



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KELLYN JOSELYN ANDINO LOPEZ

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE LIMPEZA CLONAL DE
ABACAXIZEIRO PARA *PINEAPPLE MEALYBUG WILT*
ASSOCIATED VIRUS (PMWaV) COM O USO DA
HIDROTERMOTERAPIA**

VITÓRIA, ES

2018

KELLYN JOSELYN ANDINO LOPEZ

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE LIMPEZA CLONAL DE
ABACAXIZEIRO PARA *PINEAPPLE MEALYBUG WILT*
ASSOCIATED VIRUS (PMWaV) COM O USO DA
HIDROTERMOTERAPIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Alberto R. Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura

VITÓRIA, ES

2018




UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

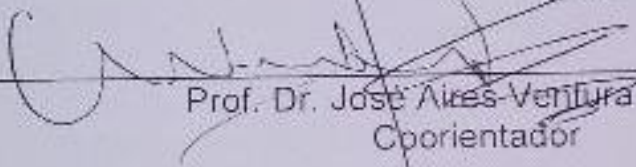
"DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE LIMPEZA CLONAL DE
ABACAXIZEIRO PARA *PINEAPPLE MEALYBUG WILT ASSOCIATED
VIRUS (PMWaV)* COM O USO DA HIDROTERMOTERAPIA"

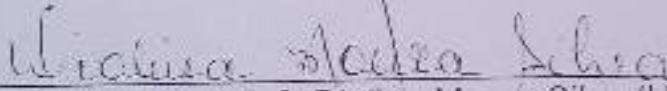
Kellyn Joselyn Andino Lopez


Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:


Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes (UFES)
Orientador


Prof. Dr. José Aires Ventura (UFES)
Coorientador


Prof. Dr. Diolina Moura Silva (UFES)
Membro Interno


Prof. Dr. Hélcio Costa (INCAPER)
Membro Externo

Vitória-ES, 28 de março de 2018.

**Aos meus pais e avós.
Jesus Cristo por ser minha força.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em memória ao meu avô Manuel Santos por todos seus bons conselhos desde criança, obrigada pela confiança nesta pequena.

Amigos e família que contribuíram positivamente na minha vida para eu alcançar o objetivo de estudar o curso de mestrado no Brasil.

Em particular expresso meu profundo agradecimento ao meu orientador Dr. A. Alberto Fernandes por sua ajuda e diplomacia com minha pessoa e por ter me ensinado que todo conhecimento é válido na vida.

Ao meu querido co-orientador, Dr. José Aires Ventura, não só por causa de seu legado científico e intelectual, mas também por seu calor humano, seu apoio paterno, seu interesse pela pessoa antes do interesse pelo bolsista e a confiança que colocou em mim, minha gratidão e carinho para o senhor sempre.

Agradeço a todos os companheiros do grupo do Laboratório de Biotecnologia (UFES), por me ajudar quando precisei: Aline Vaz, Fernanda Perón e Tathiana Antúnes. Ao técnico Vitor, do laboratório de Biotecnologia e a secretária Miriam Assis, por sua ajuda constante.

À Dra. Maria A. Mouco, pelo incentivo de vir a estudar no Brasil, à senhora María Musso, ao Dr. Osmar Klauberg e Morgana Andrade, por seus excelentes conselhos em momentos difíceis da minha vida e me ajudar a perseguir meus sonhos.

Ao senhor Ramón López pelo apoio e meus colegas Breidy Escobar, Kevin Blandon, Miguel Corea e Amisis García, obrigada pela força à distância.

Aos meus amigos brasileiros (Meu Anjo-Patricia Gómez, Andreia Sousa, Mariana Lima, Francine Nogueira, Pablo Viana, Carolina Silva, Leonardo Faria, Willian Acosta, Amanda Silva, Ícaro Milk, Eduardo Almeida, Raissa Debacker, Mauricio Ferreira, Ana, Miriaos, as Julianas e Ane Tosi) e todos os meninos da turma OEA/2016, em especial Nicolás Ortíz, Nohora Vélez, Johanna Acuña, Johana

Madroñero, Karla Alvarado, Daniela, Pérez, Ingrid Reyes, Celeny Figuera, Ronald, Andrés Méndez e María Bolívar, obrigada por seus conselhos, apoio e carinho comigo.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de estudo no Programa de Biotecnologia. À Profa. Dra. Patrícia Fernandes pela oportunidade de desenvolver o projeto no laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio.

Ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER).

Finalmente agradeço à Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).

Em todos os momentos de prova, lembra-se de Deus, espera em Deus e vença com Deus.

Anônimo.

RESUMO

ANDINO, K.J. **DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO DE LIMPEZA CLONAL DE ABACAXIZEIRO PARA *PINEAPPLE MEALYBUG WILT ASSOCIATED VIRUS* (PMWaV) COM O USO DA HIDROTERMOTERAPIA. 2018.** 57f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Programa de Pós-Graduação e Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Orientador: Prof. Dr. A. Alberto Fernandes.

A murcha do abacaxizeiro é uma doença de elevada importância econômica que ocorre em todas as regiões produtoras de abacaxi no mundo. A doença é causada pela associação do complexo de vírus *Pineapple mealybug wilt associated virus* (PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3) e a cochonilha *Dysmicoccus brevipes*. No Brasil, a doença tem sido associada à presença do PMWaV-2 e, os métodos de controle não tem sido efetivos no controle das plantas infectadas. Neste estudo, foi desenvolvida uma metodologia de limpeza clonal do PMWaV-2 com o uso da hidrotérmodoterapia (48°C, 50°C, 52°C) por 10, 20 e 30 min e 54°C, 56°C, 58°C e 60°C por 10, 20, 30, 40 e 50 minutos, em mudas do tipo filhote de abacaxizeiros cv. Pérola. Foi determinada a viabilidade dos tecidos das mudas com diferentes concentrações do tetrazólio (0,01%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,5% e 1%), sendo selecionadas como melhores a 0,075% e 0,05%. Com o tratamento hidrotérmico, foi possível obter mudas viáveis com temperaturas de 54°C a 58°C por até 50 minutos e de 60°C por até 30 minutos de tratamento. A sobrevivência das mudas diminuiu drasticamente quando expostas a temperaturas de 60°C por mais de 30 min. A indexação das mudas pela análise molecular por RT-PCR mostrou a presença do PMWaV-2 nas mudas controle não submetidas aos tratamentos hidrotérmicos. No tratamento de 56°C por 30 minutos, observou-se que em uma amostra de folha e três amostras de raiz estavam sem a presença do PMWaV-2. No entanto, no tecido foliar das mudas submetidas a 54°C, 58°C e 60°C por 30 minutos, 54°C/ 40 min, 56°C/ 40 e 50 min e 60°C por 10, 20 e 30 minutos foi detectado o vírus. Pelo método proposto verificou-se que foi possível obter mudas de abacaxi cv. Pérola, livres do PMWaV-2 mediante tratamento hidrotérmico a 56°C por 30 minutos. Estes resultados mostram que a hidrotérmodoterapia poderá se tornar um método viável e econômico para a limpeza de material propagativo a ser incorporado nas estratégias de controle da murcha causada pelo PMWaV.

Palavras-chave: *Ananas comosus* var. *comosus*; murcha; termoterapia, indexação; RT-PCR.

ABSTRACT

ANDINO, K.J. **Development of a clonal cleaning process for pineapple against *Pineapple mealybug wilt associated virus (PMWAV)* using hydrothermotherapy.** 2018. 57f. Dissertation (Masters in Biotechnology) – Post-Graduation in Biotechnology, UFES. Advisor: Prof. Dr. A. Alberto Fernandes.

The pineapple mealybug wilt is a disease of high economic importance that occurs in all pineapple production regions in the world. That is caused by the viral complex *Pineapple mealybug wilt associated virus* (PMWaV- 1, PMWaV-2 and PMWaV-3) and the mealybug *Dysmicoccus brevipes*. In Brazil, it has been associated with the presence of PMWaV-2 but the control methods have been not effective controlling infected plants. In this study we developed a PMWaV-2 clonal cleaning methodology with hydrothermotherapy (48 °C, 50 °C, 52 °C) for 10, 20 and 30 minutes and 54 °C, 56 °C, 58 °C and 60 °C for 10, 20, 30, 40 and 50 minutes in pineapple slips of cv. Pérola. The viability was determined in each sample using different concentrations of tetrazolium chloride (0.01%, 0.05%, 0.075%, 0.1%, 0.5%, 1%) obtaining the best results using 0.075% and 0.05% of tetrazolium chloride. It was possible to obtain viable pineapple slips with hydrothermal treatment using temperatures from 54 °C to 58 °C for 50 minutes and 60 °C for 30 minutes. Survival pineapple was drastically affected when were exposed to temperatures of 60 °C for more than 30 minutes. The molecular analysis using RT- PCR showed the presence of PMWaV-2 in the control samples of pineapple slips without hydrothermal treatment. The presence of PMWaV-2 was not detected in one pineapple leaf sample and three roots pineapple samples that were using the treatment of 56 °C for 30 minutes. In the other hand, pineapple leaf samples exposed to treatments at 54°C for 40 and 50 minutes and 60 °C for 10, 20 and 30 minutes were still diagnosed with the virus presence. The proposed method showed the possibility of obtaining pineapple slips of cv. Pérola free of PMWaV-2 using a hydrothermal treatment at 56°C for 30 minutes. These results show that hydrothermotherapy could be a viable and economical method used in control strategies for cleaning pineapple slips affected by *Pineapple mealybug wilt associated virus* caused by PMWaV- 2.

Keywords: *Ananas comosus* var. *comosus*, pineapple sucker, thermotherapy, RT-PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais mudas convencionais produzidas nas plantas de abacaxizeiro.....	18
Figura 2	Sintomas de mucha em mudas de abacaxizeiros cv. Pérola (A). Plantação de abacaxizeiro cv. Pérola em Marataízes-ES (B)	20
Figura 3	Árvore filogenética construída com sequências completas de aminoácidos do gene HSP70h de membros da família <i>Closteroviridae</i> , que inclui as espécies PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3.....	22
Figura 4	Organização do genoma e análise filogenética de PMWaV-1 e PMWaV-2 (A) e PMWaV-3 ORF1a: MTR- Metiltransferase; HEL- Helicase; ORF1b: RdRp- RNA polimerase dependente de RNA; ORF2: Pequena proteína hidrofóbica; ORF3 : Hsp70h (Heatshock protein 70 homolog); ORF4: Proteínas p61 ou p46; ORF5: CP Capa Proteica; ORF6: p24 ou CPd- Capa Proteica duplicada; ORF7:p20; ORF8: p22; ORF9: p6.....	23
Figura 5	Mudas provenientes do campo cv Pérola infetadas com o PMWaV-2 (A); padronização do corte das mudas pre tratamento hidrotérmico (B); banho maria e termômetro digital (C); água a temperatura ambiente 22°C (D); muda transplantada em areia após hidrotermoterapia (E).....	33
Figura 6	Viabilidade celular em tecido de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola, entre o controle (água) e as diferentes concentrações de Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio a 0,01%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,5%, 1%.....	38
Figura 7	Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola com 0,075% de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.....	39

Figura 8	Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola, com 0,5% de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.....	40
Figura 9	Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola com 1% de cloreto 2,3,5trifenil tetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.....	41
Figura 10	Massa foliar frescaem (mg) obtida de mudas de abacaxi cv. Pérola, submetidas a diferentes temperaturas e períodos de tratamento hidrotérmico.....	42
Figura 11	Crescimento foliar das mudas cv. Pérola a 90 dias após tratamento hidrotérmico, mantidas na casa de vegetação.....	42
Figura 12	<i>Amplicon</i> do primers em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecuar 1kb plus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), mudas -testemunhas sem hidrotermoterapia (C), tratamentos térmico de 54°C, 56°C e 58°C por 30 min respectivamente.....	44
Figura 13	<i>Amplicon</i> do primers em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecuar 1kb plus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), folhas com 54°C por 40 min (3,4,5); folhas com 56°C por 40 min (4 e 5); folhas com 56°C por 50 minutos (6,7 e 8); folhas com 60°C por 10 min (9 e 10); folhas com 60°C 20 (11,12 e13); folhas com 60°C por 30 minutos (14 e15).....	45
Figura 14	<i>Amplicon</i> do primers em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecuar 1kb plus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), tratamentos de 54°C, 56°C e 58°C expostos a hidrotermoterapia por 30 minutos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- cDNA-** DNA complementar (do inglês complementary DNA)
- CP-** Capa Protéica (do inglês coat protein)
- CPd-** Capa Protéica duplicada (do inglês coat protein duplicate)
- CTAB-** Bromuro trimetil amonio de cetilo (do inglês Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
- dNTPs-** desoxirribonucleotídeos trifosfatos
- DTT-** Ditioneitol (do inglês Dithiothreitol)
- EDTA-** Etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetra-acetic acid)
- FAO-** Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- HEL-** Helicase
- HSP70h-** Proteína de choque térmico 70 homólogo (do inglês *heat shock protein 70 homologue*)
- IBGE-** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- INCAPER-** Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
- LSPA-** Levantamento Sistemático da Produção Agrícola
- LSPA-** Levantamento Sistemático de Produção Agrícola
- MTR-** Metiltransferase (do inglês Methyltransferase)
- MWP-** Murcha de abacaxizeiros (do inglês Mealybug wilt of pineapple)
- OEA-** Organização dos Estados Americanos
- ORFs-** Marco de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frames*)
- PMWaV-** *Pineapple mealybug wilt associated virus*
- RdRp-** RNA polimerase dependente de RNA do inglês (RNA-dependent RNA Polymerase)
- RT-PCR-** Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)
- TAE-** Tris-Acetato-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 IMPORTÂNCIAECONÔMICA DO ABACAXI NO BRASIL.....	17
2.2 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL DO ABACAXI	18
2.3 MURCHA DE ABACAXIZEIRO	19
2.3.1 Disseminações e manejo da doença	21
2.4 PINEAPPLE MEALYBUG WILT ASSOCIATED VIRUS (PMWAV).....	22
2.5 TERMOTERAPIA	25
2.6 VIABILIDADE CELULAR	27
2.7 INDEXAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 VIABILIDADE CELULAR COM TETRAZÓLIO	30
4.1.1 Determinação de respiração celular em tecidos sem hidrotterapia	30
4.1.2 Viabilidade celular em tecidos com tratamento hidrotérmico	31
4.2 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DAS MUDAS	32
4.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO TÉRMICO DE ABACAXIZEIROS	33
4.4 INDEXAÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO POR PCR.....	34
4.4.1 Extração e análise dos ácidos nucleicos	34
4.4.2 Tratamento com DNase	35
4.4.3 Transcrição reversa	35
4.4.4 Análise por RT-PCR	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM MUDAS SEM TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	38
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MUDAS COM TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	39
5.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO HIDROTÉRMICO DE ABACAXIZEIROS.....	41

5.4 INDEXAÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO POR PCR.....	43
6 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	.49
APÊNDICES.56

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio no Brasil tem uma expressiva participação na economia do país, devido as suas características e diversidades, tais como, clima favorável, solo, água, relevo e, além disso, tem uma extensa área com potencial de expansão na sua capacidade agrícola na América do Sul (MARIANTE; SAMPAIO; INGLIS, 2008).

A fruticultura tem destaque na economia brasileira pela sua contribuição da geração de renda em regiões estagnadas e com poucas alternativas para dinamizar a economia local (BEZERRA et al., 2017). Dentro deste setor, a abacaxicultura desempenha um papel de grande importância, devido a seu potencial produtivo, sendo que em escala mundial os continentes com maior produção a Ásia, com aproximadamente 11 milhões de toneladas, e a América do Sul, com aproximadamente 9 milhões de toneladas (FAO, 2016). No Brasil a região sudeste é a que mais se destaca na produção de frutos, o Espírito Santo, posiciona-se entre os estados com maior produção por área colhida (2,414 ha), rendimento médio de 18,886 frutos/ha, e produção de 45,593t.

Economicamente, a produção de abacaxi pode ser afetada em até 80% por uma doença denominada murcha do abacaxizeiro. A doença tem como etiologia um complexo viral designado por *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) e um vetor, a cochonilha *Dysmicoccus brevipes*, os quais são os responsáveis pela manifestação dos sintomas de murcha (DEY, 2015; GUNASINGUE; GERMAN; HU, et al., 1996). As plantas doentes apresentam mudanças nos ciclos de frutificação, o que leva à redução da produção e qualidade dos frutos, afetando seu valor comercial (SETHUR; HU, 2002; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

A fonte principal de disseminação dos vírus PMWaV no campo é o plantio de material propagativo (mudas) infectado, que é a principal fonte de disseminação do vírus e dispersão das cochonilhas, para novas áreas e conseqüentemente, representa um risco enorme para a produção da cultura, sendo a utilização de mudas sadias um componente importante no manejo integrado desta doença (MATOS, 2012; VENTURA; ZAMBOLIM, 2002). O controle eficiente dos vírus que afetam as plantas representa um dos principais desafios para o desenvolvimento de medidas

eficazes e práticas de sanidade vegetal (NICKEL; FAJARDO, 2016), porém, existem táticas de manejo que visam minimizar a incidência e a severidade das doenças, como o uso de mudas ou matrizes sadias, que se torna em alternativas eficientes para o controle de agentes patogênicos, no sentido de obter uma produção de qualidade, reduzir os custos de produção e manter a sustentabilidade da cultura (COSTA; ZAMBOLIM; VENTURA, 2003).

Considerando os processos mais utilizados para a inativação de vírus e visando a produção de material vegetal de propagação sadio, destaca-se a termoterapia (SETHER et al., 2001; NICKEL; FAJARDO, 2016). Vários estudos relatam a eficácia de eliminação e redução de vírus em plantas utilizando este método (LASSOIS et al., 2013; PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). Pesquisas apontam a hidrotermoterapia como um método físico com potencial para a inativação das partículas virais nos tecidos das plantas, e o estímulo na capacidade de defesa das plantas (SZITTYA et al., 2003; CHELLAPAN et al., 2005; VIEIRA, 2015).

Devido ao ineficiente controle da murcha de abacaxizeiros com produtos químicos e o risco de disseminação da doença no campo, propõe-se utilizar a hidrotermoterapia em mudas de tipo filhote, de abacaxizeiro da cv. Pérola, para o desenvolvimento de um processo de limpeza clonal e assim, viabilizar a disponibilização de mudas sadias livres de PMWaV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ABACAXI NO BRASIL

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma planta perene, herbácea e monocotiledônea, pertence ao gênero *Ananas*, que é o mais importante da família Bromeliaceae do ponto de vista econômico, pois nele estão incluídos as cultivares comerciais. O cultivo dessa espécie ocorre em vários países, dentre os quais se destaca o Brasil, sendo a cultura produzida em quase todas as regiões e Estados da federação. A cultivar Pérola é a mais plantada e muito apreciada no mercado interno tanto na forma natural e industrializado devido ao seu sabor exótico e ao alto teor nutricional (MARIANTE; SAMPAIO; INGLIS, 2008; SANCHES, 2011).

No Brasil o cultivo do abacaxizeiro para o ano de 2016 foi de aproximadamente 102.552 ha plantados, dos quais 68.699 ha foram produtivos, logrando assim um volume na produção de 1.787.937t. O rendimento médio por hectare, a nível nacional, foi de 26.148 kg/ha com valor comercial em R\$ 2,420,673,00 favorecendo, assim, a cadeia do agronegócio no País (IBGE, 2017; FAO, 2017).

O Sudeste destaca-se como uma das regiões de maior produção no país, no setor nacional com 27,284 frutos/ha, o Nordeste com 26,756 frutos/ha seguido da região Sul com 22,578 frutos/ha, a região Centro-Oeste com produção de 22,287 frutos/ha e a região Norte que apresenta 19,463 frutos/ha (LSPA, 2017). O Espírito Santo, atualmente, posiciona-se entre os Estados com maior produção por área plantada e colhida (IBGE, 2017). Entre os principais municípios produtores do Espírito Santo, encontra-se Presidente Kennedy, Marataízes, Itapemirim e Sooretama (FERRÃO et al., 2017).

Um dos principais fatores que limitam a produção de abacaxizeiros são as doenças, estas limitam a produção agrícola consideravelmente. O controle das doenças de plantas é processo fundamental para o agronegócio da fruticultura e nela estão vários desafios como controlar sem causar danos ao meio ambiente (VENTURA;

ZAMBOLIM, 2002) em suma muitos produtores utilizam agrotóxicos ainda sendo estes impactantes para o ambiente e segurança alimentar (ZAMBOLIM; VENTURA, 2012).

2.2 PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL DO ABACAXI

O abacaxi, planta cuja inflorescência terminal origina um fruto múltiplo, que após a maturação do fruto, a planta desenvolve brotações axilares. De forma geral, a propagação do abacaxi é vegetativa, por meio de diversas mudas produzidas nas plantas adulta (Figura 1), destacando-se a coroa (brotação do ápice do fruto), filhote (brotação do pedúnculo, que é a haste que sustenta o fruto), filhote-rebentão (brotação da região de inserção do pedúnculo no caule ou talo) e rebentão (brotação do caule) e produção por meio de talo (PY et al., 1984; VENTURA, 1994; DEECKENBRUGG; LEAL apud BARTHOLOMEW; PAULL; ROHRBACH, 2003).

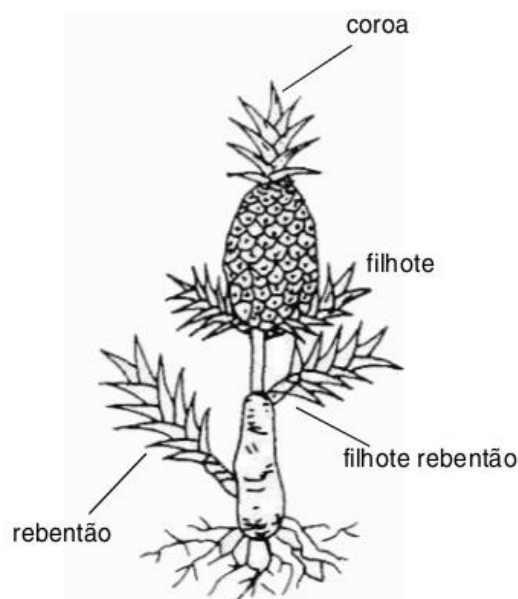


Figura 1. Principais mudas convencionais produzidas nas plantas de abacaxizeiro (Fonte: PY et al., 1984).

O número e a qualidade de mudas convencionais disponíveis do abacaxizeiro dependem entre outros fatores dos tratamentos culturais realizados na lavoura do ciclo de produção anterior, da cultivar, da presença ou ausência de pragas e doenças,

principalmente da murcha associada à cochonilha, contribuindo para a baixa qualidade do material propagativo (GOMES et al., 2003).

A cultivar Pérola é uma das mais plantadas e preferidas do mercado Brasileiro, para o consumo *in natura* devido a pouca acidez que agrada ao paladar do consumidor. Apresenta porte médio e crescimento ereto, com folhas aproximadamente de 65 cm de comprimento e espinhos nos bordos, tendo o fruto um pedúnculo longo em torno de 30 cm. Esta cultivar produz muitos filhotes (5 a 15) aderidos ao pedúnculo, próximos da base do fruto, o qual apresenta forma cônica, e quando seu fruto esta fisiologicamente maduro a casca torna-se de cor amarelada, apresenta polpa branca (com sólidos solúveis totais de 14 a 16° B) e seu fruto pesando entre 1 kg a 1,5 kg, o grande porém é a sua suscetibilidade à murcha do abacaxizeiro (CABRAL, 1999; BARTHOLOMEW; PAULL; ROHRBACH, 2003).

2.3 MURCHA DE ABACAXIZEIRO

A murcha de abacaxizeiros (MWP) é uma doença que tem importância econômica devido a sua distribuição pandêmica, chegando a causar perdas econômicas elevadas e próximas a 100% na produção de frutos (SANCHES, 2005). Mesmo com a ampla disseminação e importância econômica para a abacaxicultura, a doença tinha, até o final da década de 80, sua etiologia pouco esclarecida (GUNASINGHE; GERMAN, 1989). Anteriormente, supunha-se que a doença era causada por uma toxina produzida pelas cochonilhas *Pseudococcus brevipes* (Cockerell) *Pseudococcidae* (CARTER 1933), sendo revisada a taxonomia da cochonilha para *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell), por Ferris, em 1950 (apud JAHN et al., 2003).

A partir de estudos gerados por Ito (1962), sugeriu-se que a murcha de abacaxizeiros seria uma doença viral transmitida por meio de cochonilhas. Estudos posteriores mostram que plantas saudáveis, quando colonizadas por cochonilhas, não apresentavam quaisquer sintomas da doença, anulando a hipótese das toxinas liberadas pelas cochonilhas estarem causando a murcha. No entanto plantas inoculadas com cochonilhas provenientes de plantas doentes, estas apresentavam sintomas 60 dias após inoculação. Entretanto plantas inoculadas com cochonilhas

provenientes de condições controladas, não houve o aparecimento de sintomas, indicando a presença de um segundo agente envolvido na doença (SINGH; SASTRY, 1974).

A murcha do abacaxizeiro tem uma sequência de sintomas iniciam no sistema radicular, que apresenta crescimento prejudicado, os sintomas foliares aparecem dois a três meses após o início da infecção pelo vírus. Na cultivar Smooth Cayenne, descreveu-se os seguintes sintomas: aparecimento de coloração vermelho bronzeada e amarelada nas folhas centrais; suas margens tendem a se curvar para baixo (epinastia), perdem a turgescência e suas pontas ficam secas; as plantas infectadas apresentam menor porte do que as sadias (CARTER, 1933) (Figura 2).

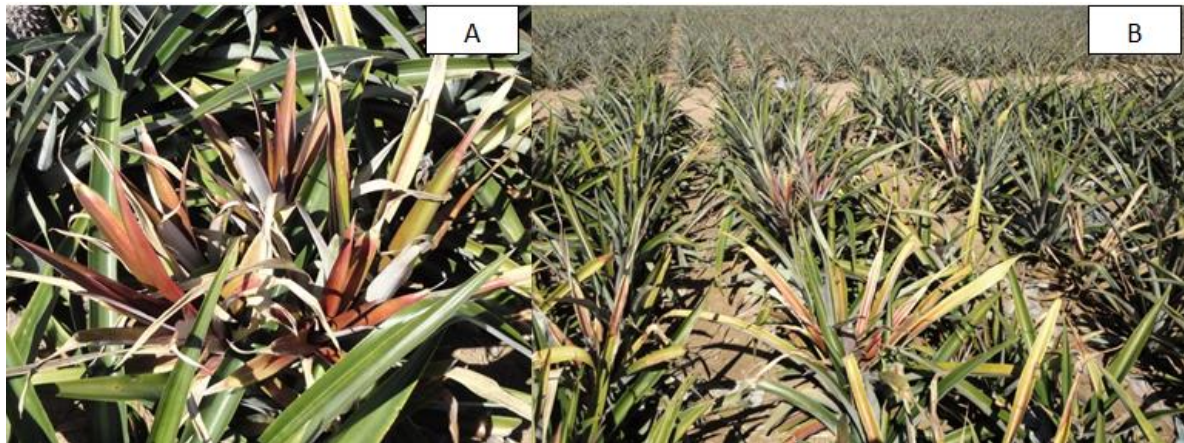


Figura 2 Sintomas de murcha em mudas de abacaxizeiros cv. Pérola (A). Plantação de abacaxizeiro cv. Pérola com sintomas de murcha em Marataízes-ES (B). Fonte: José Aires Ventura (2017).

Estudos posteriores foram realizados a partir de isolados de vírus de RNA fita simples em tecidos de abacaxizeiros sintomáticos e propuseram a etiologia viral da doença, passando a ser conhecida como *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV) pertencente ao gênero *Ampelovirus*, e a família *Closterovirus*, (GUNASINGHE; GERMAN, 1989; VENTURA; COSTA, 2002; VENTURA; GOES, 2016).

Estudos gerados no Havaí através de microscopia eletrônica imunoenzimática (ISEM) demonstraram a presença dos vírus PMWaV1 e PMWaV-2 encontrando maior quantidade de partículas virais no sistema radicular das plantas e foi confirmado a transmissão pelas cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes*), porém só o PMWaV-2 desenvolve os sintomas na planta (HU et al.,

1996; SETHER; HU 2002). No Brasil a doença é transmitida por *Dysmicoccus brevipes*, e disseminada principalmente pelo material propagativo, com perdas do campo que representam um risco enorme para a produtividade da cultura, levando a planta à morte, antes mesmo da frutificação, ou impedindo a comercialização pelo elevado número de frutos refugados (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

2.3.1 Disseminação e manejo da doença

O manejo integrado das doenças do abacaxi realiza-se considerando princípios que permitem a integração de diferentes práticas na cultura e envolvem o estudo da biologia dos patógenos, vetores e planta, além do monitoramento da cultura para a eliminação do inóculo inicial, ou reduzindo a taxa de infecção (VENTURA; COSTA, 2002; ZAMBOLIM; ZAMBOLIM, 2002). As medidas preventivas incluem princípios de erradicação que são implementadas através de métodos físicos (quimioterapia, termoterapia, podas e cirurgia) para eliminar, ou reduzir o inóculo inicial, como tentativa de garantir material propagativo sadio (ZAMBOLIM; ZAMBOLIM, 2002).

O manejo das doenças no campo tem um papel fundamental para o sucesso da cultura. Na tentativa de uma produção eficiente, diversos métodos são utilizados na fruticultura como o uso de variedades resistentes, o controle químico e o uso de mudas sadias produzidas a partir de matrizes indexadas (JÚNIOR, 2002). No entanto, alguns métodos não têm sido totalmente efetivos no controle de doenças, principalmente porque os vírus dificilmente são controlados com produtos químicos e nem sempre é possível ter variedades resistentes (ZAMBOLIM; ZAMBOLIM, 2002).

As mudas infectadas constituem uma das principais formas de disseminação da doença no campo, outros fatores como vento, chuva, restos culturais e o homem podem, também, contribuir para a dispersão dos vírus (VENTURA; COSTA, 2002). Além disso, já tem sido demonstrado que os agentes etiológicos das doenças nas plantas são capazes de infectar mais de um órgão na mesma planta e que a sintomatologia e severidade geralmente variam de uma região a outra, dependendo do inóculo existente no campo, condições climáticas e manejo da cultura (VENTURA; COSTA, 2002; AMORIN, 2016).

2.4 PINEAPPLE MEALYBUG WILT ASSOCIATED VIRUS (PMWaV)

O *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV), é classificado como um complexo viral formado pelo PMWaV1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 e PMWaV5. O genoma deste vírus é formado por RNA de fita simples, de estrutura filamentosa e alongada entre 1200 a 1500nm e 10 a 13 nm de diâmetro (GUNASINGHE; GERMAN, 1989). As espécies do PMWaV pertencem à família *Closteroviridae* e ao gênero *Ampelovirus*, e pode ser transmitido pelos vetores *Dysmicoccus brevipes* e *Dysmicoccus neobrevipes* (MARTELLI et al., 2002; AGRANOVSKY, 2016). O PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 foram separados em dois subgrupos designados I e II (Figura 3) (MARTELLI et al., 2012; DEY, 2015)

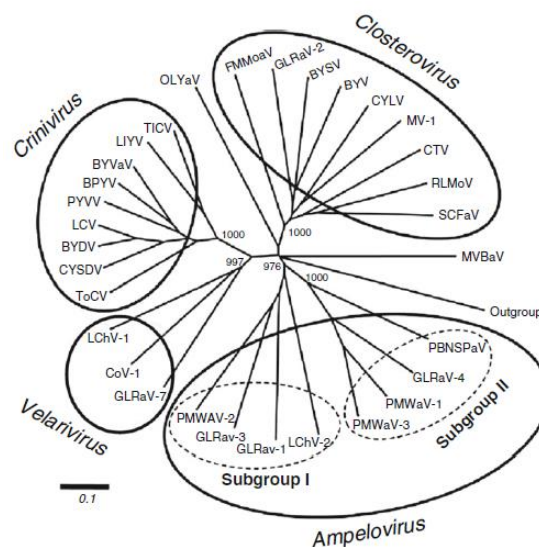


Figura 3. Árvore filogenética construída com sequências completas de aminoácidos do gene HSP70h (do inglês heat shock protein) de membros da família *Closteroviridae*, que inclui as espécies PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3. Fonte: (MARTELLI et al. 2012; AGRANOVSKY, 2016).

O subgrupo I diferencia-se do subgrupo II devido ao tamanho e estrutura genômica. O PMWaV-2 pertence ao subgrupo I, o qual apresenta genoma maior, constituído por 10 ORFs (do inglês *Open Reading Frames*), ou marco de leitura aberta (Figura 4). No subgrupo II encontram-se os vírus PMWaV-1 e o PMWaV-3, os quais têm os menores genomas entre os *Closteroviridae*, abrangendo apenas 7 ORFs (Figura 4) (VIRALZONE, 2010).

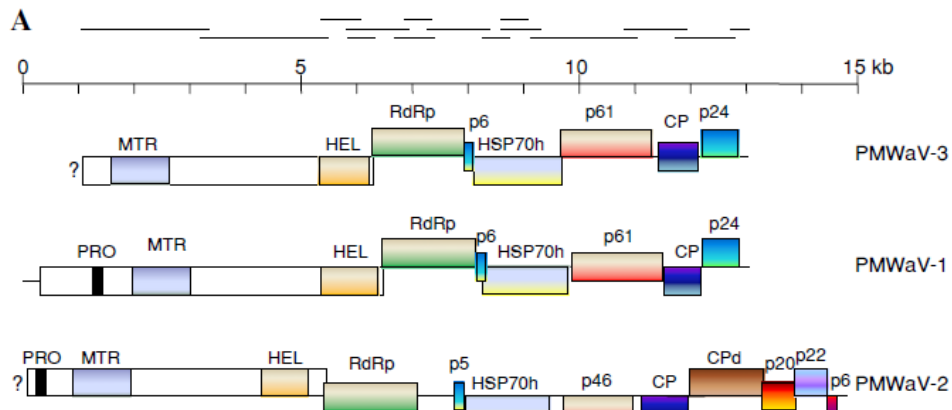


Figura 4. Organização do genoma e análise filogenética de PMWaV-1 e PMWaV-2 (A) e PMWaV-3 ORF1a: MTR- Metil transferase; HEL- Helicase; ORF1b: RdRp- RNA polimerase dependente de RNA; ORF2: Pequena proteína hidrofóbica; ORF3 : Hsp70h (Heat shock protein 70 homologo); ORF4: Proteínas p61 ou p46; ORF5: CP Capa Protéica; ORF6: p24 ou CPd- Capa Protéica duplicada; ORF7: p20; ORF8: p22; ORF9: p6. Fonte: (SETHER et al., 2009).

Em relação à estrutura genômica, o PMWaV-1 tem genoma de 13,1 kb de comprimento, massa molecular da CP de 28 KDa e ausência da CPd (MELZER et al, 2008). O PMWaV-2, difere filogeneticamente de PMWaV-1 e PMWaV-3, apresenta 10 ORFs, tem presença de Capa proteica duplicada (CPd), de 56kDa, e presença de proteínas p20, p22, e p6. O PMWaV-3 tem genoma constituído por 7 ORFs, comprimento de 14 kb, codifica a proteína CP de 28,8 kDa, e não tem a proteína casideal duplicata (MELZER et al., 2001; SETHER, 2009).

As primeiras características deste gênero foram descritas por Melzer et al. (2001), mediante o estudo do dsRNA de tecidos de abacaxizeiros infetados e isolados. Por meio de *primers* degenerados que amplificam o gene conservado hsp70, foi possível identificar duas espécies virais diferentes, designados PMWaV-1 e PMWaV-2. A transmissão por cochonilhas e a análise das regiões e sequência de aminoácidos de produtos genéticos relevantes (CP, CPm, Hsp70h), determinou que o PMWaV-3 fosse classificado com um *Ampelovírus*.

A literatura também relata a existência de mais dois vírus, o PMWaV-4 e PMWaV-5, que ainda não tiveram seus genomas completamente seqüenciados, e não estão associados aos desenvolvimento dos sintomas da murcha, por isso não estão ainda associados como agentes patogênicos do abacaxizeiro (GAMBLEY et al., 2008).

Diversas pesquisas têm relatado a presença do vírus PMWaV-1 em plantas assintomáticas para murcha. No entanto, foi constatada a redução do crescimento e rendimento na produção devido à maturação prematura ou assíncrona dos frutos (SEThER; HU, 2001; 2002). Foi demonstrada a correlação de 99% a 100% entre os sintomas de murcha e a presença do PMWaV-2 sendo esta espécie a mais virulenta e que pode causar perdas totais na produção da cultura (HU et al., 1997; SETHER, et al., 2001; SETHER; HU, 2002). Esta proposta foi confirmada mediante estudo de campo no Havaí, quando plantas com sintomas tiveram maior incidência viral que plantas assintomáticas (SEThER; HU, 2002; SUBERE, 2011; DEY, 2015).

Na Austrália, o PMWaV-2 foi detectado e associado a sintomas da doença, porém em outro estudo apresentado em baixas concentrações. Os vírus PMWaV-1 e PMWaV-3 também foram detectados nas mesmas plantas amostradas, independentemente da severidade da doença. Enquanto que a presença do PMWaV-3 em outra área foi fortemente associada a murcha. O PMWaV-5 foi ocasionalmente encontrado e não foi associado com a doença (GAMBEY et al., 2008). Em Cuba, além da presença do PMWaV-2 e PMWaV-3 (Hernández et al., 2010) foi detectado também o PMWaV-1 (Hernández et al., 2014).

No Brasil, no Estado do Espírito Santo, foi confirmada a presença pela primeira vez dos vírus PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, em amostras de plantas de campo com sintomas da doença (PERON; FERNANDES; VENTURA, 2010). No entanto, nas plantas que apresentaram sintomas de murcha, foi detectada somente a presença do vírus PMWaV-2 (PERON, 2009). Dey (2015), mencionou o papel do PMWaV na atividade supressora de silenciamento de RNA da planta em *Nicotiana bethamiana*. Mediante estudos do PMWaV1 e PMWaV-2, que codificam proteínas de ação sistêmica e local, determinado que ORFs p20 e CP do PMWaV-2 mostraram atividade de supressão local e sistêmica, enquanto que os ORFs p22 e CPd do mostraram suprimir apenas o silenciamento sistêmico. Em contraste, para o PMWaV-1, apenas o ORF p61 mostrou ter uma função supressora sistêmica. Estes resultados explicam o papel do PMWaV-2 e PMWaV-1 e seu desenvolvimento na etiologia da doença (SEThER; HU, 2002).

2.5 TERMOTERAPIA

A termoterapia é um método físico, que pode ser usado para o controle de doenças de plantas, principalmente viroses, com aplicação no tratamento de material propagativo, erradicando ou diminuindo a quantidade de inóculo nas partes vegetais durante período de repouso. Pode também ser útil para a desinfestação de solo e tratamento em pós-colheita de frutos (ULLMAN et al., 1991; VENTURA; COSTA, 2002). A termoterapia é baseada no princípio de que "os patógenos são frequentemente mortos, ou no caso de vírus inativados em regimes de tempo e temperatura que não seja prejudicial para o hospedeiro" (WASWA; KAKUHENZIRE; SSEMAKULA, 2017).-

Uma interpretação dos efeitos da termoterapia considera as novas "vias" metabólicas que são desencadeadas pela resposta antiviral natural da planta infectada, com particular referência ao silenciamento de genes induzidos pelo vírus (CHELLAPAN et al., 2005). Em alguns estudos foi identificado que o silenciamento gênico é dependente da temperatura, demonstrando assim que o estresse por calor induz um aumento na capacidade da defesa da planta, refletindo em uma ação de silenciamento do RNA viral sob temperaturas mais elevadas (SZITTYA et al., 2003; VIEIRA, 2015). De acordo com Matthews (1970, apud GRONDEAU; SAMSON, 1994, p.59) o aquecimento *in vivo* pode inativar vírus de pelo menos cinco maneiras: (1) ruptura do RNA, que pode ser reversível; (2) ruptura da partícula do vírus; (3) inativação da RNA *polimerase* viral; (4) prevenção de embalagem, devido à proteína de revestimento interrompida; e (5) inibição do movimento do vírus na planta, permitindo um novo crescimento livre de vírus. No entanto, Mink et al., (2008), citado por Panattoni et al. (2013) mencionaram que os efeitos do tratamento térmico interagem no funcionamento de proteínas de movimento viral, sendo capazes de produzir uma restrição nos tecidos infectados.

O uso da termoterapia foi relatado em 13 espécies de vírus sendo considerada eficiente no controle de agentes patogênicos em plantas, tendo vantagem em relação a outras técnicas na erradicação de vírus (PANATTONI; LUVISI; TRIOLO,

2013). Procedimentos efetuados com diferentes temperaturas tiveram êxito no processo térmico relacionado diretamente com o tipo de planta, espécie do vírus, tempo e exposição à temperatura (WANG et al., 2008). Em material propagativo, foi demonstrada inativação de partículas virais em plantas, ainda depois da pós colheita no campo (ULLMAN et al., 1991; ULLMAN et al., 1993; SETHER et al., 2001; VENTURA; COSTA, 2002).

Em plantas cítricas, além de desencadear resposta defensiva do hospedeiro à infecção viral, observou-se a expressão de proteínas chaperonas envolvidas na resposta ao estresse (NWUGO et al., 2016). Essas observações sugerem que as plantas podem possuir processos de tolerância/resistência que são induzidos por fatores abióticos, como por exemplo, o calor (NWUGO et al., 2016). Além disso, é mencionado que o tratamento térmico também pode induzir a um incremento no rendimento, qualidade de frutos, características sensoriais (incluindo aumento de compostos fenólicos) em cultivares de uva (MANNINI et al., 1996; GUIDONI et al., 1997).

De fato, para evitar ou minimizar epidemias, a regra geral e principal é usar plantas ou material propagativo sem patógenos. A terapia pelo calor representa um meio interessante para este propósito porque é simples, fácil de usar e não é dispendiosa, podendo ser transferida facilmente para os produtores rurais. Uma vantagem do tratamento térmico com água, é que o tempo de exposição é geralmente curto sendo a água é um bom condutor de calor, além disso, como o tratamento pode penetrar no tecido vegetal, os patógenos que infectam os tecidos são mais propensos a serem afetados (GRONDEAU; SAMSON, 1994).

No entanto, para o caso do abacaxizeiro antes da aplicação deste método de limpeza clonal, uma série de estudos devem ser realizados para ajustar a temperatura e tempo de exposição no tratamento térmico, mais adaptada ao material vegetal a ser tratado e ao agente patogênico, já que vírus com baixos pontos de inativação térmica podem ser facilmente eliminados por combinações do binômio temperatura e tempo, possibilitando ter temperaturas menos elevadas com menor prejuízos para hospedeiros (GEARD, 1958). Em contraste, outros vírus podem apresentar altos pontos de inativação térmica (SALDANA; LARA, 1984).

2.6 VIABILIDADE CELULAR

O tetrazólio é um sal cuja fórmula é o cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, utilizada para medir atividade respiratória associada a uma cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (ZORZAL et al., 2015). A redução do sal de tetrazólio causa formação de um composto estável e de coloração vermelha (DELOUCHE et al., 1976; CUNHA; GOMES, 2015), onde o sal de tetrazólio é reduzido, sempre que houver atividade respiratória nas mitocôndrias, significando que há viabilidade celular do tecido. Os tecidos não viáveis não reagem e, conseqüentemente, não são coloridos. A formação de um vermelho carmim claro é assim o indicativo de tecido com atividade (NETO; KRZYZANOWSKY; COSTA, 1988).

Esta técnica destaca-se pelo seu amplo desempenho na avaliação da qualidade fisiológica em sementes, atividade respiratória de meristemas apicais e estacas de plantas, além disso, o sal do tetrazólio é também usado na aplicação de células humanas para detectar viabilidade celular (RODRIGUES et al., 2015; FERREIRA et al., 2001; PEREIRA, 2016; PRICE; MILLAN, 1990). A eficiência do teste depende do desenvolvimento da metodologia adequada para cada espécie (COSTA; SANTOS, 2010).

2.7 INDEXAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS

Para fins de diagnóstico molecular, a técnica de transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é um dos métodos mais utilizados na detecção de vírus em plantas por ser altamente eficiente, pela sua precisão, permitindo a amplificação de regiões específicas do genoma viral (ZARBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2013).

Esta técnica pode ser aplicada para avaliar uma variedade de órgãos e tecidos de plantas sintomáticas e assintomáticas, tornando-se uma ferramenta de grande importância para programas sanitários e de certificação, contribuindo na redução dos

patógenos, evitando possíveis fontes de inóculo (GALLELLI et al., 2014). Entre as vantagens desta técnica destacam-se sua rapidez, alta sensibilidade, a pequena quantidade de amostra necessária para a análise, a exatidão e precisão dos resultados. Entretanto, como qualquer outra técnica, não está isenta de erros experimentais, mesmo que possam ser minimizados ao incluir uma série de controles para garantir os resultados (TUSSELL et al., 2013).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada na amplificação de um fragmento de interesse de forma exponencial em horas. Portanto, é necessário que o fragmento de DNA, alvo da amplificação, esteja livre de interferentes, permitindo o acesso da enzima termoestável DNA polimerase, responsável pela síntese dos *amplicons* (PERON, 2009). No caso de vírus de plantas com genomas de RNA, um passo deve ser realizado antes da PCR: a transcrição reversa. Considerando que as polimerases termoestáveis são todas DNA polimerase dependente de DNA, a fita de RNA viral deve ser convertida em uma fita de DNA complementar (cDNA), o que é realizado pela enzima transcriptase reversa (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2013). Posterior a este procedimento, pode-se executar os múltiplos ciclos da PCR, que visam à produção de um grande número de cópias do fragmento alvo (FAJARDO; NICKEL, 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo com o uso da hidrotermoterapia para a obtenção de mudas de abacaxizeiro da cultivar Pérola livres de PMWaV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade celular e sobrevivência do material propagativo de abacaxizeiros, após a aplicação do tratamento hidrotérmico;
- Determinar o desenvolvimento das mudas de abacaxi cv. Pérola após o tratamento hidrotérmico;
- Indexar mudas de abacaxi cv. Pérola para o PMWaV através de diagnóstico molecular com RT-PCR;
- Desenvolver um processo de limpeza clonal de mudas tipo filhote de abacaxizeiro cv. Pérola.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos foram avaliadas mudas de abacaxi da cultivar Pérola, sintomáticas para a murcha de abacaxizeiro, coletadas nas áreas de pesquisa do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), na Fazenda Experimental de Sooretama, localizada no município de Sooretama, no Estado do Espírito Santo. Durante o período de crescimento as mudas foram mantidas em vasos na casa de vegetação no Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, da Universidade Federal do Espírito Santo, campus Maruípe, Vitória-ES.

Para análise de diagnóstico molecular após tratamento térmico, foi excisada a parte aclorofilada das folhas das mudas, lavadas com água, álcool a 70% e lavadas novamente com água destilada. Estas amostras foram secas com papel esterilizado e posteriormente ensacadas e congeladas a -80°C . As amostras foram então submetidas à extração de RNA total com o protocolo de Doyle e Doyle (1990) modificado por Peron (2009), para posterior avaliação com RT-PCR.

4.1 VIABILIDADE CELULAR COM TETRAZÓLIO

4.1.1 Determinação de respiração celular em tecidos sem hidrotermoterapia

Para as análises de viabilidade celular, foram utilizadas mudas de coroas proveniente de zonas produtoras do município de Maratáizes, no Sul do Estado do Espírito Santo, cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio lote nº. 37474, marca NEON, placas de Petri, papel alumínio e estufa de circulação forçada de ar da marca SHEL LAB (SL).

Foram realizados cortes finos transversais do talo das mudas com gemas axilares, fazendo uso de um estilete para padronização dos cortes. Cada corte de tecido do talo foi colocado em placas de Petri, numa solução de 10 ml de cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio a diferentes concentrações para cada tratamento (Tabela 1), seguidamente

as placas de Petri foram envolvidas em papel alumínio e incubadas no forno de ar forçado marca LAB (SL), a 26°C, por 3 horas. Este procedimento foi realizado no escuro já que o cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio é sensível à luz. A interpretação do resultado do tratamento foi realizada imediatamente após o período de incubação.

4.1.2 Viabilidade celular em tecidos com tratamento hidrotérmico.

Para determinar a viabilidade celular dos tecidos que receberam os tratamentos hidrotérmicos, prepararam-se soluções de 0, 075%; 0,5% e 1%, a partir de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio, marca NEON (0,99%). Mudas do tipo filhote, da cv. Pérola foram submetidas a tratamentos hidrotérmicos em diferentes temperaturas: 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 60°C; durante 10, 20 e 30 minutos. Após os tratamentos procedeu-se à realização de cortes finos, transversais na parte do talo da muda, com gemas axilares, sendo as secções transversais colocadas em placas de Petri contendo 10 ml de solução de tetrazólio, nas concentrações anteriormente mencionadas e incubadas a de 26°C, por período de 3 horas, este procedimento também foi realizado no escuro. Foi determinada a sobrevivência das mudas após os tratamentos térmicos e estimada a concentração do tetrazólio economicamente viável para uso nos experimentos posteriores.

Para a preparação das soluções de tetrazólio, foi utilizada uma solução padrão a 1% (m/v) de 2,3,5-trifenil tetrazólio, com 100 ml de água destilada e um grama do tetrazólio (1 g do reagente para cada ml de água destilada), obtendo-se as concentrações finais (Tabela 1).

Tabela 1. Diferentes concentrações de cloreto 2,3,5-trifenil tetrazólio.

Solução padrão	Água destilada	Concentração final
1 ml de solução 1%	99 ml	0,01%
5 ml de solução 1%	95 ml	0,05%
10 ml de solução 1%	90 ml	0,1%
7,5 ml de solução 1%	92,5 ml	0,075%
50 ml de solução 1%	50 ml	0,5%

4.2 TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DAS MUDAS

Mudas do tipo filhote da cv. Pérola foram distribuídas em grupos de três mudas para cada tratamento hidrotérmico. As mudas foram cortadas em aproximadamente cinco cm de comprimento, lavadas três vezes com água para eliminar resíduos e submetidas aos tratamentos nas temperaturas de 48°C, 50°C e 52°C durante 10, 20, 30 min. Imediatamente após os tempos de tratamento nas diferentes temperaturas as mudas eram mergulhadas em água na temperatura ambiente (22°C) com o objetivo de estabilizar a temperatura interna das mesmas. Um segundo experimento foi realizado com as temperaturas de 54°C, 56°C, 58°C e 60°C, com tempos de 10, 20, 30, 40, e 50 minutos, sendo que para 60°C foram avaliados somente com 10, 20, e 30 minutos. Para o aquecimento da água e monitoramento das temperaturas foi usado um banho maria ultra termostato automatizado, com capacidade para 40 litros de água e temperatura até 60°C, disponível no Laboratório de Biotecnologia aplicado ao Agronegócios da Universidade Federal do Espírito Santo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (temperatura x tempo), com três repetições. Como controle foram usadas as mudas submetidas ao tratamento com água na temperatura ambiente. Após os tratamentos as mudas foram transplantadas em vasos no. 2, com capacidade de 1 kg, com areia e colocadas na casa de vegetação para avaliações posteriores e indexação molecular dos vírus por RT-PCR.

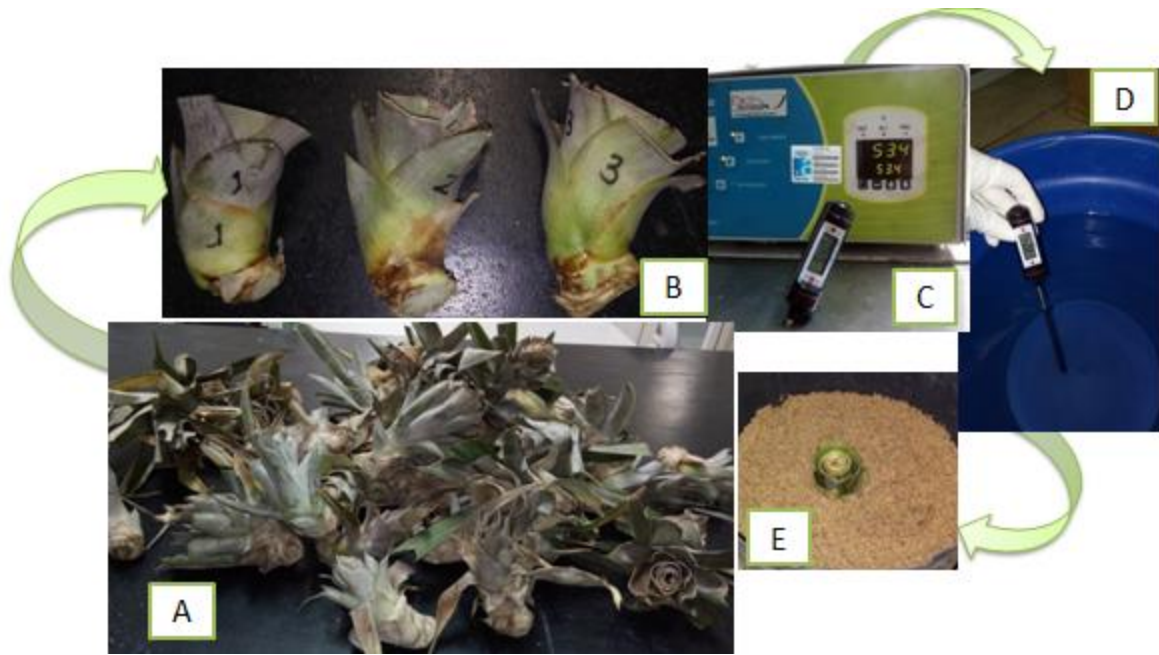


Figura 5. Mudas provenientes do campo cv Pérola infetadas com o PMWaV (A); padronização do corte das mudas-pre tratamento hidrotérmico (B); banho maria e termômetro digital (C); água a temperatura ambiente 22°C (D); muda transplantada em areia após hidrotermoterapia (E).

4.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO TÉRMICO DE ABACAXIZEIROS

Para cada tratamento térmico foi avaliado o peso fresco da folha média de uma muda de abacaxi com área de 1cm². As temperaturas utilizadas foram 54°C, 56°C, 58°C e 60°C, nos tempos de 10, 20, 30 minutos, cada. Para cada tratamento foram realizadas três repetições, além da testemunha (controle), sem tratamento térmico. Para as análises de dados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste de Tukey (P<0,05), com o auxílio do software estatístico SAS (PAES et al., 2011).

4.4 INDEXAÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO POR PCR

4.4.1 Extração e análise dos ácidos nucleicos

Foi realizada a extração de RNA total de folhas e raízes das mudas de abacaxizeiros a partir de aproximadamente 0,1g de tecido aclorofilado (folhas) e 0,1g de tecido radicular. O tecido vegetal foi pulverizado em gral e pistilo (previamente autoclavado por duas vezes), com o auxílio de nitrogênio líquido e mantido a -80°C para posterior extração de RNA total (PERON, 2009; AMORIN, 2016).

O procedimento de extração do RNA total foi realizado por meio do protocolo de Doyle e Doyle (1990), modificado por Peron (2009). Após pulverização, as amostras foram transferidas para um tubo de 2 ml e adicionados 1,0 ml de tampão de extração CTAB (1% CTAB; 1,4 M NaCl; 20mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 1% PVP e 0,1% -mercaptoetanol). A mistura foi submetida à agitação em vórtex alternada com imersão em gelo, por 4 vezes, para garantir a homogeneização sem aquecimento. Em seguida, as amostras foram colocadas na centrífuga (marca Eppendorf®, modelo Centrifuge 5418) a 12.000 rpm (11.269 G) a 4°C por 15 minutos. Após centrifugação, a fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo de 2 ml e adicionaram-se 200 µL de fenol e 100 µL de clorofórmio, depois de misturadas novamente por inversão e seguida de centrifugação, nas mesmas condições citadas acima. Este processo foi repetido por três vezes por 15 minutos, cada vez. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo de 2 ml e foram adicionados 288 µL de clorofórmio e 12 µL de álcool isoamílico, misturado por inversão e seguida de centrifugação nas mesmas condições anteriormente escrita. Esta etapa foi repetida duas vezes. Após, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 ml e foi adicionado 500 µL de etanol absoluto e 50 µL de acetato de sódio 3 M para precipitação por 12 horas, a -20° C. O precipitado foi centrifugado por 50 minutos, por 12.000 rpm (11.269 G), a 4°C.

Foi removido o sobrenadante da amostra e o *pellet* foi lavado com 500µL de etanol 70% e submetido a mais uma etapa de centrifugação por cinco minutos. O *pellet* foi

completamente seco por aproximadamente 40 minutos na câmara de fluxo laminar, seguido de ressuspensão em 30 µL de água ultrapura. A concentração e análise da pureza em números dos extratos de RNA total foram analisados no espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific, Carlsbad, EUA). O equipamento foi ajustado para 260nm para RNA e 280nm para proteínas, sempre confrontando com branco. A razão de 260/280 para análise da qualidade do extrato de RNA foi de 1,8 a 2,0. Os ácidos nucleicos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE1X, a voltagem de 65 mV, por 60 minutos. Para cada amostra foi utilizado 2,5 µL de tampão de corrida e 10 µL de amostra. Foi utilizado marcador de peso molecular de 1kbplus DNA *Ladder*, preparado com 3µL de marcador e 2 µL de tampão de corrida, preparado com azul de bromofenol. O gel foi corado com 50 µL de brometo de etídio, o qual é incorporado nos nucleotídeos e a confirmação foi definida mediante a fluorescência deste reagente na radiação ultravioleta, seguido de foto documentação digitalizada em transluminador L. Pix (Lotus Biotecnologia Molecular Imaging).

4.4.2 Tratamento com DNase

Após a verificação do RNA total em volume e qualidade adequadas, procedeu-se ao tratamento do extrato com DNase. Foi adicionado 1µL de tampão para DNase e 1 µL da enzima DNase I (Thermo Fisher) e o volume completado para 8 µL com água ultra pura. Em seguida, a reação foi incubada durante 30 minutos a uma temperatura de 37°C. Após este tratamento as amostras foram colocadas no gelo e foi adicionado 1µL EDTA por 10 minutos a 65°C para inativar a enzima e evitar que a mesma permaneça ativa durante a etapa de transcrição reversa do RNA em cDNA. Este procedimento foi realizado de acordo com a recomendação do fabricante.

4.4.3 Transcrição reversa

Para cada amostra no tubo contendo RNA tratado com DNase foi adicionado um mix de 1 µL de primer randômico, 1 µL de dNTPs (10 mN) e 5 µL de água ultrapura. Foram incubados a 65°C, por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado para cada

amostra, com 4µL de tampão de reação 5x FS Buffer (Thermo Fisher) e 2 µL de 0,1 M DTT, em suave homogeneização e incubado a 37°C durante 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1µL de enzima M-MLV (Thermo Fisher) e incubado em termociclador com os seguintes parâmetros: 25°C por 10 min, 37°C por 50 min, 70°C por 15 min. Cada procedimento foi realizado de acordo a protocolo da enzima.

4.4.4 Análise por RT-PCR

Este processo ocorreu em tubo de reação de 0,2 µL. Foi preparada uma solução mix que contém 1µL de tampão 10x para a enzima, 0,2µL de dNTPs (10mM), 0,3 de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de primers F (100ng/ µL), 0,5 µL de primers R (100 ng/µL), 1µL de cDNA, 0,2 µL de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e água ultra pura livre de RNase complementando-se para 10 µL na reação final. Seguiu-se o protocolo de acordo com orientação do fabricante e a mistura foi submetida em *Termociclador Mastercycler Personal* (Eppendorf®) com os seguintes parâmetros para as reações PCR convencional: 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C, por 45 segundos, com temperatura de anelamento de 55°C por 30 segundos de acordo com os primers utilizados para PMWaV-2, 72°C por 1 min e concluindo a extensão com 72°C, por 90 segundos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em solução tampão TAE 1x, corados com 25 µL de brometo de etídeo, durante 60 minutos em uma voltagem de 65 mV. O peso molecular foi calculado por comparação com 3µL de marcador 1 kb plus DNA *Ladder* (Promega). Foram aplicadas 10 µL de cada amostra em cada poço e 2µL do tampão de corrida elaborado a base de azul de bromofenol. As imagens foram visualizadas no sistema de captura de imagem L-HE-Pix/L-Pix IMAGE (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

Para a detecção do vírus PMWaV-2 neste estudo, foram utilizados os *primers* representados na (Tabela 2), que anelam na região conservada do genoma e que codifica a proteína de choque térmico Hsp70h (SEETHER et al., 2001; 2004; 2005a; GAMBLEY et al., 2008; PERON, 2009; AMORIN, 2016).

Tabela 2. Primers utilizados na amplificação de sequências de *ampelovirus* para a detecção do complexo viral.

<i>Primes</i>	Seq 5' para 3'	Região do genoma	Direção	Vírus específico
PMW2224	CATACGAACTAGACTCATACG	Hsp70h	Sense	PMWaV-2
PMW2223	CCATCCACCAATTTTACTAC	Hsp70h	Anti sense	PMWaV- 2

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR EM MUDAS SEM TRATAMENTO HIDROTÉRMICO.

O teste do tetrazólio constitui-se de um método rápido, barato e eficiente para a determinação da viabilidade celular em tecidos de abacaxi, confirmando resultados já observados em outras espécies (FLORES et al., 2015).

Foram avaliadas as seguintes relações de concentrações de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio: temperatura, período de incubação e tecido da muda de coroa de abacaxi sem tratamento térmico (Fig 6). Para os tratamentos com diferentes concentrações de solução de tetrazólio (0,01%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,5%, 1%) nas mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola sem termoterapia, ou em temperatura ambiente (26°C), durante 180 minutos e observou-se coloração vermelha significativa em todos os tecidos a partir da concentração de 0,075%. Adicionalmente, é possível identificar uma uniformidade da cor, principalmente no terceiro corte transversal, além da cor natural dos tecidos nas amostras controle (sem tetrazólio), confirmando, assim, a viabilidade desta técnica para a identificação de tecido vivo em abacaxizeiro.

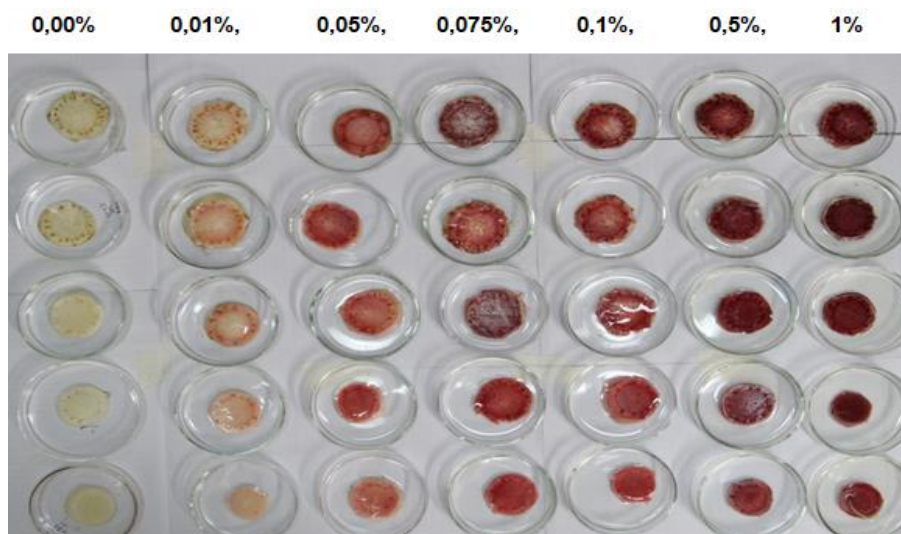


Figura 6. Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola, entre o controle (água) e as diferentes concentrações de Cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio a 0,01%, 0,05%, 0,075%, 0,1%, 0,5%, 1%.

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MUDAS COM TRATAMENTO HIDROTÉRMICO.

Foi observada a viabilidade celular das amostras de tecidos das mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola submetida aos diferentes tratamentos térmicos (48°C, 50°C, 52°C, 54°C, e 60°C), por 10min, 20 min e 30 minutos para cada temperatura (figura 8, 9 e 10). Este procedimento foi realizado com três concentrações de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (0,075%, 0,5% e 1%) detectando a respiração e a morte celular nos tecidos das mudas submetidas aos diferentes tratamentos. Os tratamentos térmicos em consórcio com 0,075% de tetrazólio, sendo possível verificar a sobrevivência dos tecidos às diferentes temperaturas (Figura 7). Porém, no tratamento de 48°C e 50°C a 10, 20 e 30 min, foi observada uma pigmentação avermelhada, diferente da observada para temperaturas mais elevadas. A partir de 52°C até 58°C por 10,20 e 30 minutos, é identificada ainda a formação de trifênilformazan, indicativo para tecido vivo. Já a 60°C, a viabilidade celular se apresentou comprometida a partir de 20 e 30 minutos, dada manutenção da cor natural da planta (FERREIRA et al.; 2001). Para descartar um resultado falso negativo nos tecidos com temperaturas maiores, foram avaliadas outras concentrações de tetrazólio.

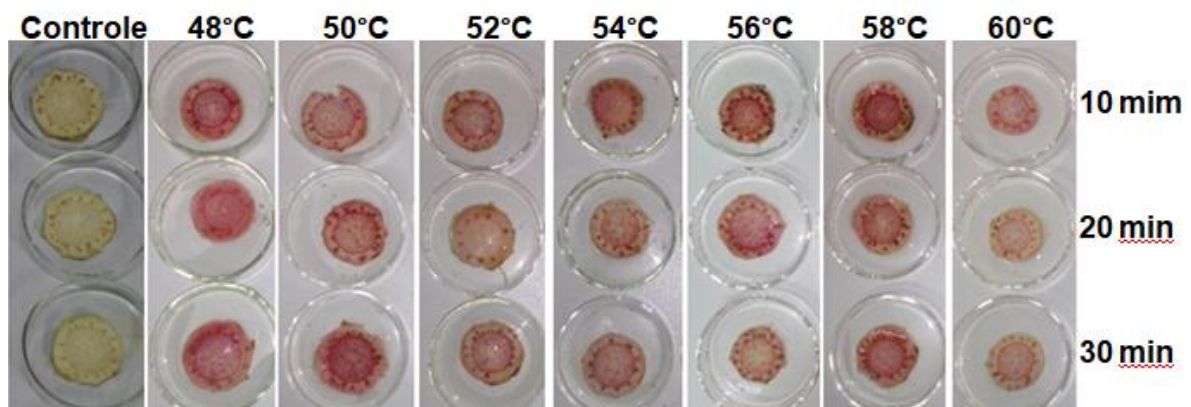


Figura 7. Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola com 0,075% de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.

Os resultados obtidos em concentrações de 0,075% (figura 7), quando comparados com concentração de 0,5% (figura 8), permitiram observar uma melhor difusão do tetrazólio nos tecidos em tratamentos de 48°C até 58°C por 10, 20 e 30 minutos. O pigmento vermelho (trifenilformazan) indica atividade respiratória nas mitocôndrias, diferenciando-se do controle (água) que mantém a cor natural da planta. Com o intuito de testar a sobrevivência da planta a temperaturas maiores, as amostras de tecidos foram submetidas a 60°C por 10, 20 e 30 minutos. Os resultados mostraram que a partir de 30 minutos o tecido foi afetado negativamente, comprometendo assim a viabilidade celular.

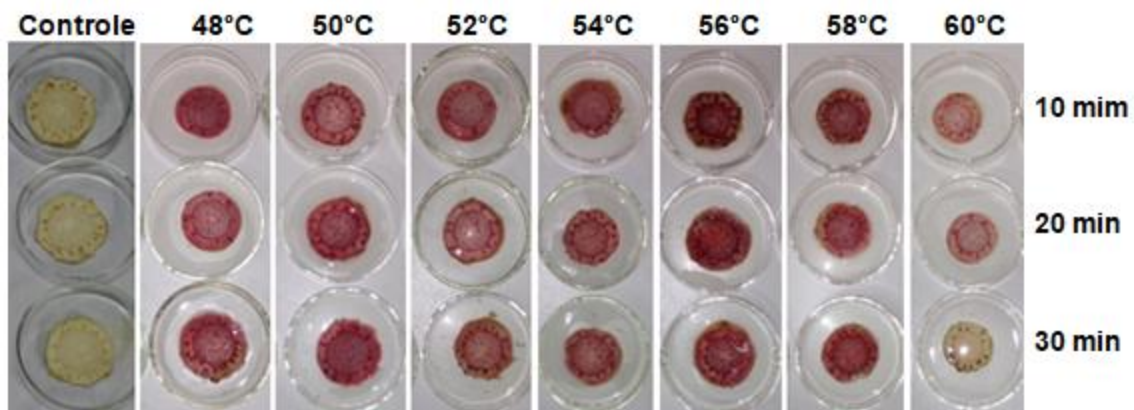


Figura 8 Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas de abacaxi cv. Pérola, com 0,5% de cloreto 2,3,5 trifeniltetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.

Os tecidos das mudas foram expostos a uma última concentração de tetrazólio 1% (Figura 9), com temperaturas de 48°C até 60°C, por 10,20 e 30 minutos. Foi possível a identificação da viabilidade em tecidos de abacaxizeiros a temperaturas de 48°C por 10, 20 e 30 minutos até 58°C 10, 20 e 30 minutos e 60°C por 10 e 20 minutos. A partir de 60°C por 30 minutos a viabilidade celular é afetada. Estes resultados confirmam os resultados obtidos a concentrações de 0,5% de tetrazólio (Figura 8), determinando assim que temperaturas maiores que 60°C por mais de 30 minutos afetam a sobrevivência celular dos tecidos, sendo assim, a sobrevivência e desenvolvimento das plantas de abacaxi cv. Pérola pode ser comprometida com este grau de exposição.

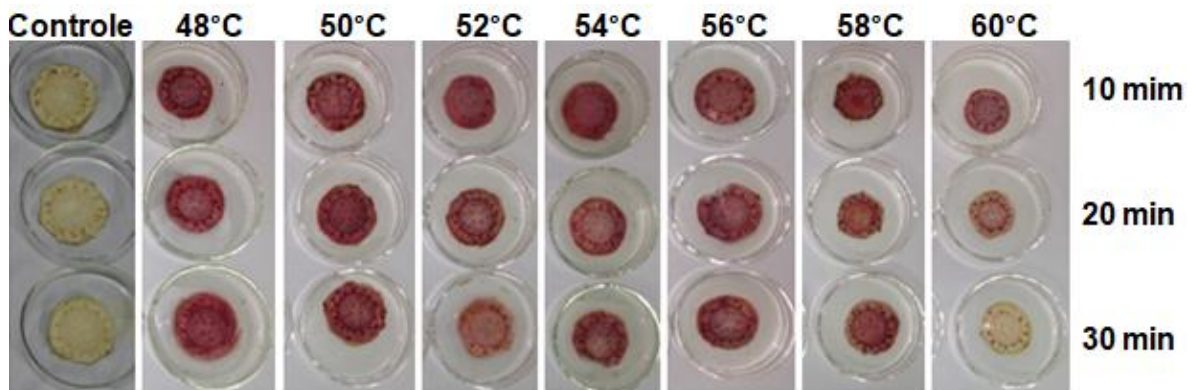


Figura 9. Viabilidade celular em tecidos de mudas de coroas abacaxi cv. Pérola com 1% de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazólio e submetido a tratamento hidrotérmico em diferentes temperaturas nos tempos de 10 min, 20min e 30min para cada tratamento térmico.

5.3 AVALIAÇÕES DO EFEITO HIDROTÉRMICO DE ABACAXIZEIROS

O comportamento de massa fresca em (mg) das folhas das mudas de abacaxizeiros cv. Pérola após exposição ao estresse hidrotérmico (Figura 10). Observou-se no tratamento de 26°C, que o comportamento da massa foliar foi semelhante para todas as repetições. O tratamento de 54°C apresenta menor acúmulo de massa fresca no tempo de 20 minutos e possui menor teor de massa fresca em comparação aos tratamentos controle (26°C), 56°C e 58°C. O tratamento térmico de 56°C apresenta maior acúmulo de massa fresca nos tempos de 10 e 20 minutos, diferentemente da temperatura de 58°C, cujo teor de massa fresca foi superior em 10 e 30 minutos. A 60°C o acúmulo de massa fresca foi menor.

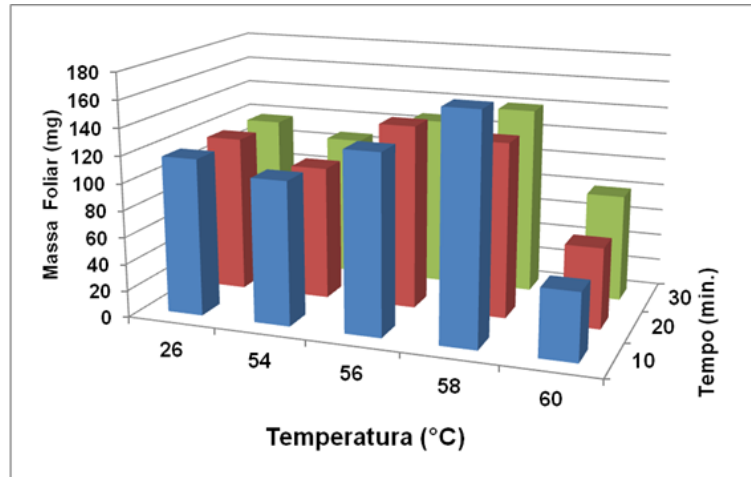


Figura 10. Massa foliar fresca em (mg) obtida de mudas de abacaxi cv. Pérola, submetidas a diferentes temperaturas e três períodos de tratamento hidrotérmico de 10, 20 e 30 minutos.

Além disso, foi avaliado o crescimento foliar de todas as mudas (figura 11), sendo os resultados similares, entre os tratamentos hidrotérmicos e tempos de exposição ao calor (54°C, 56°C, 58°C por 10, 20 e 30 minutos), a exceção de 60°C, na qual a sobrevivência das mudas foi comprometida.



Figura 11. Crescimento foliar das mudas da cv. Pérola, aos 90 dias após tratamento hidrotérmico de 54°C até 60°C por 10, 20 e 30 minutos, mantidas na casa de vegetação.

5.4 INDEXAÇÃO DO MATERIAL PROPAGATIVO POR PCR

Para indexação das mudas de cv. Pérola foram utilizados tecidos de folhas e raízes em diferentes temperatura e tempos (Tabela 3).

Tabela 3. Indexação de folhas e raízes de mudas de abacaxizeiros obtidos de produção convencional após tratamento hidrotérmico a diferentes temperaturas e tempos, por PCR convencional.

Tecido	Temperatura (°C)	Tempos (min)	Avaliação por RT-PCR (d/s) ¹
Folhas	26	0	3/0
	54	30	3/0
		40	3/0
	56	30	3/1
		40	2/0
		50	3/0
	58	30	3/0
	60	10	2/0
		20	3/0
		30	2/0
Raízes	54	30	3/1
	56	30	3/3
	58	30	3/1*

*Redução de uma planta por infecção por *Fusarium guttiforme*

¹d: doente; s: sadia

Para o tecido folhar, foi possível indexar as amostras a temperaturas de 54°C (30 e 40 min), 56°C (30,40 e 50 min), 58°C (30 min) e 60°C (10, 20 e 30 min), além das mudas sem hidrotermoterapia (testemunhas), estas avaliações foram realizadas aos 90 dias após o tratamento hidrotérmico. Para avaliações nos tecidos radiculares, somente foram considerados tratamentos de 54°C (30 min), 56°C (30 min) e 58°C 30 min (Tabela 3). A diferença entre os tratamentos e tempos dos tecidos avaliados é precisamente pela perda de mudas durante o seu crescimento.

Após extrações, procedeu-se a síntese de cDNA, utilizado como molde para os estudos na RT-PCR. Pela técnica molecular de RT-PCR foi possível verificar o *amplicon* de 609pb, que corresponde ao PMWaV-2 (Figura 12). O diagnóstico inicial

foi desenvolvido em folhas das mudas após a hidrotermoterapia para tratamentos de (54°C, 56°C e 58°C, por 30 minutos), com três repetições para cada tratamento.

Este critério foi considerado com base na literatura, que aponta que a eficiência de tratamentos térmicos acima de 50°C, depende da biologia do vírus e da planta, sendo possível inativar partículas virais em tecidos vegetais sem ocasionar danos a esses tecidos. Entretanto, neste estudo, uma observação importante foi que no tratamento a 56°C por 30 minutos, amostra em folha e em raízes, tiveram resultado negativo para a presença do PMWaV-2 (Figura 12). Cabe mencionar que neste estudo, o acompanhamento das plantas foi realizado até três meses após o tratamento térmico.

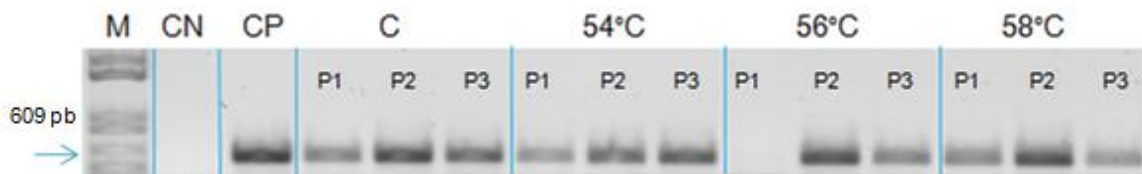


Figura 12. *Amplicon* do primers em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecular 1kb plus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), mudas -testemunhas sem hidrotermoterapia em amostras de folhas (C), tratamentos térmico de 54°C, 56°C e 58°C por 30 min respectivamente em amostras de folhas.

Estes resultados negativos para RT-PCR mostram que o vírus foi suprimido no tecido vegetal, mantendo a sobrevivência das mudas nesta temperatura. Resultados similares foram encontrados por SETHER et al. (2001), explicando que após pré-tratamentos hidrotérmicos e segundos tratamentos em coroas de abacaxi por 58° C, durante 40 minutos, ou temperatura de 56°C durante 60 minutos em banho-maria, contribuíram positivamente para a eliminação da infecção do PMWaV-1 através da propagação de gema apical e lateral, com 92% de sobrevivência das plantas. Embora a termoterapia para limpeza clonal vegetal seja também utilizada com outras técnicas, são comuns relatos de obtenção de mudas livres de patógenos, após o tratamento térmico. Produtores viveiristas de cítricos submetem mudas infectadas com sorose (*Citrus ringspot virus*) em câmara climática com 16 h de luz a 38 °C e 8 h no escuro a 32 °C para a produção de ápices caulinares sadios empregados na microenxertia (CARVALHO; SANTOS; MACHADO, 2002). Por outro lado, estudos desenvolvidos para limpeza com termoterapia demonstraram que o tratamento de mudas por 45 dias, com 16 horas de foto período a 37 °C na luz e 35°C no escuro

foram suficientes para obter plântulas livres de vírus (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ, 2009). A vantagem dessa metodologia, além de ser mais econômica, é que apresenta maior índice de sobrevivência após o tratamento térmico (KRIZAN; ONDRUSKOVÁ, 2009).

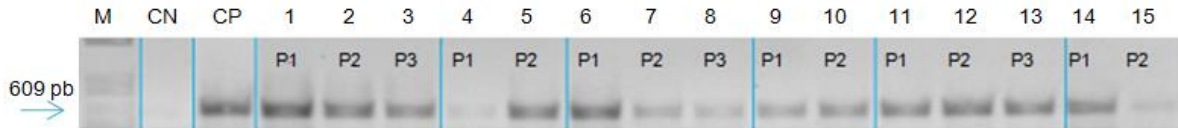


Figura 13. *Amplicon* do primers em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecular 1kbplus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), folhas com 54°C por 40 min (1,2,3); folhas com 56°C por 40 min(4 e 5); folhas com 56°C por 50 minutos (6,7 e 8); folhas com 60°C por 10 min(9 e 10); folhas com 60°C por 20 min (11,12 e13); folhas com 60°C por 30 minutos (14 e15).

As amostras 4 do tratamentos 56°C por 40 minutos e amostra 7 e 8 do tratamento 56°C por 50 minutos apresentaram fragmento amplificado correspondente para o PMWaV-2 (Figura 13). No entanto, o fragmento amplificado após o tratamento hidrotérmico, é significativamente menos intenso quando comparado às plantas controles (sem hidrotermoterapia), o que pode indicar possivelmente uma diminuição na carga viral em mudas tratadas pela termoterapia apesar da limpeza clonal não ter sido totalmente efetiva nestes tecidos.

Na tentativa da confirmação da ausência do PMWaV-2 em toda a muda, uma última avaliação por RT-PCR for realizada nos tecidos radiculares para tratamentos de 54°C, 56°C e 58°C por 30 minutos. A análise da RT-PCR nestas amostras de raízes, das mesmas mudas que foram avaliadas anteriormente em tecido de folhas, foram negativos para presença do PMWaV-2 nas temperaturas de 56°C a 30 min (Figura 14), também em numa amostra de folha com tratamento a 56°C por 30 minutos não foi possível detectar o vírus (Figura 12). Além disso, nos tecidos radiculares, foram negativas também uma amostra para o tratamento de 54°C a 30 minutos e uma amostra de 58°C a 30 minutos (Figura 14).

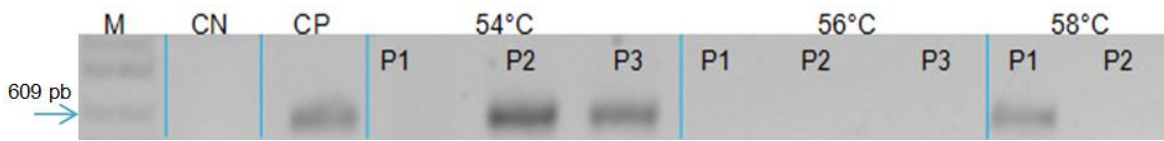


Figura 14. *Amplicon* do primer em 609 pb característico do PMWaV-2. Marcador de peso molecular 1kb plus (M), controle negativo (CN), controle positivo (CP), tratamentos de 54°C, 56°C e 58°C expostos a hidrotermoterapia por 30 minutos.

Os resultados obtidos podem estar relacionados com a movimentação das proteínas virais, já que relatos na literatura descrevem a termoterapia como uma técnica eficiente, dependendo do movimento do vírus. Em alguns casos os efeitos do tratamento térmico sobre a funcionalidade das proteínas de movimento viral são capazes de produzir uma restrição dos tecidos infectados (MINK et al., 1998 apud PANATTONI; LUVISI; TRIOLO, 2013). Isto pode ser explicado já que a termoterapia desencadeia um processo de defesa antiviral natural produzido pela planta infectada, que pode causar um desequilíbrio celular. Considerando que na planta infectada, a síntese e degradação do vírus ocorrem simultaneamente, o tratamento hidrotérmico pode provocar um desequilíbrio no qual em determinadas temperaturas a síntese deste vírus seja mais lenta que sua degradação, resultando na eliminação da infecção viral no tecido tratado.

Hipóteses sobre o efeito da termoterapia narram que a replicação do vírus é inibida em temperaturas subletais para a planta, porém, a atividade metabólica do vírus é destruída em temperaturas acima de 40°C, no entanto a planta hospedeira consegue-se recuperar (NYLAND; GOHEEN, 1969). Por outro lado, alguns autores consideram que ocorre uma redução da movimentação das partículas virais na planta infectada. Existem estudos sobre a degradação de RNA viral em células foliares e pontas de brotos de várias espécies em crescimento ativo durante o tratamento térmico. Entretanto, pesquisadores avaliam a hipótese de que a termoterapia altera a translocação do vírus, diminuindo a infecção das brotações desenvolvidas durante o tratamento por meio do silenciamento de RNA, afetando a relação planta-vírus (PANATTONI; TRIOLO, 2010; VIEIRA et al., 2015).

Para evidenciar a boa qualidade da presença de ácidos nucléicos nas amostras negativas para RT-PCR, observa-se o gel de agarose para as amostras, verificando

a integridade do RNA ribossomal da planta (Apêndice A) e determinado o seu grau de pureza (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV para determinar o grau de pureza de RNA total.

Absorbância de onda de luz UV	Grau de pureza (Amostras)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
(A260/A280)	2,01	2,00	2,00	1,94	1,93	1,90	1,74	1,74

Considerando a boa qualidade de extrato de RNA total (Apêndice A) e a quantificação do grau de pureza da amostra, demonstra-se a confiabilidade nos resultados obtidos pelo RT-PCR.

Esses resultados divergentes na concentração de vírus das mudas após o tratamento, como foi já mencionado anteriormente, podem estar relacionados ao grau de infecção das plantas hospedeiras (carga viral), bem como à temperatura utilizada e o tempo de tratamento em exposição ao calor. Assim, para garantir o número maior de matrizes sadias, é preciso considerar os tratamentos de hidrotermoterapia eficientes em tecidos de folhas e raízes a 56°C, por 30 minutos, obtidos neste trabalho para posterior validação da técnica. Além disso, outras temperaturas de 54°C e 58°C por 30 minutos podem ser alternativas para gerar um maior número de plantas sadias, já que foi possível obter ao menos uma planta sadia para estes tratamentos em tecido radiculares. É sugerido validar esta tecnologia efetuando uma nova indexação das mudas de abacaxi cv. Pérola para confirmar a efetiva limpeza clonal dessas plantas, monitorar a manifestação de sintomas e efetuar RT-PCR quantitativa (RT-PCR em tempo real) para quantificarmos a presença do vírus. Desta forma será possível promover a erradicação do PMWaV-2 por um método simples e econômico, sem uso de mão de obra especializada, visando a aplicação desta técnica no campo, fornecendo um controle eficiente do vírus, e com fácil acesso aos produtores. Também possibilita conhecimento para melhor entender o manejo da doença.

6 CONCLUSÕES

A viabilidade celular nos tecidos de abacaxizeiro pode ser determinada com cloreto trifenil tetrazólio na concentração de 0,075%, em tecidos sem hidrotermoterapia. Já em tecidos com tratamento hidrotérmico, a melhor concentração para detectar viabilidade celular foi de 0,5%.

Foi possível obter mudas viáveis com temperaturas de 54 °C a 58 °C, por até 50 minutos e de 60°C por até 30 minutos. Após esta última temperatura, a sobrevivência das mudas reduziu drasticamente.

O aumento na taxa do crescimento das mudas foi favorecido quando submetidos a tratamento hidrotérmico de 56°C e 58°C.

Este trabalho comprova a efetividade do uso de hidrotermoterapia (56°C por 30 minutos) para obtenção de mudas do tipo filhote, de abacaxizeiros cv. Pérola, livres do PMWaV-2.

Os resultados apoiam a implementação de procedimentos para certificação de plantas matrizes de abacaxi para produção de mudas livres do vírus como estratégia de manejo integrado da doença e reduzir o impacto econômico da doença no País.

REFERÊNCIAS

- AMORÍN, W.A. **Desenvolvimento de um método para o diagnóstico do complexo do *Pineapple mealybug wilt-associated virus***. 2016. 104f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2016.
- AGRANOVSKY, A.A. Closteroviruses: molecular biology, evolution and interactions with cells. In: GAUR, R.K. et al. (Eds.). **Plant viruses: evolution and management**. Singapore: Springer, 2016. Cap.14, p.233-236.
- BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. **The pineapple: botany, production, and uses**. Wallingford: CABI, 2003. 301p.
- BEZERRA, A.D.S. et al. Produção de mudas de acerola (*Malpighia marginata*) pelo método de enxertia em topo por garfagem em fenda cheia. **Agroecossistemas**, Belém, v. 9, n. 1, p.251-260, 2017.
- CABRAL, J.R.S. **Cultivares de abacaxi. Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas (BA), 1999 20p.
- CARTER, W. Review: ants and pineapple mealybug wilt. The pineapple Mealybug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology**, St Paul, v. 23, p.207-242, 1933.
- CARVALHO, S.A.; SANTOS, F.A.; MACHADO, M.A. Eliminação de vírus do complexo sorose dos citros por microenxertia associada a termoterapia. **Fitopatologia Brasileira**, Cordeirópolis, v.27, p.306-308, 2002.
- COSTA, C.J.; DOS SANTOS, C.P. Teste de Tetrazólio em sementes de *Leucaena*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 32, n. 2, p. 66-72, 2010.
- COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Manejo Integrado das doenças do Morangueiro. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: produção integrada; fruteiras tropicais; doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 2003. p.131-185.
- CUNHA, M.C.L.; GOMES, I.H.R. Viabilidade de sementes de *Erythrina velutina* Willd pelo teste de tetrazólio. **Nativa**, Cuibá, v. 3, n. 3, p.196-200, 2015.
- CHELLAPPAN, P. et al. Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants. **Plant Physiology**. Washington, v.138, p.1828–1841. 2005
- DELOUCHE, J.C. et al. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976.

DEY, K.K. et al. Analysis of Pineapple mealybug wilt associated Virus -1 and -2 for Potential RNA silencing suppressors and pathogenicity factors. **Viruses**, Warwick, v. 7, n. 3, p. 969-995, 2015.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

FAJARDO, T.V.M.; NICKEL, O. **Técnicas de Detecção e Estudo de Vírus em Plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. 8p. (Comunicado Técnico 179).

FERRÃO, L.M.V. et al. **Consolidação das estatísticas agropecuárias de 2015-2016 e previsão da produção agrícola para 2017**. Vitória: INCAPER, 2017. 12p. (INCAPER. Boletim técnico, n. 9).

FERREIRA, R.A. et al. Morfologia da semente e de plântulas e avaliação da viabilidade da semente de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth. – fabaceae pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 108-115, 2001.

FLORES, M.F. et al. Criteria for implementation of a tetrazolium test in canola seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 4, p.222-227, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: agricultural statistic database. Disponível em: <<http://fao.org/faostat/es/#data/QC>>. Acesso em: 10 out. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: agricultural statistic data base. Disponível em: <<http://fao.org/faostat/es/#data/QC>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

GAMBLEY, C.F. et al. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australasian Plant Pathol.**, Clayton, v. 37, n. 2, p. 95–105, 2008.

GALLELLI, A.; PILOTTI, T.M.; LORETI, S. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. **Plant Pathol.**, Oxford, v. 63, p. 264–276, 2014.

GEARD, I. D. The role of therapy in the control of plant diseases. **J. Australian Inst. Agr. Sci**, Melbourne, v. 24, p. 312-18, 1958.

GUIDONI S. et al. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera*). *Am J Enol Viticult*, Davis, v.48, p.438-442, 1997.

GRONDEAU, C.; SAMSON, R.; SANDS, D.C.A. Review of Thermotherapy to Free Plant Materials from Pathogens, Especially Seeds from Bacteria. **Critical Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v. 13, n.1, p.57-75, 1994.

GOMES, J.A. et al. **Recomendações técnicas para a cultura do abacaxizeiro**. Vitória: INCAPER, n. 122, p. 27. 2003.

GUNASINGHE, U.B.; GERMAN, T.L. Purification and partial characterization of a virus from pineapple. **Phytopathol.**, St. Paul, v.79, n.12, p.1337-1341, 1989.

HERNÁNDEZ, L. et al. First report of *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* infecting pineapple in Cuba. **New Disease Reports**, v. 22, p. 18, 2010.

HERNANDEZ, L. et al. Geographic distribution of mealybug wilt disease of pineapple and genetic diversity of viruses infecting pineapple in Cuba. **Crop protection**, Guildford, v. 65, p. 43-50, 2014.

HU, J.S.; SETHER, D.M.; ULLMAN, D.E. Detection of pineapple *closterovirus* in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. **Plant Pathol.**, Oxford. v.45, n.5, p.829-836, 1996.

HU, J.S. et al. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of Pineapple *Closterovirus* in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v.81, n.10, p.1150-1154, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático de produção agrícola-LSPA**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em 10 de setembro, 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola-LSPA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em 10 de dezembro. 2017.

ITO, K. Additional immunological evidence supporting the vírus nature of mealybugswilt. **Pineapple Res. Inst. News**, [S.l.], v.10. p.158-162, 1962.

JANH, G.C.; BEARDSLEY, J.W.; HERNÁNDEZ, H. A Review of the association of ants with Mealybug wilt disease of pineapple. **Proc. Haw. Entomol. Soc**, Honolulu, v.36, p.9-28, 2003.

JÚNIOR, M.T.S. Fruteiras Transgênicas: Potencial e Perspectivas. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado: fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa: UFV, 2002. p.83-104.

KRIZAN, B.; ONDRUŠIKOVÁ, E. Thermotherapy of apricot cultivars. In: **I International Symposium on Biotechnology of Fruit Species: BIOTECHFRUIT**, Dresden, n. 839, p.269-274, 2008.

LASSOIS, L. et al. Thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 994, p.419-433, 2013.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA: PESQUISA MENSAL DE PREVISÃO E ACOMPANHAMENTO DAS SAFRAS AGRÍCOLAS NO ANO CIVIL. Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 1-81, 2017.

MANNINI, F.; ARGAMANTE, N.; CREDI, R. Improvements in the quality of grapevine 'Nebbiolo' clones obtained by sanitation. In: Strategies to Optimize Wine Grape Quality, Acta Hort. 427, p. 319-324, 1996. Disponível em: https://www.actahort.org/books/427/427_37.htm. Acesso em: 20 setembro, 2017.

MARIANTE, A.S.; SAMPAIO, M.J.A.; INGLIS, M.C.V. **Informe nacional sobre a situação dos recursos fitogenéticos para alimentação e agricultura do Brasil**. Brasília: Embrapa/MAPA, 2008.155p.

MATOS, A.P. **Produção Integrada de fruteiras tropicais**. Cruz das Almas (Ba): Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2012. 374p.

MARTELLI, G.P. et al. The family *Closteroviridae* revised. **Virology Division News**, [S.l.],v.147. n.10, p.2039-2044, 2002.

MELZER, M.J. et al. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. **J. Gen. Virol.**, London, v.82, n.1, p.1-7. 2001.

MELZER, M.J. et al. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Arch. Virol.**, New York, v.153, n.4, p.707-714, 2008.

NETO, F.J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p. (Doc. n.116).

NICKEL, O.; FAJARDO, T.V.M. **Eliminação de vírus latentes de macieiras por quimioterapia e cultivo de meristemas *in vitro***. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016. 9p. (Comunicado Técnico 193).

NYLAND, G.; GOHEEN, A.C. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. **Ann. Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, v. 7, n.1, p. 331-354, 1969.

NWUGO, C.C. et al. Proteomics analysis reveals novel host molecular mechanisms associated with thermotherapy of 'Ca. Liberibacter asiaticus'-infected citrus plants. **BMC Plant Biology**, London, v.16, n.1, p.10-15, 2016.

PAES, A. T. et al. Por dentro da estatística. **Rev. Einstein**, São Paulo, v.9, p.125-7, 2011.

PANATTONI, A.; TRIOLO, E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 125, n.1, p. 63-67, 2010.

PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Span. J. Agric. Res.**, Madrid, v.11, n.1, p.173-188, 2013.

PERON, F.N. **Diagnóstico molecular e imunoenzimático de Pineapple Mealybug Wilt-Associated Vírus (PMWaV) em diferentes** Genótipos de Abacaxizeiro. 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

PERON, F.N.; FERNANDES, P.M.B.; VENTURA, J.A. Detecção de PMWAV-1 e PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. **Trop. Plant Pathol.**, Brasília, v. 34, Supl., p. 268, 2010.

PEREIRA, P.G. Atividade respiratória de meristemas apicais de ramos Plagiotrópicos e enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* (bertol.) kuntze. **Ciênc. Florest.**, Santa Maria, v.26, n.1, p.203-211, 2016.

PRICE, P.; MILLAN, T.J. Use of the Tetrazolium Assay in Measuring the Response of Human Tumor Cells to Ionizing Radiation. **Cancer res.**, Baltimore, v.50, p.1392-1396, 1990.

PY, C.; LACOEUILHE, J.J.; TEISSON, C. **L'ananas: sa culture, ses produits.** 526, 1984.

RODRIGUES, A.P.M.D.S. et al. Tetrazolium test for evaluation of the physiological quality of seeds of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v. 46. n.3. p.638–644, 2015.

SALDANA, H.L.; LARA, O.M. Thermoherapy and tissue culture for elimination of Potato Virus X (PVX) in Mexican potato cultivars resistant to late blight. **Am Potato J.**, Orono (Me), v.61 n.12, p.735-739, 1984.

SANCHES, N. F. **Manejo integrado da cochonilha do abacaxi.** Cruz das Almas (Ba): EMBRAPA CNPMF; EMBRAPA-CNPMF, 2005. (Abacaxi em foco, n.35).

SANCHES, N. F. Monitoramento da Murcha do abacaxizeiro associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* em áreas de Sistema de Produção Integrada na região de Itaberaba-Bahía ciclo 2011. Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, 2011.

SETHER D.M. et al. Genome organization and phylogenetic analysis of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family *Closteroviridae* members. **Virus Genes**, Norwell, v.38, n.3, p.414-420. 2009.

SETHER D.M. et al. Diversity and mealybug transmissibility of amplexiviruses in pineapple. **Plant Disease**, St. Paul, v.89, n.5, p.450-456, 2005.

SETHER, D.M.; HU, J.S. Yield impact and spread of Pineapple mealybug wilt associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Disease**, St. Paul, v.86, n.8, p.867–874, 2002.

SETHER, D.M. et al. Differentiation, distribution and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, n.8, p.856-864, 2001.a

SETHER, D.M. et al. Molecular diversity of pineapple mealybug wilt associated *closteroviruses* in pineapple. **Phytopathol.**, St. Paul, v.94, p.1031, 2004.

SETHER, D.M., MELZER, M.J.; HU, J.S. Pineapple mealybug wilt associated viruses 1, 3, and 4, and Grapevine leafroll associated viruses 4, 5, 6, and 9 are a distinct group in the genus *Ampelovirus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF VIROLOGY, 13, East Rochester, 2005. **Anais...** Washington: American Society for Microbiology, 2005.p.121-122.

SINGH, S.; SASTRY, K.S.M. Wilt of pineapple – a new virus disease in India. **Indian Phytopathol.**, New Delhi, v. 27, p.298-303, 1974.

SUBERE, C.V.Q. et al. Detection and Absolute Quantification of *Pineapple Mealybug Wilt- Associated Virus-2* in Pineapple Using Real-Time RT-PCR (TaqMan®) Assays. In: INTERNATIONAL PINEAPPLE SYMPOSIUM, 7., Kuala Lumpur, 2011 **Acta Hort.** 902, n. 902, p. 349-355, July, 2011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/283314898_Detection_and_absolute_quantification_of_pineapple_mealybug_wilt-associated_virus-2_in_pineapple_using_real-time_RT-PCR_TaqManR_assays. Acesso em: 10 de setembro, 2017.

SZITTYA, G.R.; et al. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. **The EMBO Journal**. London, v.22.n.3, p.633-640, 2003.

TUSSELL, R.T. et al. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR Convencional. In: **Protocolos para la detección molecular de Fitopatógenos y Organismos Genéticamente Modificados**. Mérida: sn, 2009. Cap. 2, p. 21-44.

ULLMAN, D.E. et al. Effect of heat treatment on a closteroviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.8, p.1991.

ULLMAN, D.E. et al. Heat treatment of pineapple: Subsequent growth and occurrence of mealybug wilt of pineapple. **I International Pineapple Symposium**, n. 334, p.407-410, 1993.

VENTURA, J.A.; GOES, J.A. Doenças do abacaxi. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A.M.; FILHO, A.B.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino (MG), 2016. p. 9-10.

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle Integrado de Viroses de Fruteiras Tropicais. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado fruteiras tropicais: doenças e pragas**. Viçosa (MG): UFV, 2002. p.155-184.

- VENTURA, J.A. Propagação do abacaxizeiro por divisão do talo. In: RUGGIERO, C. et al. (Org.). **Controle Integrado da Fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p.35-41.
- VENTURA, J.A.; COSTA, H. Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: abacaxi, banana e mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa-MG: UFV, 2002. p.279-352.
- VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa: UFV, 2002. p.445-487.
- VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. 1994. Propagação por biotecnologia: micropropagação in vitro do abacaxizeiro. In: RUGGIERO, C. (Org.). **Controle integrado da fusariose do abacaxizeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 43-50.
- VIEIRA, L. et al. Efficient elimination of vírus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. **Acta physiol. Plant.**, Warszawa, n. 37, p.1733, 2015.
- VIRALZONE. Ampelovirus. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/286?outline=all_by_species. Acesso em: 25 de dezembro 2017.
- WANG, Q. et al. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. **Mol. Plant. Pathol.**, Helsinki, v. 9, n.2, p.237–250, 2008.
- WASWA, M.; KAKUHENZIRE, R.; SSEMAKULA, M.O. Effect of thermotherapy duration, virus type and cultivar interactions on elimination of potato viruses X and S in infected seed stocks. **African Journal of Plant Science**, Lagos, v. 11, n.3, p.61-70, 2017.
- ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Mecanismos gerais de atuação dos nutrientes sobre a severidade de doenças de plantas. In: ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.; ZANÃO-JR, L. (Org.). **Efeito da nutrição mineral no controle de doenças de plantas**. Viçosa (MG), 2012. p.25-46.
- ZAMBOLIM, E.M.; ZAMBOLIM, L. Controle Integrado de Viroses de Fruteiras Tropicais. In: ZAMBOLIM, L. (Org.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa (MG): UFV, 2002. p.155-178.
- ZERBINI, F. M.; CARVALHO, M.G.; ZAMBOLIM, E. M. Métodos diagnósticos de viroses vegetais. In: ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI JR., F. M.; CARVALHO, M. G. (Org.). **Introdução à virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2002. Cap. 10, p.114-134.
- ZORZAL, T. A. et al. Teste do tetrazólio para estimativa da viabilidade de sementes. *Natureza on line*, v. 13, n.3, p. 144-149, 2015.

APÊNDICES

Apêndice A: Gel de extração de tecidos radiculares que evidencia a presença íntegra de ácidos nucléicos na banda referente ao rRNA 28S e 18S da planta. Marcador (M), amostra de raízes com 54°C 30 min (1,2 e 3) amostras de raízes com 56°C por 30 min (4,5 e 6), tratamentos de 58°C por 30 min (amostras 7 e 8).

