

Fotos: Osmar Nickel.



Eliminação de vírus latentes de macieiras por quimioterapia e cultivo de meristemas *in vitro*

Osmar Nickel¹
Thor Vinícius Martins Fajardo²

Introdução

Com produção de 1,26 milhão de toneladas de maçãs em 2015, o Brasil ocupa posição de destaque entre os maiores produtores do mundo. Os três estados do sul detêm 98,9 % da área plantada e 99,3 % da produção nacional (IBGE, 2016), envolvendo cerca de 3.000 produtores (MAPA, 2013).

Como planta exótica de clima temperado, a macieira enfrenta consideráveis problemas de adaptação ao clima tropical e subtropical. Entre estes fatores adversos destacam-se os invernos amenos para *Malus spp.*, a insuficiência e a irregularidade de horas-frio, necessárias para uma brotação intensa e uniforme da macieira. Diante desta constatação, adquirem relevância fatores que possam afetar negativamente o potencial de produção e adaptação, entre os quais destacam-se as infecções virais.

As mais relevantes e frequentes espécies de vírus em macieiras são *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) e *Apple stem pitting virus* (ASPV), todos, geralmente

latentes em cultivares comerciais. Uma quarta espécie viral, *Apple mosaic virus* (ApMV), ocorre com menor frequência em macieiras. Copas de plantas infectadas por ASGV em viveiros podem ser fracas e menos vigorosas que as sadias. ASPV pode causar incompatibilidade na enxertia. ApMV causa degradação de pomares e a frutificação pode ser severamente afetada. Na produção de plantas infectadas predominam frutos de menor calibre (NICKEL et al., 2008; CIEŚLIŃSKA; RUTKOWSKI, 2008) e, portanto, de menor valor comercial. Inúmeros impactos e efeitos negativos não são reconhecíveis ou não são mensuráveis visualmente (HADIDI; BARBA, 2011; GUERRA et al., 2012).

O controle eficiente dos vírus que afetam macieiras representa um dos principais desafios para o desenvolvimento de medidas eficazes e práticas de sanidade vegetal. Como se desconhecem vetores destes vírus, o uso de material de plantio sadio, livre de vírus, é uma das formas mais eficientes de controle.

Entre os procedimentos de eliminação de vírus (PEVs) mais utilizados na produção de material

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: osmar.nickel@embrapa.br

² Engenheiro-agrônomo, Dr., Pesquisador, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. E-mail: thor.fajardo@embrapa.br

sadio, destacam-se a termoterapia, a quimioterapia e o cultivo de meristemas *in vitro*. Termoterapia é o método mais frequentemente utilizado em PEV para limpeza de material propagativo de macieiras. O cultivo de meristemas, isoladamente, é a forma menos utilizada de eliminação de vírus de plantas (PANATTONI et al., 2013). Entretanto a associação entre quimioterapia e o cultivo de tecidos meristemáticos é o procedimento mais utilizado em pesquisa científica sobre limpeza clonal. Um estudo cobrindo publicações do período 1991-2010 sobre técnicas antivirais usadas na limpeza de plantas lenhosas e herbáceas constatou que 73,3% e 26,7% dos trabalhos publicados usaram, respectivamente, a termoterapia e a quimioterapia para eliminação de vírus. Somente 34% dos estudos com ribavirina foram feitos com plantas lenhosas; a videira foi a principal hospedeira lenhosa (11,3%), seguida de macieiras e ameixeiras (7,5%) (PANATTONI et al., 2013). Numerosos estudos relatam aumento da eficácia da eliminação de vírus latentes de macieiras e pereiras e outras fruteiras quando a cultura de tecidos é associada à termoterapia ou quimioterapia (KNAPP et al., 1995b; WANG et al., 2006; LASSOIS et al., 2013). Mais recentemente a crioterapia desponta como instrumento altamente eficaz de eliminação de vírus de plantas, cuja eficácia também aumenta quando associada à termoterapia, inclusive de agentes virais de difícil remoção pelos métodos tradicionais já mencionados (WANG et al., 2008; BARBA et al., 2015).

Destacam-se entre as substâncias mais utilizadas em quimioterapia de vírus de plantas, como agentes antivirais, os flavonóides, substâncias naturais muito disseminadas no reino vegetal, a exemplo de glicirrizina, quercetina, morina e outras, com atividade contra uma série de vírus animais como *Herpes simplex virus*, vírus da poliomielite e vírus da pseudorraiva. Em plantas, vários flavonóides foram relatados como inibidores do *Tobacco mosaic virus*, *Potato virus X* e *Tomato ringspot virus*. Outras substâncias antivirais que apresentaram potencial terapêutico contra vírus de plantas são os análogos de bases nitrogenadas como ribavirina, dioxixaidrotriazina (DHT), desidroxipropiladenina (DHPA) e outras. Moléculas derivadas da estrutura da ribavirina com significativa ação antiviral pertencem aos inibidores de desidrogenase de monofosfato de inosina (inglês: inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH), hidrolase

de S-adenosilomocisteína (SAH) e neuraminidase (NA) (PANATTONI et al., 2013) em células animais.

A ribavirina, como análogo, ou precursor das bases hidrogenadas adenina e guanina, dependendo da sua mutarotação, assemelha-se à adenosina e/ou guanosina. Ela pertence ao grupo de inibidores da IMPDH em mamíferos. Por esta razão, quando incorporada ao RNA (ou DNA), parecia-se igualmente bem com uracila ou citosina. O acúmulo destas mutações ou hipermutações pode levar à inativação do RNA viral. Resumidamente, entre outras funções, a enzima IMPDH age no caminho metabólico da produção de mono-, di- e trifosfato de guanosina. A presença de seu inibidor (ribavirina) reduz o complexo intracelular de guanosina, bloqueando, assim, a síntese do RNA viral (PARKER, 2005). Em plantas, conjectura-se que a ribavirina atue por mecanismo relacionado à replicação viral. Isto, entretanto, afeta também o metabolismo da planta e contribui para explicar os conhecidos efeitos citotóxicos/fitotóxicos da ribavirina, já observados por vários autores (CIEŚLIŃSKA, 2002; PUPOLA et al., 2009; HU et al., 2015). Ao reduzir fortemente a replicação e induzir ao erro-catástrofe por acúmulo de mutações no genoma viral, a ribavirina pode tornar-se tóxica para as células vegetais por outro mecanismo (PARKER, 2005). A utilização da ribavirina na remoção de ASGV e ACLSV de macieiras foi relatada por vários autores.

O objetivo deste estudo foi aplicar protocolos já estabelecidos de eliminação de vírus por quimioterapia *in vitro*, comparativamente a sua associação com o cultivo de meristemas e avaliar sua eficácia na limpeza de vírus latentes de cultivares comerciais de macieiras de relevância econômica no Brasil.

Material e Métodos

Cultivares de macieiras e vírus. Foram estabelecidos cultivos *in vitro* a partir de explantes constituídos de internós das cultivares Royal Gala acesso M053, Cripps Pink M075, Castel Gala M193 e Fuji Select M184 com 3 infecções virais (ASGV, ACLSV e ASPV); cultivares Royal Gala M073 e Cripps Pink M080 com 2 infecções virais (ASPV e ACLSV). As infecções originais foram detectadas por RT-PCR, qRT-PCR, IC-RT-PCR, Western blot e/ou por indexagem biológica recorrente.

Quimioterapia e cultivo *in vitro* de tecidos. Os tratamentos constituíram-se de 1. excisão e cultivo de meristemas em meio MS (suplementado com 1 mg.L⁻¹ de benzilamino-purina (BAP), 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de ágar) (MURASHIGE; SKOOG, 1962); 2. Cultivo em meio MS com ribavirina (1; 5; 7,5 e 10 µg.mL⁻¹) e 3. cultivo em meio MS com ribavirina seguido de remoção de meristemas. Condições de cultivo: fotoperíodo de 16:8 h e temperatura de 22 °C ± 3 °C nos três tratamentos, em experimentos independentes, por períodos de 30 a 90 dias de tratamento (dtr) com três a quatro repetições por tratamento, repicagem para meio com ribavirina fresco a cada 30 dias de cultivo, transferência para meio de desintoxicação (sem ribavirina) por 30 dias, enraizamento *in vitro* e

aclimatação em casa de vegetação com adaptação gradativa em ambiente com alta umidade relativa do ar (Figura 1). O termo “livre de vírus” será usado no âmbito dos vírus para os quais as plantas foram testadas, sendo restrito aos tecidos analisados. As porcentagens de plantas sadias obtidas de cada cultivar são determinadas pela menor porcentagem de materiais obtidos livres de cada um dos três vírus latentes.

RT-PCR, RT-qPCR e IC-RT-PCR. Nas análises de plantas submetidas a eliminação de vírus foram usados protocolos, iniciadores e insumos já relatados anteriormente (NICKEL; FAJARDO, 2014; 2016; NICKEL et al., 2001; RADAELLI et al., 2006; SILVA et al., 2008).

Ilustração: Luciana Mendonça Prado.

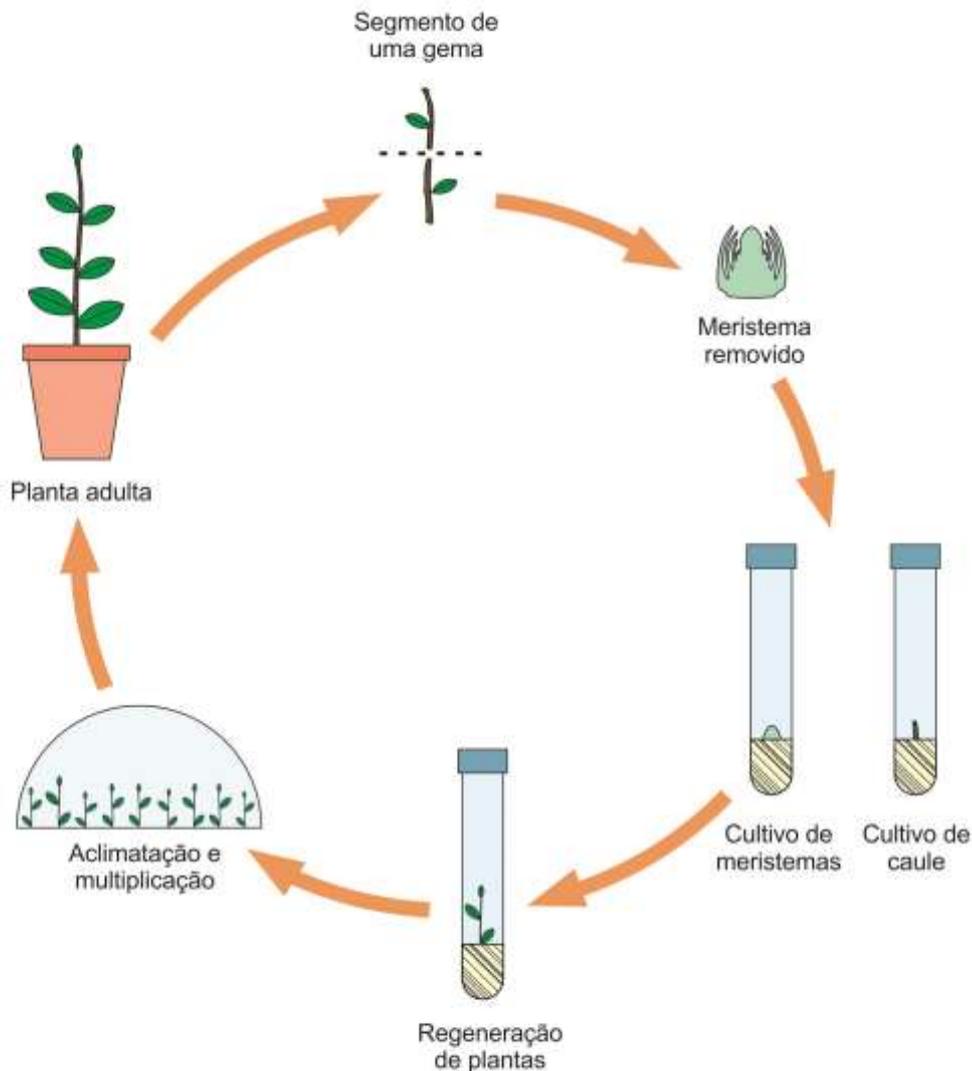


Fig. 1. Representação esquemática do procedimento de eliminação de vírus por cultivo de meristemas e do cultivo de segmentos caulinares

Resultados e Discussão

Todas plantas regeneradas de meristemas excisados de plantas sem tratamento prévio das cvs. Royal Gala M073 e Cripps Pink M080 permaneceram infectadas por ACLSV, enquanto somente duas plantas (M1 e M2) de quatro repetições (50%) regeneradas de meristemas de Cripps Pink estavam livres de ASPV (Figura 2 A e B). A ineficácia e erraticidade da eliminação de vírus de plantas lenhosas pelo cultivo de meristemas sem pré-tratamento é uma observação recorrente e está em consonância com outros relatos. Ela pode ser influenciada pela espécie/cultivar, pelo vírus envolvido e pelas características de invasão do tecido pelo vírus (WANG et al., 2008; PUPOLA et al., 2009). A persistência do ACLSV em meristemas surpreende. Segundo KNAPP et al. (1995a) o padrão de distribuição do ACLSV indicaria que o mesmo não tem habilidade para invadir células meristemáticas. Outros relatos sugerem que a maioria dos vírus e viroides são incapazes de penetrar em tecidos meristemáticos (HULL, 2002; GOSALVES-BERNAL et al., 2006). Entretanto, há consistentes relatos

de que alguns vírus conseguem invadir meristemas (WANG et al., 2008). Mais recentemente o fenômeno da ausência de vírus em tecidos com alta atividade de divisão celular tem sido atribuído não a um bloqueio físico determinado, entre outros fatores, pela ausência de vascularização nos tecidos meristemáticos, mas sobretudo à supressão da replicação viral pela reação de silenciamento de RNA do sistema de defesa do hospedeiro. Na perspectiva destes estudos, a invasão do meristema decorreria do desligamento do sistema de defesa pelo supressor de silenciamento de RNA do vírus invasor (MARTIN-HERNANDES; BAULCOMBE, 2008; SCHWACH et al., 2005).

O conhecimento de algumas características dos meristemas e do seu cultivo facilita a compreensão destes resultados. Ápices caulinares são estruturas anatômicas que consistem de meristemas de brotações axilares (laterais) ou do ápice caulinar (apicais) de cerca de 1 a 1,5 mm de tamanho com 1 a 4 primórdios foliares (WANG et al., 2008) (Figura 3). As células mais jovens do meristema não são vascularizadas e por esta razão, geralmente

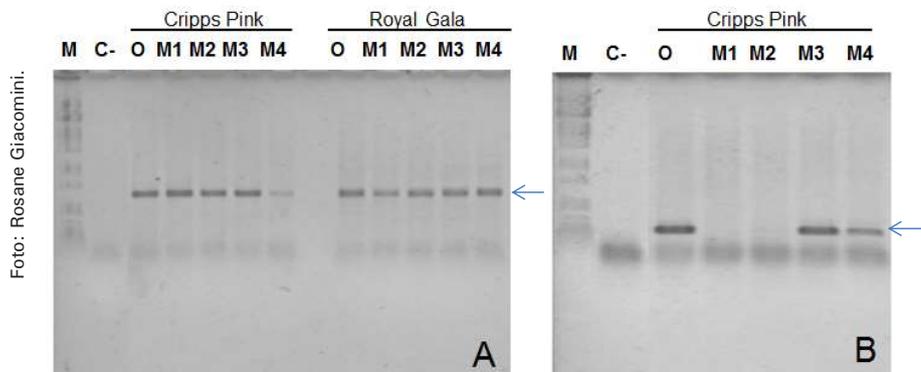


Fig. 2. Análise eletroforética de produtos de RT-PCR de plantas regeneradas de meristemas. A) ACLSV; B) ASPV. M, marcador de massa molecular (λ /PstI); C-, controle negativo livre de vírus; M1-4: meristema; O, controle positivo, planta original infectada, cultivada nas mesmas condições *in vitro*; setas indicam reações positivas.

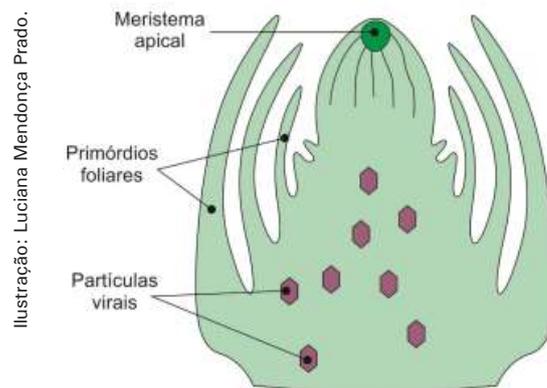


Fig. 3. Representação esquemática de um meristema apical.

(e teoricamente), consideradas até então, livres de vírus, bactérias, fitoplasmas e outros parasitas obrigatórios (WANG; VALKONEN, 2009). Há, entretanto, numerosos relatos da presença de vírus em meristemas apicais, como mencionado acima.

A cultura de meristemas tem limitações na eliminação de vírus especialmente nos casos de vírus cuja eliminação é difícil devido à eficiente invasão pelo vírus de primórdios foliares e de todos os tecidos meristemáticos, exceto as células menos diferenciadas (WANG et al., 2008). A eliminação do patógeno é inversamente proporcional ao tamanho do tecido excisado, enquanto existe uma correlação positiva entre sua capacidade de regeneração e o tamanho do meristema (WANG et al., 2008; WANG; VALKONEN, 2009). Obter plantas livres de vírus de um meristema excisado, portanto, representa o desafio de cortar com extrema precisão, sob o estereomicroscópio, e remover o mais diminuto fragmento possível de tecido – segundo diversos autores algo entre 1 e 1,5 mm e 0,2 e 0,4 mm (TAN et al., 2010; WANG et al., 2006; WANG; VALKONEN 2009; PANATTONI et al., 2013) - e de garantir sua sobrevivência e regeneração. As chances de crescimento de um pedaço tão pequeno de tecido são geralmente pequenas, de forma que junto com o meristema corta-se também 1 ou 2 primórdios foliares. Com isto, estes ápices que atingem cerca de 1 mm de comprimento, têm mais chances de desenvolvimento, mas menor probabilidade de estarem livres de vírus, daí que a erradicação de patógenos é mais eficaz com meristemas menores (WANG; VALKONEN, 2009). O cultivo de meristemas apicais se mostra bastante eficaz e representa uma excelente alternativa para remoção de vírus de espécies vegetais muito sensíveis a altas temperaturas como espécies de pequenas frutas. As baixas taxas de regeneração e de eliminação de vírus via cultivo de meristemas em várias espécies ajudam a explicar o seu uso, geralmente, em associação com outro método de eliminação de vírus, principalmente com a termoterapia (PANATTONI et al., 2013). O esquema contido na Figura 1 descreve as etapas da excisão e do cultivo de meristemas *in vitro*.

Quando, neste estudo, meristemas foram extraídos de plântulas das cvs. Royal Gala M073 e Cripps Pink M080 oriundas de segmentos de caules cultivados em meio MS com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ribavirina por 90

dias (dtr), todas as plantas regeneradas estavam livres de vírus. Na sequência, plantas das mesmas cultivares/clones foram tratadas exclusivamente com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ribavirina por 90 dias, suprimindo-se o trabalhoso e longo processo de remoção e cultivo de meristemas. Não se observou diferença de eficácia da eliminação de vírus entre os dois procedimentos, estando, após o tratamento exclusivamente com ribavirina, todas as plantas igualmente livres de vírus (Figuras 4 A e B). CIEŚLIŃSKA (2002) relataram que uma associação da quimioterapia por ribavirina com a termoterapia não foi superior ao efeito da quimioterapia isoladamente. Entretanto, a associação da ribavirina a outro agente antiviral pode aumentar a eficácia de eliminação de vírus, quando seu efeito, isoladamente, não é suficiente para a remoção do(s) vírus (JAMES et al., 1997).

A cultivar Cripps Pink foi afetada pelo efeito fitotóxico da ribavirina a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com sintomas tipo escaldadura (Figura 5). Após a transferência para meio de desintoxicação as plantas se recuperaram e não apresentavam anormalidade na passagem para a aclimação. Outros autores também relataram efeitos fitotóxicos da ribavirina em *Malus sp.*, entretanto, em concentração superior a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (CIEŚLIŃSKA, 2002; PAUNOVIC et al., 2007; PUPOLA et al., 2009).

Na continuação, avaliou-se o efeito da redução da concentração de ribavirina no meio de cultivo como também a redução do tempo de tratamento sobre a eliminação de vírus. Observou-se que um tratamento com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por 30 dias foi ineficaz, tendo removido somente 33% das infecções de ACLSV e ASPV da cv. Cripps Pink M075; a cv. Royal Gala M053 continuou infectada pelo ASGV. Em outro experimento, entretanto, tratamentos com 5, 7,5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ribavirina por 30 dias tiveram uma eficácia de eliminação de ASGV de 100% em qualquer das concentrações utilizadas de ribavirina nas cultivares Royal Gala M053 e Cripps Pink M075 e de ASPV na cv. Fuji Select. Na cv. Castel Gala, persistiam aos 30 dtr as infecções originais de ACLSV e ASPV. Com 60 dtr as infecções de ACLSV e ASPV foram removidas da cv. Castel Gala em 88,8%, indicando que esta duração de tratamento é um parâmetro com razoável margem de segurança para a eliminação de vírus latentes destas cultivares de macieiras (NICKEL et al., 2010).

Há relatos controversos quanto à facilidade de eliminação de ACLSV e ASPV vs ASGV. Enquanto PAPERSTEIN et al. (2013) relatam maior resistência à remoção de ASPV do que de ASGV da cv. Fragrance pela ribavirina (100 µg.mL⁻¹), HU et al., (2015) reportam ter sido mais fácil remover ASPV que ASGV e ACLSV da cv. Xinhongjiangjun com ribavirina (15 a 25 µg.mL⁻¹). Estas observações parecem indicar que o genótipo pode ser determinante da maior ou menor recalcitrância do agente viral. Adicionalmente, ACLSV e ASGV se distribuem desigualmente nos mesmos tecidos da macieira *in vitro*: enquanto o ACLSV se acumula em caules basais e diminui em direção à região apical, o ASGV acumula-se em regiões apicais de plântulas de macieiras *in vitro* (KNAPP et al., 1995a), o que pode explicar a maior dificuldade de eliminação deste último. Esses mesmos autores relataram que a porcentagem de eliminação de ASGV foi maior quando o mesmo foi erradicado de infecções mistas com ACLSV, comparativamente à situação quando o ASGV ocorre em infecções simples. Esta observação poderia explicar a remoção do ASGV das cvs. Royal Gala e Cripps Pink. Apesar de o ACLSV ser, geralmente, considerado de mais fácil remoção em macieiras, alguns autores observaram que sua eliminação de pereiras exige tratamentos mais longos, seguidos de cultivo de meristemas de menor tamanho (WANG et al., 2006).

Tratamentos com ribavirina, por 60 dias, levaram à obtenção de plantas livres das infecções originais nas cvs. Royal Gala M053, Cripps Pink M080, Castel Gala M193 e Fuji Select M184. Os dados obtidos na sequência imediata do PEV, demonstram que, independentemente do vírus em questão, um gradiente da eficácia de eliminação de vírus paralelamente ao aumento da concentração da ribavirina de 1 a 10 µg.mL⁻¹ ocorreu só pontualmente: na cv. Cripps Pink M080, a eficácia de eliminação de ACLSV aumentou de 25 % para 50 % e 100 %, enquanto nas outras cultivares houve uma queda da eliminação nas concentrações acima de 5 µg.mL⁻¹. Em Castel Gala M193 houve queda da eficácia de eliminação dos três vírus nas concentrações acima de 5 µg.mL⁻¹. A eliminação de ASGV e ASPV na cultivar Fuji Select M184 atingiu 100% a partir 1 µg.mL⁻¹; a eliminação do ASGV da cv. Royal Gala M053 foi total a partir de 5 µg.mL⁻¹ e acima desta concentração não se observou efeito adicional na eliminação de vírus (Tabela 1). A significativa perda de plantas por morte em diversos tratamentos na aclimação provocou desuniformidade dos dados que inviabilizou a análise estatística.

Estes resultados são comparáveis em termos de eficácia de eliminação de vírus aos obtidos por outros autores, que, entretanto, usaram

Tabela 1. Avaliação da eliminação de vírus após a quimioterapia por RT-PCR. Números de plantas livres das infecções virais originais vs. plantas tratadas, por vírus e concentração do agente antiviral.

Cultivar / Vírus	ACLSV				ASGV				ASPV			
	Ribavirina µg.mL ⁻¹				Ribavirina µg.mL ⁻¹				Ribavirina µg.mL ⁻¹			
	1	5	7,5	10	1	5	7,5	10	1	5	7,5	10
Castel Gala	3/4**	4/4	3/4	2/4	2/4	3/4	3/4	2/4	3/4	4/4	2/4	2/4
Cripps Pink M080	1/4	2/4	*	4/4	*	*	*	*	3/4	3/4	*	3/4
Cripps Pink M075	*	*	*	*	*	4/4	4/4	4/4	*	*	*	*
Royal Gala M053	*	*	*	*	3/4	4/4	4/4	4/4	*	*	*	*
Fuji Select M184	4/4	4/4	*	3/4	4/4	4/4	*	4/4	4/4	4/4	*	4/4
Porcentagem média/ concentração	66,6	83,3	75	75	75	93,7	91,6	87,5	83,3	91,6	50	75
Porcentagem média/ vírus	74,9				86,9				74,9			

* Análises de RT-PCR não realizadas. ** n° de plantas com RT-PCR negativa para os vírus indicados/n° de plantas tratadas.

concentrações substancialmente mais altas de ribavirina (CIEŚLIŃSKA, 2002). JAMES et al. (1997) relataram que ocorreu eliminação completa de ASGV de macieiras tratadas por 9 a 12 semanas com 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ribavirina, somente quando esta esteve associada a quercetina, uma substância fenólica. Conclui-se que, como observado por outros autores (PAPRSTEIN et al., 2013; HU et al., 2015) a eficácia da eliminação de vírus depende do processo complexo da interação entre genótipo vegetal, o(s) vírus presentes e a concentração do agente antiviral.

Material obtido por qualquer método de eliminação de vírus deve ser monitorado quanto a sua sanidade em face de possíveis infecções residuais. Os dados deste estudo indicam que os resultados de análises de plantas recém removidas do meio de cultivo *in vitro* ao final do PEV podem ser alterados substancialmente quando a avaliação de sanidade é realizada após períodos de cultivo *in vivo*. Os resultados da avaliação de sanidade imediatamente após o PEV podem ser mascarados pela supressão do título viral abaixo do nível de detecção em plantas *in vitro*. Isto pode decorrer do “efeito diluição” em que poucas partículas virais persistem em uma massa muito pequena de tecido vegetal após o tratamento, aumentando a probabilidade de que sejam perdidas durante o procedimento de extração de ácidos nucléicos, resultando em falsos-negativos na RT-PCR. A (re-)invasão do(s) vírus nos tecidos tratados pode se estender por longos períodos até que a sua concentração seja novamente detectável, especialmente em sistemas sorológicos e biológicos de detecção (KNAPP et al., 1995b). Assim, para uma avaliação de sanidade, é necessária a definição criteriosa do lapso de tempo transcorrido entre o tratamento e a análise ou indexagem (JAMES, 2010). Na cultivar Fuji Select o ASGV foi novamente detectado 6 anos após a conclusão do tratamento em 2010, quando os resultados das análises foram negativos.

A ocorrência de infecções residuais pode ser observada nos resultados obtidos com as quatro cultivares estudadas. Várias plantas da cultivar Cripps Pink submetidas a cultivo de meristemas precedido de quimioterapia estavam livres dos três vírus latentes na sequência imediata do PEV. A análise por RT-PCR de algumas plantas continuou negativa para ASGV um ano após o tratamento, mas estava novamente positiva para ACLSV e ASPV.

De dezesseis plantas aclimatadas da cv. Cripps Pink M075, oito plantas sobreviveram à aclimação e somente duas (25 %) plantas se revelaram livres de ASGV seis anos após o tratamento (dados não mostrados).

Na cultivar Royal Gala M053, de um total de 17 plantas regeneradas de vários tratamentos de quimioterapia e analisadas, em quatro (23,5 %), dezesseis (93,3 %) e quinze plantas (87,5 %), respectivamente, a eliminação dos três vírus ASGV, ACLSV e ASPV foi confirmada seis anos após o tratamento (Tabela 2). A presença residual do ASGV na cultivar Royal Gala atingiu concentrações detectáveis no primeiro ano após o tratamento em treze (76,5 %) das plantas e manteve-se estável por seis anos, enquanto na cv. Castel Gala ASGV e ACLSV residuais foram diagnosticados, respectivamente em 6 (37,5) e 10 (62,5 %) das plantas tratadas, seis anos após o tratamento. Esses (falsos-) negativos nos resultados de 2010, são reações perfeitas de RT-PCR na imediata sequência do tratamento de eliminação de vírus, determinados, provavelmente, por baixa concentração de ASGV e ACLSV nos tecidos tratados *in vitro* (KNAPP et al., 1995b) e perda de RNA total durante a purificação, que afetam a detecção do vírus (Tabela 2).

Em plantas da cv. Royal Gala M073, com RT-PCR 100% negativa para ACLSV e ASPV no momento da aclimação, os dois vírus foram novamente detectados em todas as plantas tratadas um ano após o duplo tratamento por quimioterapia e cultivo de meristemas.

O tratamento com ribavirina teve maior eficácia quanto à eliminação de vírus nas cultivares Castel Gala M193 e Fuji Select M184. Na avaliação de longo prazo, seis anos após o tratamento, considerando-se todos os tratamentos realizados, quatro (37,5 %), oito (88,8 %) e 3 (23,5 %) das plantas sobreviventes de Castel Gala, Fuji Select e Royal Gala, respectivamente, estavam livres dos três vírus latentes; as plantas restantes estavam ainda contaminadas com um ou mais vírus. Embora um grau considerável de estabilidade da eliminação de vírus nestas duas cultivares se anunciava nos resultados das análises em 2014, ainda em 2016 seis anos após o tratamento, foram detectadas infecções residuais de ASGV e ACLSV, em plantas da cv. Castel Gala com diagnóstico negativo após

Tabela 2. Plantas livres de vírus oriundas de distintos tratamentos de quimioterapia seis anos após o tratamento de eliminação de vírus.

Cultivar	ASGV				ACLSV			ASPV			
	Ano da análise				Ano da análise			Ano da análise			
	2010	2011	2014 2015	2016	2010	2011/ 2014	2016	2010	2011	2014	2016
Castel Gala M193	16/81,2*	16/81,2	**	16/62,5	16/100	18/77,7	16/37,5	16/71,4	16/71,4	16/71,4	16/61,1
Fuji Select M184	16/100	**	9/100	9/100	16/100	9/88,8	9/88,8	16/100	9/88,8	9/88,8	9/88,8
Royal Gala M053	16/94,1	16/23,5	16/23,5	17/23,5	16/100	15/100	17/94,1	16/100	17/94,1	17/91,6	17/88,2
Porcentagem média/vírus	91,8			62	100		73,5	90,5			79,3

* Número de plantas tratadas e aclimatadas com êxito oriundas de tratamentos com ribavirina/porcentagem de plantas livres das infecções virais originais; O número de análises variou entre os vírus analisados por ano. ** Análises de RT-PCR não realizadas.

o tratamento em 2010, 2011 e 2014. Diferenças de taxas de êxito da eliminação de vírus deste e de outros estudos podem ser atribuídas ao fator cultivar, à especificidade dos isolados virais e a determinantes experimentais (CIEŚLIŃSKA, 2002). HU et al. (2015) observaram com a cv. Xinhongjiangjun uma taxa média de eliminação de 94,1 %, 84,8 % e 83 % respectivamente para ASPV, ACLSV e ASGV utilizando 15 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto neste estudo as taxas médias (de 1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de eliminação por vírus foram, respectivamente, de 79,3, 73,5 e 62 %, seis anos após o tratamento.

Vários autores observaram que a dificuldade de eliminação de um vírus pode estar associada às características do vírus e do genótipo da espécie, cultivar ou clone (PUPOLA et al., 2009). O grau de resistência/suscetibilidade de uma cultivar ou um clone a determinado vírus pode também ser determinante do sucesso ou da ineficácia da eliminação do patógeno. Assim, HAUPTMANOVÁ e POLÁK (2011) relataram que o efeito de uma mesma concentração de ribavirina na eliminação de *Plum pox virus* de ameixeiras foi reduzido em até 30 % em cultivares suscetíveis, comparativamente às resistentes.

Nas cultivares avaliadas observou-se que a partir de dois anos após o PEV por quimioterapia, o estado sanitário viral havia-se estabilizado na maioria das plantas analisadas. A grande sensibilidade de métodos de detecção molecular de vírus podem encurtar substancialmente estes limites para avaliação de material de PEVs. É necessário acompanhar regularmente o estado sanitário de plantas matrizes destinadas à produção de material propagativo independentemente do método de eliminação de vírus pelo qual elas tenham sido obtidas (JAMES, 2010).

O êxito da eliminação de vírus, como exposto, pode variar fortemente, dependendo da espécie vegetal, cultivar ou clone utilizado do patógeno, do tipo de infecção, do tipo do tecido infectado, das condições, intrínsecas e específicas do método usado e de cada experimento. No presente estudo foram obtidas 3 (23,5 %), 4 (37,5 %) e 8 plantas (88,8 %) (dados não mostrados), respectivamente, das cultivares Royal Gala, Castel Gala e Fuji Select livres de infecções virais originais por tratamento com ribavirina.

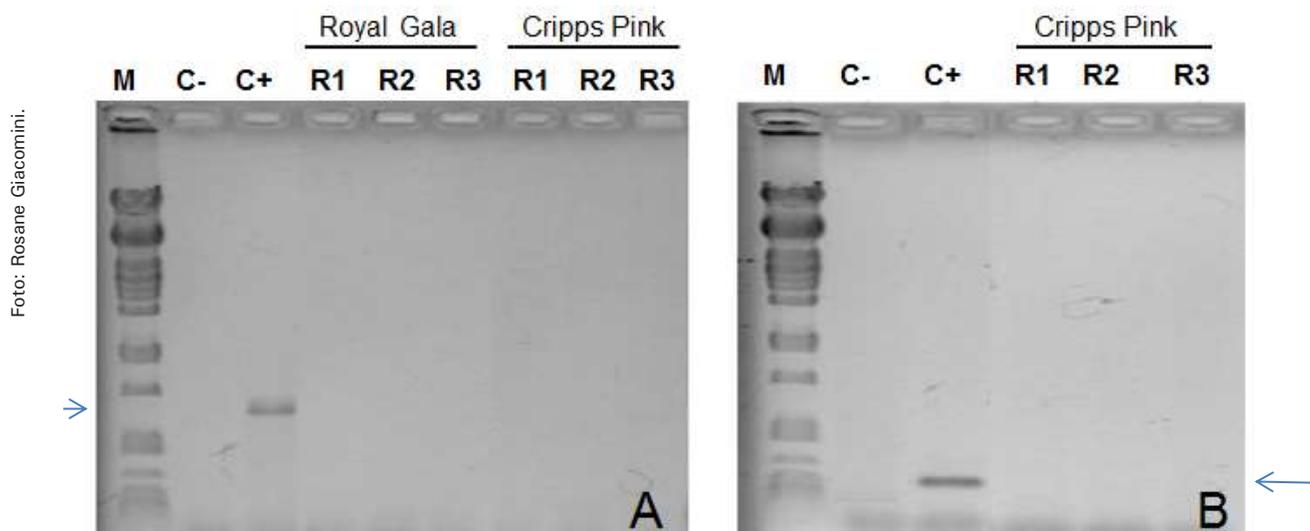


Foto: Rosane Giacomini.

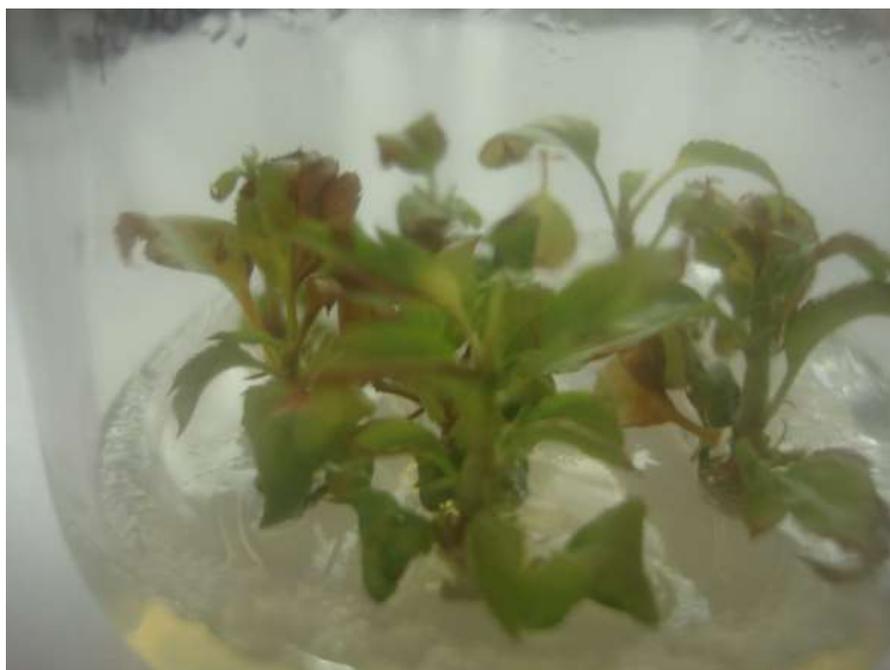


Fig. 5. Efeitos fitotóxicos tipo escaldadura (parte das folhas com coloração marron) em plantas da cultivar Cripps Pink após 12 semanas de cultivo na presença de ribavirina ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Conclusões

Tratamentos com ribavirina têm uma eficácia significativa contra vírus latentes de macieiras que aumenta a segurança da eliminação de vírus. O procedimento é simples e prescinde do trabalhoso e demorado cultivo de meristemas.

Os procedimentos de eliminação de vírus (PEVs) quando não eliminam o(s) vírus totalmente, podem

provocar uma supressão da concentração do patógeno a níveis não detectáveis na sequência imediata do tratamento.

A avaliação de sanidade deve ocorrer após a aclimação em casa de vegetação. É necessário o monitoramento de longo prazo de plantas matrizes, obtidas por este processo, destinadas à produção de material propagativo a fim de garantir sua sanidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao técnico Marcos F. Vanni pelo excelente suporte técnico, ao CNPq e à Fapergs pelo suporte financeiro para Rosane Giacomini, Fabiana de Souza, Sheila Montipo, Camila Eckert e Flavia Zanin de Villa.

Referências

BARBA, M.; ILARDI, V.; PASQUINI, G. Control of pome and stone fruit virus diseases. In: LOEBENSTEIN, G.; KATIS, N. I. (Ed.) **Advances in Virus Research**, v. 91, p. 47-83, 2015.

CIEŚLIŃSKA, M. Elimination of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. **Acta Horticulturae**, v. 596, p. 481-484, 2002. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.596.80.

CIEŚLIŃSKA, M.; RUTKOWSKI, K. P. Effect of apple chlorotic leaf spot virus on yield and quality of fruits from 'Golden Delicious' and 'Sampion'. **Acta Horticulturae**, v. 781, p. 119-124, 2008. DOI: 10.17660/ActaHortic.2008.781.17.

GOSALVES-BERNAL, B.; GARCIA-CASTILLOS, S.; PALLÁS, V.; SANCHES-PINA, M. A. Distribution of carnation viruses in shoot tip: exclusion from the shoot apical meristem. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 69, n. 1-3, p. 43-51, Sept. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.12.004>.

GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; DEL PONTE, E. M.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; FAJARDO, T. V. M.; MARODIN, G. A. B. Development of glomerella leaf spot is enhanced in virus-infected maxi gala apples. **Journal of Plant Pathology** v. 94, n. 1, p. 237-241, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.f.a.2012.017>.

HADIDI, A.; BARBA, M. Economic impact of pome and stone fruit viruses and viroids. In: HADIDI, A.; BARBA, M.; CANDRESSE, T.; JELKMANN, W. (Eds.) **Virus and Virus-like diseases of pome and stone fruits**. Saint Paul; American Phytopathological Society, 2011. p. 1-7.

HAUPTMANOVÁ, A.; POLÁK, J. The elimination of Plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of *in vitro* cultures. **Horticultural Science** (Prague), v. 38, n. 2, p. 49-53, 2011.

HU, G.; DONG, Y.; ZHANG, Z.; FAN, X.; REN, F.; ZHOU, J. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 2, p. 435-443, May 2015. DOI: 10.1007/s11240-015-0714-6.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 4th ed. San Diego: Academy Press, 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm> >. Acesso em: 24 jun. 2016.

JAMES, D. Confirmation of the elimination of Apple stem grooving virus from apple trees by *in vitro* chemotherapy. In: **International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 21., 2010**. Quedlinburg. . Proceedings... Quedlinburg, Germany: Julius Kühn Institute v. 427, p. 47-50, 2010.

JAMES, D.; TRYTTEN, P. A.; MACKENZIE, D. J.; TOWERS, G. H. N.; FRENCH, C. J. Elimination of apple stem grooving virus by chemotherapy and development of an immunocapture RT-PCR for rapid sensitive screening. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 131, n. 3, p. 459-470, Dec. 1997.

KNAPP, E.; HANZER, V.; WEISS, H.; MACHADO, A. C.; WANG, Q.; WEISS, B.; KATINGER, H.; MACHADO, M. L. da C. Distribution of apple chlorotic leafspot virus in apple shoots cultivated *in vitro*. **Acta Horticulturae**, v. 386, n. 24, p. 187-194. 1995a

KNAPP, E.; MACHADO, A. C.; PÜHRINGER, H.; WANG, Q.; HANZER, V.; WEISS, H.; WEISS, B.; KATINGER, H.; MACHADO, M. L. da C. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of Malus sp. and Prunus sp. **Journal of Virological Methods**, v. 55, n. 2, p. 157-173, Oct. 1995b.

- LASSOIS, L.; LEPOIVRE, P.; SWENNEN, R.; VAN DEN HOUWE, I.; PANIS, B. Thermoherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. **Methods in Molecular Biology**, v. 994, p. 419-433, 2013. DOI: 10.1007/978-1-62703-074-8_32..
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Secretaria de Política Agrícola, Informativo**, ano 6, v. 54, mar. 2013.
- MARTIN-HERNANDES, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus 16-kilodalton-protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. **Journal of Virology**, v. 82, n. 8, p. 4064-4071, Apr. 2008. DOI: 10.1128/JVI.02438-07.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- NICKEL O.; FAJARDO, T. V. M.; JELKMANN, W.; KUHN, G. B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in Southern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 655-659, Sept. 2001. DOI: 10.1590/S0100-41582001000300014.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Detection of viruses in apples and pears by real time RT-PCR using 5´-hydrolysis probes. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 1, p. 207-213, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V96I1.047>.
- NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. **Deteção de Vírus de Macieiras e Pereiras por IC-RT-PCR usando Anticorpos Policlonais contra Proteínas Virais Expressadas em *Escherichia coli***. Bento Gonçalves: Embrapa uva e Vinho, 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 182). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142272/1/Comunicado-Técnico-182.pdf>>. Acesso em: 02 maio 2016.
- NICKEL, O.; QUECINI, V. M.; FAJARDO, T. V. M.; SOUZA, F. de. Remoção de Apple stem grooving virus, Apple stem pitting virus e Apple chlorotic leaf spot virus de macieiras por quimioterapia *in vitro*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. S277, ago. 2010.
- NICKEL, O.; GUERRA, D. S.; BERNARDI, J.; FAJARDO, T. V. M. Infecções virais em macieiras “Maxi Gala” provocam redução de produção e da qualidade dos frutos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 20., 2008. Vitória. **Anais...** Vitória: Incaper, 2008, 4 p. CD-ROM.
- PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 1, p. 173-188, 2013.
- PAPRSTEIN, F.; SEDLÁK, J.; SVOBODOVÁ, L.; POLÁK, J.; GADIOU, S. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance – Short communication. **Horticultural Science** (Prague), v. 40, n. 4, p. 186-190, 2013.
- PARKER, W. B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. **Virus Research**, v. 107, n. 2, p. 165-171, Feb. 2005.
- PAUNOVIC, S.; RUZIC, D.; VUJOVIC, T.; MILENKOVIC, S.; JEVREMOVIC, D. *In vitro* production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 21, n.4, p. 417–421, 2007. DOI: 10.1080/13102818.2007.10817486.
- PUPOLA, N.; LEPSE, L.; KALE, A.; MOROCKO-BICEVSKA, I. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy. **Sodininkyste ir Darzininkyste**, v. 28, n. 3, p. 165-172, 2009.
- RADAELLI, P.; NICKEL, O.; SCHONS, J.; ARAGÃO, F. J. L.; FAJARDO, T. V. M. Diagnóstico biológico e molecular e análise da seqüência de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de um isolado do Apple stem pitting virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 51-56, jan./fev. 2006.
- SCHWACH, F.; FAISTIJ, F.E.; JONES, L.; BAULCOMBE, D.C. An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and is required for the activity but not for production of a systemic silencing signal. **Plant Physiology**, v. 138, n. 4, p.1842-1852, Aug. 2005. DOI: 10.1104/pp.105.063537.

SILVA, F. N.; NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M.; BOGO, A. Indexação biológica múltipla e RT-PCR para detecção de vírus latentes em macieiras. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 157-161, Mar./Apr. 2008. DOI: 10.1590/S1982-56762008000200011 .

TAN, R.; WANG, L.; HONG, N.; WANG G. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear. **Plant Cell and Tissue Organ Culture**, v. 101, n. 2, p. 229-235, May 2010.

WANG, L.; WANG, G.; HONG, N.; TANG, R.; DENG, X.; ZHANG, H. Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus from *in vitro*-cultured pear

shoot tips. **HortScience**, v. 41, n. 3, p.729-732, June 2006.

WANG, Q.; CUELLAR, W. J.; RAJAMÄKI, M-L.; HIRATA, Y.; VALKONEN J. P. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 2, p. 237-250, Mar. 2008. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x.

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, v. 14, n. 3, p. 119-122, Mar. 2009. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.11.010.

Comunicado Técnico, 193

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: Embrapa Uva e Vinho
Rua Livramento, 515 - Caixa Postal 130
95701-008 Bento Gonçalves, RS
Fone: (0xx) 54 3455-8000
Fax: (0xx) 54 3451-2792
<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/>

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



1ª edição

Comitê de Publicações

Presidente: César Luis Girardi
Secretária-executiva: Sandra de Souza Sebben
Membros: Adelião Carginin, Alexandre Hoffmann, Ana Beatriz da Costa Czermainski, Henrique Pessoa dos Santos, João Caetano Fioravanzo, João Henrique Ribeiro Figueredo, Jorge Tonietto, Rochelle Martins Alvorcem e Viviane Maria Zanella Bello Fialho

Expediente

Editoração gráfica: Cristiane Turchet
Normalização bibliográfica: Rochelle Martins Alvorcem