me apoiaram com muita paciência e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que atua de forma misteriosa e tem guiado meus caminhos até aqui, me dando força e sabedoria. Aos meus pais, minha mãe, a minha verdadeira alma gêmea, que a todo o momento me dá carinho, amizade e sua paciência. É meu exemplo de mulher forte e determinada, Te amo muito. A meu Pai, por sua força, por acreditar e confiar em mim de maneira incondicional, sempre sinto seu amor, Te amo da mesma maneira.

Ao meu irmão Yuri, pelo carinho, atenção e proteção e à minha cunhada Miriam pela ternura e leveza de alma. Aos meus avós paternos e maternos por todo carinho, todos os beijos e orações e em especial Alberto Araújo Santos *in memoriam*. Sempre vou sentir seu carinho e proteção especial, saudades.

Ao meu irmão de coração Manassés, carinhosamente “Ninho”, Deus escolheu você para fazer parte da minha vida e só tenho a agradecer por isso. Foi uma longa jornada juntos, de muitas alegrias, aventuras e aflições. Que venham muito mais nas nossas vidas.

Às pessoas maravilhosas que conheci durante essa jornada Neylane, Rafa, Josélia, Taise Rodrigues, Joaquim, Edivânia, Ronilze Leite, Bruna de Fatima, Gabi Navarro, vocês me fazem querer reviver tudo de novo. À Lívia de Jesus, por seus ensinamentos iniciais sem os quais nada seria possível.

Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Cultura de tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Dona Tânia por estar sempre de bem com a vida e em especial a Helder Carvalho por todo o conhecimento transmitido. Você é um excelente profissional e principalmente pelas longas conversas filosóficas no Laboratório de Biologia Molecular, ri e aprendi muito sobre a vida nesses momentos. Foi bom trabalhar com você.

Ao meu coorientador Dr. Everton Hilo de Souza, muito obrigada por todo carinho, paciência, dedicação e orientação. Saiba que tem minha verdadeira admiração por ser um excelente profissional e de um coração enorme.

À minha orientadora Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza, seu amor e paixão pelo que faz me contagiou, meu muito obrigada por isso. Minha admiração e carinho serão eternos. Além disso, obrigada por ser a fonte de conhecimento que adquiri durante nossa convivência.

A todos que conheci durante essa jornada acredito que nada é por acaso e com certeza contribuíram de alguma forma na minha vida pessoal e acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Edital CAPES-EMBRAPA 15/2014 e PROCAD - 2013), pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária, NAP/MEPA, ESALQ/USP e ao Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas, na pessoa da Prof^a. Adriana Pinheiro Martinelli e Mônica Lanzoni Rossi, CENA/USP pela infraestrutura para realização dos trabalhos de microscopia.

À UFRB e a Embrapa Mandioca e Fruticultura, por ter permitido o início e a concretização deste trabalho.

Aos demais.

Obrigada!

EPÍGRAFE

*“A forma como escolhemos ver o mundo cria o mundo
que nós vemos”.*

Barry Neil Kaufma

CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOTERAPIA DE ÁPICES CAULINARES PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO VIRAL ASSOCIADO A MURCHA (PMWAV) EM VARIEDADES SILVESTRES DO GÊNERO *Ananas*

RESUMO: Estratégias de conservação e erradicação de patógenos têm sido propostas para diversas culturas que tenham coleções in vitro e no campo. O ataque de pragas e doenças vem causando perdas significativas em germoplasma do gênero *Ananas*. Sendo assim, o desenvolvimento e otimização de protocolos de criopreservação e crioterapia de variedades cultivadas e silvestres de abacaxi tornam-se necessárias para conservação desses recursos genéticos. No presente estudo foram utilizadas plantas de abacaxizeiros provenientes de quatro variedades botânicas pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) e dois híbridos oriundos do programa de melhoramento genético do abacaxizeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O objetivo geral desse trabalho foi avaliar as condições do material de partida (ápices caulinares) em diferentes tempos de cultivo da planta doadora e sua correlação com as porcentagens de regeneração, assim como, estabelecer um protocolo de crioterapia para remoção do complexo viral da murcha do abacaxizeiro (o PMWAV). Para os estudos do material de partida foi utilizada a técnica de criopreservação já estabelecida para ápices caulinares de abacaxi. Plantas in vitro foram cultivadas por 30, 45 e 60 dias para retirada dos ápices caulinares a serem criopreservados. Foram avaliadas as porcentagens de regeneração em cada tratamento tanto para os grupos controle quanto aos ápices expostos ao nitrogênio líquido, e realizados cortes histológicos para avaliação da anatomia do material de partida. Para os ensaios de crioterapia foram realizados procedimentos de indexação via RT-PCR em dois momentos distintos, antes e depois do congelamento. Os resultados indicaram uma interação entre o tempo de cultivo da planta doadora e os genótipos, influenciando de forma significativa nas porcentagens de regeneração dos ápices caulinares. Os acessos *A. comosus* var. *comosus* (BGA-009), *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119) apresentaram as maiores porcentagens de regeneração com 95 % e 90 %, respectivamente, para o tempo de cultura de 30 dias. Os cortes histológicos explicaram o insucesso de alguns tratamentos após o congelamento. Para os BGA-009 e BGA-376 (*A. comosus* var. *paraguayensis*) a crioterapia foi eficiente na remoção do complexo viral. No entanto, para o BGA-119 o PMWAV-3 foi eliminado em cerca de 83 % das plantas tratadas. Esses resultados são promissores para a melhoria da metodologia de criopreservação e para que a crioterapia possa ser utilizada como metodologia de rotina para a remoção do complexo viral da murcha do abacaxizeiro em germoplasma de abacaxi.

Palavras-chave: *Ananas comosus* (L) Merr., ápices caulinares, *Pineapple Mealybug Associated Virus*.

CRYOPRESERVATION AND CRYOTHERAPY SHOOT TIPS TO ERADICATE THE VIRAL COMPLEX ASSOCIATED WITH WILT (PMWaV) IN WILD VARIETIES OF *Ananas* GENUS

ABSTRACT: Strategies for the conservation and eradication of pathogens have been proposed for several cultures that have as collections in vitro and in the field. The attack of pests and diseases has caused significant losses in germplasm of the genus *Ananas*. Thus, the development and optimization of creativity and cryotherapy protocols of cultivated and wild pineapple varieties are necessary for conservation of genetic resources. In the present study, pineapple plants of four botanical varieties belonging to the Pineapple Active Germplasm Bank (AGB Pineapple) and two hybrids from the genetic improvement program of the Embrapa Cassava and Fruits research unit (Embrapa Mandioca e Fruticultura). The main objective was to evaluate the conditions of the starting material (stem tips) after different cultivation intervals of the donor plant and their correlation with the regeneration rates, as well as to establish cryotherapy protocol for removal of the pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) complex. The suitability of the starting material was studied using cryopreservation of pineapple stem tips. Plants were cultivated in vitro for 30, 45 and 60 days before removal of the stem tips for cryopreservation. The regeneration rates of each treatment were calculated and histological sections were observed to evaluate the anatomy of the starting material. For the cryotherapy tests, indexation by RT-PCR was performed before and after freezing. The results indicated an interaction between cultivation time of the donor plant and the genotypes, with a significant influence on the regeneration percentages of the stem tips. The accessions *A. comosus* var. *comosus* (AGB-009) and *A. comosus* var. *bracteatus* (AGB-119) showed the highest regeneration rates, of 95% and 90%, respectively, for cultivation time of 30 days. The histological sections revealed the failure of some treatments after thawing. For AGB-009 and AGB-376 (*A. comosus* var. *paraguazensis*), the cryotherapy was efficient in removing the viral complex. However, for AGB-119, the PMWaV-3 was eliminated in 83% of the plants. These results are promising for improvement of the cryopreservation method and for use of cryotherapy for routine removal of the pineapple mealybug wilt-associated virus complex from germplasm material.

Key words: *Ananas comosus* (L) Merr., shoot tips, *Pineapple Mealybug Associated Virus*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE ABACAXI PELA TÉCNICA DE <i>DROPLET-VITRIFICATION</i> : AS CONDIÇÕES DO MATERIAL DE PARTIDA.....	20
CAPÍTULO 2 CRIOTERAPIA PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO VIRAL PMWaV EM VARIEDADES SILVESTRES DO GÊNERO <i>Ananas</i>	42
REFERÊNCIAS	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

INTRODUÇÃO

Características e importância econômica do gênero *Ananas*

O Brasil, mais especificamente a Amazônia, é o centro de origem e de dispersão do abacaxi [*Ananas comosus* (L) Merr.] com importante diversidade genética incluindo formas silvestres, cultivadas e intermediárias (COPPENS D'EECKENBRUGGE; LEAL, 2003; SOUZA et al., 2012).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de abacaxi em 2014 foi de 25,44 milhões de toneladas em uma área plantada de 1,02 milhões de hectares. O Brasil é o segundo maior produtor mundial, com 2,64 milhões de toneladas, estando as regiões Nordeste, Sudeste e Norte com elevados índices de produtividade (FAOSTAT, 2017). A produção brasileira de abacaxi é, em sua maioria, destinada ao mercado interno de frutas frescas. O crescimento em pesquisas para novos usos de diversas variedades do gênero *Ananas* inclui extração de fibras (LEAO et al., 2009; SENA NETO et al., 2013; SOUZA et al., 2017), fitoterápicos (SUN et al., 2002) e como plantas ornamentais (SOUZA et al., 2012; 2014; COSTA JÚNIOR et al., 2016).

O abacaxi é uma planta monocotiledônea, herbácea e perene (COPPENS D'EECKENBRUGGE; LEAL, 2003). A planta adulta pode alcançar até 2 m de altura e na inflorescência terminal se desenvolve um fruto com coloração branca, amarela ou laranja avermelhada, muito apreciada por seu sabor ácido adocicado (SILVA; TASSARA, 2005).

Como fruta de clima tropical, apresenta ótimo crescimento e melhor qualidade na faixa de temperatura de 22 °C a 32 °C. Temperaturas acima de 32 °C e abaixo de 20 °C afetam o crescimento da planta. Desenvolve-se melhor em locais com alta incidência de radiação solar e solos com a faixa de pH de 4,5 a 5,5 são os mais recomendados para o seu cultivo (MATOS et al., 2006).

Entretanto, a exploração comercial de poucas variedades e o ataque de pragas e doenças, vem causando erosão genética no gênero e indicam a necessidade de intensificação das atividades de preservação desses materiais (CABRAL et al., 2004; PANIS; LAMBARDI, 2006). Considerando esse

panorama atual, aliado às mudanças climáticas, a conservação da variabilidade genética de um cultivo de importância econômica pode significar sua sobrevivência frente aos novos desafios.

Outro aspecto a ser considerado é o avanço silencioso do complexo viral associado a murcha do abacaxizeiro (*Pineapple mealybug wilt-associated virus* - PMWaV) (SILVA, 2014), o que demanda ações voltadas tanto para a detecção, quanto para a busca de estratégias que possam remover o vírus de plantas infectadas.

Murcha do abacaxizeiro

O *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) foi descrito pela primeira vez no Havaí, e se constitui em um dos entraves para o aumento da produtividade da cultura no Brasil e nos demais países produtores (CARTER, 1942; HU et al., 1997; SETHER et al., 2001; 2005). Os primeiros sintomas causados pela doença são constatados no sistema radicular, que apresenta crescimento reduzido. Os sintomas foliares aparecem dois a três meses após o início da infecção pelo vírus e em alguns casos ocorrem mudanças na fisiologia da planta, acarretando a perda de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas do abacaxizeiro, fazendo-o definhando progressivamente, podendo levar a planta à morte (SETHER; HU, 2002).

A expressão dos sintomas também é variável e, aparentemente, ligada a fatores como condições ambientais, população das cochonilhas e ao genótipo. Em alguns períodos do ciclo da cultura, algumas plantas infectadas podem não apresentar sintomas. O avermelhamento das folhas também pode ser devido à presença de nematoides na área ou por causa de deficiência de cobre (MEISSER FILHO; SANCHES, 2010).

O PMWaV pertence à família *Closteroviridae*, gênero *Ampelovirus*. Atualmente considera-se o PMWaV um complexo de vírus (PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV-5) (GAMBLEY et al., 2008). No Brasil, foi detectada, a presença das espécies PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 em amostras de plantas no campo com murcha do abacaxizeiro no estado do Espírito Santo (PERON, 2010).

O vírus encontra-se amplamente distribuído nas regiões produtoras de abacaxi do Brasil, trazendo problemas fitossanitários para cultura (SANTA-CECÍLIA, 2004), principalmente pelo fato de ser um vírus disseminado pelo material propagativo e por apresentar diferentes espécies (SETHER et al., 2005; GAMBLEY et al., 2008).

Métodos para detecção do PMWaV

Um fator importante que permitiu a disseminação do PMWaV foi a falta de um método de detecção rápido e confiável, uma vez que plantas infectadas com o PMWaV podem ser assintomáticas (GAMBLEY et al., 2008). Anticorpos monoclonais específicos para PMWaV-1 e PMWaV-2 foram usados em imunoenaios de transferência de tecido (TBIA) para testar mil plantas por dia (HU et al., 1997; SETHER et al., 1998; SETHER; HU; 2002). As ferramentas visando o diagnóstico dos vírus que infectam o abacaxizeiro têm evoluído ao longo dos anos e atualmente contando com os testes moleculares. Gambley et al. (2009) realizaram um ensaio para a detecção do PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 utilizando a combinação da captura imunomagnética com o RT-PCR de uma ou duas etapas e permite a detecção de vírus desde que os anticorpos estejam disponíveis.

A RT-PCR baseia-se na amplificação e detecção do material genético dos vírus de RNA ou apenas PCR, no caso dos vírus de DNA, em amostras vegetais infectadas. Esses métodos moleculares de detecção apresentam maior sensibilidade e para abacaxi já existem oligonucleotídeos específicos capazes de detectar o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (SETHER et al., 2005).

Tendo em vista que as mudas são altamente eficientes na dispersão do vírus, as medidas de controle devem ser dirigidas inicialmente para a origem e o aspecto fitossanitário do material de plantio. As estratégias para obtenção de mudas sadias devem ser precedidas da etapa de indexação do material vegetal.

Conservação do Abacaxizeiro e duplicatas de segurança

Conservação em Campo

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia, mantém um Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) com aproximadamente 700 acessos distribuídos em duas espécies (*Ananas comosus* e *A. macrodontes*) e cinco variedades botânicas do gênero *Ananas* (*A. comosus* var. *microstachys*, *A. comosus* var. *bracteatus*, *A. comosus* var. *comosus*, *A. comosus* var. *erectifolius* e *A. comosus* var. *parguazensis*).

Esse banco foi formado a partir de coletas em todo o território nacional e algumas incursões em países vizinhos, além de intercâmbio e doações (CABRAL et al., 2004; SOUZA et al., 2012). A conservação e manutenção dessa coleção é laboriosa e enfrenta ameaças, seja por fatores bióticos ou abióticos, o que deixa o germoplasma sob risco de perdas (SOUZA et al., 2012).

Nos últimos anos tem sido registrada a perda de vários acessos, de todas as variedades botânicas, principalmente, em decorrência da incidência da murcha do abacaxizeiro (PMWaV). A rígida legislação para recursos genéticos, como é possível observar na Lei nº 13.123/ 2015 que foi regulamentada pelo Decreto nº 8.772/ 2016, o elevado custo das coletas e uma erosão genética que avança cada vez mais nas zonas de origem, tornam essas perdas significativas para a conservação do germoplasma de abacaxi.

Em vista disso, o estabelecimento de duplicatas de segurança passou a ser uma demanda prioritária para a curadoria do BAG Abacaxi a fim de aumentar a eficiência da conservação e minimizar as perdas em campo (CANTO et al., 2004; SOARES et al., 2006; SILVA et al., 2016).

Conservação in vitro

Dessa forma, em 2003, se iniciou o estabelecimento de um Banco in vitro como duplicata de segurança e que conta com 50% dos acessos já resguardados por essa forma de conservação (SOUZA et al., 2012). A técnica

utilizada é a de crescimento mínimo, que por meio da redução do metabolismo celular das plantas in vitro, reduz também a velocidade de crescimento das mesmas. Uma das desvantagens da conservação in vitro é o número de subcultivos necessários para sua renovação, aumentando custo e trabalho (SANTOS, 2000; CARVALHO; VIDAL, 2003). A condição de crescimento lento permite contornar, em parte, essa desvantagem. Em trabalho realizado por Silva et al. (2016) foi avaliado o efeito de dez anos de conservação in vitro de abacaxi sobre a viabilidade e a estabilidade genética das plantas conservadas. Ficando evidente que essa estratégia de conservação é viável e segura.

Apesar da eficiência que foi comprovada da conservação in vitro, a busca por uma estratégia de longo prazo, sem a necessidade de intervenções periódicas, é uma demanda antiga na conservação de germoplasma. A criopreservação está sendo aplicada para superar as limitações encontradas por estratégias tradicionais de conservação de germoplasma tanto em campo quanto in vitro (WANG et al., 2009).

Criopreservação

A criopreservação é uma técnica de conservação em longo prazo, que envolve a manutenção de material biológico em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou na sua fase vapor $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (KARTHA, 1985). A base teórica dessa técnica abrange vários aspectos fisiológicos e físicos do material a ser utilizado (SAKAI et al., 2008). O estado da água e a crioproteção são os fatores mais determinantes para a sobrevivência, em combinação com fatores fisiológicos do material de partida, uma vez que, a água tem propriedades físico-químicas únicas e essenciais para as funções celulares. Dois mecanismos são fundamentais para o sucesso da criopreservação, a retirada da água congelável no interior da célula, assim como uma efetiva proteção da membrana celular (BENSON, 2008).

Sob o armazenamento criogênico o material biológico pode ser conservado por longos períodos de tempo porque a temperatura do nitrogênio líquido reduz de forma significativa a atividade metabólica. As divisões celulares são interrompidas e a possibilidade das células não sofrerem

alterações genéticas durante o armazenamento é muito reduzida (ENGELMANN, 2004), o que pode ocorrer quando são micropropagadas sucessivamente, como é o caso dos subcultivos na conservação *in vitro*. Além disso, o material criopreservado ocupa um espaço reduzido, considerando o número de amostras que cabe em um botijão criogênico e não está exposto à constante manipulação (REED, 2008). O congelamento de tecidos vivos requer um tratamento específico para evitar a formação de cristais na célula e danos irreversíveis na membrana celular, o que inviabilizaria o resgate do material congelado (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

São várias as técnicas para a criopreservação de material vegetal, mas o encapsulamento-vitrificação e a vitrificação em gotas estão entre as mais utilizadas por sua eficiência para várias espécies (SAKAI; ENGELMANN, 2007; SAKAI et al., 2008). O encapsulamento consiste na captura de explantes em cápsulas de alginato de sódio, com a finalidade de proteger tecidos mais sensíveis da exposição à temperatura ultrabaixa, e pode vir acompanhado de procedimentos de desidratação ou vitrificação (YAMAMOTO et al., 2011; 2012)

A desidratação pode ser obtida pelo cultivo das cápsulas em meios nutritivos com altas concentrações de sacarose. Já a vitrificação consiste na transição da água para o estado vítreo, um estado semissólido e amorfo no qual, ela apresenta alta viscosidade, porém, sem que ocorra formação de cristais, responsáveis pelos maiores danos às estruturas celulares durante o congelamento (BENSON et al., 2007).

Esse processo pode ser obtido a partir do uso de soluções específicas. Dentre essas soluções, a PVS2 (*Plant Vitrification Solution* nº 2) tem sido a mais utilizada e consiste em 30 % de glicerol, 15 % de etileno glicol, 15 % de dimetil sulfoxido (DMSO) (todos v / v) e 0,4 M de sacarose (SAKAI et al., 1990). Açúcares como sacarose, trealose e glicose podem ser utilizados como crioprotetores, uma vez que, são excelentes agentes vitrificantes, com alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento (KOSTER, 1991).

A integridade estrutural de amostras criopreservadas é mantida, o que permite altas porcentagens de recuperação e crescimento direto e rápido dos explantes (KARTHA et al., 1982; BENSON, 2008; REED, 2008). Outras vantagens da vitrificação consistem na proteção contra mudanças no pH e a

prevenção de colapso celular durante a perda da água, resultando na diminuição de reações químicas indesejáveis que poderiam levar à deterioração de seu conteúdo (BENSON et al., 2007). O sucesso da sua utilização pode ser atribuído à sua alta reprodutibilidade e ao fato de que pode ser aplicada a uma vasta gama de tecidos e espécies de plantas (PANIS et al., 2005).

Para a vitrificação em gotas, os explantes são pré-cultivados por um a sete dias, com ou sem osmoproteção e expostos diretamente em gotas de solução PVS2, por tempos variáveis, em laminas de alumínio, seguido da imersão em nitrogênio líquido (ENGELMANN et al., 2008; SAKAI et al., 2008).

Protocolos de criopreservação foram estabelecidos para ápices caulinares de abacaxi, utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação (GAMEZ-PASTRANA et al., 2004), vitrificação (GONZALEZ-ARNAO et al., 1998; 2000; MARTINEZ-MONTERO et al., 2005; 2012) e, mais recentemente, para variedades silvestres e cultivadas com resultados promissores para a criopreservação de germoplasma de abacaxi (Souza et al., 2016).

Entretanto, ainda são necessários estudos que possam aumentar a eficiência da técnica para uma gama tão grande de acessos do BGA Abacaxi, aproximadamente ,700 de diferentes variedades botânicas.

Fatores que podem afetar a eficiência da criopreservação

O processo de criopreservação envolve fenômenos complexos, não sendo totalmente compreendido. A porcentagem de regeneração dos explantes após o congelamento está associada principalmente à fisiologia, teor de água nas células e a utilização eficiente de crioprotetores (BENSON, 2008).

Particularmente em espécies tropicais, os tratamentos de proteção são necessários para induzir artificialmente tolerância a baixas temperaturas, já que estas são extremamente sensíveis às condições ambientais da criopreservação (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Por isso a condição fisiológica do material de partida é um fator determinante para o sucesso da criopreservação. A maioria das células vegetais possuem altas quantidades de água congelável e por isso são extremamente sensíveis a temperaturas abaixo de 0 °C. Essas células

precisam ser desidratadas antes da incubação em nitrogênio líquido para evitar a formação de cristais de gelo, que podem destruir organelas e causar danos irreversíveis à membrana plasmática, comprometendo sua sobrevivência. A desidratação excessiva, por outro lado, pode levar a danos como desnaturação protéica e desequilíbrio metabólico devido ao aumento na concentração de solutos (WANG et al., 2009).

O protocolo de Souza et al. (2016) para abacaxi tem como base o congelamento de ápices caulinares oriundos de plantas *in vitro*. A condição fisiológica desses ápices é totalmente dependente da condição fisiológica da planta doadora. Plantas estioladas, por más condições de incubação, envelhecidas ou com problemas nutricionais não devem ser usadas para essa finalidade. O tempo de cultivo das plantas doadoras e suas condições de incubação serão, portanto, determinantes para o êxito do congelamento, permitindo a regeneração e resgate do que foi mantido em nitrogênio.

A padronização de uma condição ideal do material de partida deve ser uma premissa para esse tipo de trabalho, e, apesar de sua importância, praticamente não existem registros sobre isso na literatura.

Crioterapia

A crioterapia consiste na utilização da criopreservação para fins de erradicação de patógenos, seja vírus, fitoplasmas, bactérias, entre outros, sendo um método biotecnológico eficaz para o resgate de plantas infectadas (WANG; VALKONEN, 2009).

A técnica foi aplicada pela primeira vez com êxito na remoção do *Plum pox virus* - PPV em um porta-enxerto interespecífico de ameixeira *Prunus L.* (BRISON et al., 1997). Um estudo realizado por Helliot et al. (2002) observou a eliminação do *Cucumber mosaic virus* (CMV) do pepino, e do *Banana streak virus* (BSV) da bananeira (*Musa L. spp.*). Estudos posteriores foram realizados com espécies de grande importância econômica como batata (*Solanum tuberosum L.*) (WANG et al., 2006), *Citrus L. spp.* (DING et al., 2008), batata-doce [*Ipomoea batatas (L.) Lam.*] (FENG et al., 2011), entre outros.

Um dos tecidos mais utilizados na crioterapia é o ápice caulinar, que pode ter um tamanho variando de 0,5 a 2,0 mm, composto pela região do domo

meristemático com grande quantidade de células indiferenciadas que se dividem ativamente, com poucos e pequenos vacúolos e uma elevada relação núcleo citoplasma (ENGELMANN, 2004). Os vírus e outros patógenos normalmente se encontram em tecidos mais jovens, que são as mais atingidas pela exposição ao nitrogênio líquido. Já as células da região do domo meristemático suportam melhor a desidratação do que as células diferenciadas cuja fisiologia é também perturbada pela ação dos agentes patogênicos (WANG et al., 2008).

Entretanto, apesar da técnica auxiliar no tratamento de várias espécies, respostas diferenciadas podem ocorrer, quando genótipos (cultivares) da mesma espécie podem diferir em sua resposta ao criotratamento (ENGELMANN, 2004; BENSON, 2008) e por isso a necessidade de constantes estudos de aperfeiçoamento.

Não existem registros de uso de crioterapia para erradicação do PMWaV em variedades de abacaxi. Sendo assim, a otimização de protocolos de criopreservação e crioterapia para essa finalidade, garante um método de eliminação viral e a conservação de um germoplasma sadio e livre de enfermidades.

Cultivo de ápices caulinares, crioterapia e remoção do complexo viral em plantas de abacaxi

O cultivo de ápices caulinares em dimensões muito reduzidas tem-se mostrado eficiente para eliminar infecções virais em algumas espécies de importância econômica (RETHEESH; BHAT, 2010; RAMGAREEB et al., 2010; WANG et al., 2011; MILOSEVIC et al., 2012), incluindo o abacaxi (SILVA, 2014). Uma das hipóteses pela qual nem todas as células encontram-se infectadas é a incipiente ligação vascular do meristema com o restante dos tecidos, o que proporcionaria uma menor distribuição das partículas patogênicas (WANG; VALKONEN, 2009).

Remover os tecidos infectados e garantir a sobrevivência e regeneração dos ápices é um dos desafios da cultura de ápices caulinares, por isso combinar a crioterapia é particularmente interessante para a limpeza de plantas infectadas por vírus (FACCIOLI; MARANI, 1998; WANG; VALKONEN, 2009).

Em trabalho realizado por Silva (2014) com variedades silvestres de abacaxi, o cultivo de ápices caulinares mostrou-se eficiente, com 90% de sucesso na eliminação do PMWaV, mas ainda demanda uma estratégia complementar.

Com base nisto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as condições do explante de partida, a partir do tempo de cultivo das plantas usado para a retirada dos ápices caulinares, assim como estabelecer um protocolo de crioterapia para ápices caulinares de abacaxizeiros silvestres, efetivos na remoção do complexo viral da murcha do abacaxizeiro (PMWaV).

REFERÊNCIAS

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

BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Humana Press, p. 163-184, 2007.

BRISON, M.; DE BOUCAUD, M. T.; PIERRONNET, A.; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with *Plum pox poty-virus*. **Plant Science**, Clare, v. 123, p. 189-196, 1997.

CABRAL, J. R. S.; CASTELLEN, M. S.; SOUZA, F. V. D.; MATOS, A. P.; FERREIRA, F. R. **Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Documentos, n. 146). 2004.

CANTO, A. M. M. E.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. C.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. S.; CABRAL, J. R. S. Conservação in vitro de germoplasma de abacaxi tratado com paclobutrazol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 717-720, 2004.

CARTER, W. Geographic distribution of mealybug wilt with some other insect pests of pineapple. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 35, p. 10-15, 1942.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: Embrapa Algodão. (**Boletim Técnico; Documento, 115**). 2003.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G.

(Eds.) **The pineapple**: botany, production and uses. CABI Publishing, New York, pp. 13-32, 2003.

COSTA JUNIOR, D. S.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. E. C.; SOUZA, F. V. D. Clonal evaluation of new ornamental pineapple hybrids to use as cut flowers. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 38, p. 475-483, 2016.

DING, F.; JIN, S. X.; HONG, N.; ZHONG, Y.; CAO, Q.; YI, G. J.; WANG, G. P. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus *Huanglongbing* pathogen, from in vitro adult shoot tips. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 241-250, 2008.

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

ENGELMANN, F. The development of encapsulation dehydration. In: REED, BM (Org.). **Plant cryopreservation: A practical guide**. Springer: New York, pp. 59-75, 2008.

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

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 30 junho 2017.

FENG, C.; YIN, Z.; MA, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, L.; WANG, B.; LI, B.; HUANG, Y.; WANG, Q. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 29, p. 84–93, 2011.

GAMBLEY, C. F.; STEELE, V.; GEERING, A. D. W.; THOMAS, J. E. Development of an immunomagnetic capture-reverse transcriptase-PCR assay for three pineapple ampeloviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.155, p. 187–192, 2009.

GAMBLEY, C. F.; STEELE, V.; GEERING, A. D. W.; THOMAS, J. E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. Australas. **Plant Pathology**, London, v. 37, p. 95-105, 2008.

GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. An improved cryopreservation protocol for pineapple ápices using encapsulation-vitrification. **CryoLetters**, London, v. 25, p. 405-414, 2004.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. H.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 1-13, 2008.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. **CryoLetters**, London, v. 19, p. 375-382, 1998.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. JIRCAS/IPGRI, Japan, Italy, pp. 390-392, 2000.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and Banana streak viroses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, Lisboa, v. 20, p. 1117-1122, 2002.

HU, J. S., SETHER, D. M., LIU, X. P., WANG, M., ZEE, F., AND ULLMAN, D. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. **Plant Disease**, New York, v. 81, p. 1150-1154, 1997.

KARTHA, K. K. **Cryopreservation of Plant Cells and Organs**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p.276. 1985

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

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, p. 302–304, 1991.

LEÃO, A. L.; MACHADO, I. S.; SOUZA, S. F.; SORIANO, L. Production of curaua fibers for industrial applications: characterization and micropropagation. **Acta Horticulturae**, João Pessoa, v. 822, p. 227-238, 2009.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation: review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merrill) cases. In: KATKOV, I. (Ed.) **Current frontiers in cryopreservation**, Intech, Croatia, pp. 359-396, 2012.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; MARTINEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comusus* (L.) Merr) apices and calluses. **Acta Horticulturae**, Vertacruz, v. 666, p, 127–130, 2005.

MATOS, A. P.; REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S.; SANCHES, N. F.; ALMEIDA, O. A. **A cultura do abacaxi**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 2ª ed. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, p, 91. 2006.

MEISSNER FILHO, P. E.; SANCHES, N. F. Vírus da murcha do abacaxi. **Toda fruta:** o portal da fruticultura. 2010. Disponível em:<

<http://www.todafruta.com.br/portal/icnoticiaaberta.asp?idnoticia=22912>> Acesso em: 24 março 2017.

MILOSEVIC, S; SUBOTIC, A; BULAJIC, A; DJEKIC, I; JEVREMOVIC, S; VUCOROVIC, A; KRTIC, B. Response of antioxidative enzymes to long-term *Tomato spotted wilt virus* infection and virus elimination by meristem-tip culture in two *Impatiens* species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 79, p. 79-88, 2012.

PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In: **The Role of Biotechnology**. Villa Gualino, Turin, Italy, 2006.

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

PERON, N. F. **Diagnóstico Molecular e Imunoenzimático de *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus (PMWaV)* em diferentes genótipos de abacaxizeiro**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

RAMGAREEB S, SNYMAN SJ, VAN ANTWERPEN T. Elimination of virus and rapid propagation of diseasefree sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 100, p. 175-181, 2010.

REED, B. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York, NY: Springer, p, 515, 2008

RETHEESH S.T., BHAT, A.I. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. **Crop Protection**, Oxford, v. 29, p. 1214-1217, 2010.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, London, v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, Lisboa, v. 9, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED B. M. (Org.) **Plant Cryopreservation: a practical guide**. pp. 33-57, 2008.

SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; BUENO, V. H. P.; PRADO, E. Desenvolvimento de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p.1015-1020, 2004.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-840, 2000.

SENA-NETO, A. R.; ARAUJO, M. A. M.; SOUZA, F. V. D.; MATTOSO, L. H. C.; MARCONCINI, J. M. Characterization and comparative evaluation of thermal, structural, chemical, mechanical and morphological properties of six pineapple leaf fibervarieties for use in composites. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, p. 529–537, 2013.

SETHER, D. M.; HU, J. S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, p. 928-935, 2002.

SETHER, D. M.; HU, J. S.; ULLMAN, D. E. Transmission of pineapple mealybug wilt associated virus by two species of mealybugs (*Dysmicoccus* spp.). **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, p. 1224-1230, 1998.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J.; BUSTO, J.; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Disease**, New York, v. 89, p. 450-456, 2005.

SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA C.; ZEE, F.; KISLAN, M.; BUSTO, J.; HU, J.S. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Dis.**, v. 85, p. 856-864, 2001.

SILVA, R. L. **Viabilidade, limpeza viral e estabilidade genética de plantas de abacaxizeiro oriundas da conservação in vitro**. Dissertação de Mestrado. Cruz das Almas, UFRB, 2014.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 127, p. 123-133, 2016.

SILVA, S.; TASSARA, H. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel, pp.25-27, 2005.

SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. Acclimatization of pineapple plants from in vitro conservation. **Pineapple News**, Hawai, v. 13, p. 12-14, 2006.

SOUZA, C. P. F.; FERREIRA, C. F.; SOUZA, E. H.; SENA NETO, A. R.; MARCONCINI, J. M.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D. Genetic diversity and ISSR marker association with the quality of pineapple fiber for use in industry. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 104, p. 263-268, 2017.

SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Selection and use recommendation in hybrids of ornamental pineapple. **Revista Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v. 45, p. 409–416, 2014.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIN.E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with

ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 7 p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoottips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 124, p. 351–360, 2016

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.

WANG, B.; MA, Y.; ZHANG, Z.; WU, Z.; WU, Y.; WANG, Q.; LI, M. Potato viruses in China. **Crop Protection**, Oxford, v. 30, p. 1117-1123, 2011.

WANG, Q. C.; CUELLAR, W. J.; RAJAMÄKI, M. L.; HIRAKA, Y.; VALKONEN, J. P. T. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 9, p. 237-250, 2008.

WANG, Q. C.; LIU, Y.; XIE, Y. H.; YOU, M. S. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY). **Potato Research**, Netherlands, v. 49, p.119-129, 2006.

WANG, Q. C.; PANIS, B.; ENGELMANN, F.; LAMBARDI, M.; VALKONEN, J. P. T. 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**, Hoboken, v. 154, p. 351-363, 2009.

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

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

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; FUKUI, K.; SEKIZAWA, K.; NIINO, T. V-cryo-plate procedure as na effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. **CryoLetters**, London, v. 33, p. 12–23, 2012.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W.S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **Cryo Letters**, London, v. 32, p. 256–265, 2011.

CAPÍTULO 1

CRIOPRESERVAÇÃO DE ÁPICES CAULINARES DE ABACAXI PELA TÉCNICA DE *DROPLET-VITRIFICATION*: AS CONDIÇÕES DO MATERIAL DE PARTIDA

Artigo a ser submetido ao periódico científico Scientia Horticulturae.

Criopreservação de ápices caulinares de abacaxi pela técnica de *droplet-vitrification*: as condições do material de partida

RESUMO: Os avanços na biotecnologia fornecem novas opções para a coleta, multiplicação e conservação da biodiversidade vegetal e devido ao custo-benefício da conservação em longo prazo, a criopreservação em nitrogênio líquido, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, é uma técnica que vem sendo bastante utilizada. A criopreservação de ápices caulinares de abacaxi tem sido estabelecido a partir de vários protocolos inclusive a vitrificação em gotas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as condições anatômicas do material de partida em diferentes tempos (30, 45 e 60 dias) de cultura antes do congelamento e sua correlação com a porcentagem de ápices caulinares criopreservados. Foram utilizados quatro acessos, *A. comosus* var. *comosus* (BGA-009), *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119), *A. comosus* var. *parguazensis* (BGA-376) e *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-750) provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) e dois híbridos do Programa de Melhoramento Genético, FIB-ROX1 (*A. comosus* var. *bracteatus* X *A. comosus* var. *erectifolius*) e FIB-ROX2 (*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*) todos mantidos em campo e que tinham sido recentemente introduzidos no BAG in vitro. As seções histológicas antes do congelamento e as porcentagens de sobrevivência após o congelamento foram obtidas levando em consideração os diferentes tempos de cultivo das plantas doadoras. Os resultados mostraram uma interação significativa entre genótipos (acessos e híbridos) e o tempo de cultivo do material de partida. Os acessos BGA-009 e BGA-119 apresentaram as maiores porcentagens de regeneração com 95 % e 90%, respectivamente, para o tempo de cultura de 30 dias. Foram obtidos diferentes resultados para cada genótipo mostrando a necessidade de melhorias na padronização do material de partida o poderia melhorar a repetibilidade do protocolo.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, tempo de cultivo, material de partida, regeneração.

**Cryopreservation of pineapple apices by the *Droplet vitrification*
technique: the conditions of the starting material**

ABSTRACT: The advances in biotechnology provide new options for collection, propagation and genetic conservation of plants. Due to the cost-benefit of long-term conservation, cryopreservation in liquid nitrogen at -196 °C is a technique that has been widely used. Cryopreservation of pineapple shoot tips has been established from various protocols including *droplet-vitrification*. Thus, this work aimed to evaluate the anatomical conditions of the starting material in different times (30, 45 and 60 days) of culture before freezing and its correlation with the percentage of survive of the cryopreserved shoot tips. Four accessions, *Ananas comosus* var. *comosus* (BGA-009); *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119); *A. comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376), *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-750) from the Active Germplasm Bank of Pineapple (AGB pineapple) and two hybrids from the Genetic Breeding Program, FIB-ROX1 (*A. comosus* var. *bracteatus* X *A. comosus* var. *erectifolius*) and FIB-ROX2 (*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*) all kept in the field and which had recently been introduced in vitro. Histological sections before freezing and the percentages of survival after freezing were obtained taking into account the different times of cultivation of the donor plants. The results showed a significative interaction between genotypes (accessions and hybrids) and the time of culture. The accessions BGA-009 and BGA-119 showed the highest survival rates with 95% and 90% respectively for the 30-day culture time. Different results were obtained for each genotype showing the need for improvements in the standardization of the starting material, which would allow a good repeatability of the protocol.

Key words: *Ananas comosus*, growing time, starting material, regeneration.

INTRODUÇÃO

O Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura (BAG Abacaxi) é o maior do mundo e foi estabelecido há mais de quatro décadas mediante a realização de coleta e intercâmbio de germoplasma em nível nacional e internacional (SOUZA et al., 2012). Acessos conservados no campo foram estabelecidos *in vitro* a partir de 2003, a fim de minimizar perdas decorrentes da conservação em campo e estabelecer uma duplicata de segurança (SILVA et al., 2016). Entretanto, apesar de sua importância, a conservação *in vitro* pode ser laboriosa, pela necessidade de subcultivos periódicos para a renovação das plantas, além da possibilidade de ocorrência de instabilidade genética por variação somaclonal (SANTOS, 2000; CARVALHO; VIDAL, 2003).

Os avanços na biotecnologia fornecem novas opções para a multiplicação e conservação em curto e longo prazo da biodiversidade vegetal, utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. A criopreservação em nitrogênio líquido, a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, é uma técnica que garante o custo-benefício da conservação em longo prazo de uma gama de espécies de plantas (REED, 2008; CRUZ-CRUZ et al., 2013). A parada quase total do metabolismo da planta, evita a necessidade de renovação, minimizando os riscos de variação somaclonal e reduzindo significativamente os custos de manutenção.

A criopreservação de ápices caulinares de abacaxi tem sido estabelecida a partir de diferentes protocolos mediante técnicas de encapsulamento-vitrificação (GAMEZ-PASTRANA et al., 2004), vitrificação (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 1998; 2000; MARTINEZ-MONTERO et al., 2005; 2012) e mais recentemente a vitrificação em gotas (SOUZA et al., 2016). Esta última apresenta resultados satisfatórios para variedades cultivadas ou silvestres com porcentagens de regeneração entre 40 % a 90%. O tempo de 45 min de exposição à solução de vitrificação PVS2 promoveu o melhor desempenho para a maioria dos genótipos, ainda que, alguns materiais responderam melhor aos tempos de 30 e 60 min de exposição ao PVS2. Isso deixa evidente o efeito do genótipo na criopreservação de abacaxi (SOUZA et al., 2016) o que pode dificultar a repetibilidade do protocolo, considerando o número elevado de acessos conservados de abacaxi em campo.

O sucesso do protocolo de criopreservação implica na passagem dos explantes por uma série de etapas sucessivas (pré-cultivo, tratamento com crioprotetor, imersão em nitrogênio líquido e descongelamento), sem perder a viabilidade e o potencial de regeneração pós-conservação (SAKAI et al., 2008).

Dentre os fatores que podem influenciar o resultado final da criopreservação em abacaxi, os explantes de partida estão entre os mais determinantes. Como os ápices caulinares são obtidos a partir de plantas *in vitro*, as condições de incubação dessas plantas podem alterar de forma significativa as condições celulares da estrutura a ser criopreservada e afetar tanto a retirada de água nos tecidos quanto os mecanismos de proteção da membrana (ENGELMANN, 2011).

De acordo com Panis et al. (2011), dependendo da espécie-alvo, o desenvolvimento de um protocolo adequado pode levar anos de estudo. O uso das soluções crioprotetoras são extremamente importantes, pois determinam a desidratação celular e o número de componentes que permeará as células (CHEN et al., 2011). O principal sucesso do protocolo de criopreservação reside verdadeiramente na aplicabilidade em diversas cultivares, e deve superar os problemas associados ao genótipo (JEON et al., 2015).

A técnica de vitrificação em gotas foi eficiente na criopreservação de ápices caulinares de diferentes genótipos de abacaxi (SOUZA et al., 2016) e possui baixo custo e fácil execução quando comparada às outras técnicas já utilizadas. Entretanto, ensaios adicionais deixaram evidente a necessidade de se avaliar e padronizar as plantas utilizadas para excisão dos ápices caulinares para a criopreservação.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o tempo de cultivo das plantas doadoras do material de partida (ápices caulinares) a fim de padronizar e otimizar o protocolo de criopreservação de abacaxi pela técnica de vitrificação em gotas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizados quatro acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) e dois híbridos do Programa de Melhoramento Genético da Embrapa Mandioca e Fruticultura, todos recém estabelecidos in vitro. Os acessos foram provenientes de diferentes variedades botânicas: *Ananas comosus* var. *comosus* (BGA-009), *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119), *A. comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376), *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-750) e dois híbridos denominados FIB-ROX1 (*A. comosus* var. *bracteatus* X *A. comosus* var. *erectifolius*) e FIB-ROX2 (*A. comosus* var. *erectifolius* X *A. comosus* var. *bracteatus*).

Material de partida e extração dos ápices caulinares

Os acessos/híbridos inicialmente foram multiplicados, em meio de cultivo composto por sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com 3,0 % (m/v) de sacarose e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, 0,5 mg L⁻¹ de 6 - Benzilaminopurina (BAP) e 0,02 mg L⁻¹ de Ácido naftalenoacético (ANA) e colocados em câmara de crescimento a 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 μmol m⁻² s⁻¹, a fim de se obter o número mínimo de plantas para a realização do estudo, considerando três tempos de cultivo das plantas doadoras (30, 45 e 60 dias) (Figura 1 A-C). Ápices caulinares das plantas in vitro foram excisados com aproximadamente 0,5 mm e usados como material biológico para a criopreservação (Figura 1 D-F).

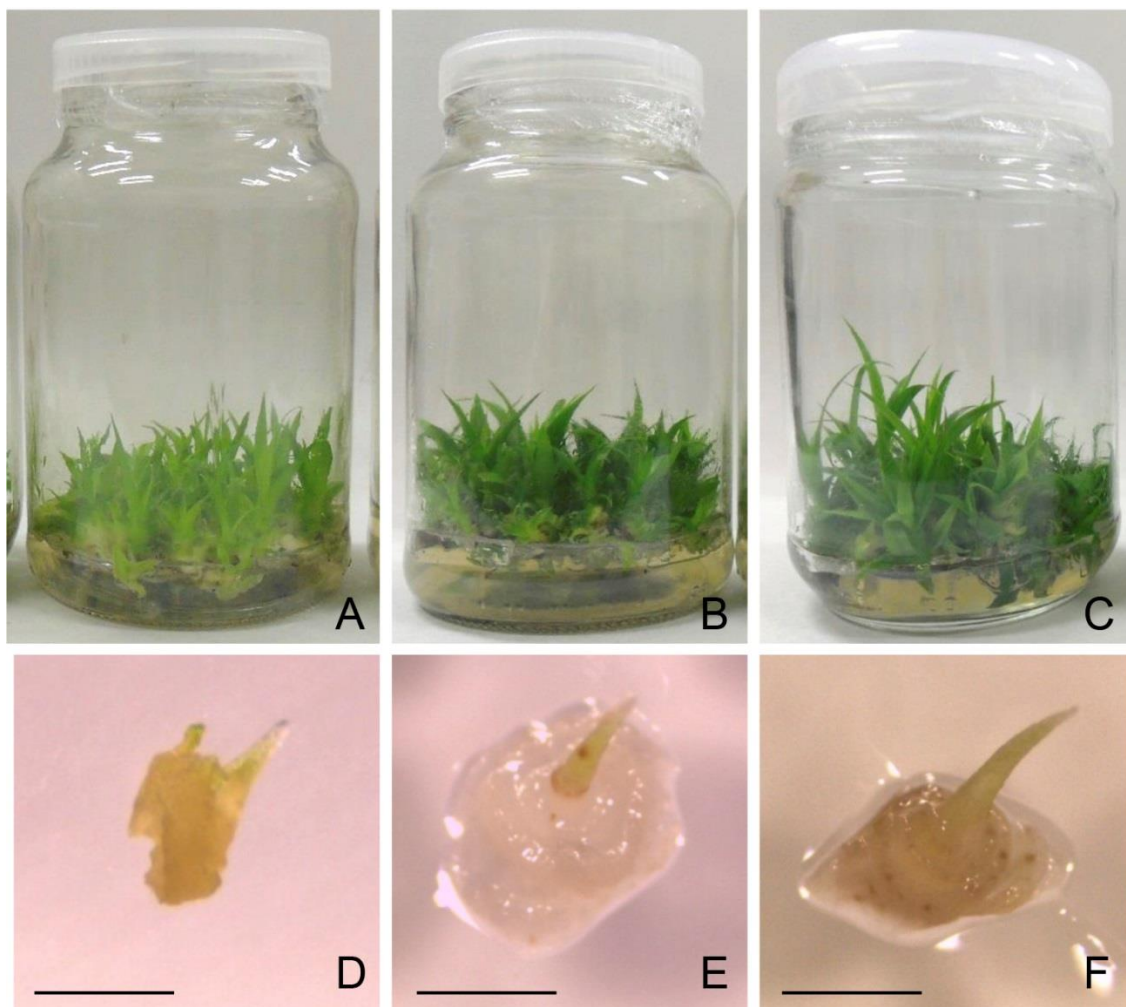


Figura 1. A-C) Plantas in vitro. **D-F)** e ápices caulinares de *Ananas comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376) cultivadas aos 30 (**a, d**), 45 (**b, e**) e 60 dias (**c, f**) após multiplicação em meio de cultura. Barra: 0,5 mm.

Pré-cultivo dos ápices caulinares

Ápices caulinares oriundos de plantas de diferentes tempos de cultivo (30, 45 e 60 dias) foram cultivados em placas de Petri contendo meio de pré-cultivo composto por sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose e $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de Phytigel® e incubados por 48 horas em câmara de crescimento a $27 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Vitrificação: exposição à solução de PVS2

Após o período de pré-cultivo, os ápices caulinares foram transferidos em condições assépticas para lâminas de alumínio contendo de cinco a dez gotas de 4 μL da solução de vitrificação PVS2 (15 % de dimetilsulfóxido – (DMSO); 30 % de glicerol; 15 % etilenoglicol; e 0,4 M de sacarose), sendo colocado um ápice por gota (Figura 2A). O tempo de exposição ao PVS2 foi de 45 minutos e foi realizada sobre o gelo, garantindo a temperatura próxima a 0 °C, como mostra a Figura 2B. Após os respectivos tempos de exposição, as lâminas contendo os ápices caulinares foram colocadas diretamente dentro do nitrogênio antes de serem introduzidas em criotubos de 2 mL (Figura 2B) que foram então imersos no nitrogênio dentro do botijão criogênico e mantidos por 24 horas (Figura 2C).

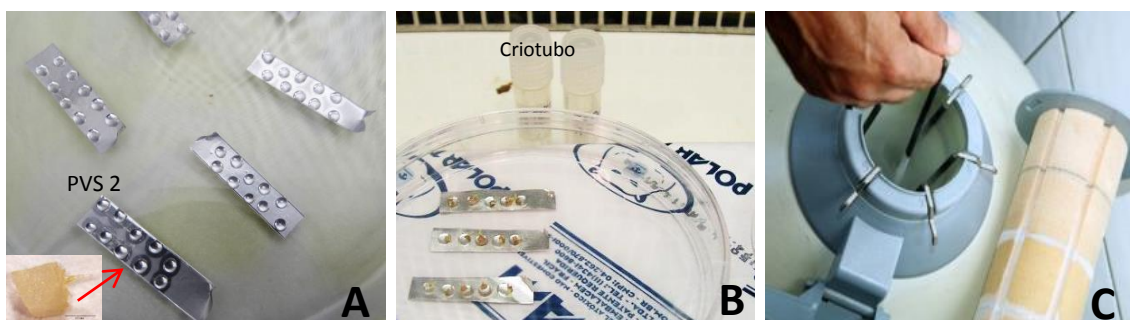


Figura 2. (A) Lâminas de alumínio com gotas de PVS2 onde são depositados os ápices caulinares; (B) ápices já em exposição ao PVS2 e sob gelo (C) e depósito em nitrogênio líquido.

Descongelamento e regeneração

O descongelamento dos ápices foi realizado retirando-se as lâminas de alumínio dos criotubos e emergindo-as rapidamente em solução de lavagem (sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 1,0 mol L⁻¹ de sacarose, por 20 min. Após esse procedimento, os ápices foram cultivados em meio de regeneração composto por sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3,0 % (m/v) de sacarose,

2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e incubados em condições de sala de crescimento, como já descrito no item de pré-cultivo. As porcentagens de regeneração dos ápices caulinares foram avaliadas aos 30 dias após o procedimento de criopreservação.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 3 (tempos de cultivo das plantas doadoras) x 6 (genótipos) com 10 repetições por tratamento onde uma repetição se constituiu em um ápice caulinar. Os controles se constituíram de ápices caulinares recém removidos (controle absoluto), ápices que passaram pelo pré-cultivo (solução MS+sacarose) e ápices que passaram igualmente pelo PVS2, mas não passaram pelo nitrogênio líquido (NL-).

Os dados da porcentagem de regeneração foram transformados para arc sen ($\sqrt{x/100}$) antes da análise estatística. Para comparação das médias, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,01$) e as médias comparadas com o teste Scott-Knott ($p \leq 0,01$) para os genótipos e teste Tukey ($p \leq 0,05$) para a variável tempo, por meio do programa SAS (2010).

Morfoanatomia dos ápices caulinares

Para caracterização morfológica, três ápices caulinares de aproximadamente 1 mm de cada tempo de cultivo (30, 45 e 60 dias), foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, em seguida desidratados em série etílica (35-100%). As amostras foram secas ao ponto crítico com CO₂ líquido e montadas sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável LEO 435 VP (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Para a caracterização anatômica, três ápices nas mesmas condições, foram coletados e fixados na mesma em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada, por 48 horas, infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit

Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Helderberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas. Cortes histológicos seriados (4-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leitz, modelo 1516, dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de fluorescência B x S1 (Olympus Latin America Inc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Porcentagem de regeneração

A análise de variância evidenciou o efeito do genótipo isolado, bem como, a interação genótipo x tempo de cultivo para os tratamentos controle (NL-) e imersão no nitrogênio líquido (NL+) dos ápices caulinares (Tabela 1). Esses resultados corroboram o que foi apresentado por Souza et al. (2016) onde o efeito do genótipo também foi significativo.

Tabela 1. Análise de variância dos acessos/híbridos de abacaxizeiro em função dos diferentes tempos de cultivo do material de partida por meio das técnicas de criopreservação.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio ²	
		NL ⁻ (Controle)	NL ⁺
Genótipo	5	1,5223**	1,3462**
Tempo	2	0,1246 ^{ns}	0,0029 ^{ns}
Genótipo x Tempo	10	0,1496**	0,4298**
Erro experimental	33 (30 ¹)	0,0424	0,0440
Coeficiente de variação (%)		19,86	36,55
Média Geral		67,4510	35,4167

**significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F. ^{ns}não significativo a 5% de probabilidade.
¹relativo à criopreservação. ²dados transformados para $\arcsen \sqrt{X/100}$.

Os resultados obtidos para os controles do PVS2 nos diferentes genótipos foram muito variáveis, de 10% de regeneração no BGA-750 com

ápices de 45 dias de cultivo à 100% no BGA-119 com ápices de 30 dias de cultivo (Tabela 2). O PVS2 pode ser extremamente tóxico para as células e por isso a importância desses controles a fim de separar esse efeito do que pode ser provocado pelo congelamento e outros fatores do procedimento de criopreservação (VOLK; WALTERS, 2006).

Para os acessos BGA-009, BGA-119 e BGA-376, a exposição ao PVS2, por 45 min, não resultou em efeito tóxico, mas não foi eficiente de forma homogênea para o processo de vitrificação como pode ser constatado pelos resultados pós-congelamento (Tabela 2). O controle absoluto evidencia altas porcentagens de regeneração, de 80 a 100%, assim como o controle do pré cultivo (MS+ sacarose), deixando evidente que a sacarose não tem efeito deletério sobre os ápices caulinares.

Esses acessos apresentaram resultados superiores após a criopreservação, quando comparados ao acesso BGA-750 e aos híbridos FIB-ROX1 e FIB-ROX2, tanto no controle do PVS2, quanto nos ápices caulinares criopreservados, com exceção do tempo de cultivo de 30 dias para o acesso BGA-376 e para ápices com 45 dias do acesso BGA-009 onde as porcentagens de regeneração de (16,67%) foram extremamente baixas.

Para o acesso BGA-750 o efeito deletério da sacarose é observado, com drásticas reduções das porcentagens de regeneração, o que significa que os ápices já perdem grande parte de sua viabilidade nessa etapa. A ausência completa de regeneração após o congelamento é resultado do efeito da sacarose com um efeito adicional do PVS2. Os híbridos também apresentaram queda nas porcentagens de regeneração na etapa de pré-cultivo, mas bem menos drástica foi observada no BGA-750. A sacarose é um importante agente crioprotetor usado em processos de congelamento em nitrogênio líquido (REED, 2008). Sua ação está dirigida à retirada da água intracelular, evitando a formação de cristais de gelo, além de atuar como agente de proteção da membrana e do citoplasma quando ocorre a rápida entrada de substâncias crioprotetoras (WOELDERS et al., 1997; JOO et al., 2014). Estudos confirmam que açúcares estabilizam a bicamada fosfolipídica agindo como um agente osmótico externo (JOO et al., 2014).

Tabela 2. Porcentagem de regeneração dos ápices caulinares em função dos genótipos e dos tempos de cultivo, nos diferentes tratamentos.

Genótipos	Tempos de cultivo (dias)					
	30	45	60	30	45	60
	Controle Absoluto (*)			Controle Pré-cultivo		
BGA-009	100,0	100,0	100,0	100,0	80,0	100,0
BGA-119	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
BGA-376	90,0	90,0	90,0	90,0	80,0	100,0
BGA-750	90,0	90,0	100,0	30,0	10,0	30,0
FIB-ROX1	80,0	100,0	100,0	60,0	60,0	80,0
FIB-ROX2	100,0	90,0	80,0	70,0	40,0	80,0
	Controle PVS2 (NL-)			NL+		
BGA-009	96,7 aA	90,0 aA	96,7 aA	95,0 aA	16,7 cC	63,3 bB
BGA-119	100,0 aA	83,3 aA	100,0 aA	90,0 aA	56,7 bB	56,7 bB
BGA-376	73,3 bB	93,3 aAB	100,0 aA	16,7 bB	100,0 aA	100,0 aA
BGA-750	20,0 cAB	10,0 c	46,7 bA	0,0 cA	0,0 cA	0,0 cA
FIB-ROX1	55,0 bA	53,3 bA	13,3 cB	20,0 bA	16,7 cA	0,0 cA
FIB-ROX2	56,7 bA	35,0 bB	60,0 bA	30,0 bA	36,7 bA	45,0 bA

(*) Cultivo dos ápices caulinares sem passar por pré-cultivo e por PVS2; Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas dentro do mesmo fator (NL- e NL+) pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os híbridos FIB-ROX1 e FIB-ROX2 apresentaram porcentagens de regeneração variando de 13,33 a 60% nos tratamentos controles para os ápices caulinares oriundos dos diferentes tempos de cultivo. Apenas os ápices com 60 dias de cultivo do acesso FIB-ROX2 apresentaram 45% de regeneração após o congelamento. Para o FIB-ROX1 os valores médios são considerados baixos com 20% (30 dias), 16,67% (45 dias) e nenhuma regeneração com ápices oriundos do tratamento de 60 dias. Esses resultados refletem o que foi observado nos controles do PVS2 de ambos os híbridos deixando evidente a relação das condições do material de partida com a eficiência do protocolo criogênico.

Como pode ser observado nos controles do pré-cultivo, a sacarose tem um efeito sobre os ápices, tendo sido registradas porcentagens de regeneração bem inferiores ao controle absoluto. A avaliação em relação ao PVS2, por sua vez, deve considerar a toxicidade, a eficiência na alteração do estado físico da água e a proteção da membrana celular. O agente crioprotetor deve penetrar rapidamente no citoplasma das células e formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água para prevenir sua cristalização (AYE et al., 2010), o que parece não ter acontecido nestes materiais, uma vez que as porcentagens de regeneração para os controles PVS2 (NL-) variaram de 0 a 100%.

Morfoanatomia dos ápices caulinares

Os BGA-009, BGA-119 e BGA-376 apresentaram plantas de morfologia normal com folhas distribuídas em espiral e um bom desenvolvimento. Já o BGA-750 e os híbridos FIB-ROX1 e FIB-ROX2 apresentaram diversas brotações laterais sem uma definição exata do ápice caulinar (Figura 3A), dificultando inclusive a retirada do mesmo, independente dos tempos de cultivo das plantas doadoras (30, 45 e 60 dias). Essa morfologia desuniforme foi mais evidente no acesso de partida BGA-750. A presença das brotações laterais, por sua vez, sugere uma perda de dominância apical que pode ser devido a causas variadas e pode afetar o desenvolvimento dos ápices caulinares (USMAN et al., 2013)

As características morfológicas ideais dos ápices caulinares a serem usados como material de partida determinam um tamanho de aproximadamente 0,5 mm de comprimento com dois a três primórdios foliares (WANG; VOLKENEN, 2009), como podem ser verificadas no acesso BGA-119 nas (Figuras 3B e 3C). Em contrapartida, ápices que podem ser considerados inadequados para extração, não possuem uma região do domo meristemático conforme observado no acesso BGA-750 (Figuras 3D e 3E).

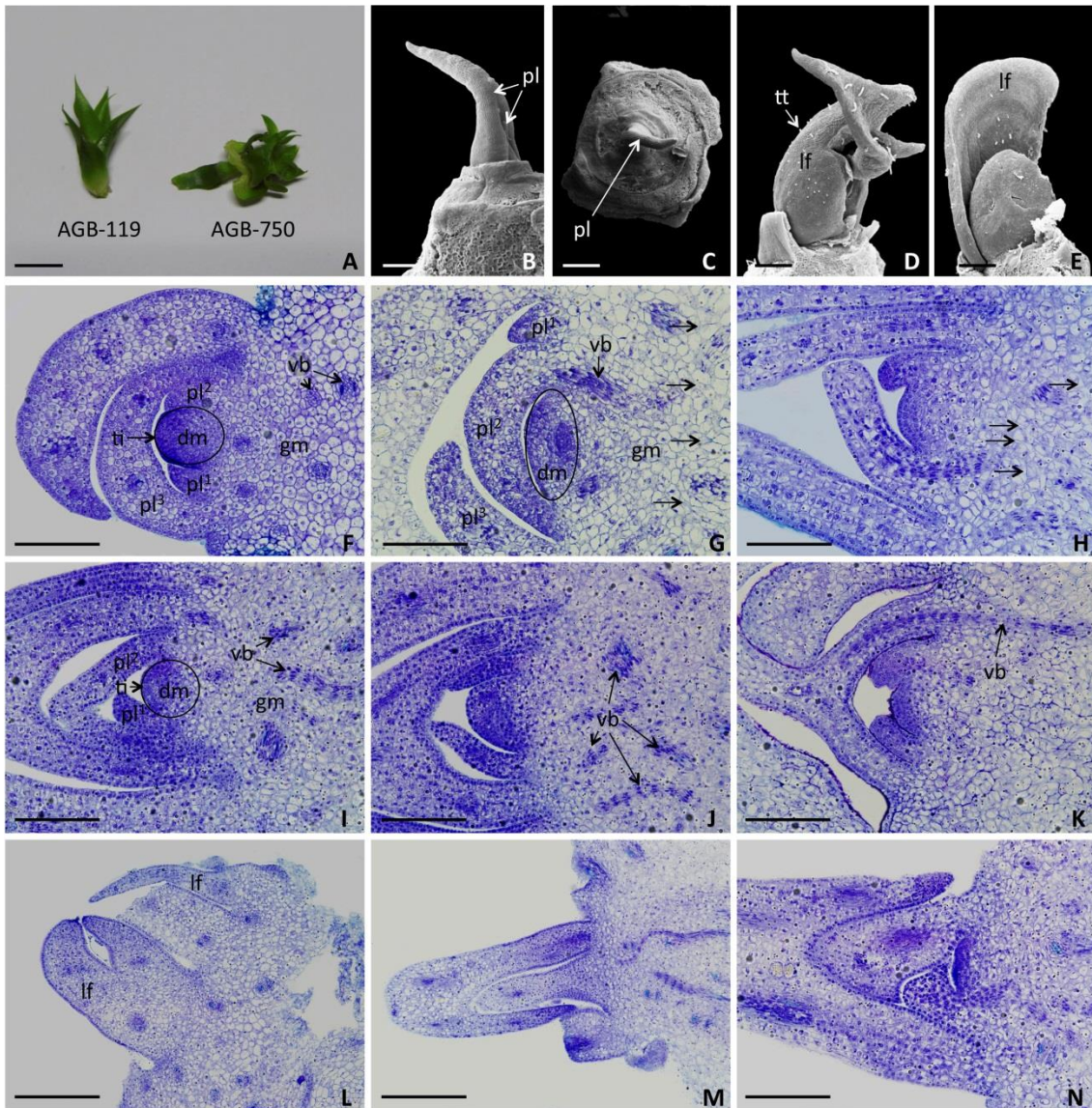


Figura 3. **A)** Plantas de abacaxizeiros após 45 dias de multiplicação em meio de cultura MS evidenciando uma morfologia ideal (BGA-119) e uma morfologia inadequada (BGA-750) da planta para a excisão dos ápices caulinares. **(B-E)** Microscópio de varredura. **(B, D)** Ápices caulinares nas vistas transversal e **(C, E)** longitudinal, (BGA-119) e (BGA-750) respectivamente. **(F-N)** Microscópio de luz. **(F-H)** Ápices caulinares de *A. comosus* var. *comosus* (BGA-009). **(I-K)** *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119) e **(L-N)** *A. comosus* var. *erectifolius* (BGA-750) após 30 dias **(F, I, L)** 45 dias **(G, J, M)** e 60 dias **(H, K, N)** de multiplicação em meio de cultura MS. **dm** = células do domo apical, **gm** = células secundárias do ápice caulinar, **pl** = (1, 2 e 3) primórdios foliares, **tt** = tricômas tectores, **vb** = feixes vasculares, **ti** = túnica. Setas indicam grandes espaços

intracelulares. Barras: **A)** 1cm, **E-K; M-N)** 200 μ m, **L)** 100 μ m. **Fotos B-E:** Mônica L. Rossi.

As análises histológicas, nos diferentes intervalos de cultivo, confirmaram a diferença anatômica entre os genótipos e a relação com as porcentagens de regeneração observados. No acesso BGA-009, os ápices oriundos de plantas cultivadas por 30 dias apresentaram uma estrutura com domo meristemático formado por células isodiamétricas, citoplasma denso, núcleos bem definidos, poucos feixes vasculares e dois primórdios foliares em perfeito estado, configurando assim um ápice ideal para a criopreservação. Essas características não foram observadas nos ápices de plantas de 45 dias (Figura 3G) onde se observou a presença de células com grandes vacúolos, espaços intracelulares maiores, o que é indicativo de um maior volume de água, levando assim, a maiores danos no processo de congelamento e consequentemente a baixa porcentagem de regeneração (16,67%). A mudança do volume celular é um importante fator relacionado à possibilidade de dano mecânico e ruptura de membrana (BENSON, et al., 2007). Com os ápices de plantas de 60 dias de cultivo (Figura 3H) já se observou uma anatomia intermediária, entre os explantes de 30 dias e 45 dias, com a presença de células com citoplasma denso, mas também células de vacúolos e espaços intercelulares maiores.

O acesso BGA-119 (Figura 3I-K) apresentou primórdios foliares com células regulares, núcleo adensado, domo meristemático com células bem justapostas e elevado número de feixes vasculares, na região de células secundárias do ápice caulinar. Na região basal do ápice caulinar vários traços de procâmbio com células alongadas e citoplasma pouco denso. As variações anatômicas dentro do mesmo genótipo, nos diferentes tempos de cultivo, explicam as diferentes porcentagens de regeneração para os ápices de plantas de 30 dias, com excelente desempenho (90%) oriundos de plantas de 45 e 60 dias, com um percentual de regeneração em torno de 56,7%. É possível ver na sequência de imagens a diminuição de células adensadas à medida que se aumenta o tempo de cultivo, assim como uma modificação na zona do domo meristemático com ápices oriundos de plantas de 60 dias. Esse fato tem uma

forte relação com o início de brotações nesse genótipo, caracterizando, provavelmente, o início da perda da dominância apical.

O acesso BGA-750 e os híbridos FIB-ROX 1 e FIB-ROX2 apresentaram na grande maioria dos ápices seccionados para anatomia, uma ausência de domo meristemático organizado, com a presença apenas de primórdios foliares com epiderme uniestratificada, feixes vasculares distribuídos no parênquima fundamental bem vacuolado e grande presença de espaços intracelulares (Figura 3L-N).

As causas do dano celular após a criopreservação podem estar no protoplasma, devido a um maior volume de água e à ineficiência do processo de desidratação/ vitrificação. As células mais vacuoladas estão sujeitas a um maior nível de plasmólise quando tratadas com sacarose nos tratamentos de crioproteção e vitrificação e podem não sobreviver ao estresse osmótico imposto (SAKAI et al., 2008), o que parece ter ocorrido nestes materiais. Nesses genótipos, os resultados obtidos nos controles já preconizam um insucesso após o congelamento. No BGA-750 esse aspecto se confirma, a partir de porcentagens extremamente baixas de regeneração no controle do pré-cultivo e no controle do PVS2 e nenhuma regeneração após a imersão em nitrogênio.

Até o presente momento, os estudos anatômicos existentes são voltados para crioinjúrias após a criopreservação (GANINO et al., 2012; WANG et al., 2014; JEON et al., 2015; SOUZA et al., 2016) sem considerar, no entanto, a condição anatômica do explante de partida. O estudo morfológico de Souza et al. (2016) foi o primeiro voltado para variedades botânicas do gênero *Ananas*, e demonstraram que os danos celulares em sua grande maioria estão em células já diferenciadas e pouco adensadas o que corrobora com os dados aqui apresentados, já que o material de partida que apresentou essas características não sobreviveu à criopreservação.

Este trabalho é o primeiro a avaliar o ápice caulinar como material de partida e sua correlação com as porcentagens de regeneração após o congelamento e com as crioinjúrias e trouxe questões relevantes sobre o tratamento in vitro que é dado ao material até o processo de retirada dos ápices caulinares.

O germoplasma do gênero *Ananas* está composto por aproximadamente 700 acessos de diferentes variedades botânicas. Ajustar um protocolo considerando essa diversidade é determinante para o sucesso da criopreservação do gênero. Estudos como esse mostram o quanto a condição do material de partida é determinante para o sucesso no congelamento, mas também que o efeito do genótipo é uma das maiores dificuldades quando se pensa em criopreservar uma coleção dessa dimensão.

Nesse estudo, a retirada dos ápices caulinares ocorreu a partir de plantas que foram cultivadas por 30, 45 e 60 dias, o que possibilitou o conhecimento das condições do material de partida, uma vez que, as condições de incubação podem alterar de forma significativa as condições celulares e afetar a retirada de água da célula e os mecanismos de proteção da membrana plasmática (ENGELMANN, 2011).

Embora, o protocolo de vitrificação em gotas tenha mostrado uma variação significativa entre os acessos/híbridos na porcentagem de regeneração, é importante ressaltar que, resultados acima de 40% são considerados satisfatórios (SOUZA et al., 2016).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que se o material de partida estiver em boas condições celulares, o tempo de cultivo não é determinante, já que foram obtidos bons resultados com ápices oriundos de plantas cultivadas nos três tempos propostos, como pode ser observado na Tabela 2.

Por outro lado, parece haver uma modificação a medida que aumenta o tempo de cultivo e que pode estar relacionada com o início de perda da dominância apical e o início de brotações, já que o meio de regeneração utilizado tem em sua formulação 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Outra observação em relação ao PVS2 é que existem dois aspectos que precisam ser considerados, como já mencionado anteriormente, se a solução está sendo tóxica para a célula ou não está cumprindo seu papel de proteção, o que são aspectos muito distintos.

Finalmente, esse trabalho confirma que a técnica de vitrificação em gotas é eficiente para preservar ápices caulinares dos acessos *A. comosus* var. *comosus* (BGA-009) *Ananas comosus* var. *bracteatus* (BGA-119), *A. comosus*

var. *paraguayensis* (BGA-376), sendo ainda necessários ajustes para aumentar as porcentagens de sobrevivência e regeneração.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram a importância do material de partida para o êxito da criopreservação, uma vez que são diretamente afetados pelo congelamento em nitrogênio líquido, mas também a forte influência do genótipo.

Referências

AYE, M.; DI GIORGIO, C.; DE MO, M.; BOTTA, A.; PERRIN, J.; COURBIERE, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 1905-1912, 2010.

BENSON, E. E.; HARDING, K.; JOHNSTON, J. W. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, pp. 163-184, 2007.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. Crioconservação no melhoramento vegetal. Campina Grande: Emprapa Algodão. (**Documento, 115**). 2003.

CHEN, X. L.; LI, J. H.; XIN, X.; ZHANG, Z. E.; XIN, P. P.; LU, X. X. Cryopreservation of in vitro- grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, p. 397-403, 2011.

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

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. In: TREVOR, A. T.; YEUNG, E. C. (Eds.) **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**,

Methods in Molecular Biology, v. 710, Springer Science: Business Media, LLC. 2011.

FEDER, N.; O' BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, p.123-142, 1968.

GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. **CryoLetters**, London, v. 25, p. 405-414, 2004.

GANINO, T.; SILVANINI, A.; BEGHÉ, D.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A. Anatomy and osmotic potential of *Vitis* rootstock shoot tips recalcitrant to cryopreservation. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.56, p.78-82, 2012.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. **CryoLetters**, London, v. 19, p. 375-382, 1998.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRÁ, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. JIRCAS/IPGRI, Japan, Italy, pp. 390-392, 2000.

JEON, S. M.; ARUN, M.; LEE, S. Y.; KIM, C. K. Application of encapsulation vitrification in combination with air dehydration enhances cryotolerance of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips. **Scientific Horticulture**, Amsterdam, v. 194, p. 91-99, 2015.

JOO, J. K.; LEE, Y. L.; JEONG, J. E.; KIM, S. C.; KO, G. R.; LEE, K. S. Vitrification solution without sucrose for cryopreservation in mouse blastocysts. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, Larchmont, v. 41, n. 3, p. 115-119, 2014.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138A, 1965.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation: review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cases. In: KATKOV, I. (Ed.) **Current frontiers in cryopreservation**, Intech, Croatia, pp. 359–396, 2012.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; MARTINEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr] apices and calluses. **Acta Horticulturae**, Vertacruz, v. 666, p. 127–130, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, p. 473-92, 1962.

PANIS, B.; PIETTE, B.; ANDRÉ, E.; HOUWE, I.; SWENNEM, R. Droplet-vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 908, p.157-164, 2011.

REED, B. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York, NY: Springer, p, 515, 2008.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED B. M. (Org.) **Plant Cryopreservation: a practical guide**. pp. 33-57, 2008.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 70-840, 2000.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm

after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 127, p. 123-133, 2016.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 7 p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoottips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 124, p. 351–360, 2016

USMAN, I. S.; ABDULMALIK, M. M.; SANI, L. A.; MUHAMMAD, A. N. Development of an efficient protocol for micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. var. Smooth Cayenne). **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 8, p. 2053-2056, 2013.

VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, Maryland Heights, v. 52, p. 48-61, 2006.

WANG, B.; LI J. W.; ZHANG, Z. B.; WANG, R. R.; MA, Y. L.; BLYSTAD, D. R.; KELLER, E. R.; WANG, Q. C. Three vitrification-based cryopreservation procedures cause different cryo-injuries to potato shoot tips while all maintain genetic integrity in regenerants. **Journal Biotechnology**. Austria, v. 20, p. 47-55, 2014.

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

WOELDERS, H.; MATHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose, and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intractness

of sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, San Diego, v.35, p.193-195, 1997.

CAPÍTULO 2

CRIOTERAPIA PARA ERRADICAÇÃO DO COMPLEXO VIRAL PMWaV EM VARIEDADES SILVESTRES DO GÊNERO *Ananas*

Artigo a ser submetido ao periódico científico *Annals of Applied Biology*.

Crioterapia para erradicação do complexo viral PMWaV em variedades silvestres do gênero *Ananas*

RESUMO: O *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) causa a murcha do abacaxizeiro, uma doença que traz perdas consideráveis devido à redução de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas do abacaxi, fazendo-o definhando progressivamente e podendo levar a planta à morte. A crioterapia tem sido usada para outras espécies com resultados promissores na erradicação de vírus por meio do congelamento e morte de células infectadas e nunca foi testada para o abacaxi. Assim, o objetivo desse trabalho foi utilizar um protocolo criogênico a fim de erradicar o complexo viral da murcha do abacaxizeiro, em acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG Abacaxi) em campo e sua introdução na duplicata de segurança in vitro. Foram utilizados três acessos [*A. comosus* var. *comosus* (BGA-009) *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119), e *A. comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376)] provenientes do BAG Abacaxi e recentemente introduzidos in vitro. Seis plantas de cada acesso foram indexadas por RT-PCR para confirmar a presença das espécies virais (PMWav-1, PMWaV-2 e PMWaV-3), onde verificou-se a presença de infecções mistas, e deu-se início ao protocolo de vitrificação em gotas como método crioterapêutico. O cultivo de ápice caulinar permitiu 100 % de regeneração a depender do tempo de exposição ao PVS2 para cada genótipo. O tempo de exposição ao PVS2 por 45 minutos foi bem-sucedido para o BGA-009 e BGA-376 resultando em 95% e 100% de regeneração após o congelamento. Ambos os acessos apresentaram todas as plantas livres do vírus após serem submetidas à crioterapia. Já no BGA-119, uma planta ainda manteve o PMWaV-3 resultando em uma porcentagem de 83% de plantas limpas. Esses resultados são promissores para a criopreservação/ crioterapia, que pode ser utilizada como metodologia de rotina para erradicação viral em plantas de abacaxi e garantir uma duplicata de segurança sadia desse importante germoplasma (BAG in vitro).

Palavras-chave: *Ananas comosus*, ápice caulinar, erradicação viral, PVS2.

Cryotherapy for eradication of the PMWaV viral complex in wild varieties of the genus *Ananas*

ABSTRACT: *Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV)* causes wilting of pineapple, a disease that causes considerable losses due to the reduction of turgescence of leaf tissues and succulent parts of the pineapple, causing it to languish progressively and may lead to the plant death. Cryotherapy has been used for other species with promising results in eradicating viruses through the freezing and killing of infected cells and has never been tested for pineapple. Thus, the objective of this work was to use a cryogenic protocol to eradicate the viral complex of the pineapple wilt, in accesses conserved in the Active Bank of Germplasm (BAG Abacaxi) in the field and its introduction in the in vitro safety duplicate. Three accessions from the AGB-Pineapple were used [*A. comosus* var. *comosus* (AGB-009), *A. comosus* var. *bracteatus* (AGB-119), and *A. comosus* var. *parguazensis* (AGB-376)] that had recently been introduced in vitro. Six plants of each accession were indexed by RT-PCR to confirm the presence of the viral species (PMWav-1, PMWav-2 and PMWav-3), where we confirmed the presence of mixed infections. We then tested a protocol for droplet vitrification as the cryotherapeutic method. The cultivation of stem tips allowed 100% regeneration depending on the exposure time to PVS2 of each genotype. The exposure time to PVS2 for 45 minutes was successful for AGB-009 and AGB-376, resulting in 95% and 100% regeneration after thawing. For both accessions, all the plants were free of virus after submission to cryotherapy. In turn, one plant of AGB-119 continued to be infected by PMWav-3, resulting in an 83% cleaning rate. These results are promising for cryopreservation / cryotherapy, which can be used as a routine methodology for viral eradication in pineapple plants and guarantee a safe duplicate of this important germplasm (BAG in vitro).

Key words: *Ananas comosus*, shoot tips, viral eradication, PVS2.

INTRODUÇÃO

A crioterapia é uma aplicação da técnica de criopreservação que permite a erradicação de patógenos como vírus, fitoplasmas e bactérias por meio do tratamento em nitrogênio líquido (WANG; VALKONEN, 2009). Os vírus são microparasitas que dependem das células para sua sobrevivência, multiplicação e replicação. Causam doenças importantes e são responsáveis por perdas de rendimento e qualidade em diversas culturas no mundo (GERGERICH; DOLJA, 2006; JEGER et al., 2009).

O tecido meristemático é composto de células indiferenciadas que se dividem ativamente, com poucos e pequenos vacúolos e uma elevada relação núcleo citoplasma (ENGELMANN, 2004). A significativa redução da vascularização dos tecidos diferenciados até o tecido meristemático tem sido uma das hipóteses para explicar a ausência de vírus em meristemas (AGÜERO et al., 2013).

Um dos tecidos mais utilizados na crioterapia é o ápice caulinar, que pode ter um tamanho variando de 0,2 a 2,0 mm e é composto pela região do domo meristemático com grande quantidade de células e primórdios foliares. Essa região do domo meristemático, pelas características de suas células, suporta melhor a desidratação e o congelamento do que as células diferenciadas (WANG; VOLKENEN, 2008).

A murcha do abacaxizeiro, é causada pelo *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV), em associação com cochonilhas das espécies *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes* (Hemiptera: Coccoidea) (GAMBLEY, 2008). O vírus do PMWaV pertence ao gênero *Ampelovirus* da família Closteroviridae (SETHER; HU, 2002) e se apresenta em três espécies (PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3) (GAMBLEY, 2008). A doença causa perdas consideráveis, devido à redução de turgescência dos tecidos foliares e partes suculentas do abacaxizeiro, fazendo-o definhar progressivamente, podendo levá-lo à morte (SETHER et al., 2001;2005).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a produção mundial de abacaxi em 2014 foi de 25,44 milhões de toneladas em uma área plantada de 1,02 milhões de hectares. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de abacaxi, com uma produção de

2,64 milhões de toneladas, sendo a fruta cultivada na maioria dos estados do país (FAOSTAT, 2017).

Não existem métodos diretos para controlar a disseminação do vírus no abacaxizeiro, mas ações que podem minimizar os efeitos da infecção. Assim, os métodos de detecção e identificação do vírus, tanto em plantas quanto em vetores, desempenham um papel crítico na gestão da doença (NAIDU; HUGHES, 2001).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil, mantém um Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) com aproximadamente 700 acessos distribuídos em duas espécies e cinco variedades botânicas do gênero *Ananas*, resultado de coleta em todo o território nacional e algumas incursões em países vizinhos, além de intercâmbio e doações (CABRAL et al., 2004; SOUZA et al., 2012).

A preservação desses recursos fitogenéticos é um dos pilares para o desenvolvimento de novas cultivares e para a sobrevivência dos cultivos frente às mudanças climáticas. Entretanto, essa conservação deve considerar a manutenção de acessos saudáveis e por isso a importância de métodos eficientes para melhorar o estado fitossanitário dos acessos em bancos de germoplasma (ALCÁZAR, 2005). No caso do BAG abacaxi, uma cópia de segurança *in vitro* está sendo estabelecida desde 2003 no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (SILVA et al., 2016), ainda que, apesar da importância, sua manutenção é laboriosa e onerosa, demandando mão de obra especializada constante.

Protocolos de criopreservação foram estabelecidos para ápices caulinares de abacaxi, utilizando a técnica de encapsulamento-vitrificação (GAMEZ-PASTRANA et al., 2004), vitrificação (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 1998; 2000; MARTINEZ-MONTERO et al., 2005; 2012) e vitrificação em gotas (SOUZA et al., 2016).

Os protocolos criogênicos baseados na vitrificação eliminam os danos potenciais da cristalização da água intracelular, durante os processos de congelamento e descongelamento, que alteram a integridade coligativa e osmótica das células, o que resulta em rupturas físicas e injúrias mecânicas, letais (BENSON, 2008).

Os crioprotetores são substâncias que interagem com a membrana plasmática das células exercendo uma ação estabilizadora da passagem do estado líquido para um sólido amorfo (ENGELMANN et al., 2008). Um razoável número de compostos químicos com propriedades crioprotetoras tem sido utilizado, sendo que a solução PVS2 e o gel de alginato de sódio (3%) são os mais comuns e importantes. Estes podem ser utilizados isolados, misturados ou em combinação com alguns outros compostos como: sacarose, álcoois e aminoácidos (ENGELMANN et al., 2008; SAKAI et al., 2008).

A sacarose é um crioprotetor extracelular que recobre a superfície celular e estabiliza a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos causados pelo processo de congelamento, podendo ser aplicada em uma ampla variedade de tecidos vegetais como calos, ápices caulinares, suspensões celulares, embriões zigóticos entre outros sendo possível a imersão direta em nitrogênio líquido (YILDIZ et al., 2000; SAKAI; ENGELMANN, 2007)

Souza et al. (2016) utilizando a técnica de vitrificação em gotas em ápices caulinares de abacaxi, obtiveram uma porcentagem de regeneração de 44 a 86% para diferentes genótipos, o que é bastante significativo para o estabelecimento de uma rotina de criopreservação e até mesmo um banco criogênico de germoplasma de abacaxi e por isso, foi o método escolhido para a realização deste trabalho.

Não existem relatos na literatura a respeito da técnica de crioterapia para a cultura do abacaxizeiro. Erradicar o complexo viral causador da murcha do abacaxizeiro é uma demanda importante para a conservação desse germoplasma. Dessa forma, a crioterapia é uma estratégia interessante e que pode resultar em aplicações práticas de grande impacto, não apenas para a conservação, mas também para o melhoramento genético e para a produção de mudas em larga escala a partir de matrizeiros saudáveis.

Assim, o objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de crioterapia de ápices caulinares de abacaxizeiros a fim de promover a erradicação viral da murcha do abacaxizeiro, para posterior aplicação no Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi e no estabelecimento de matrizeiros saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizados três acessos [*Ananas comosus* var. *comosus* (BGA-009) *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119), e *A. comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376)], provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi (BAG Abacaxi) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Uma planta de cada acesso em campo foi indexada por RT-PCR para confirmar a presença das espécies virais (PMWav-1, PMWaV-2 e PMWaV-3). Para os procedimentos de crioterapia foram utilizadas seis plantas in vitro de cada acesso.

Extração de RNA total

O procedimento de indexação foi realizado conforme estabelecido no protocolo de extração de Gambino (2008). Foram coletados cerca de 100 mg de tecido da parte basal da folha (tecido branco), homogeneizado em nitrogênio líquido e transferido para microtubos de 2 mL. Em cada microtubo foram adicionados 800 µL de tampão de extração CTAB (100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM de EDTA (ácido etileno diamonotetracético); 2 M NaCl; 2,5% de (PVP) polivinilpirrolidona; 2% (CTAB) brometo de cetiltrimetilamônio; e 2% de β-mercaptoetanol) preaquecida a 65°C. Logo após a adição do tampão a mistura foi agitada em Vórtex e as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 20 min realizando agitação por inversão a cada 5 minutos.

Após a incubação, as amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas à temperatura ambiente. Para a extração dos ácidos nucleicos, foi adicionado 800 µL de solvente orgânico clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) com vigorosa homogeneização. A seguir as amostras foram centrifugadas por 10 min a 11.000 g, separando-se as fases orgânica e aquosa, sendo transferidas posteriormente para um novo tubo de 2 mL. As amostras foram novamente submetidas a extração com solvente orgânico, seguido à centrifugação por 10 minutos a 11.000 g, separando-se em duas fases. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, no qual adicionou-se LiCl (Cloreto de lítio) 3,0 mol.L⁻¹. A

mistura foi incubada no gelo, por 30 minutos, em seguida foi centrifugada a 21.000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi ressuspenso em 500 µL de SSE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 % SDS e 1 M de NaCl) preaquecido a 65°C e foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 500 µL de solvente orgânico clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugado a 11.000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubos de 1,5 mL.

O RNA foi precipitado com 0,7 volumes de isopropanol gelado e centrifugado a 21.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol a 70 % e foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi seco a 37°C por 15 minutos e ressuspenso em água RNase free. As amostras foram acondicionadas a -80°C para o uso posterior.

Detecção do PMWaV por RT-PCR

A transcrição reversa (RT) consiste de duas etapas consecutivas. Durante a primeira etapa, foram adicionados em um microtubo: 4 µL µg de RNA total, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 1 µL de Primer randômico 6pb-10mM, 1 µL de Primer PMWaV-1R, PMWaV-2R e PMWaV-3R cada, e água livre de nucleases, completando o volume para 10 µL. As amostras foram incubadas por 10 min a 70 °C seguida de 4°C por 2 minutos e transferidas imediatamente para o gelo. Na segunda etapa foram adicionados ao microtubo: 2 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV, Invitrogen) 10x, 1 µL de enzima (M-MLV RT, Invitrogen), 0,5 µL de RNase out, foi adicionado água livre de nucleases até completar o volume de 20 µL. A reação final foi incubada a 37 °C por 50 minutos e em seguida a 80 °C por 10 min após esse período há 4 °C

A região genômica de interesse foi amplificada via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o auxílio de primers específicos para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (SETHET et al.,2001;2005), para cada amostra foi acrescentado 3 µL do cDNA, 2,5 µL do tampão 10x da enzima Taq (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL da mistura de dNTPs a 2,5 mM cada, 0,2 µL (1U) da Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), e 1 µM de cada Primer R e F específico, e o volume da reação foi completado para 25 µL,

adicionando-se água livre de nuclease. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida de 36 ciclos que envolvem as etapas sequenciais de desnaturação (94 °C/ 45 s), anelamento dos primers (48 °C/ 40 s) e extensão (72 °C/ 1:30 min). Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Vale ressaltar, que a indexação foi realizada antes e depois do cultivo de ápices caulinares e do procedimento de vitrificação em gotas para avaliar se amostras permaneceram positivas ou não.

Material de partida e extração dos ápices caulinares

Os acessos foram multiplicados inicialmente em meio de cultivo composto por sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3,0 % (m/v) de sacarose e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, 0,5 mg L⁻¹ de 6 - Benzilaminopurina (BAP) e 0,02 mg L⁻¹ de Ácido naftalenoacético (ANA). Os frascos com as plantas foram colocados em câmara de crescimento a 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 µmol m⁻² s⁻¹, a fim de se obter o número mínimo de plantas para a realização do estudo considerando o tempo de 45 dias de cultivo das plantas doadoras dos ápices caulinares. Assim, ápices caulinares foram excisados com o uso de um microscópio estereoscópio até aproximadamente 0,5 mm e usados como material de partida para os procedimentos de crioterapia.

Pré-cultivo dos ápices caulinares

Os ápices caulinares foram cultivados em placas de Petri contendo meio de pré-cultivo composto por sais e vitaminas do MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementados com 0,3 mol L⁻¹ de sacarose e 2,4 g L⁻¹ de Phytigel® e incubados por 48 horas em câmara de crescimento a 27 ± 1 °C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 22 µmol m⁻² s⁻¹.

Vitrificação em solução de PVS2 e congelamento em nitrogênio líquido (NL+)

Após o período de pré-cultivo, os ápices caulinares foram transferidos, em condições assépticas, para lâminas de alumínio contendo cinco gotas de 4 μ L de solução de vitrificação PVS2 (SAKAI et al.,2008) sendo um ápice por gota. Os tempos de exposição ao PVS2 foram de 30, 45 e 60 minutos. Todas as etapas da vitrificação foram realizadas sobre o gelo, garantindo a temperatura próxima a 0 °C. Após o respectivo tempo de exposição, as lâminas contendo os ápices caulinares foram colocadas diretamente dentro do nitrogênio antes de serem introduzidas em criotubos de 2 mL, que foram então imersos no nitrogênio dentro do botijão criogênico e mantidos por 24 horas.

Descongelamento e regeneração

O descongelamento dos ápices foi realizado retirando-se as tiras dos criotubos e emergindo-as rapidamente em solução de lavagem, composta de sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementada 1,0 mol L⁻¹ de sacarose. Os ápices foram mantidos nessa solução por 20 min, tempo considerado suficiente para a remoção total do PVS2 dos tecidos. Após esse procedimento, os ápices foram cultivados em meio de regeneração composto por sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 3,0 % (m/v) de sacarose, 2,4 g L⁻¹ de Phytigel®, 0,5 mg L⁻¹ de BAP e incubados em condições de sala de crescimento, como já descrito no item de pré-cultivo. As avaliações referentes à regeneração dos ápices foram realizadas 30 dias após o procedimento de criopreservação da planta.

A segunda etapa de indexação, para comprovação da eliminação viral, ocorreu 60 dias após o descongelamento e cultivo em meio de regeneração. As plantas nessa fase já apresentavam um maior crescimento e desenvolvimento das estruturas foliares. O protocolo de extração de RNA e RT-PCR para indexação do material proveniente da criopreservação foram os já descritos anteriormente.

Delineamento experimental

Foram utilizados 70 ápices caulinares de cada acesso para a realização do experimento, considerando-se 10 ápices para cada etapa, incluindo os controles relativos a cada tempo de exposição ao PVS2 e ao cultivo dos ápices, ou seja, ápices que não passaram nem pelo PVS2 e nem pelo congelamento com nitrogênio líquido (NL+). Foram considerados controles (NL-) as placas contendo ápices que foram expostos ao PVS2 sem incubação em nitrogênio líquido. Foram realizadas três repetições experimentais para cada acesso. Devido ao não atendimento das premissas básicas de utilização de técnicas estatísticas paramétricas, foi calculado a frequência percentual para comparação de cada um dos tratamentos.

Anatomia dos ápices caulinares

Para a caracterização anatômica, três ápices caulinares de aproximadamente 1 mm de cada acesso, foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl₂ (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas. Cortes histológicos seriados (4-5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leitz, modelo 1516, dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados e fotografados em microscópio de fluorescência B x S1 (Olympus Latin America Inc).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão os resultados da regeneração de todos os controles (absoluto e PVS2) e dos ápices criopreservados. O controle do cultivo de ápices caulinares é extremamente importante para se avaliar a condição do material de partida, já que não passa pela exposição ao PVS2 e nem pelo congelamento. A porcentagem de 93% para o BGA-376 e 100% para os outros dois acessos, evidencia um material de boas condições celulares e que, em teoria, é adequado para a criopreservação.

Tabela 1. Regeneração (%) dos acessos BGA-009 *Ananas comosus* var. *comosus*; BGA-119 (*A. comosus* var. *bracteatus*), e BGA-376 (*A. comosus* var. *parguazensis*) aos 30 dias, nos controles dos diferentes tempos de exposição ao PVS2 (NL-) e após a exposição ao nitrogênio líquido (NL+).

Acesso	Tratamentos	Regeneração (%)	
		(NL-) Controle	(NL+)
BGA-009	Cultivo de ápice caulinar	100	
	Criopreservação (PVS2 30 min)	97	45
	Criopreservação (PVS2 45 min)	97	95
	Criopreservação (PVS2 60 min)	90	50
BGA-119	Cultivo de ápice caulinar	100	
	Criopreservação (PVS2 30 min)	90	63
	Criopreservação (PVS2 45 min)	93	50
	Criopreservação (PVS2 60 min)	100	67
BGA-376	Cultivo de ápice caulinar	93	
	Criopreservação (PVS2 30 min)	90	47
	Criopreservação (PVS2 45 min)	90	100
	Criopreservação (PVS2 60 min)	80	23

Por outro lado, todos os controles do PVS2 (NL-), apresentaram resultados acima de 80% de regeneração (PVS2-60 min) deixando evidente uma boa tolerância dos tecidos ao agente crioprotetor, o que é importante, já

que este é um processo fundamental para a sobrevivência da célula após o congelamento. Já os resultados após o congelamento foram bastante variáveis dependendo, não apenas do tempo de exposição ao PVS2, mas também dos genótipos, confirmando mais uma vez esse efeito sobre os resultados da criopreservação (SOUZA et al., 2016). Porcentagens de regeneração acima dos 40% são consideradas satisfatórias para criopreservação com o foco na conservação do germoplasma, já que a partir dessa porcentagem de ápices vivos, como no caso do abacaxi, é possível regenerar plantas inteiras e efetivamente resgatar o material conservado.

Os três acessos criopreservados mostraram resultados excelentes com o BGA-376 tendo apresentado 100% de regeneração no tempo de 45 min de exposição ao PVS2, seguido de 95% para o BGA-009, enquanto que para o BGA-119 o melhor tempo de exposição foi o de 60 min com quase 70% de ápices regenerados.

A eficiência no processo de criopreservação que possa garantir uma boa porcentagem de resgate das plantas é a base para o desenvolvimento de um protocolo de crioterapia que tenha êxito, já que o resultado final da técnica é o resgate de uma planta livre de vírus.

A indexação realizada com as plantas em condição de campo mostrou plantas com a presença dos três tipos virais (PMWaV 1, 2 e 3), inclusive com infecção mista, quando mais de um tipo viral ocorre na mesma planta (Tabela 2 e Figura 1). Os acessos BGA-009 e BGA-376 apresentaram as três espécies virais e o acesso BGA-119 as espécies PMWaV-1 e PMWaV-3 (Tabela 2 e Figura 1). Os resultados demonstraram que a técnica de RT-PCR utilizando *primers* específicos foi eficiente para detectar a infecção por vírus nas plantas de abacaxizeiros. Após a confirmação da presença viral, as plantas passaram pelo processo de multiplicação e posterior procedimento de criopreservação/crioterapia cujos resultados são os que estão apresentados na Tabela 1.

Após a retirada dos ápices do nitrogênio são necessários aproximadamente 60 dias em meio de cultivo para que se tenham plantas em tamanho suficiente para a realização de uma nova indexação que comprove a remoção ou não do vírus.

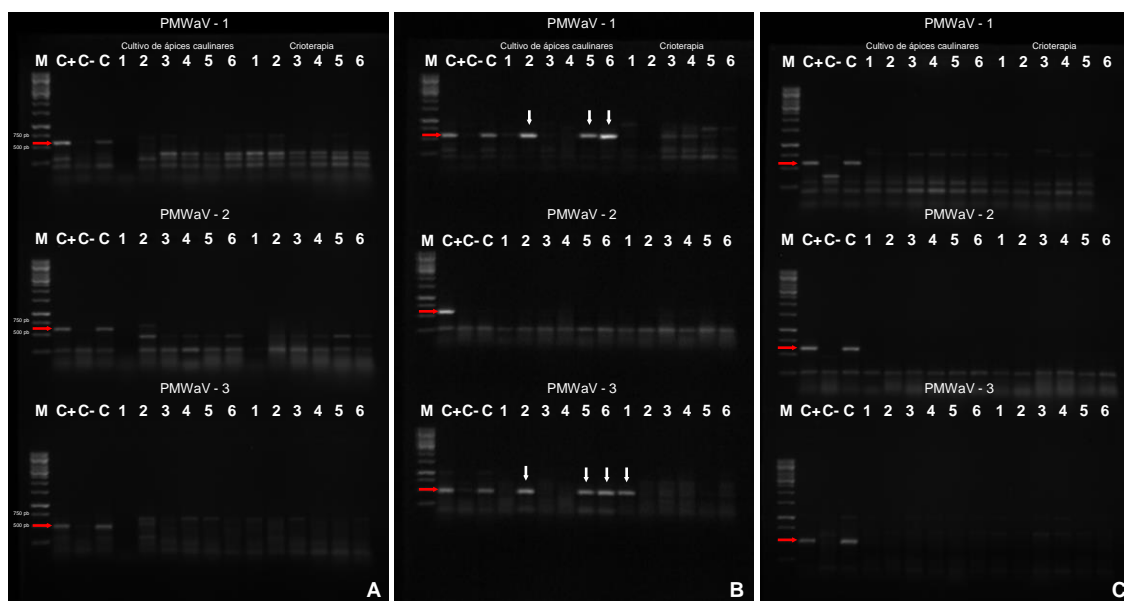


Figura 1. Eletroforese de produto de RT-PCR para indexação do vírus da murcha do abacaxizeiro (*Pineapple mealybug wilt-associated virus*, PMWaV). **A)** *Ananas comosus* var. *comosus* (BGA-009). **B)** *A. comosus* var. *bracteatus* (BGA-119). **C)** *A. comosus* var. *paraguayensis* (BGA-376). Identificação das amostras em ordem no gel. **M:** Marcador de Peso Molecular 1 kb Invitrogen®; **C+:** Controle Positivo; **C-:** Controle Negativo; **C:** Planta de campo; Plantas do cultivo de ápice caulinar e plantas submetidas à crioterapia. Setas brancas indicam plantas contaminadas.

O cultivo de ápice caulinar tem-se mostrado eficiente na eliminação de infecções virais em diferentes espécies de importância econômica. Estudo desenvolvido por Retheesh e Bhat (2010) com *Vanilla planifolia* G. Jackson infectada simultaneamente pelo *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) obteve uma frequência de eliminação de CMV de 79,4%, enquanto a CymMV foi de 82,4% quando testada individualmente, e uma frequência de 75% de eliminação simultânea de ambos os vírus. Pradhan et al. (2016) utilizando a cápsula imatura de *Cymbidium aloifolium* obtida do habitat natural, obteve uma limpeza viral de 83,33% a partir da técnica de cultura de tecidos.

Integrar a conservação do germoplasma em longo prazo e a remoção do complexo viral foi o foco deste trabalho e os resultados após a crioterapia mostraram uma porcentagem de eliminação de 100% para os acessos BGA-

009 e BGA-376 e de 83% para o BGA-119. A permanência do PMWaV-3 se deu em apenas um tempo de incubação no PVS2 planta, o que faz com que esses resultados sejam considerados promissores.

Estudo conduzido por Helliott et al. (2002) demonstrou que a crioterapia mantém viva células do domo apical e algumas células da região meristemática. Em contrapartida, causa o colapso das células do parênquima fundamental e células do feixe vascular (xilema e floema). Diversos estudos (HU et al., 1997; SETHER; HU,2002; NIEHL; HEINLEIN, 2011) relatam que o vírus PMWaV se localiza no floema das plantas e é disseminado nos seus tecidos por meio dos feixes vasculares e procâmbio.

Por meio das análises histológicas se observa que o acesso BGA-119 foi o que apresentou maior presença de feixes vasculares, inclusive bem próximos à região do domo meristemático (Figura 2A), o que pode explicar a persistência deste tipo viral. Nos demais acessos não se observou esse número elevado de feixes (Figura 2B) com o domo meristemático formado por células isodiamétricas, citoplasma denso, núcleos bem definidos, dois a três primórdios foliares.

Outro aspecto que não pode ser ignorado se refere às pequenas variações que podem ocorrer ao se fazer a incisão dos ápices caulinares e que podem resultar na permanência de mais tecido em torno da zona meristemática.

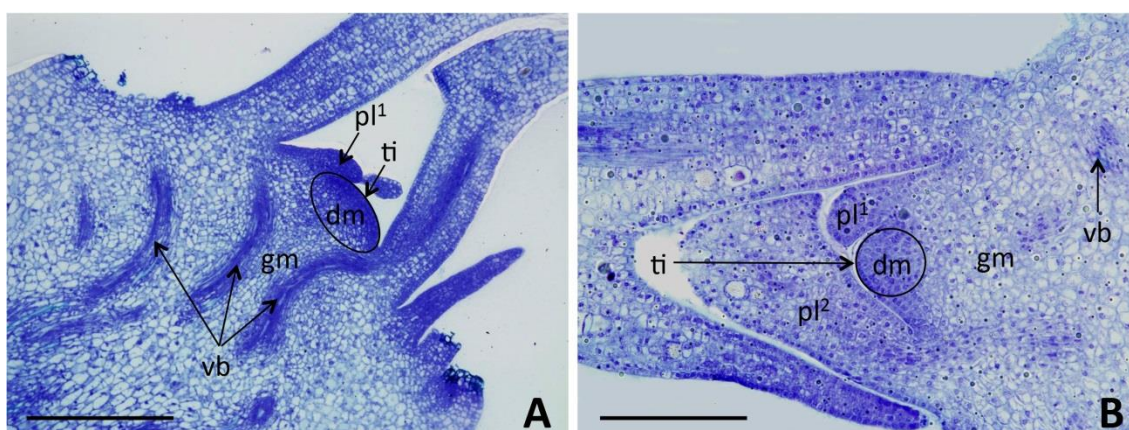


Figura 2. A-B) Cortes histológicos de ápices caulinares do acesso BGA-119 (*Ananas comosus* var. *bracteatus*) **(A)** e do acesso BGA-009 (*A. comosus* var. *comosus*) **(B)** em vista longitudinal observadas em microscópio de luz após 45 dias da multiplicação *in vitro*. **dm** = células do domo apical, **gm** = células

secundárias do ápice caulinar, **pl**^(1 e 2) = primórdios foliares, **vb** = feixes vasculares, **ti** = túnica. Barras: 200 μ m.

O estudo morfológico de Souza et al. (2016) foi o primeiro voltado para variedades botânicas do gênero *Ananas* e relata que os danos celulares, em sua grande maioria, são localizados no parênquima fundamental, nos feixes vasculares e nos primórdios foliares, deixando intactas as células do domo meristemático e permitindo, desta forma, a regeneração dos ápices caulinares.

Em estudo realizado por Shin et al. (2013) para a produção de *Dioscorea opposita* livre do *Yam mosaic virus* (YMV), obtiveram até 90% das plantas regeneradas após as imersões em nitrogênio líquido estavam livres de vírus, enquanto que apenas 40% dos regenerados usando cultura de meristema estavam limpos. O sucesso no método de criogenia para eliminar o vírus da videira foi demonstrado por Wang et al. (2003) que observou 97% das plantas regeneradas sem *Grapevine virus A* (GVA) contra apenas 12% após a cultura de meristemas. O mesmo pode ser observado para a erradicação de bactéria *Candidatus liberbacter asiaticus* (HLB) em 98,1% das plantas de citrus obtidas por criopreservação em comparação com uma porcentagem de 25,3% produzido pela cultura convencional de meristemas (DING et al., 2008).

Utilizando gemas apicais e axilares de clones infectados de uva, Pathirana et al. (2015), demonstraram a remoção de três vírus do gênero *Closteroviridae*, usando protocolo de criopreservação.

Esses dados corroboram com nossos estudos, já que apesar das porcentagens de regeneração terem sido menores após a crioterapia, em comparação com a cultura de meristemas, a diferença foi compensada pela maior proporção de plantas livre de vírus. Essa resposta diferencial, em relação à limpeza, pode estar conectada também com a distribuição desigual do vírus, geralmente restrito a tecidos vasculares, pouco presente em tecidos meristemáticos muitos jovens, ou seja, o ápice caulinar (WANG; VALKONEN, 2009).

Vários relatórios sobre diferentes espécies de vírus e espécies têm relatado que o tamanho do explante é crucial para o sucesso da erradicação viral (BRISON et al., 1997; FACCIOLI; MARANI, 1998; DING et al., 2008). Uma das vantagens da crioterapia, em comparação com a cultura do ápice caulinar,

é a possibilidade de usar tecidos um pouco maiores, que apesar de mais propensos ao diagnóstico viral positivo, devido ao maior teor de água são facilmente destruídos durante o congelamento em nitrogênio líquido (WANG; VALKENEN, 2008). Por outro lado, é preciso ter cuidado com essa questão, uma vez que os próprios procedimentos de vitrificação podem ser eficientes para esses tecidos já mais vascularizados. Assim, ajustar um protocolo de crioterapia deve levar em conta uma quantidade mínima de tecidos em torno do domo meristemático.

Outro fator que pode atuar sobre a eliminação do vírus é o uso da solução crioprotetora de PVS2 que penetra profundamente nas células e pode exibir algum tipo de efeito quimioterapêutico, inclusive provocar o choque osmótico destruindo as células diferenciadas (WANG; VALKONEN, 2009; SAKAI; ENGELMANN, 2007). Entretanto existem poucos estudos a cerca desses efeitos, ainda que a influência de reguladores de crescimento, usados na cultura de tecidos, para regular a divisão e a diferenciação celular nos explantes, que é necessário para o desenvolvimento do vírus, já tenha sido relatada (YOUSSEF et al., 2009; ENGELMAN; 2011; RAI et al., 2011; PANATTONI et al.,2013)

CONCLUSÃO

No presente estudo, relatou-se a eliminação bem-sucedida do PMWaV em diferentes variedades do gênero *Ananas* tanto por cultivo de ápice caulinar quanto por crioterapia, sendo que esta última alcançou resultados promissores com variação entre 83,33% a 100% de produção de material livre de vírus, que pode ser utilizada como metodologia de rotina para limpeza viral em plantas de abacaxi.

Referências

AGÜERO, J.; VIVES, M. C.; VELÁZQUEZ, K.; RUIZ-RUIZ, S.; JUÁREZ, J.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. *Citrus leaf blotch virus* invades meristematic regions in *Nicotiana benthamiana* and citrus. **Molecular Plant Pathology**. Oxford, v. 14, n. 6, p. 610-616, 2013.

ALCÁZAR, E. Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 6, n.12, p. 946-953, 2005.

BENSON, E. Cryopreservation Theory. In: REED, B. M. (Org). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Corvallis: Springer, p.1532. 2008.

BRISON, M.; BOUCAUD, M. T.; PIERRONNET, A; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with *Plum pox poty-virus*. **Plant Science**, Clare, v. 123, p. 189-196, 1997.

CABRAL, J. R. S.; CASTELLEN, M. S.; SOUZA, F. V. D.; MATOS, A. P.; FERREIRA, F. R. Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura** (Documentos, n. 146), 2004.

DING, F.; JIN, S. X.; HONG, N.; ZHONG, Y.; CAO, Q.; YI, G. J.; WANG, G. P. Vitrification-cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, p. 241-250, 2008.

ENGELMANN, F. Cryopreservation of embryos: an overview. In: TREVOR, A. T.; YEUNG, E. C. (Eds.) **Plant Embryo Culture: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology, v. 710, Springer Science: Business Media, LLC. 2011.

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

ENGELMANN, F.; ARNAO, M.T.G.; WU, U.; ESCOBAR, R. The development of encapsulation dehydration. In. REED, BM (Org.). **Plant cryopreservation: A practical guide**. Springer: New York, pp. 59-75, 2008.

FACCIOLI, G.; MARANI, F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: HADID, A.; DHETARPAL, A. R. K.; KOGANEZAWA, H. (Ed.). **Plant virus diseases control**. St. Paul: American Phytopathological Society. p. 436-380.1998.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Agricultural Production**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 30 junho 2017.

FEDER, N.; O' BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, p.123-142, 1968.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, I. A. Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 19, p. 520-525, 2008.

GAMBLEY, C. F.; STEELE, V.; GEERING, A. D. W.; HOMAS, J. E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australian Plant Pathology**, South Perth, v. 37, p. 95-105, 2008.

GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y.; BERISTAIN, C. I.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification. **CryoLetters**, London, v. 25, p. 405-414, 2004.

GERGERICH, R. C.; DOLJA, V. V. Introduction to plant viruses, the invisible foe. **The Plant Health Instructor**, 2006, doi: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRRA, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices. **CryoLetters**, London, v. 19, p. 375-382, 1998.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; URRRA, C.; MARTINEZ-MONTERO, M. E.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of tropical plant germplasm**. JIRCAS/IPGRI, Japan, Italy, pp. 390-392, 2000.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, E. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and Banana streak viroses from banana (*Musa* spp.). **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 20, p. 1117-1122, 2002.

HU, J. S., SETHER, D. M., LIU, X. P., WANG, M., ZEE, F., AND ULLMAN, D. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple closterovirus in Hawaii. **Plant Disease**, New York, v. 81, p. 1150-1154, 1997.

JEGER, M. J.; MADDEN, L. V.; VAN DEN BOSCH, F. The effect of transmission route on plant virus epidemic development and disease control. **Journal of theoretical biology**, Amsterdam, v. 258, p. 198-207, 2009.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138A, 1965.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation: review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.)

Merrill) cases. In: KATKOV, I. (Ed.) **Current frontiers in cryopreservation**, Intech, Croatia, pp. 359-396, 2012.

MARTINEZ-MONTERO, M. E.; MARTINEZ, J.; ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T. Cryopreservation of pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr] apices and calluses. **Acta Horticulturae**, Vertacruz, v. 666, p. 127–130, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and biomass with tabaco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 15, p. 473-92, 1962.

NAIDU, R. A.; HUGHES J. A. Methods for the detection of plant virus diseases,. In: HUGHES, J. A., ODU B. O. (Eds.). **Plant Virology in Sub-Saharan Africa**. Proceedings of a Conference Organized by IITA (Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture) p. 233-260, 2001.

NIEHL, A.; HEINLEIN M. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. **Protoplasma**, Wien, v. 248, p. 75-99, 2011.

PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 11, p. 173-188, 2013.

PATHIRANA, R.; MCLACHLAN, A.; HEDDERLEY, D.; CARRA, A.; CARIMI, F; PANIS, B. Removal of leaf roll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 1083, p. 491-498, 2015.

PRADHAN, S.; REGMI, T.; RANJIT, M.; PANT, B. Production of virus-free orchid *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. by various tissue culture techniques. **Heliyon**, v. 2, n. 10, 2016.

RAI, M.K.; SHEKHAWAT, N. S.; GUPTA, H. A. K.; PHULWARIA, M.; RAM, K.; JAISWAL, U. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent

progress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, p. 179-190, 2011.

RETHEESH, S. T., BHAT, A. I. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. **Crop Protection**, Oxford, v. 29, p.1214-1217, 2010.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and dropletvitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS based vitrification and encapsulationvitrification protocols. In: REED, B. M. (Org.) **Plant Cryopreservation: a practical guide**. pp. 33-57, 2008.

SETH, D. M.; MELZER, M. J.; BUSTO, J.; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Disease**, New York, v. 89, p. 450-456, 2005.

SETH, D., M.; HU, J. S. Closterovirus infection and Mealybug exposure are necessary for the development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. **Phytopathology**. St Paul, n. 9, v. 92, p.928-935, 2002.

SETH, D.M.; KARASEV, A.V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA C.; ZEE, F.; KISLAN, M.; BUSTO, J.; HU, J.S. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, v. 85, p. 856-864, 2001.

SHIN, J. H.; KANG, D. K.; SOHN, J. K. Production of *yam mosaic virus* (ymv)-free *Dioscorea opposita* plants by cryotherapy of shoot-tips. **CryoLetters**, London, v. 34, n. 2, p.149-157, 2013.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; SILVA, P. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple

germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 127, p. 123-133, 2016.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA, J. R. D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 59, n. 7 p. 1357-1476, 2012.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; VIEIRA, L. J.; SOUZA, E. H.; AMORIM, V. B. O.; SKOGERBOE, D.; MATSUMOTO, T.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoottips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 124, p. 351-360, 2016.

WANG, Q. C.; MAWASSI, M.; LI, P.; GAFNY, R.; TANNE, E. Elimination of *Grapevine virus A (GVA)* by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera L.* **Plant Science**, Clare, v. 165, p. 321-327. 2003.

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

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 14. n. 3, p. 119-122. 2009.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa duringfreezing. **Theriogenology**, New York, v. 54, p. 579-585, 2000.

YOUSSEF, S.A.; AL-DHAHER, M.M.A.; SHALABY, A.A. Elimination of *Grapevine fanleaf virus (GFLV)* and *Grapevine leaf roll-associated virus-1*

(GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. **International Journal Virology**, v. 9, p. 89–99, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho buscou elucidar o efeito do material de partida e sua importância para o êxito da criopreservação de ápices caulinares de abacaxi, com a finalidade de melhorar a eficiência da técnica para aplicação na conservação de germoplasma de abacaxi.

A necessidade de se padronizar um material de partida considerando o tamanho do germoplasma de abacaxi conservado em campo originou a ideia de se avaliar diferentes tempos de cultivo para a planta doadora e ver seu efeito nos resultados após o congelamento. Entretanto, os resultados mostraram que não existe um efeito isolado desse tempo de cultivo, mas sim uma forte interação com os genótipos, o que já vem sendo registrado em outros trabalhos com abacaxi.

A confirmação dessa forte dependência genotípica leva à necessidade de delineamentos para a amostragem do que deverá ser criopreservado, uma vez que será impossível avaliar diferentes tempos de exposição ao PVS2 para tantos genótipos, aproximadamente 700, que compõem o Banco de Germoplasma de Abacaxi.

Por outro lado, os estudos histológicos deixam evidente, que tipos de células estão propensas ao insucesso após o congelamento e qual a melhor condição celular para a criopreservação. A obtenção dessa condição ideal tem uma forte relação com as condições de incubação, principalmente a irradiância. Assim essas condições devem sempre ser observadas.

No que se refere à crioterapia, apesar da eliminação do vírus não ter sido 100% em um dos acessos, esse protocolo pode ser considerado de êxito para essa finalidade, já que no mesmo acesso mais de 80% das plantas ficaram limpas, permitindo, portanto, o resgate das mesmas.

Está claro, também que a eliminação do vírus depende de vários fatores, desde condições fisiológicas do ápice caulinar, do próprio vírus em questão, de possíveis efeitos de reguladores ou das soluções de vitrificação, o que ainda demanda maiores esclarecimentos.

Associar a conservação a longo prazo e a eliminação do complexo viral PMWaV é possível para a cultura do abacaxi e pode ser utilizada como metodologia de rotina para limpeza viral dos acessos conservados.