

CULTIVO DE MERISTEMAS APICAIS DE PLANTAS IN VITRO PARA LIMPEZA VIRAL EM ABACAXI

Fernanda Vidigal Duarte Souza¹; Eduardo Andrade Chumbinho¹; Davi Theodoro Junghans¹
Elder Lima Carvalho², Keila Cidreira dos Santos,³

¹ Pesquisadores Doutores da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Caixa postal 007 – Cruz das Almas – BA; CEP: 44380-000; e-mail: fernanda@cnpmf.embrapa.br; eandrade@cnpmf.embrapa.br; davi@cnpmf.embrapa.br; ² Assistente de Pesquisa da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical – e-mail: elder@cnpmf.embrapa.br; ³ Estudante biomedicina -FAMAM.

INTRODUÇÃO

O abacaxi é uma das frutas tropicais mais apreciadas em todo mundo. O Brasil, como um dos centros de origem e diversidade genética da espécie, tem se destacado no melhoramento genético e na conservação de germoplasma desta importante fruteira (Cabral et al., 2004).

Dentre as doenças de maior impacto na abacaxicultura brasileira destaca-se a fusariose, para a qual várias ações estão sendo desenvolvidas, incluindo o lançamento de híbridos resistentes. O programa de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF) já lançou os abacaxis Imperial, Vitória e Ajubá, com excelentes características organolépticas, alta produtividade e resistentes à fusariose (Cabral e Matos, 2005; Ventura et al., 2007; Cabral e Matos, 2008).

Por outro lado, a murcha do abacaxizeiro, causada por um complexo viral (*Pineapple mealybug wilt associated virus*, PMWaV 1-3), transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Sether et al., 2005), é uma doença que tem ocasionado grandes perdas econômicas nas principais regiões produtoras do Brasil e do mundo

Além dos danos diretos no vigor e produção da planta, os danos indiretos são preocupantes, pois em alguns casos as plantas contaminadas não apresentam sintomas, que só se manifestam quando a planta infectada pelo vírus também é colonizada pela cochonilha vetora (Sether et al., 2002), dificultando a seleção de mudas no campo para o plantio. Outro agravante, são as mudas produzidas em biofábricas que não são certificadas, e por não apresentarem sintomas, poderão estar introduzindo o vírus em áreas produtoras ainda indenas. O diagnóstico simultâneo deste complexo viral já foi desenvolvido no CNPMPF, permitindo, dessa forma a indexação de materiais elite oriundos do programa de melhoramento genético (Andrade et al., 2010).

Para instalação de novas áreas de plantio, tradicionalmente se utiliza de mudas propagadas vegetativamente (filhotes ou rebentões), o que torna essa virose ainda mais significativa. Um dos agravantes é a presença de algumas cepas do vírus, sem os sintomas

reconhecidos, o que pode ampliar sua disseminação em grandes cultivos comerciais, onde as mudas são originadas, prioritariamente de biofábricas e não são certificadas.

Entretanto, uma vez identificada a presença do vírus é necessário o desenvolvimento de uma estratégia de remoção e limpeza, considerando principalmente a questão do estabelecimento de matrizeiros para a produção de mudas certificadas.

O cultivo de meristema e a termoterapia são estratégias usadas para limpeza de vírus em diversas espécies. Em abacaxi, no entanto, ensaios realizados no Hawaii a partir do cultivo *in vitro* e da termoterapia de gemas axilares, mostraram que o uso de temperaturas elevadas não foi eficiente e o cultivo de gemas axilares obteve um resultado discreto e diretamente ligado ao tamanho do explante utilizado (Sether et al., 2001).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia que possa garantir a limpeza do vírus da murcha do abacaxizeiro a partir de meristemas apicais excisados de plantas *in vitro*, como uma nova estratégia a ser avaliada.

MATERIAL E MÉTODOS

Como material vegetal foram usadas plantas do híbrido Ajubá cultivadas em telado e previamente indexadas, onde se comprovou a presença do vírus. O método de indexação utilizado foi o desenvolvido por Andrade et al. (2010). As plantas com xxxx de idade foram identificadas, com cada gema axilar identificada individualmente. As gemas a partir do terço superior do talo foram removidas, desinfestadas e introduzidas em tubos de ensaio, individualmente em meio de cultura MS sem qualquer regulador de crescimento (Souza et al., 2009). Numa primeira etapa do processo, as gemas foram introduzidas com aproximadamente 5 a 7 mm, com retirada do máximo de tecido ao redor da mesma e incubadas em câmara de crescimento com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 1$; intensidade de fluxo de fótons de $22 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Numa segunda etapa do processo, as plantas únicas oriundas destas gemas foram levadas para a cabine de fluxo laminar e, com auxílio de um microscópio estereoscópio, foi realizada a excisão do meristema apical com aproximadamente 1 mm, que foi em seguida cultivado em meio MS + 0,5 mg de BAP/L, 30 g de sacarose/L, e 2,0 g/l de Phytigel.. As condições de incubação foram as mesmas da etapa anterior. Após o desenvolvimento dos meristemas e obtenção de planta inteira, foi realizada nova indexação, pelo seguinte critério: foi utilizado como controle, um lote de plantas oriundas da primeira etapa, ou seja, plantas que foram introduzidas (ou obtidas ?!) *in vitro*, mas não passaram pela segunda etapa de retirada de meristema reduzido.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As gemas introduzidas na primeira etapa levaram aproximadamente 60 dias para se desenvolver, o que inclui o intumescimento e o desenvolvimento da planta. Entretanto, se optou que a planta atingisse um maior tamanho, para permitir maior êxito na retirada do meristema apical, por ser um procedimento extremamente delicado, uma vez que se utilizou em uma planta monocotiledônea *in vitro*. Não existem, até o momento, registros desse procedimento em plantas *in vitro* de abacaxi, até pela dificuldade que apresenta o uso de seu meristema apical em plantas *in vivo*.

Extremamente aquoso e difícil de ser identificado, além da facilidade e bons resultados obtidos com as gemas axilares de talos ou coroas, o uso de meristemas apicais em abacaxi é pouco expressivo e praticamente não é usado, ainda que Albuquerque et al. (2000), tenham utilizado esse tipo de explante para limpar plantas infectadas por *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, agente causal da fusariose.

O desenvolvimento das plantas nesta segunda etapa foi extremamente lento, em decorrência, principalmente, ao tamanho do meristema. Esse comportamento é também observado em outras espécies cujo cultivo de meristema é usado para limpeza clonal e onde o tamanho do explante é decisivo para o êxito do trabalho. Em morango, a metodologia descrita por Biswas et al. (2007) relata que o meristema deve estar entre 0,3 e 0,5 mm para que a remoção do vírus seja obtida. Em mandioca, o meristema deve conter o domo meristemático acompanhado de dois primórdios foliares apenas, o que determina um meristema em torno de 0,2 a 0,3 mm (Souza et al., 2009). Em banana, outra monocotiledônea, o tamanho adequado, está em torno de 1 mm.

O resultado com as plantas da primeira etapa apenas, mostrou que a simples passagem pela cultura de tecidos não foi suficiente para remover o vírus, como mostraram os resultados da posterior indexação. Do lote de seis plantas controle (plantas da primeira etapa) 100% seguiam com a presença do vírus.

Das plantas que foram cultivadas nas duas etapas, obteve-se 50% de recuperação, resultado considerado muito interessante, visto que não se utilizou nenhum tipo de termoterapia ou estratégia acessória. Como uma planta adulta de abacaxi pode ter aproximadamente 20 gemas possíveis de serem introduzidas *in vitro*, ao considerar os terços médio e superior, a recuperação de 10 plantas garante matrizes que podem ser usadas para micropropagação de plantas efetivamente saudas.

A passagem de uma planta pela cultura de tecidos pode melhorar muito seu desempenho no campo, com aumento da produtividade pela sanidade e padronização do material plantado. Entretanto, apenas esse procedimento não pode garantir a limpeza do clone, se este está infectado por vírus.

Novos lotes de plantas estão sendo avaliados a fim de validar a metodologia proposta.

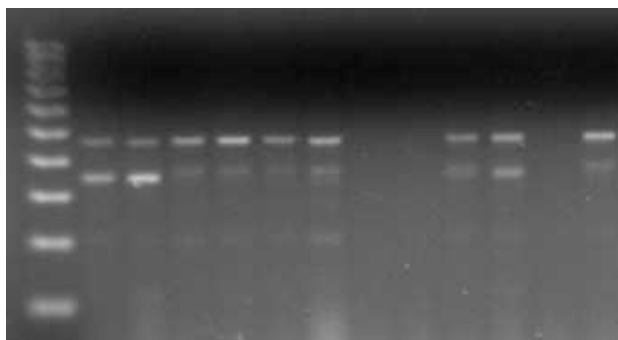


Figura 1: Indexação das mudas de abacaxi *in vitro* quanto ao PMWaV por RT-PCR. Foram testados dois lotes de mudas, o primeiro formado de mudas oriundas de gemas laterais retiradas de plantas infectadas (linhas 1 a 6) e o segundo formado de mudas oriundas de meristemas apicais de aproximadamente 1mm excisados de mudas *in vitro* (linhas 7 -12). M, marcador de peso molecular 100pb

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, C.C.; Camara, T.R.; Menezes, M.; Willadino, L.; Meunier, I.; Cláudia Ulisses, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose, **Sciencia Agrícola**, Piracicaba. V.57, n.2, p.363-366, 2000.

Biswas, M.K.; Hossain, M.; Islam, H. Virus free plantlets production of strawberry through meristem culture. **World Journal of Agricultural Sciences**, n.3, v.6. p757-763, 2007.

CABRAL, J. R. S.; FERREIRA, F. R.; MATOS, A. P.; SANCHES, N. F. **Banco ativo de germoplasma de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura**. Cruz das Almas. Embrapa – CNPMF, 2004. 30p. (Documentos, 80).

Cabral, J.R.S., Matos, A.P. BRS Ajubá, nova cultivar de abacaxi. Comunicado Técnico 126. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 4p. 2008.

Cabral, J.R.S., Matos, A.P. Imperial, Nova Cultivar de Abacaxi. Comunicado Técnico 114. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 4p. 2005.

Ventura, J.A., Costa, H., Cabral, J.R.S., Matos, A.P. 'Vitória': New Pineapple Cultivar Resistant to Fusariosis. *Acta Horticulturae*, 822:51-55. 2007.

Sether, D.M., Karasev, A.V., Okumura, C., Arakawa, C., Zee, F., Kislán, M.M., Busto, J.L. and Hu, J.S. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different Pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. *Plant Dis.* 85:856-864.

Sether, D. M.; Hu, J. S. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, n.9, p.928-935, 2002.

Sether, D. M.; Melzer, M. J.; Busto, J.; Zee; F.; Hu, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Disease**, v. 89, p. 450-456, 2005