

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Obtenção de *Phalaenopsis* livres de vírus a partir de plantas matrizes infectadas

Renato Brogia Ferreira

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema
Orientador: Dr. Marcelo Eiras
Co-orientador: Dr. Giulio Cesare Stancato

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Ferreira, Renato Brogia.

Obtenção de *Phalaenopsis* livres de vírus a partir de plantas matrizes infectadas.
/ Renato Brogia Ferreira. – São Paulo, 2015.
67 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Marcelo Eiras.

Versão do título para o inglês: Obtention of virus-free *Phalaenopsis* from intected stock plants.

1. Cultivo in vitro 2. *Cymbidium mosaic virus* 3. *Odontoglossum ringspot virus*
4. Orquídea 5. Ribavirin I. Ferreira, Renato Brogia II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibl./2015/013



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252

CEP 04014-002 - São Paulo - SP

secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Renato Brogia Ferreira

Título: Obtenção de *Phalaenopsis* livres de vírus a partir de plantas matrizes infectadas

Orientador: Marcelo Eiras

Co-orientador: Giúlio Cesare Stancato

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em: 02/06/2015

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Marcelo Eiras

*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Lee Tseng Sheng Gerald

*Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Ligia Maria Lembo Duarte

*Instituição: Instituto Biológico

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Professor Dr. Marcelo Eiras e ao Co-orientador Dr. Giúlio Cesare Stacanto, pela oportunidade de desenvolvimento do experimento, orientações e verdadeiras aulas em suas respectivas áreas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico pelos ensinamentos.

Aos colegas, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Fitovirologia: Maria Amélia Vaz Alexandre, Ligia Maria Lembo Duarte, Alexandre Levi Rodrigues Chaves, Addolorata Colariccio Trevisan, Alyne de Fátima Ramos, Leilane Karam Rodrigues, Danielle Gobatto e Daniel Lima; pela convivência, apoio e participações diretas ou indiretas durante a realização deste trabalho, além do excelente convívio.

Um agradecimento especial à Leilane Karam Rodrigues pela paciência e ajuda na realização das análises iniciais.

Aos membros da banca: Ligia Maria Lembo Duarte, Lee Tseng Sheng Gerald, Daniela de Argollo Marques e Ricardo Harakava pela leitura criteriosa e correções, que contribuíram para o incremento da qualidade deste trabalho.

A todos do Laboratório de Floricultura do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio da Horticultura: Giúlio Cesare Stancato, Luiz Antonio Ferraz Matthes, Anésio Maria dos Santos e Victor Morandi, pela convivência e auxílio direto ou indireto na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, Titular do Departamento de Nematologia e Fitopatologia da ESALQ/USP pelos *primers* utilizados neste trabalho.

Ao Professor Dr. Ricardo Harakava pela colaboração no sequenciamento das amostras.

Ao Professor Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, professor do Departamento de Biotecnologia e Produção Animal e Vegetal do CCA/UFSCAR pela formulação dos meios de cultura e protocolo de micropropagação utilizados neste trabalho.

A todos da empresa Vivaflora pelo apoio e matrizes, em especial a Mauricio Kievitsbosch pela gentileza e auxílio.

A todos da Instituição Religiosa *Perfecty Liberty* por permitirem a realização deste trabalho em seu Instituto Botânico, em especial a Mario Sakuragi pelo auxílio durante o cultivo no laboratório.

A sra. Ana Rita Stenico, gerente do mercado de flores do CEASA-Campinas, pela oportunidade de realizar as entrevistas.

Aos amigos da República Boia Fria pela amizade, apoio e momentos de lazer durante todo o mestrado.

À minha família pelo apoio incondicional e ajuda para realização deste projeto, em especial aos meus pais Elaine Aparecida Brogia e Marcos Antônio Ferreira.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Prefiro as máquinas que servem para não funcionar:
quando cheias de areia de formiga e musgo –
elas podem um dia milagrar flores.”

(Manoel de Barros)

FERREIRA, R.B. **OBTENÇÃO DE PHALAENOPSIS LIVRES DE VÍRUS A PARTIR DE PLANTAS MATRIZES INFECTADAS.** São Paulo, SP. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

Desde a década de 1990, no Brasil, houve um incremento significativo da produção de orquídeas do gênero *Phalaenopsis*, atingindo mais de 450.000 vasos produzidos e comercializados anualmente, somente no Estado de São Paulo. *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Potexvirus*, e *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Tobamovirus*, são os principais vírus responsáveis por danos que causam a depreciação dessa espécie. Em infecções simples ou mistas, induzem perda de vigor das plantas, quebra de coloração das flores e manchas cloróticas e necróticas nas folhas. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de mudas de *Phalaenopsis* spp. livres de vírus, utilizando-se o antiviral ribavirin associado ao cultivo *in vitro* de matrizes coinfectedas em micropropagação por morfogênese direta, com as gemas da haste floral como explante. Foram instalados dois ensaios denominados (A) e (B). No primeiro ensaio foram utilizadas plantas matrizes (cultivar indeterminada) obtidas por meio de semeadura, enquanto no segundo empregou-se uma cultivar clonada. Utilizou-se a concentração de 40 ppm de ribavirin no ensaio (A), e 0, 10, 30 e 50 ppm de ribavirin para o ensaio (B). Em ambos os ensaios foram empregados explantes a partir de matrizes coinfectedas pelos dois vírus, confirmado por DAS-ELISA. As taxas de multiplicação das plântulas dos tratamentos foram avaliadas por teste de Tukey, atestando que o antiviral, até a concentração utilizada, não foi prejudicial ao cultivo. Foram feitas três amostragens, com intervalo de 90 dias entre a primeira e segunda e de 50 dias entre as duas últimas, obtendo-se 5,56% de limpeza para ORSV e 44,44% para CymMV, e de 38,89% para ambos os vírus no ensaio (A), e 24,45% de limpeza somente para CymMV no ensaio (B). O antiviral foi eficiente nas concentrações de 30, 40 e 50 ppm, porém a confirmação por RT-PCR de 27 plântulas ELISA-negativas demonstrou que algumas delas ainda permaneciam infectadas. Não se regeneraram plântulas livres de vírus espontaneamente, ou seja, sem acréscimo de ribavirin. Quando as plântulas foram mantidas em concentrações maiores, 50, 75 e 100 ppm, por 45 dias, não houve desinfecção. Apesar de não terem sido obtidas plantas limpas, ou seja, livres dos dois vírus, foi possível obter plantas livres de um ou outro vírus. Os resultados negativos obtidos em DAS-ELISA, porém positivos em RT-PCR, ao final do experimento, indicam que, provavelmente, houve uma diminuição do título viral devido à quimioterapia.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, Orquídea, ribavirin

FERREIRA, R.B. **OBTENTION OF VIRUS-FREE *PHALAENOPSIS* FROM INFECTED STOCK PLANTS.** São Paulo, SP. 2015. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

Orchids are important ornamental plants in national and international markets. Since the 1990s, in Brazil, there has been an increase in the production of orchids of *Phalaenopsis* genus, with more than 450.000 vases produced and commercialized yearly, only in São Paulo State. *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Potexvirus*, and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Tobamovirus*, are the most important viruses responsible for depreciation in this species. In simple or mixed infections, both induce loss of vigor, flower colour-break and chlorotic and necrotic spots in leaves. The objective of this work was to obtain virus-free *Phalalenopsis* plantlets, using ribavirin associated with tissue culture of coinfecting stock plants by direct morphogenesis, using floral stem buds as explants. Two assays were conducted and named (A) and (B). On the first, the stock plants were of an indetermined cultivar obtained by seedlings; a cloned cultivar was used in the second one. 40 ppm of ribavirin was used in the first assay (A) and 0,10, 30 and 50 ppm were used in the assay (B). The explants used in both assays were obtained from coinfecting stock plants, confirmed by DAS-ELISA. The antiviral was not harmful to the culture in these concentrations, as confirmed by Tukey's test of the multiplication rate of plantlets. Three samplings were made, with 90 days between the first two and 50 days between the second and last one. The rate for ORSV-Free plantlets were 5,56%, 44,44% for CymMV-Free and 38,78% for both in assay (A), while in assay (B) 24,45% of CymMV-Free plantlets were obtained. These results were obtained using concentrations of 30, 40 and 50 ppm of the antiviral. However, some plantlets (ELISA-negative) were still infected when RT-PCR was performed in 27 samples. By the methodology adopted here, no virus-free plantlet was found without addition of ribavirin. When plantlets were subcultured in higher concentrations of 50, 75 and 100 ppm, for 45 days, there were no ELISA-negative plantlets. Although virus-free plantlets has not been detected by RT-PCR, it was possible to obtains CymMV-Free or ORSV-Free. Probably, the negative results in DAS-ELISA, but positive in RT-PCR, point to a reduction of virus titre due to chemotherapy.

Key-Words: *In vitro* culture, *Cymbidium Mosaic vírus*, *Odontoglossum Ringspot virus*, orchid, ribavirin.

Índice de tabelas

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Principais vírus descritos em orquídeas, espécies hospedeiras e os países em que foram relatados..... | 11 |
| Tabela 2 - Uso de ribavirin no controle de vírus de plantas associado à cultura de tecidos | 24 |
| Tabela 3 - Respostas do questionário que avaliou o nível de conhecimento dos produtores de orquídeas no Estado de São Paulo, sobre a ocorrência, detecção e medidas profiláticas no controle de fitoviroses. | 41 |
| Tabela 4 - Resultados da indexação por meio de DAS-ELISA para os ensaios (A) e (B) visando identificar matrizes coinfetadas por ORSV e CymMV | 42 |
| Tabela 5 – Número de plântulas obtidas ao final do experimento em ambos os ensaios e taxa de multiplicação entre repetições..... | 47 |
| Tabela 6 – Resultado do teste de Tukey aplicado às taxas de multiplicação de ambos os ensaios | 47 |
| Tabela 7 – Indexação por DAS-ELISA de plântulas e suas brotações após 100 dias de cultivo in vitro, visando detectar a regeneração de plantas limpas na ausência de antiviral | 48 |
| Tabela 8 – Indexação de 14 plântulas com 80 dias de cultivo ao final de 45 dias sob ação de 50, 75 e 100 ppm de ribavirin | 49 |
| Tabela 9 – Primeira amostragem do Ensaio (A) após 360 dias de cultivo in vitro, 300 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 54 |
| Tabela 10 - Primeira amostragem do Ensaio (B) após 240 dias de cultivo in vitro, 200 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 55 |
| Tabela 11 – Segunda amostragem do Ensaio (A) após 450 dias de cultivo in vitro, 410 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 56 |
| Tabela 12 - Segunda amostragem do Ensaio (B) após 330 dias de cultivo in vitro, 290 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 56 |
| Tabela 13 - Terceira amostragem do Ensaio (A) após 490 dias de cultivo in vitro, 450 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 57 |
| Tabela 14 - Terceira amostragem do Ensaio (B) após 380 dias de cultivo in vitro, 340 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV) | 57 |
| Tabela 15 - Resultados da indexação DAS-ELISA, em nm, para as amostras que tiveram confirmação por RT-PCR na segunda amostragem | 60 |
| Tabela 16 - Resultados da indexação DAS-ELISA, em nm, para as amostras que tiveram confirmação por RT-PCR na terceira amostragem | 61 |

Índice de figuras

- Figura 1** - Divisão do gênero *Phalaenopsis* grosseiramente em dois grupos: (1) um com hastes menores, flores alongadas e cerosas com cores mais vibrantes e um segundo grupo (2 e 3) com hastes longas, atingindo um metro de comprimento, flores arredondadas e predominantemente róseas (2) ou brancas (3). 6
- Figura 2** - À esquerda a molécula de ribavirin (1- [(2R,3R,4S,5 R) -3,4-dihydroxy-5- (hydroxymethyl) oxolan-2-yl]-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) um antiviral análogo do nucleosídeo guanosina à direita. 22
- Figura 3** - À esquerda, flores da matriz de *Phalaenopsis* cultivada sendo à direita, no Ensaio (A) e à esquerda, cultivar 44611, no ensaio (B). 27
- Figura 4** - (1) Haste floral com aproximadamente 30 dias de desenvolvimento e ao longo da haste podem ser observadas as gemas, que foram utilizadas como explantes em ambos os ensaios (A e B). (2) Em destaque (círculo vermelho), gema da haste floral ainda coberta pela bráctea. 27
- Figura 5** - Ordem cronológica das amostragens e da terapia com antiviral do ensaio (A), em dias. ... 28
- Figura 6** - Ordem cronológica das amostragens e da terapia com antiviral do ensaio (B), em dias. ... 29
- Figura 7**- Sequência para a obtenção de plântulas: (1) Haste floral possuindo entre 4-5 nós para o cultivo in vitro; (2) secção da haste floral composta por nó e entre-nó; (3) posição da gema no explante; (4) Após 20 dias em sala de crescimento, vendo-se em destaque um nó; (5) Novas brotações subcultivadas individualizadas, na posição horizontal, sob quimioterapia com ribavirin; (6) Após 40 dias de subcultivo, as brotações se desenvolvendo em plântulas - fim da fase de estabelecimento (Imagens adaptadas de TANAKA e SAKANISHI, 1978). 34
- Figura 8** - (1) Plântula única obtida ao final do estabelecimento; (2) Após subcultivo e 20 dias em sala de crescimento, ela desenvolve brotações laterais ou imersas no meio; (3) Divisão grosseira das brotações em pequenas e grandes durante o subcultivo; (4) Após mais 20 dias em sala de cultivo, há formação de novas brotações; (5) Novo subcultivo e divisão das plântulas por tamanho, os subcultivos são realizados até que haja plântulas em tamanho ideal para iniciar enraizamento. 35
- Figura 9** - (1) Após a multiplicação, plântulas com tamanho foliar próximo à 3 cm iniciam o enraizamento in vitro; (2) Plântulas selecionadas são subcultivadas em meio de enraizamento, as demais prosseguem em multiplicação; (3) É feito subcultivo aos 45 dias em meio de multiplicação, sendo possível observar o desenvolvimento do sistema radicular; (4) Com mais 45 dias de cultivo, o sistema radicular está plenamente formado e a orquídea está pronta para ser aclimatizada 36
- Figura 10** - Mapa do Estado de São Paulo. Em vermelho estão os municípios de Artur Nogueira, Arujá, Atibaia, Holambra, Ibiúna, Mogi das Cruzes e São José dos Campos; correspondentes aos produtores entrevistados. Em Amarelo está Campinas onde é localizado o CEASA. Ao todo foram entrevistados 10 produtores. 40
- Figura 11** - (1) Haste de *Phalaenopsis* contendo 4 gemas, em destaque nos círculos vermelhos; (2) Seções de haste, em torno de 5 cm, antes de serem levadas ao fluxo laminar; (3) Frascos contendo em torno de 15 seções de haste em solução desinfetante (50ml/L de dióxido de cloro); (4) Haste após inoculação em tubo de ensaio de base reta, a gema está em destaque no círculo vermelho; após ser mantida por 20 dias em sala de crescimento apresentará crescimento reprodutivo. 45
- Figura 12** - (1) Hastes apresentando crescimento reprodutivo após 20 dias em sala de crescimento; (2) Hastes com 20 dias de crescimento dispostas em placas de Petri; (3) Brotações das hastes segmentadas; (4) Brotações individualizadas dispostas horizontalmente em frascos; (5) Após 20 dias de crescimento, é perceptível a formação de folíolos; (6) Multiplicação das brotações originais, após mais 20 dias em sala de crescimento; 45
- Figura 13** - (1) Plântulas de *Phalaenopsis* após 100 dias em estágio de multiplicação; (2) Plântulas e brotações indexadas visando identificar plantas limpas na ausência de antiviral; (3) Brotações após o subcultivo separadas por tamanho, frasco com brotações pequenas a esquerda e grandes a direita. 50
- Figura 14** - De (1)→(2): Seleção de plântulas com folhas de aproximadamente 3 cm para início do enraizamento in vitro; de (1) →(3): Plântulas não aptas para iniciar o enraizamento in vitro prosseguem em meio de estabelecimento e multiplicação; de (2) →(4): Após 45 dias em sala de crescimento é perceptível o alongamento foliar, porém as raízes necessitam de um subcultivo e

- outros 45 dias em sala de crescimento (4)→(5) Após 90 dias totais de enraizamento in vitro, e com sistema radicular plenamente formado as plântulas estão aptas a iniciar a aclimatização; 52
- Figura 15** – Plântulas no início da etapa de aclimatização em (1A e 1B) apresentando sistema radicular com 2 a 4 raízes e área foliar de até 5 cm; (2) Plântulas em bandeja subdivididas em células, indicada para a etapa de aclimatização, mostrando o sistema radicular envolto em esfagno. 53
- Figura 16** – (1) Resultado do DAS-ELISA, em nm, obtido por diluição seriada do extrato, leituras inferiores a 0.200 nm foram consideradas negativas, simulando as quantidades iniciais de material vegetal em contraste com a leitura obtida; (2) Resultado da diluição seriada do RNA total extraído, simulando as quantidades iniciais de material vegetal, após reação de RT-PCR; visualização das bandas em gel de ágarose (0,75%) sob luz ultravioleta. 59
- Figura 17** – Resultado das amplificações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 681 bp, obtidos com primers específico para o CymMV, a partir de RNA total extraído de 11 amostras, inicialmente consideradas negativas para o CymMV em DAS-ELISA. Os fragmentos de tamanho esperado podem ser observados nas amostras 16, I-1 e I-8; estando os controles positivo e negativo identificados por (+) e (-). 60
- Figura 18** – Resultado das amplificações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 218 bp, obtidos com primers específico para o ORSV, a partir de RNA total extraído de 6 amostras, inicialmente consideradas negativas para o ORSV em DAS-ELISA. Os fragmentos de tamanho esperado podem ser observados nas amostras 11, 12, 13, 14 e 15; estando os controles positivo e negativo identificados por (+) e (-). 61
- Figura 19** - Resultado das amplificações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 681 bp, obtidos com primers específico para o CymMV, a partir de RNA total extraído de 16 amostras, inicialmente consideradas negativas para o CymMV em DAS-ELISA. Nenhuma amostra obteve resultado negativo. 62

APÊNDICES

| | |
|---|-----------|
| Apêndice A - Questionário apresentado aos produtores do Estado de São Paulo que comercializam no CEASA/Campinas, junto com fotos dos principais sintomas causados por ORSV e CymMV | 80 |
| Apêndice B - Fotos dos principais sintomas causados por infecção mista por ORSV e CymMV em <i>Phalaenopsis</i> | 81 |
| Apêndice C - Sintomas encontrados em visitas à unidades de produção de <i>Phalaenopsis</i> | 84 |
| Apêndice D - Sintomas de infecção por <i>Erwinia</i> spp | 85 |
| Apêndice E - Componentes minerais e orgânicos dos meios de cultura utilizados | 86 |
| Apêndice F - Resultados do sequenciamento de CymMV e ORSV | 87 |
| Apêndice G - Resultados da indexação para seleção de matrizes | 88 |
| Apêndice H - Resultados da indexação das três amostragens por DAS-ELISA..... | 90 |

Sumário

| | |
|--|-------------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | viii |
| Índice de tabelas | ix |
| Índice de figuras | x |
| Apêndices | xii |
| Introdução | 1 |
| 1 - Revisão Bibliográfica | 3 |
| 1.1 - Orquídeas..... | 3 |
| 1.1.1 – Classificação botânica..... | 3 |
| 1.1.2- Aspectos econômicos e importância das orquídeas no comércio nacional e internacional de ornamentais..... | 4 |
| 1.2 - Vírus de orquídeas..... | 7 |
| 1.2.1 - Informações gerais..... | 7 |
| 1.2.2 – Indexação..... | 12 |
| 1.2.3 - Métodos de controle..... | 16 |
| 1.3 - Aplicação de antivirais em plantas..... | 20 |
| 1.4 - Ribavirin e seu uso em cultura de tecidos..... | 22 |
| 2– Objetivos | 25 |
| 3 - Material e métodos | 26 |
| 3.1 – Avaliação do nível de informação sobre as viroses e seu controle, de produtores paulistas de <i>Phalaenopsis</i> , por meio de questionário..... | 26 |
| 3.2 – Indexação de matrizes e avaliação da limpeza viral..... | 26 |
| 3.3 - DAS-ELISA..... | 29 |
| 3.4 – Caracterização de isolados de ORSV e CymMV..... | 30 |
| 3.4.1 – Extração de RNA..... | 30 |
| 3.4.2 - RT-PCR..... | 31 |
| 3.4.3 – Eletroforese em gel de agarose..... | 31 |
| 3.4.4 - Sequenciamento..... | 31 |
| 3.5 - Cultivo <i>in vitro</i> | 32 |
| 3.5.1- Meios de cultura..... | 32 |
| 3.5.2 – Fase de Estabelecimento e início da quimioterapia..... | 32 |
| 3.5.3 – Multiplicação..... | 34 |
| 3.3.4 - Enraizamento <i>in vitro</i> | 36 |
| 4 - Resultados e discussão | 38 |
| 4.1 - Avaliação do nível de informação sobre as viroses e seu controle, de produtores paulistas de <i>Phalaenopsis</i> , por meio de questionário..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 - Indexação de matrizes..... | 42 |
| 4.3 - Caracterização de isolados de ORSV e CymMV | 43 |
| 4.4 - Cultivo <i>in vitro</i> | 43 |
| 4.4.1 – Estabelecimento | 43 |
| 4.4.2 - Multiplicação | 46 |
| 4.4.3 – Enraizamento <i>in vitro</i> | 51 |
| 4.4.4 – Aclimatização..... | 53 |
| 4.5 - Avaliação da limpeza viral..... | 54 |
| 5 – Conclusões | 66 |
| 6 - Referências Bibliográficas..... | 67 |

Introdução

Orchidaceae é a maior família botânica, com aproximadamente 25.000 espécies em 850 gêneros, sendo tradicionalmente cultivadas como flores ornamentais. Gêneros como *Cymbidium*, *Vanda*, *Cattleya*, *Oncidium* e *Phalaenopsis*, entre outros, despertam enorme apreço entre orquidófilos e produtores. Cada gênero possui diversas cultivares, existindo flores nas mais variadas formas, tamanhos e cores. Também são cultivados híbridos intergenéricos com relativa facilidade, elevando-se o número de cultivares (COZZOLINO; WIDMER, 2005).

Phalaenopsis é, atualmente, um dos gêneros de maior destaque no comércio mundial, sendo originário do sudeste asiático. Entre os fatores de seu sucesso comercial destacam-se a boa resposta à indução floral, durabilidade de suas flores e diversidade de cores e tamanhos, com enorme aceitação nos mais exigentes mercados consumidores da Europa, Ásia e Américas. Nos dias atuais ocorre um intenso intercâmbio (formal e informal) de espécimes entre mercados produtores e consumidores de países desenvolvidos, principalmente Holanda e Japão. Além disso, é comum que as mudas de *Phalaenopsis* sejam produzidas em países asiáticos como China e Tailândia e, posteriormente, sejam enviadas para áreas de produção em outros países (JUNQUEIRA; PEETZ 2011).

Há uma série de pragas e doenças que acometem as orquídeas, incluindo o gênero *Phalaenopsis*, porém, há dois vírus que podem ser considerados os principais patógenos responsáveis por danos que levam à depreciação da qualidade e causam significativas perdas econômicas: *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), pertencente ao gênero *Potexvirus*, família *Alphaflexiviridae*, e *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), gênero *Tobamovirus*, família *Virgaviridae*. Apesar dos sintomas induzidos por esses vírus variarem em função da idade, estado nutricional e da cultivar, geralmente as plantas apresentam manchas cloróticas ou necróticas nas folhas, alteração na coloração das flores, deformação de pétalas e/ou sépalas, inibição no desenvolvimento da planta e menor número de flores por haste floral. CymMV e ORSV não possuem vetores conhecidos, sendo que a falta de assepsia, a má esterilização de ferramentas, a manutenção de plantas infectadas dentro de estufas de produção, a reutilização do substrato e/ou do vaso sem a devida esterilização ou descontaminação, são os principais modos de disseminação (ALEXANDRE *et al.*, 2012).

Por não existirem métodos de controle curativo dessas viroses, recomenda-se o descarte das plantas infectadas, o que inevitavelmente acarretará em prejuízo ao

produtor. Inclusive, certas cultivares, chegam a ter sua produção interrompida por não haver matrizes livres de vírus para o início da produção.

Existem algumas técnicas utilizadas para contornar essa questão, como por exemplo, a termoterapia, cultivo de meristemas apicais e quimioterapia. As orquídeas são sensíveis ao emprego da termoterapia e, ORSV e CymMV apresentam resistência a tal método. O cultivo do meristema apical é utilizado em outros gêneros de orquídeas, sendo *Cymbidium* o exemplo mais comum (MOREL, 1960). Porém essa metodologia não possui amplo uso em *Phalaenopsis*, provavelmente por apresentar meristema frágil e de difícil extração.

Os antivirais de uso comum em fitovirologia são caracterizados como nucleosídeos, moléculas similares às bases de RNA ou DNA. Prioriza-se o uso daqueles que sejam solúveis em água, não fitotóxicos na concentração utilizada e inócuos à flora, fauna e ao homem (JUERGEN HANSEN; STACE-SMITH, 1989). Outro fator importante é a eficiência contra mais de um vírus, por tornar a produção economicamente mais viável. É comum uma espécie vegetal ser hospedeira de diferentes vírus, sendo normal ocorrerem infecções múltiplas.

No presente trabalho utilizou-se o antiviral ribavirin, que além de apresentar as características citadas, tem apresentado eficiência comprovada contra o ORSV e CymMV (FREITAS-ÁSTUA, 1996; PORTER; KUEHNLE, 1997). O antiviral foi adicionado ao meio de cultura antes da esterilização.

Tendo em vista os fatos expostos, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de controle do CymMV e ORSV em cultivos *in vitro* de *Phalaenopsis*, pela adição do antiviral ribavirin (produto comercial - Virazole) ao meio de cultura, durante a propagação *in vitro*, visando à produção de mudas livres de vírus a partir de plantas matrizes infectadas. Esta metodologia tem sido adotada para outros gêneros de orquídeas com sucesso, sendo que este trabalho corresponde à primeira avaliação do emprego de quimioterapia com ribavirin para orquídeas do gênero *Phalaenopsis*.

1 - Revisão Bibliográfica

1.1 - Orquídeas

1.1.1 – Classificação botânica

Orchidaceae, ordem Asparagales, é a maior família do reino vegetal (APG, 2009), com mais de 25.000 espécies distribuídas em 850 gêneros, constituindo aproximadamente 10% das Angiospermas no mundo (ROBERTS; DIXON, 2008). Esse elevado número de espécies está distribuído por todo o globo; excetuando-se locais extremos, como os polos e grandes altitudes. O centro de origem provavelmente é a região da Malásia que possui cerca de 12.000 espécies, seguida da região tropical das Américas, com aproximadamente 10.000 espécies (ENGELMANN; HAMACHER, 2008). Por apresentar tal número de espécies e gêneros fica difícil encontrar uma característica em comum para toda a família (RODRIGUES, 2011).

Aspectos normalmente utilizados para classificar orquídeas estão relacionados à presença de flores hermafroditas (por vezes unissexuais, sendo então dimorfas, como por exemplo, *Catasetum spp.*), trímeras, com três sépalas e três pétalas, sendo normalmente uma dela oposta ao estame fértil, e modificada para constituir o labelo. O androceu, normalmente constituído de um único estame, forma uma estrutura protetora que se desprende no momento da retirada de pólen. Este, por sua vez, é unido por 2, 4, 6 ou 8 polínias. O ovário é ínfero e os frutos capsulares e secos, raramente carnosos. São plantas preferencialmente alógamas, reproduzindo-se por reprodução cruzada; pois a disposição das partes florais dificulta a autofecundação. Após serem polinizadas dão origem a cápsulas contendo centenas de milhares de sementes, com tamanho inferior a 1 mm, constituídas basicamente por um embrião rudimentar sem presença de endosperma (DRESSLER, 1981).

Apesar das características gerais citadas, existem diversas exceções na família. Quanto ao hábito de crescimento, as orquídeas podem ser terrestres, litofíticas e epífitas; sendo que, em torno de 73% das orquídeas conhecidas são classificadas como epífitas (DRESSLER, 1981). O número de espécies citado desconsidera os milhares de híbridos existentes. Em Orchidaceae, de modo geral, ocorrem cruzamentos intergenéricos e interespecies com relativa facilidade, ocasionando inúmeras possibilidades na obtenção de novas cultivares (COZZOLINO; WIDMER, 2005).

Muitas flores em Orchidaceae sofreram coevolução com seus polinizadores, existindo grande especificidade entre as partes. Esse processo evolutivo singular deu origem a uma enorme diversidade de flores na família, com grande variedade de cores,

formas e tamanho (VAN DER PIJL; DODSON, 1969). Quando polinizada, a flor produz uma cápsula deiscente que, após amadurecer por período que varia de 3 a 6 meses, abre-se e tem as sementes dispersas pelo vento (RODRIGUES, 2011). A enorme variedade de espécies somada à grande quantidade de híbridos justifica o interesse comercial e sucesso das orquídeas como plantas ornamentais em todo o mundo.

Com poucas exceções, como por exemplo, a *Vanilla* spp., empregada como especiaria na culinária, as orquídeas cultivadas são, em sua grande maioria, destinadas ao comércio como plantas ornamentais, quer seja como flores de corte e/ou vaso. A maior diversidade de espécies de orquídeas está concentrada nos trópicos, sendo que somente no Brasil ocorrem cerca de 2.000 espécies, com excelente potencial para o desenvolvimento de híbridos e novas cultivares (BARROS *et al.*, 2010). Entre os gêneros brasileiros existem alguns tradicionalmente há muito cultivados, por exemplo: *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia* e *Oncidium* (SILVA, 1986), entre outros.

1.1.2- Aspectos econômicos e importância das orquídeas no comércio nacional e internacional de ornamentais

As orquídeas têm destaque no mercado internacional de flores e plantas ornamentais, possuindo alto valor agregado e com mercado bem estabelecido em diversos países. Estima-se que o comércio dessas ornamentais movimentou US\$ 11 bilhões em 1985, passando para 24 bilhões em 1990, 30 bilhões em 1996 e aproximadamente 60 bilhões em 2003 (VAN UFFLEN; DE GROOT, 2003). Elas participam do mercado de flores de corte e vaso, também possuindo forte presença no comércio de mudas. O Brasil importa quantidade expressiva de mudas, principalmente da Holanda, Japão e Tailândia equivalendo a 15,66% do total de mudas comercializadas no País, entre janeiro e maio de 2011. Um crescimento de 67,43% quando comparado ao mesmo período de 2010 (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011).

No mercado de flores e plantas ornamentais, as orquídeas têm grande importância e destaque. É praticamente impossível dimensionar o número de cultivares e espécies cultivadas no País, tendo em vista que as empresas especializadas em micropropagação desenvolvem constantemente um elevado número de cultivares, havendo constante renovação em seus catálogos. Segundo dados do IBRAFLORE (2013), excetuando-se o gênero *Phalaenopsis*, são comercializados pelo Veiling-Holambra entre 100.000 e 200.000 vasos de orquídeas/mês, sendo que as orquídeas ainda participam do mercado de flores de corte.

1.1.3 – O sucesso do gênero *Phalaenopsis*: comércio, produção e propagação

Somente o gênero *Phalaenopsis* ultrapassa o restante das orquídeas somadas, com vendas médias em torno de 400.000 a 450.000 vasos de flores/mês (IBRAFLOR, 2013). A produção excepcional dessa flor deve-se à fácil indução floral, permitindo que os agricultores programem a produção. Isso é de extrema importância para um mercado que é sazonal e está ligado às datas festivas e comemorativas (CHONE, 2005).

Quando se considera o total de vendas de orquídeas no Brasil e no mundo, observa-se que o gênero de maior destaque é o *Phalaenopsis*. Somente na Holanda, maior país em comércio de flores, foram comercializados 18 milhões de vasos em 2003, com faturamento em torno de €\$ 82,4 milhões. No mesmo período, os EUA e o Japão comercializaram 15,6 e 28 milhões de vasos, respectivamente. Ainda em 2003, Taiwan produziu 36 milhões de vasos; exportando 33% de sua produção, enquanto que a Tailândia produziu 35 milhões de vasos (LAWS, 2004). Os maiores mercados importadores são a União Europeia, os EUA e o Japão; nesse país asiático, as orquídeas são preferência nacional e plantas do gênero *Phalaenopsis* chegam a representar cerca de 30% do total de orquídeas comercializadas (LAWS, 2004).

No Brasil, cultivares deste gênero de orquídea foram recentemente introduzidas e o aumento na produção está sendo decorrente do aumento na procura, concomitantemente ao aumento no mercado externo (LAWS, 2004). Contudo, a produção está voltada ao mercado interno, seguindo essa tendência de alta. A partir de 2000, o cultivo de *Phalaenopsis* se destacou e ocupa parcelas cada vez mais significativas do mercado. O faturamento através do Veiling-Holambra aumentou consideravelmente no começo dos anos 2000, saltando de 216.654 vasos, em 2001, para 486.00 em 2003. Com isso, houve um aumento no faturamento da ordem de R\$ 4,9 milhões (CHONE, 2005). Comparando os meses de dezembro de 2012 com 2013, o aumento em número de vasos foi de 40,8%, alcançando 455.451 unidades (IBRAFLOR, 2014).

O gênero *Phalaenopsis* foi batizado pelo botânico holandês Carl Blume, em 1825 (CHRISTENSON, 2001), fazendo referência a um grande grupo de mariposas originalmente descrito por Linnaeus, "Phalaena", o que leva a suposição do nome estar relacionado ao formato das flores, similar à aparência desses insetos voando, sendo comum referir-se a elas como orquídeas mariposa, em inglês "moth orchids". O gênero é composto por 66 espécies, sendo que todas apresentam metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), são epífitas e monopodiais, apresentando folhas carnosas (MOHR; SHOPFER, 1995). Com fins comerciais, é possível dividi-lo grosseiramente em

dois grupos (Figura 1): **(i)** com hastes menores, flores alongadas e cerosas com cores mais vibrantes; **(ii)** com hastes mais longas, podendo atingir 1 m de comprimento, flores arredondadas e predominantemente brancas ou róseas (CHRISTENSON, 2001).

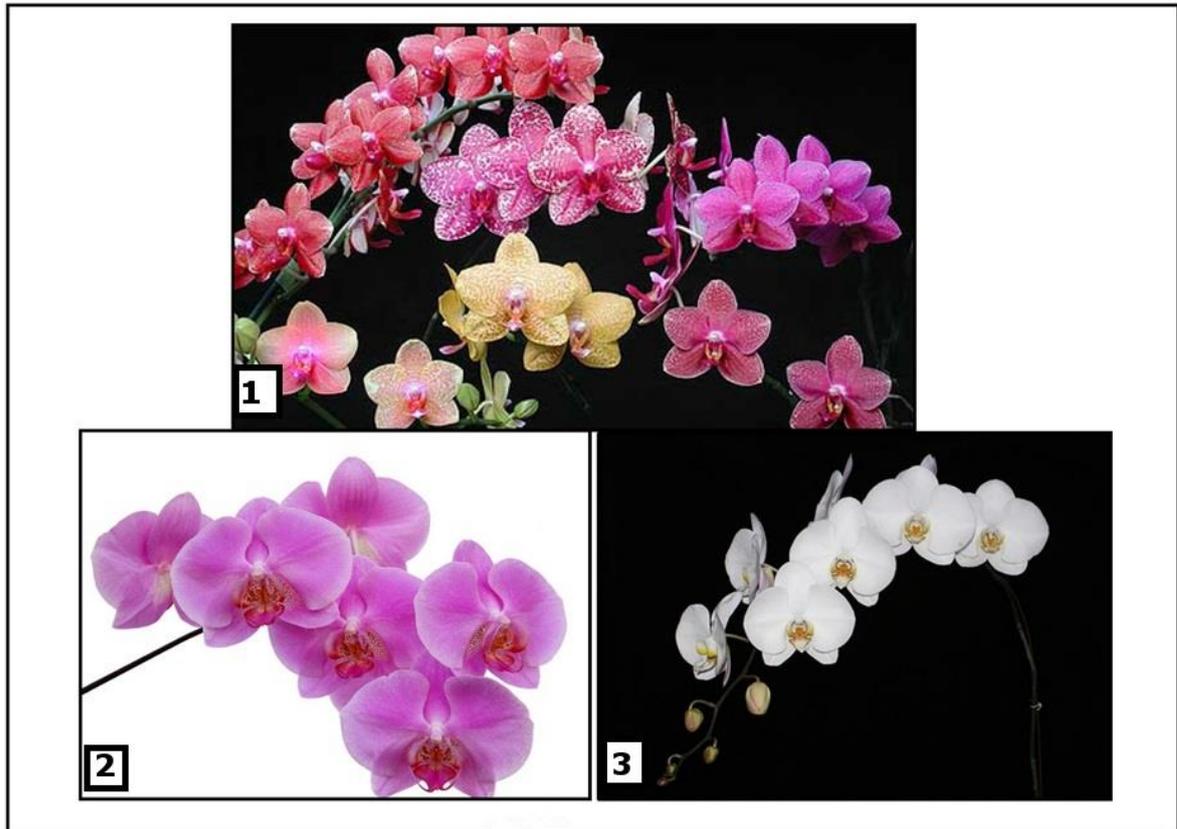


Figura 1 - Divisão do gênero *Phalaenopsis* grosseiramente em dois grupos: (1) um com hastes menores, flores alongadas e cerosas com cores mais vibrantes e um segundo grupo (2 e 3) com hastes longas, atingindo um metro de comprimento, flores arredondadas e predominantemente róseas (2) ou brancas (3).

Rotor (1949) demonstrou que os entre-nós das hastes florais de *Phalaenopsis* podiam crescer em meio Knudson C, quando segmentados e esterelizados. Este método é considerado o precursor da micropropagação de orquídeas por três motivos: ser asséptico, utilizar um meio já estabelecido e fazer uso de explante (YAM; ARDITTI, 2009). Em 1956, foram desenvolvidos os primeiros estudos indicando que usar cortes de orquídeas como explante seria viável, particularmente a região apical (THOMALE, 1956). O resultado ao final do cultivo é a produção de inúmeros clones, eliminando a diferença fenotípica resultante do cultivo por sementes.

Inicialmente, as primeiras cultivares de *Phalaenopsis* eram brancas, havendo carência de flores com outras cores. Visando a obtenção de outras tonalidades, foram realizados cruzamentos intergenéricos e seleção artificial, resultando em flores com tonalidade rósea (BATCHELOR, 1982). A hibridação e melhoramento do gênero é algo comum e o recente sequenciamento do genoma de *Phalaenopsis equestris* (CAI *et al.*, 2015) deve contribuir para a obtenção de novas cultivares.

Em 1983, *Phalaenopsis* correspondia a 5% do mercado mundial de orquídeas, passando a cerca de 66% em 1994 (GRIESBACH, 2000). Para suprir essa demanda foi necessário expandir o número de biofábricas. Para ser eficiente, uma biofábrica necessita, de equipamentos adequados, como capela de fluxo laminar, vidraria, pinças e bisturis, além dos sais minerais, fitormônios e demais componentes dos meios de cultura e mão de obra especializada (CHONE, 2005). A necessidade de pessoal treinado, associado aos gastos com energia e material de consumo, torna alto o custo de produção da muda, em comparação ao da muda importada (CHONE, 2005). Isso justifica a opção que muitos produtores adotam em adquirir mudas no exterior.

1.2 - Vírus de orquídeas

1.2.1 - Informações gerais

Atualmente são conhecidas mais de 25 espécies de vírus, distribuídas em dez famílias, que infectam Orchidaceae (Tabela 1). A maioria desses vírus infecta também outros grupos de plantas. Além disso, a grande maioria é transmitida por afídeos, porém o contato mecânico é o principal modo de transmissão, sendo responsável pela disseminação e ampla distribuição desses vírus entre cultivos de orquídeas em todo o mundo (ALEXANDRE *et al.*, 2012). Convém destacar que, no Brasil, já foi descrita a

ocorrência de apenas *Cymbidium Mosaic virus* (CymMV), *Odontoglossum Ringspot virus* (ORSV), *Orchid Fleck virus* (OFV) e *Cucumber Mosaic virus* (CMV).

Os vírus ORSV (*Odontoglossum ringspot virus*) e CymMV (*Cymbidium mosaic virus*) estão presentes no mundo todo e não possuem vetores conhecidos, sendo considerados os patógenos mais importantes no cultivo de orquídeas. Ambos têm sua disseminação intrinsicamente ligada aos sistemas de produção, não havendo relatos em literatura da presença desses vírus na natureza, até o momento. A presença do CymMV e ORSV nos sistemas de produção, normalmente, está relacionada: **(i)** à má esterilização de ferramentas durante o cultivo; **(ii)** à reutilização de substrato e materiais contaminados; e **(iii)** ao intercâmbio de material vegetal infectado. O método mais utilizado para obtenção de mudas de orquídeas é a cultura de tecidos. Ao utilizar esta técnica a produção pode resultar em lotes inteiramente infectados, em especial quando o explante utilizado no início do cultivo estiver infectado por vírus. O intenso comércio internacional de plantas e mudas reflete a situação fitossanitária atual, pois nem sempre os vegetais comercializados estão livres de vírus. Vale ressaltar que além do CymMV e ORSV, também foram descritos, no Brasil, o *Orchid fleck virus* (OFV) e o *Cucumber mosaic virus* (CMV) infectando orquídeas (NÓBREGA, 1947; FREITAS, 1996; KUBO, 2006; MORAES; 2013).

Infecção por ORSV resulta em mosaico, anéis e manchas cloróticas, e também pode resultar em anéis e quebra de coloração em flores (AJIKUTTIRA, 2003). O ORSV pertence ao gênero *Tobamovirus*, família *Virgaviridae* (KING *et al.*, 2012). As partículas são rígidas e alongadas, com tamanho de cerca de 300 nm de comprimento e 18 nm de largura, apresentando núcleo com cerca de 4 nm de diâmetro (WEBSTER; GRANOFF, 1994). Seu genoma foi inteiramente sequenciado por Ryu e Park (1995), e é constituído por um RNA de fita simples, positivo, com cerca de 6.618 nucleotídeos, com uma estrutura do tipo CAP (m7G) no terminal 5', não apresentando cauda Poli-A no terminal 3'. Apresenta 4 fases abertas de leitura (ORFs) que codificam: **(i)** a RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp ou replicase viral) de 126 e 183 kDa, localizadas entre os nucleotídeos 63-3401/4901; **(ii)** a proteína de movimento de 33 kDa, localizada entre os nucleotídeos 4807-5718; e **(iii)** a capa proteica (CP) de 18 kDa, localizada entre os nucleotídeos 5721-6197 (MORAES, 2013). Até o momento, não há vetores conhecidos relacionados à transmissão do ORSV.

O CymMV causa manchas cloróticas e/ou necróticas em folhas, podendo causar deformação e quebra de coloração em flores. Pertence ao gênero *Potexvirus*, família *Alphaflexiviridae* (KING *et al.*, 2012). O gênero é constituído de vírus com partículas que

apresentam morfologia flexuosa e alongada (filamentosa) e tamanho que varia entre 450 e 550 nm (FRANCKI, 1970). CymMV possui partículas com 480 nm de comprimento e 13nm de largura (MORAES, 2013). O genoma é composto por RNA senso positivo de cadeia simples com 6.227 nucleotídeos. Possui estrutura do tipo CAP (m7G) no terminal 5' e cauda poli-A no terminal 3' (WONG *et al.*, 1997). Apresenta cinco fases abertas de leitura (*Open Reading Frames*, ORFs), as quais codificam as proteínas virais: **(i)** RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) de 160 KDa localizada entre os nucleotídeos 73/4326; **(ii)** o “bloco triplo de genes” (*Triple Gene Block*, TGB), localizados entre os nucleotídeos 4333/5478, que codificam para três proteínas (26KDa, 13KDa e 10KDa) relacionadas com movimento do vírus na planta; e **(iii)** proteína do capsídeo (CP) de 24 KDa, localizada entre os nucleotídeos 5481/6152 (MORAES, 2013). Até o momento, não há vetores conhecidos relacionados à transmissão do CymMV.

Os sintomas de ambos podem variar em função do gênero, cultivar, idade e estado nutricional da orquídea, sendo comum plantas infectadas permanecerem assintomáticas. Em função do modo de transmissão e disseminação de ambos os vírus serem similares, devido às dificuldades de controle e falta de manejo adequado das viroses nos sistemas de cultivo, e, principalmente pela propagação vegetativa das orquídeas e os sistemas voltados para produção intensiva, as infecções mistas são bastante comuns, e ambos os vírus são encontrados frequentemente nos sistemas de cultivo de orquídeas. Quando em coinfeção, já foi observado sinergismo entre os patógenos com agravamento dos sintomas (AJJIKUTTIRA, 2003).

Levantamentos realizados no Estado de São Paulo indicaram que as populações de CymMV e ORSV apresentam pouca variabilidade genética, de 92 a 100% de identidade de nucleotídeos da CP, não havendo variação relacionada à localidade ou hospedeira (AJIKUTIRA, 2003; MORAES 2013). Pode-se tentar explicar a alta conservação pela origem externa de grande parte das mudas cultivadas no país. Esse fato pode ser utilizado em programas de melhoramento genético ou na obtenção de orquídeas transgênicas que visem à resistência a esses vírus.

Em levantamento realizado em 2013 por Moraes, o Orchid fleck virus (OFV) foi detectado somente nas cidades de Atibaia e Piracicaba, indicando uma incidência restrita no Brasil. Esse vírus foi descrito pela primeira vez no Japão em plantas de *Cymbidium*, induzindo manchas cloróticas e necróticas (DOI *et al.*, 1996). O OFV é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus californicus* e induz sintomas bastante singulares, como manchas ou anéis necróticos, acompanhados ou não de clorose nas folhas (MORAES, 2013). Há diversidade genética desse vírus no Brasil, com níveis de

similaridade de nucleotídeos entre 82 a 100%, sendo possível agrupar as variantes por localidade (KUBO, 2006). Apesar de primeiramente ter sido descrito como um *Rhabdovirus* e Kondo *et al.*, em 2006, terem proposto a criação de um novo grupo “*Dichorhabdovirus*”, atualmente o OFV é classificado como “unassigned” (espécie com classificação taxonômica ainda não definida) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (KING *et al.*, 2012).

As partículas de OFV têm forma de bastonete não envelopado com tamanho que varia de 100-150 nm de comprimento e 32-40 nm de largura (KONDO *et al.*, 2006). O genoma é bipartido, formado por duas moléculas de RNA de fita simples senso negativo: RNA 1, com 6413 nucleotídeos e RNA 2, com 6001 nucleotídeos. A primeira codifica proteínas de 49 kDa (ORF1), 26 kDa (ORF2), 38 kDa (ORF3), 20 kDa (ORF4) e 61 kDa (ORF5), e a segunda codifica uma única proteína de 212 kDa (ORF6). As proteínas codificadas pelas ORF1, ORF5 e ORF6 apresentam 21–38 % de identidade com proteínas do nucleocapsídeo (N), glicoproteína (G) e polimerase (L), respectivamente, de outros Rhabdoviridae, ao passo que as proteínas codificadas pelas ORF2, ORF3 e ORF4 não possuem similaridades relevantes com outras proteínas (KONDO *et al.*, 2006).

O *Cucumber mosaic virus* (CMV) foi descrito, no Brasil, pela primeira vez em orquídeas, infectando *Dendrobium nobile* (NÓBREGA, 1947). O CMV pertence ao gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*, e é bastante generalista sendo um importante patógeno de várias culturas, como tomate, pimentas, pimentões e banana (MACNAB; SHERF; SPRINGER, 1983). Seu genoma é composto por três moléculas de RNA de fita simples senso positivas, denominadas RNAs 1, 2 e 3. O RNA 1 codifica a proteína 1a envolvida no complexo replicase e no movimento do vírus. O RNA 2 codifica para a proteína 2a, que é a subunidade da RNA polimerase dependente de RNA, e para a proteína 2b, traduzida a partir de um RNA subgenômico e relacionada à virulência e distribuição sistêmica do vírus. Por último, o RNA 3 codifica a proteína 3a ligada ao movimento do vírus e a proteína capsial (CP) (EIRAS *et al.*, 2004).

Os principais vírus que infectam espécies de orquídeas estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais vírus descritos em orquídeas, espécies hospedeiras e os países em que foram relatados

| Espécies de vírus | Gênero | Principais Hospedeiras | Países relatados | Sigla |
|---|------------------------|--|-------------------------|--------------|
| <i>Cymbidium mosaic virus</i> | <i>Potexvirus</i> | <i>Cymbidium</i> , <i>Vanilla</i> , <i>Cattleya</i> , <i>Phalaenopsis</i> | Vários países | CymMV |
| <i>Odontoglossum ringspot virus</i> | <i>Tobamovirus</i> | Todas as espécies cultivadas comercialmente | Vários países | ORSV |
| Orchid fleck virus* | Ainda não classificado | <i>Odontoglossum</i> , <i>Cattleya</i> , <i>Laelia</i> , <i>Oncidium</i> . | Brasil e Japão | OFV |
| <i>Cucumber mosaic virus</i> | <i>Cucumovirus</i> | <i>Phalaenopsis</i> e <i>Dendrobium nobile</i> | Brasil e Taiwan | CMV |
| <i>Dendrobium vein necrosis virus</i> * | <i>Closterovirus</i> | <i>Dendrobium</i> e <i>Phalaenopsis</i> | Alemanha e EUA | DVNV |
| <i>Tomato ringspot virus</i> | <i>Nepovirus</i> | <i>Ponthieva</i> e <i>Cymbidium</i> | - | ToRSV |
| <i>Tomato Chlorotic Spot Virus</i> | <i>Tospovirus</i> | <i>Phalaenopsis</i> e <i>Epidendrum</i> | EUA | TCSV |
| <i>Bean yellow mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Dactylorhiza foliosa</i> , <i>Masdevallia</i> | EUA, Alemanha e Japão | BYMV |
| <i>Calanthe mild mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Calanthe</i> , <i>Phalaenopsis</i> , <i>Tetragonia</i> e <i>Cymbidium</i> | Japão e Índia | CaIMMV |
| <i>Ceratobium mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Ceratobium</i> | Austrália | CerMV |
| <i>Clover yellow vein virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Dendrobium</i> | - | CIYVV |
| <i>Dasheen mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Spiranthes</i> | EUA | DsMV |
| <i>Cypripedium chlorotic streak virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Cypripedium</i> | - | CypCSV |
| <i>Habenaria mosaic virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Habenaria</i> | Japão | HaMV |
| <i>Turnip mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> | <i>Calanthe</i> e <i>Orchis</i> | Alemanha | TuMV |
| <i>Vanilla mosaic virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Vanilla</i> | Polinésia francesa | VanMV |
| <i>Vanilla necrosis virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Vanilla</i> | Polinésia Francesa | WMV |
| <i>Cymbidium ringspot virus</i> | <i>Tombusvirus</i> | <i>Cymbidium</i> | - | CymRSV |
| <i>Impatiens necrotic spot virus</i> | <i>Tospovirus</i> | <i>Oncidium</i> e <i>Phalaenopsis</i> | EUA | INSV |
| <i>Tomato spotted wilt virus</i> | <i>Tospovirus</i> | <i>Oncidium</i> , <i>Phalaenopsis</i> , <i>Brassia gireoudiana</i> , <i>Cattleya</i> | EUA | TSWV |
| <i>Tobacco rattle virus</i> | <i>Tobravirus</i> | <i>Elleanthus</i> , <i>Epidendrum</i> , <i>Oncidium</i> , <i>Orchis</i> | Costa Rica | TRV |
| <i>Phalaenopsis chlorotic spot virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Phalaenopsis</i> | Taiwan | PhCSV |
| <i>Cypripedium calceolus virus</i> * | <i>Potyvirus</i> | <i>Cypripedium</i> | Alemanha | CypCV |

* Espécie ainda não aceita pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV).

1.2.2 – Métodos utilizados na indexação de orquídeas para vírus

A grande variedade de sintomas apresentados por orquídeas infectadas por CymMV e ORSV, e não raramente a ausência deles, torna impossível detectar os vírus meramente baseando-se nesse tipo de diagnóstico visual, requerendo métodos confiáveis de indexação. Um bom método de indexação deve apresentar elevada sensibilidade e especificidade, a fim de não gerar resultados falsos, além de ser de fácil execução e reprodutibilidade. Os métodos de indexação, de uma maneira geral, podem ser divididos em três categorias: **(i)** métodos biológicos, baseados na transmissão do vírus por inoculação mecânica ou por vetores para plantas indicadoras; **(ii)** métodos sorológicos, baseados nas interações e reações observadas entre as proteínas virais e anticorpos específicos; e **(iii)** moleculares, que se baseiam na complementariedade entre as bases nitrogenadas do DNA ou RNA.

Dos métodos biológicos de indexação, o mais clássico é realizado por meio de inoculação mecânica de extratos foliares de plantas infectadas (por vírus) na superfície foliar de espécies vegetais (sadias) passíveis de infecção e que expressem sintomas (plantas indicadoras). Para detecção de CymMV são utilizadas as espécies de plantas indicadoras, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Datura stramonium* (COEBETT, 1960; FRANCKI, 1970; HOLLINGS, 1965; INOUE, 1965, 1968), e para ORSV, *Chenopodium* spp. *Nicotiana* spp., *Gomphrena globosa* e *Tetragonia expansa* (INOUE, 1965; KADO *et al.*, 1968; THOMPSON; SMIRK, 1967). As vantagens deste método incluem seu baixo custo, pois não há a necessidade de equipamentos sofisticados e o uso de reagentes caros, simplicidade, além de não requerer mão de obra altamente especializada. Por outro lado, requer espaço em casa de vegetação, manutenção de plantas sadias (livres de vírus, insetos vetores e outros patógenos e pragas), condições controladas e tempo para a expressão de sintomas (PANT; MEDHI, 2012).

Existem métodos mais práticos e rápidos em alternativa aos métodos biológicos. Destacam-se os testes sorológicos, baseados na interação antígeno e anticorpo, que podem apresentar elevada especificidade e/ou sensibilidade (detecção de baixos títulos dos vírus em plantas infectadas), com a possibilidade de se analisar muitas amostras simultaneamente (PANT; MEDHI, 2012).

Imunodifusão em ágar é uma técnica sorológica bastante simples, consistindo na precipitação de antígenos por anticorpos diluídos em gel. Já foi empregada na

detecção de CymMV e ORSV por WISLER, *et al.* (1982) no diagnóstico de aproximadamente 1700 orquídeas provenientes de diversas coleções.

O método sorológico de maior destaque é o “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA). A detecção por ELISA baseia-se na reação entre a proteína viral, normalmente a capa proteica, por um ou mais anticorpos específicos (monoclonais ou policlonais). Um dos anticorpos é conjugado a uma enzima (fosfatase alcalina ou peroxidase). O resultado é colorimétrico, obtido medindo-se a intensidade de coloração resultante da degradação do substrato. Por exemplo, no caso da utilização de anticorpo conjugado à fosfatase alcalina, utiliza-se o substrato p-nitrofenilfosfato, que é degradado pela enzima, resultando em uma coloração amarelada, que por sua vez é mensurada em um colorímetro com filtro específico para leituras, nesse caso, em um comprimento de onda de 405 nm. Existem kits comerciais para detecção de CymMV e ORSV (Agdia, EUA) por ELISA (BATCHMAN, 2008).

Hu *et al.* (1992) utilizaram “double antibody sandwich” DAS-ELISA para indexar orquídeas no Havaí, diagnosticando um total de 3600 plantas de 44 gêneros diferentes para CymMV, ORSV e *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). Os autores obtiveram um maior número de plantas infectadas por CymMV, em torno de 45%, e comprovaram a praticidade de DAS-ELISA ao indexar um grande número de amostras. Na Flórida, 420 orquídeas dos principais gêneros cultivados foram indexadas por ELISA indireto por Siegman *et al.* (1998); também com maior porcentual de infecção por CymMV. Wong (1994) fez uso de ELISA indireto para indexar 2333 orquídeas em Singapura, constando também maior porcentagem de infecção para CymMV, entre 56,4% para orquidários particulares e 34,5% no Jardim Botânico de Singapura. A incidência de ORSV nos dois casos foi de 4 e 0,3%, respectivamente. Na Índia, Pant *et al.* (2010) indexou mais de 100 espécies e híbridos utilizando “triple antibody sandwich” (TAS) e DAS-ELISA. Houve maior incidência de infecção mista por ORSV e CymMV, em torno de 40%, do que infecção simples por CymMV, 17%, ou ORSV, 29%. Freitas (1996) verificou a incidência de CymMV e ORSV no Estado de São Paulo. Ao todo 1777 orquídeas foram indexadas por “plate-trapped antigen” (PTA) ELISA, e a incidência média do CymMV e ORSV foi de 11%. Recentemente, Moraes (2013) utilizou DAS-ELISA para diagnosticar a presença de CymMV e ORSV no Estado de São Paulo. Ao analisar 385 amostras, constatou-se 71,16% de infecção para CymMV e 15,85% para ORSV. Outros vírus como *Cymbidium Ringspot virus* (CymMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Vanilla mosaic virus* (VanMV) não foram encontrados no estado (FREITAS, 1996; MORAES, 2013). Nota-se o importante e preocupante aumento na incidência dos vírus em 17 anos.

“Immunosorbent electron microscopy” (ISEM) é uma técnica que consiste no aprisionamento de partículas virais, ligadas a anticorpos específicos, e posterior visualização em microscópio eletrônico de transmissão. Já foi utilizada para detecção de CymMV e ORSV, indicando maior incidência do segundo vírus e ausência de partículas virais em meristemas ou sementes (PARK *et al.*, 1990). “Rapid Immuno Filter Paper Assay” (RIPA) faz uso de placas mergulhadas em anticorpos para detecção de vírus, é bastante rápida e precisa. Foi utilizada para indexar orquídeas na Tailândia (TANAKA *et al.*, 1997).

“Tissue Blot Immuno Assay” (TIBIA), assim como em DAS-ELISA, utiliza anticorpos para detecção de vírus. O extrato da planta é aplicado em membrana de nitrocelulose ou náilon e o vírus é identificado por um anticorpo marcado com uma substância fluorescente ou por quimioluminescência. É uma técnica útil para se analisar um grande número de amostras e menos trabalhosa que DAS-ELISA (PANT; MEDHI, 2012). Foi utilizada na indexação de *Cattleya* e *Cymbidium* na Coreia, sendo identificados os vírus CymMV e ORSV em extratos de raízes e folhas (LA *et al.*, 1999).

É possível diferenciar vírus pelo peso molecular de suas capas proteicas. Técnicas como “liquid chromatography/mass spectrometry” (LC/MS) e “matrix assisted laser desorption-ionization” (MALDI) fazem uso dessas propriedades para realizar indexação. Possuem como principais vantagens a acuidade e automação (PANT; MEDHI, 2012). Foram técnicas utilizadas na indexação de *Oncidium* com infecção mista por CymMV e ORSV (TAN *et al.*, 2000) a partir de 1 g de extrato preparado da flor, sendo a primeira aplicação desse tipo de análise para diagnosticar dois vírus simultaneamente.

“Immuno Capillary Zone Electrophoresis” (I-CZE) é uma técnica que combina a especificidade e sensibilidade de métodos sorológicos aliados à rapidez e automação da eletroforese por capilaridade. I-CZE foi utilizada para detecção de CymMV e ORSV em *Oncidium* em Singapura por Eun e Wong (1999), em 0,5 g do extrato das flores por amostra. I-CZE se mostrou bastante sensível, com capacidade para detecção de até 10 fg (10^{-15} g) de ambos os vírus.

A indexação de fitovírus pode se basear na interação entre ácidos nucleicos (métodos moleculares de diagnóstico) dos patógenos e suas características moleculares. Dentre estes métodos, muitos já foram utilizados para indexar CymMV e ORSV, como “Tissue Print Hybridization”, que faz uso de membranas de nitrocelulose ou náilon, pressionando-se uma folha de orquídea cortada transversalmente e hibridizando-a com cDNAs marcados de CymMV e ORSV. Wang *et al.* (2000)

conseguiram detectar até 20 pg (10^{-12} g) de CymMV purificado por leitura radiográfica; demonstrando a sensibilidade do método. Outro método utilizado para detecção de CymMV e ORSV é o “Slot-Blot hybridization”. Realizado a partir de sondas de RNA marcadas por digoxigenina (DIG), obtidas por síntese de cDNAs clonados de ambos os vírus (HU *et al.*, 1998). Detectando até 50 pg e 250 pg de CymMV e ORSV, a técnica é bastante sensível e específica (HU *et al.*, 1998). Por possuir fácil aplicabilidade, é ideal para testes de rotinas e indexação de grande número de plantas. Pode utilizar RNAs purificados ou extratos das folhas para diagnóstico.

A PCR (“Polymerase Chain Reaction”), e suas variações, estão amplamente difundidas para detecção de fitovírus. Utilizando a enzima *Taq DNA polymerase*, é possível amplificar regiões de interesse no genoma dos patógenos, selecionadas e flanqueadas por oligonucleotídeos (*primers*) específicos. ORSV e CymMV já tiveram seu genoma sequenciado, possibilitando que as técnicas baseadas em PCR sejam amplamente utilizadas na detecção de ambos os vírus. Lim *et al.* (1993) utilizaram RT-PCR para detectar ORSV e CymMV em plantas obtidas após tratamento *in vitro* utilizando ribavirin, ao confirmar resultados obtidos por ELISA, houve confirmação de maior sensibilidade da técnica molecular, pois plantas com resultados negativos na primeira análise por ELISA continuavam infectadas quando feita análise molecular.

É possível, sob certas condições, detectar mais de um vírus em uma única reação de RT-PCR, denominada Multiplex PCR. Nesse caso, é importante que as áreas amplificadas possuam diferentes tamanhos. Essa metodologia já foi desenvolvida para os vírus CymMV e ORSV por Lee e Chang (2006), que desenharam primers específicos para os genes da capa proteica de cada vírus. Os autores detectaram até 1 pg de CymMV e 10 pg de ORSV, em infecções simples ou mistas. “Molecular beacons” é a técnica que se utiliza de fitas simples de ácidos nucleotídeos com um terminal em forma de “loop”, que possui regiões complementares a sequências-alvo do fitovírus. Os terminais apresentam estruturas que, quando separadas, emitem fluorescência. Eun e Wong (2000) utilizaram essa técnica na detecção de CymMV e ORSV, sendo feita uma RT-PCR (“Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”) com primers que amplificaram regiões de interesse complementares a região de “loop” do “molecular beacon”, detectando até 0,5 ng para ambos os vírus em 100 mg de folhas coinfectedas de *Oncidium*.

1.2.3 - Métodos de controle

Até o momento, não existem métodos curativos, descritos em literatura, que possam ser aplicados eficientemente contra fitovírus, sendo recomendadas diferentes estratégias e táticas sempre relacionadas à prevenção.

Dos vírus que infectam orquídeas, relatados no Brasil, nenhum foi diagnosticado em ambiente natural, ou seja, sua distribuição está sempre associada aos cultivos de orquídeas (ALEXANDRE *et al.*, 2005). Os métodos de clonagem das plantas, seja em biofábricas ou por meio de propagação vegetativa, podem ser fatores cruciais na disseminação dos vírus de orquídeas, incluindo o ORSV e o CymMV. Um dos principais agravantes que contribui na ampla disseminação desses patógenos está relacionado com a ausência de sintomas (latência), o que significa que plantas infectadas, porém assintomáticas, atuam como fonte de inóculo e disseminação de vírus, tanto nos próprios sistemas de cultivo, como na distribuição de mudas infectadas, o que contribui para a introdução desses patógenos em outras regiões, estados, países e continentes (ALEXANDRE; DUARTE, 2013).

Vírus podem ser transmitidos por vetores, sendo os mais comuns afídeos, tripses cigarrinhas, besouros e moscas brancas (COSTA, 1998). Alguns gêneros de nematoides e fungos podem ser vetores (COSTA, 1999). Nesses casos, associadas às medidas preventivas que valem para quaisquer fitovírus, o controle e, em alguns casos, a total eliminação dos vetores passa a ser importante. O controle de vetores pode ser feito através de isolamento de plantas com telas de proteção, controle químico, óleos para inibir a transmissão, semioquímicos e repelentes, barreiras ópticas, superfícies refletoras e armadilhas amarelas (SALAS *et al.*, 2010). Contudo, CymMV e ORSV não possuem vetores conhecidos, e sua disseminação nos sistemas de produção de orquídeas se dá principalmente por transmissão mecânica provocada por práticas culturais e manejo inadequado, além do intercâmbio e propagação vegetativa de plantas infectadas.

Há uma série de problemas e, de certa forma, podem ser designados como falhas no manejo da cultura, frequentemente observadas nos cultivos de orquídeas, tais como: **(i)** esterilização inadequada de ferramentas; **(ii)** elevada densidade de plantas nas estufas; **(iii)** manejo inadequado da produção; **(iv)** produção de mudas feita com material previamente infectado; e **(v)** manutenção de plantas sintomáticas nas estufas (ALEXANDRE *et al.*, 2012; FREITAS, 1996).

Ao se produzir orquídeas é necessário, entre outros cuidados, transplantar mudas para vasos maiores, trocar substratos, cortar raízes e colher as hastes florais. Essas práticas envolvem o manuseio e uso de ferramentas. Estas operações, quando realizadas de maneira inadequada, ou seja, sem assepsia são o principal modo de disseminação dos vírus CymMV e ORSV em casas de vegetação.

Para desinfecção química de ferramentas é feita uma imersão em solução desinfetante, havendo muitos compostos que podem ser utilizados, com maior ou menor grau de sucesso (BROCK, 1952; HU *et al.*, 1994; HAYES, 2008). Como não existem produtos certificados para essa utilização, existe grande diversidade nos métodos empregados, nem sempre com a eficiência desejada. Portanto, antes de utilizar uma substância química, alguns pontos devem ser considerados: a toxicidade para o ser humano, atividade em presença de matéria orgânica, compatibilidade com o material tratado, a liberação de resíduos, custo, estocagem, disponibilidade e se apresenta risco ambiental (NESTER *et al.*, 1995). O ideal é que o agente tenha amplo espectro contra patógenos e curto tempo de uso.

A utilização de hipoclorito de sódio comercial é bastante comum entre produtores. Utilizado em concentrações variadas, entre 1 e 10%, e tempo de contato de 1 minuto possui comprovada eficiência contra vírus, atingindo 100% de descontaminação (BROCK, 1952; HAYES, 2008).

Etanol 70% é utilizado tanto para flambagem, a 150°C por 15-20 segundos, como para imergir as ferramentas (HU *et al.*, 1994; HAYES, 2008). O primeiro método ocasiona certo risco e é pouco prático, por necessitar de maçaricos ou similares. Mesmo quando utilizado para assepsia externa seu armazenamento deve ser cuidadoso, pois é inflamável. Também possui eficácia comprovada contra bactérias fitopatogênicas (TEOVITDALE, 1991).

Amônia quaternária tem comprovada eficiência como biocida (CHEN *et al.*, 2000), porém testes de concentração e tempo de ação conduzidos por Hayes (2008) demonstraram que o uso de amônia comercial, na concentração recomendada, resultou em alto percentual de plantas infectadas, o tempo de uso recomendado pelo fabricante, 10 minutos de imersão, é inviável em grande escala.

O uso de trifosfato de sódio (Na_3PO_4) é realizado em diversas concentrações obtendo-se, por vezes, resultados insatisfatórios. Quando diluído em concentração de 10%, resultou em controle de 97% de infecção viral (PATEGAS *et al.*, 1989), quando utilizado a 3% v/v teve controle aproximado de 44% (HAYES, 2008). Hayes (2008) constatou que a utilização de leite em pó na prevenção de infecções virais é promissora,

devido às características do produto: inócuo, de fácil descarte, armazenamento, obtenção, e a sua eficiência. Apesar de seu método de ação não ter sido inteiramente esclarecido.

A desinfecção de ferramentas quando associada a outras práticas culturais como: limitar número de pessoas com acesso direto aos vegetais, uso de roupas de proteção, assepsia das mãos e treinamento adequado de funcionários (PHILLIPSON; WEEKES, 2005). Fitovirus persistem em roupas de proteção, portanto a armazenagem e limpeza delas devem ser adequadas (BROADBENT; FLETCHER, 1963).

Uma orquídea infectada por CymMV ou ORSV que permanece em casa de vegetação pode servir como inóculo de ambos durante a produção. Um ambiente úmido, com pouca ventilação e alta densidade de vegetais facilita a disseminação de vírus, bem como de bactérias e fungos fitopatogênicos. Como estratégia de controle, indivíduos sintomáticos devem ser isolados assim que identificados e, se possível, retirados da casa de vegetação e incinerados.

Vegetais ao redor das casas de vegetação podem servir como hospedeiros secundários e devem também ser monitoradas quanto à presença de sintomas suspeitos. Orquídeas assintomáticas presentes nas casas de vegetação são um dos grandes problemas a se enfrentar no controle de doenças, principalmente virais. O tempo que uma planta permanece na casa de vegetação é proporcional à possibilidade de ser infectada.

A primeira orquídea transgênica foi obtida por Belarmino e Mii (2000) que transformaram *Phalaenopsis* via *Agrobacterium* para o gene de β -glucuronidase. A viabilidade em se produzir orquídeas transgênicas levou à aplicação de resistência via inserção de gene da capa proteica de CymMV e ORSV. A alta taxa de conservação entre isolados de ambos especialmente em genes da capa proteica torna possível a obtenção de orquídeas resistentes para qualquer zona produtora.

Phalaenopsis e *Dendrobium* resistentes à CymMV já foram obtidos. Em ambos utilizou-se o gene da cápsula proteica, porém o modo de inserção diferiu. No primeiro caso utilizou-se bombardeamento de partículas e, no segundo, transformação biolítica. Foi possível obter plantas resistentes nos dois gêneros (LIAO *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005).

Apesar das tentativas de se obterem plantas resistentes a ORSV ou a CymMV e ORSV em conjunto (FAN, 2011), ainda não foram obtidas orquídeas com nível adequado de resistência (YU; WONG, 1998). Tendo em vista que objetivou-se utilizar o

gene da capa proteica para obter resistência a ORSV sem bons resultados, é possível que utilizar outros genes virais seja mais eficiente (KOH *et al.*, 2014). Chan (2005), obteve exemplares de *Phalaenopsis* resistentes a CymMV e *Pectobacterium carotovora* (anteriormente conhecida como *Erwinia carotovora*), por inserção de genes via *Agrobacterium* (KOH *et al.*, 2014).

Quando a planta é de interesse econômico recomenda-se realizar a indexação de plantas assintomáticas visando encontrar matrizes sadias para iniciar a produção (HOLLINGS, 1965). Na impossibilidade de encontrar matrizes sadias existem algumas alternativas para limpar vegetais de viroses e obter clones isentos de vírus, os principais são: o cultivo de meristemas, termoterapia e quimioterapia (HOLLINGS, 1965).

O cultivo de meristemas apicais é utilizado para limpeza de vírus em alguns gêneros de orquídeas como *Cymbidium* (MOREL, 1960). Os principais entraves dessa técnica são: **(i)** o diminuto tamanho do tecido (0,1 a 0,3 mm), que dificulta sua extração; **(ii)** a rápida oxidação e ressecamento (é comum o meristema ser retirado sob ação de antioxidantes); e **(iii)** a morte da planta-matriz durante o processo (MOREL, 1960; ALBOUY *et al.*, 1988; ISHII, 1974). Outro ponto a ser considerado são as diferenças morfológicas existentes entre o meristema nos diversos gêneros e híbridos de orquídeas. *Phalaenopsis*, por exemplo, tem um meristema de difícil extração e que não tem boa resposta às técnicas de propagação *in vitro* existentes.

Sementes de orquídea, normalmente, não portam vírus. Iniciar cultivo *in vitro* utilizando-as como explante é um modo de se obter plântulas sadias. *Oncidium*, por exemplo, é normalmente produzido por meio dessa metodologia. O grande problema em se cultivar sementes está na homogeneização das plantas, devido ao cruzamento o genótipo das plantas filhas é heterogêneo. Durante o crescimento *in vitro* dificilmente é notada variação entre as mudas, porém durante a aclimação em casa de vegetação e produção de haste floral a variação se torna perceptível nas flores e, muitas vezes, nas folhas e aspecto geral da orquídea. Gêneros mais susceptíveis à variação, dentre eles *Cymbidium* e *Phalaenopsis*, tem sua venda prejudicada devido à falta de uniformidade nos lotes. A diferença morfológica se traduz em menor preço de venda, não sendo raros cruzamentos amadores resultarem em plantas sem valor comercial que nem chegam a venda. Pelo tempo passado em casa de vegetação e biofábrica uma planta nessas condições acarreta grande prejuízo.

A termoterapia no controle de vírus de plantas é, normalmente, realizada submetendo o tecido vegetal, órgãos de propagação (bulbos, tubérculos, rizomas, explantes) ou mesmo a planta toda, a temperaturas entre 35 e 50 °C durante períodos

que podem variar de dias a semanas. É uma técnica empregada em certos cultivos comerciais, sendo que no Brasil destaca-se o uso, com relativo sucesso, em toletes de cana-de-açúcar e bulbilhos de alho. Entretanto, explantes de orquídeas são frágeis e não sobrevivem se expostos às temperaturas que seriam suficientes para limpá-los dos vírus mais importantes. Além disso, tanto vírus do gênero *Tobamovirus* como *Potexvirus* resistem a temperaturas elevadas, o que impossibilitaria o processo de eliminação do ORSV e CymMV de tecidos ou explantes de orquídeas via termoterapia.

Outra possibilidade é o emprego de quimioterapia para o controle de vírus de plantas, que de maneira simplificada, pode ser definida como uma estratégia de controle que envolve a adição de um antiviral ao meio de cultura (no caso de cultivo *in vitro*) onde serão produzidos os explantes. O composto (antiviral) pode ser adicionado antes da esterilização ou filtrado no meio de cultivo após a esterilização em autoclave (FREITAS, 1996). O primeiro método é mais simples. Já, o segundo envolve a utilização de filtros estéreis em fluxo laminar com o meio de cultura ainda quente, necessitando de maior tempo e mão-de-obra. Vale ressaltar que os antivirais devem ser solúveis em água ou em solvente inócuo e não apresentar fitotoxicidade na concentração utilizada. A seguir, a utilização de antivirais em plantas será discutida em detalhes.

1.3 - Aplicação de antivirais em plantas

Duggar e Armstrong (1925) demonstraram que extratos de várias plantas inibiam a replicação do *Tobacco mosaic virus* (TMV) quando aplicados em folhas previamente inoculadas. Após esse trabalho inicial envolvendo antivirais, o pouco conhecimento sobre a replicação dos vírus não direcionava a pesquisa e os compostos estudados. Desse modo substâncias diversas e pouco relacionadas foram testadas; por exemplo: corantes, extratos vegetais e os análogos de nucleotídeos azaguanina e “thiouracil”. Muitos demonstraram ser eficientes para inibir a biossíntese do vírus estudado ou sua replicação (JUERGEN HANSEN; STACE SMITH, 1989).

Apesar de certa variação entre os métodos utilizados para se descobrir novos antivirais ser necessária, em função de particularidades do vegetal estudado e do vírus, a falta de padronização nesse período gera inconsistências ao comparar dados de trabalhos publicados (JUERGEN HANSEN; STACE SMITH, 1989). O método geralmente aceito consiste na imersão de discos foliares, previamente inoculados, sejam imersos em solução com diferentes concentrações do composto antiviral a ser avaliado, sendo realizada indexação após o tratamento. A morfologia da folha tem grande influência nos resultados (JUERGEN HANSEN; STACE SMITH, 1989).

No início da década de 1950 havia grande esperança que antivirais conseguissem ser eficientes no controle de viroses. Até o início da década de 1960, as pesquisas relacionadas aos antivirais eram resumidas a testes para encontrar novos compostos eficientes. Como resultado, nos cinco anos seguintes muitos foram identificados (JUERGEN HANSEN; STACE SMITH, 1989). Já se sabia que os vírus eram responsáveis por controlar a própria replicação no interior das células hospedeiras, quando Markham e Smith, em 1949, elucidaram o papel do RNA como molde e mensageiro (o que mais tarde levaria a descoberta da síntese proteica – RNA como molde para reconhecimento pelo aparato ribossomal). Essa descoberta possibilitou que a pesquisa avançasse rapidamente, num primeiro momento nos estudos relativos à replicação e posteriormente na caracterização molecular e identificação dos vírus de plantas.

Tal progresso direcionou o desenvolvimento de antivirais. O novo entendimento do papel do RNA possibilitou a criação de análogos de bases (nucleosídeos) como “thiouracil” e ribavirin, que interferissem diretamente na replicação viral. Quak (1961) eliminou o *Potato virus X* (PVX) durante o cultivo *in vitro* de meristemas apicais de batata ao adicionar “thiouracil” ao meio de cultura. Esse trabalho provou que era possível “limpar” plantas com infecção sistêmica, sem prejudicar o metabolismo celular na propagação *in vitro* (JUERGEN HANSEN; STACE SMITH, 1989).

A comprovação do trabalho de Quak (1961) possibilitou a aplicação de sua metodologia em outros vírus e hospedeiros. Atualmente, estão disponíveis métodos de quimioterapia em diversas culturas, por exemplo: uva, maçã, batata, ameixa, pera, damasco, uva, tomate e orquídeas (ALBOUY *et al.*, 1988; GUIĂ; BUCIUMEANU, 2011; HAUPTMANOVÁ; POLÁK, 2011; HU *et al.*, 2012; QUAK, 1961). Segundo Panattoni, Luvisi e Triolo (2013) entre 1991 e 2010 ao menos 15 espécies vegetais foram submetidas à quimioterapia contra 9 famílias de vírus. Obtendo-se êxito na limpeza.

1.4 - Ribavirin e seu uso em cultura de tecidos

Um antiviral bastante utilizado em quimioterapia vegetal é o ribavirin, também conhecido como Virazole. Sua origem remete à descoberta dos antibióticos showdomicina e pyrazomicina que foram isolados de bactérias do gênero *Streptomyces*. Ambos são nucleosídeos e o segundo, em especial, apresenta ação antiviral em cultura de células. Após a caracterização estrutural, foram sintetizados diversos fármacos que os utilizam como base de suas moléculas. Dentre eles o ribavirin (1- [(2R,3R,4S,5 R) -3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) (SMITH; KIRKPATRICK, 1980) (Figura 2).

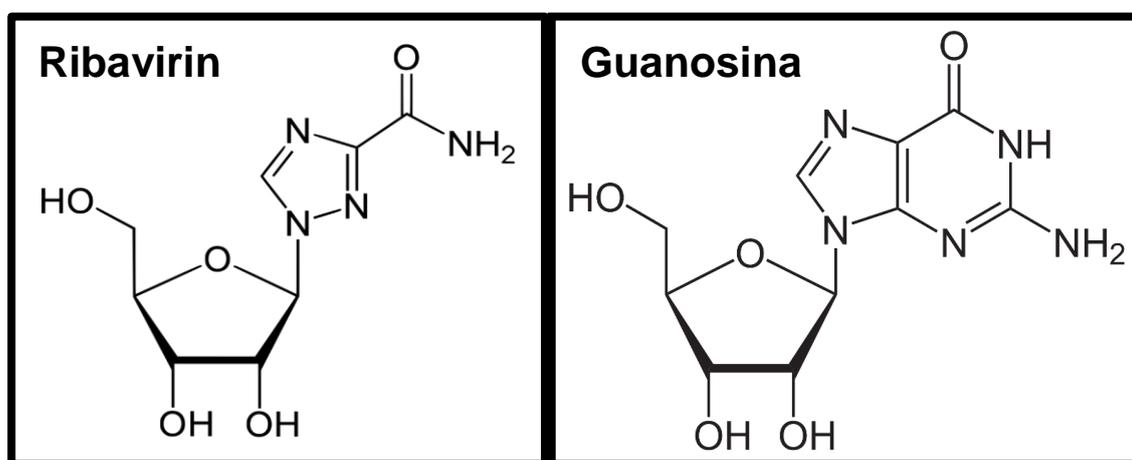


Figura 2 - À esquerda a molécula de ribavirin (1- [(2R,3R,4S,5 R) -3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl) oxolan-2-yl]-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) um antiviral análogo do nucleosídeo guanosina à direita.

O ribavirin tem amplo espectro antiviral, sendo eficiente contra várias famílias. É utilizado no tratamento de doenças como Hepatite C, febres hemorrágicas virais e o vírus sincicial respiratório (PAESHUYSE, *et al.* 2011; SOARES-WEISER *et al.*, 2010; SIDWELL *et al.*, 1972). Inicialmente, sugeriu-se que o ribavirin inibia a enzima inosina desidrogenase monofosfato, interferindo diretamente na via metabólica do vírus.

Para que uma determinada substância seja utilizada como antiviral em plantas, as seguintes características são desejáveis: **(i)** solubilidade em água ou solvente inócuo; **(ii)** eficiência em relação aos vírus de importância econômica; **(iii)** utilização em concentrações não fitotóxicas; **(iv)** ser de fácil aplicação; e **(v)** não apresentar toxicidade em relação à fauna, flora e ao homem. Outro fator importante é o agente antiviral funcionar contra um amplo espectro de vírus. Desse modo, sua produção torna-se mais

interessante, tendo em vista que é comum uma mesma espécie vegetal ser infectada por mais de um vírus (JUERGEN HANSEN; STACE-SMITH, 1989). De modo geral, o ribavirin atende a esses requisitos.

Quando utilizado durante a fase de micropropagação, filtrado ou adicionado ao meio de cultura, o antiviral ribavirin apresenta bons resultados para diversas espécies vegetais infectadas. Em alguns casos, regenera 100% de plantas tornando-as sadias (HANSEN; LANE, 1985; CASSELS; LONG, 1980; DE FAZIO; CANER; VICENTE, 1980).

Também visando à eliminação de viroses *in vitro*, a metodologia utilizada por Morel (1960), de cultivar meristemas apicais, tem seu sucesso proporcional ao tamanho do explante retirado, visa-se retirar apenas o meristema; quando esse pré-requisito não é atendido é possível que o vírus continue presente no cultivo. Em especial o ORSV teve resultados insatisfatórios na limpeza por esse método (ALBOUY, 1988).

Albouy *et al.* (1988) utilizaram “Protocorm Like Bodies” (PLBs) infectados por CymMV e ORSV. Seu método consistiu em adicionar ribavirin juntamente aos outros componentes do meio, antes da esterilização, na fase de multiplicação de PLBs. Utilizando concentrações de 25 e 35 ppm, não foram notados efeitos fitotóxicos, porém se uma concentração elevada for mantida por longo período, a multiplicação é prejudicada. Obtiveram-se 90% de plantas sadias após o tratamento.

Freitas (1996) aliou o cultivo de meristemas caulinares ao uso de antiviral no cultivo de *Cymbidium* para obter mudas livres de ORSV. Filtrando o ribavirin em meio de cultura após esterilização e adicionando-o antes da esterilização. Foram recuperadas até 100% de plantas livres após um ano de cultivo em concentração de 30 ppm/L, sendo ele filtrado ao meio de cultura após esterilização.

No cultivo de *Dendrobium*, Porter e Kuehnle (1997) obtiveram resultados positivos ao utilizar ribavirin e “dithiouracil” para limpeza de CymMV. Os antivirais foram aplicados em duas etapas: durante a multiplicação em meio líquido e durante a diferenciação em meio sólido. A toxicidade foi notada na primeira fase, fazendo com que o material perdesse a cor verde, passando a uma cor “amarronzada”, e perdendo seu potencial de multiplicação e cultivo. O ribavirin teve maior eficiência que o “dithiouracil”, recuperando-se até 100% de PLBs sadios, enquanto que com o emprego do segundo antiviral, em seu melhor desempenho, houve apenas 23% de recuperação.

Lim, *et al.* (1993) utilizaram a retirada de meristemas axilares e adição de ribavirin no cultivo do híbrido “Mokura Char Kuan 'Pink” visando à limpeza de CymMV e ORSV. Ao usar meristemas, o sucesso do cultivo foi proporcional ao tamanho do

explante retirado, sendo que, quanto menor o tamanho, menor foi a taxa de sobrevivência. Utilizando ribavirin em fases adiantadas de cultivo foi possível obter até 100% de PLBs sadios. A concentração ideal foi de 10 ppm/L, e observou-se que concentrações maiores por longo período de tempo levam à morte do explante.

Na Tabela 2 foram relacionadas às espécies vegetais e espécies virais em que o uso de ribavirin foi associado à cultura de tecidos vegetais, visando à obtenção de plantas livres de vírus. As orquídeas não estão relacionadas na tabela, pois estão descritas acima.

Tabela 2 - Uso de ribavirin no controle de vírus de plantas associado à cultura de tecidos

| Cultura | Vírus (Sigla) | Gênero | Referência |
|-------------------|--|--------------------|---|
| Maçã | <i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV) | <i>Trichovirus</i> | HANSEN, A.J.; LANE, W.D. (1985) |
| Batata | <i>Potato virus X</i> (PVX) | <i>Potexvirus</i> | OANA (2009); QUAK, R. (1961) |
| Tomate | <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) | <i>Tospovirus</i> | DE FAZIO, G.; CANER J.; VICENTE, M. (1980) |
| Tabaco | <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) | <i>Tospovirus</i> | DE FAZIO, G.; CANER, J.; VICENTE, M. (1980) |
| | <i>Potato virus X</i> (PVX) | <i>Potexvirus</i> | (1980) |
| | <i>Potato virus Y</i> (PVY) | <i>Potyvirus</i> | SHULZE, S.; KLUGE, S. (1994) |
| | <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) | <i>Cucumovirus</i> | CASSELS, A. C.; LONG, D. (1980) |
| | <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) | <i>Tobamovirus</i> | |
| Uva | <i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV) | <i>Nepovirus</i> | GUIÃ, I. C.; BUCIUMEANU, E. C. (2011) |
| | <i>Grapevine leafroll virus associate serotype-1</i> (GLRaV-1) | <i>Ampelovirus</i> | WEILAND, et al. (2004) |
| | <i>Grapevine virus A</i> (GVA) | <i>Vitivirus</i> | |
| Alho | Não especificado | <i>Potyvirus</i> | RAMÍREZ-MALAGÓN, R. et al. (2006) |
| Ameixa | <i>Plum pox virus</i> (PPV) | <i>Potyvirus</i> | HAUPTMANOVÁ A.; POLÁK, J. (2011) |
| | <i>Prunus necrotic ringspot virus</i> (PNRSV) | <i>Irlavirus</i> | |
| | <i>Prunus dwarf virus</i> (PDV) | <i>Irlavirus</i> | |
| Bambu | <i>Bamboo mosaic virus</i> (BaMV) | <i>Potexvirus</i> | CHEN, T.H.; LU, Y.T. (2000) |
| Morango | <i>Strawberry mottle virus</i> (SMV) | <i>Sadwavirus</i> | CIESLINSKA, M. (2003) |
| Lírio | <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) | <i>Cucumovirus</i> | XU, P.; NIIMI, Y.; ARAKI, H. (2000) |
| Crisântemo | <i>Chrysanthemum B carlavirus</i> (CVB) | <i>Carlavirus</i> | RAM et al., (2005) |
| | <i>Tomato aspermy virus</i> (TAV) | <i>Cucumovirus</i> | |
| | <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) | <i>Cucumovirus</i> | |

2- Objetivos

Gerais:

- Obter mudas de *Phalaenopsis* livres de vírus a partir de matrizes infectadas por CymMV e ORSV, por meio de quimioterapia associada ao cultivo *in vitro* de matrizes coinfetadas em micropropagação por morfogênese direta;

Específicos:

- Comprovar que, mesmo utilizando-se as gemas de hastes florais como explantes que sabidamente carregam os vírus, o acréscimo de ribavirin ao meio de cultura pode ser uma alternativa viável para se obter plântulas livres de vírus;

- Avaliar se os explantes obtidos de plantas coinfetadas por CymMV e ORSV produzirão mudas isentas dos dois vírus por meio do acréscimo de ribavirin, em protocolo já estabelecido para a micropropagação de *Phalaenopsis*;

- Determinar a concentração ideal de ribavirin para compor o meio de cultura, a qual não prejudique os explantes e nem o desenvolvimento e multiplicação das plântulas;

- Avaliar se existe variação na resposta ao tratamento entre uma matriz obtida por propagação vegetativa e outra oriunda de reprodução sexuada;

- Mostrar, por meio de entrevistas, como os produtores do estado de São Paulo encaram o problema das viroses de orquídeas, verificando se o atual estado da disseminação de ambos foi influenciado por más práticas de cultivo;

-Caracterizar os vírus neste trabalho através do sequenciamento de bandas obtidas por RT-PCR, do RNA extraído uma matriz coinfetada, utilizando oligonucleotídeos específicos para CymMV e ORSV, e sua comparação com as sequências depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3 - Material e métodos

3.1 – Avaliação do nível de informação sobre as viroses e seu controle, de produtores paulistas de *Phalaenopsis*, por meio de questionário

Visando reunir informações sobre a ocorrência, distribuição e medidas adotadas na prevenção de CymMV e ORSV, foi elaborado um questionário elaborado e distribuído aos produtores de orquídeas do estado de São Paulo que comercializam no CEASA/Campinas. Foram elaboradas questões práticas sobre o manuseio das plantas durante o cultivo e comercialização, que serviram de premissa para identificar o problema e propor soluções junto aos produtores após ouvir as suas argumentações. Este questionário permitiu traçar um panorama sobre o tema, a partir das informações prestadas, bem como argumentar sobre os danos causados e esclarecer a importância do emprego de antivirais durante a propagação *in vitro* de orquídeas. Ao todo foram entrevistados 10 produtores estando distribuídos pelas cidades de Holambra, três produtores, e Atibaia, Artur Nogueira, Arujá, Ibiúna, Itu, Mogi das Cruzes e São José dos Campos, um produtor cada. O questionário e as fotos apresentadas estão nos Apêndices A e B.

3.2 – Indexação de matrizes e avaliação da limpeza viral

Neste trabalho foram realizados dois ensaios, denominados **(A)** e **(B)**, ambos utilizando matrizes coinfectadas por CymMV e ORSV. O ensaio **(A)** teve como objetivo avaliar o efeito do genótipo na quimioterapia e, para tal, utilizou-se de plantas matrizes “irmãs”, oriundas de sementes de uma mesma cápsula, obtidas por reprodução sexuada. Esta opção baseou-se no fato de que plantas “irmãs” apresentam variações genotípicas mínimas, o que é normal entre progênies, inclusive ligadas à resistência de doenças, em particular as viroses. Somente foi testada uma concentração de 40 ppm de ribavirin. O experimento foi montado com este único tratamento (40 ppm) dividido em três repetições (I, II e III), sendo que, as matrizes escolhidas possuíam flores roxas (Figura 3). O ensaio foi realizado no Instituto Botânico da *Perfect Liberty*, localizada no município de Arujá/SP, com material oriundo da própria Instituição.

Para o início de ambos os ensaios as matrizes foram indexadas para CymMV e ORSV através do teste DAS-ELISA, com kit comercial da empresa Agdia, possuindo protocolo e os controles positivos e negativos, já inclusos no kit. Foram utilizadas como explantes as gemas da haste floral, sendo selecionadas matrizes cujas hastes

estivessem bem desenvolvidas, porém com botões florais nos estádios iniciais (Figura 4), condição ideal para o cultivo *in vitro* (LEE, 2011). A indexação foi realizada escolhendo-se ao acaso as matrizes cultivadas em casa de vegetação, num total de 35 para o ensaio (A) e de 55 para o (B). Somente aquelas que apresentaram resultado positivo à sorologia para CymMV e ORSV foram utilizadas como matrizes. Foi empregado o mesmo protocolo de cultivo *in vitro* para ambos os ensaios.



Figura 3- À esquerda, flores da matriz de *Phalaenopsis* cultivada sendo à direita, no Ensaio (A) e à esquerda, cultivar 44611, no ensaio (B).



Figura 4 - (1) Haste floral com aproximadamente 30 dias de desenvolvimento e ao longo da haste podem ser observadas as gemas, que foram utilizadas como explantes em ambos os ensaios (A e B); (2) Em destaque (círculo vermelho), gema da haste floral ainda coberta pela bráctea.

O ensaio **(A)** teve duração aproximada de 500 dias e a quimioterapia iniciada com o acréscimo de ribavirin foi realizada aos 40 dias de cultivo *in vitro*, havendo um subcultivo aos 20 dias após a inoculação. A avaliação da limpeza viral foi realizada com três amostragens, a primeira aos 360 dias de cultivo, ou seja, 320 dias de quimioterapia. As amostragens foram realizadas assim que houvessem plântulas para iniciar o enraizamento *in vitro*. A segunda amostragem foi realizada aos 450 dias de cultivo e a última aos 490 dias. Sendo coletadas 30 plantas de cada repetição (I, II e III), cada repetição constitui de três explantes inoculados inicialmente, totalizando 90 amostras (Figura 5). Todas as amostras foram indexadas por DAS-ELISA e na segunda houve confirmação de 6 amostras negativas para ambos os vírus por RT-PCR.



Figura 5 – Ordem cronológica das amostragens e da terapia com antiviral do ensaio **(A)**, em dias.

O ensaio **(B)** teve como objetivo avaliar a concentração ideal de ribavirin para composição do meio de cultura. Foi realizado utilizando-se matrizes clonadas, de uma cultivar produzida pela empresa “Long Pride” e cultivada na empresa Vivaflora, com o nome de 44611. Tal cultivar teve sua produção interrompida recentemente em decorrência da infecção por CymMV e ORSV e a resultante incapacidade de produzir mudas saudáveis. Foram realizados quatro tratamentos de 0, 10, 30 e 50 ppm de ribavirin, sendo cada um dividido em três repetições (I, II e III), sendo cada uma constituída de três explantes inoculados inicialmente. O ensaio foi realizado com plantas provenientes da empresa Vivaflora, situada no município de Holambra/SP, e o cultivo *in vitro* foi conduzido no laboratório de micropropagação em Floricultura do Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas. No ensaio **(B)**, 25 matrizes selecionadas foram mantidas em casa de vegetação no IAC, sob tela de sombreamento de 70%, recebendo adubação semanal N: P: K (18:18:18) solúvel em água na concentração 1,0 g/L e irrigadas duas vezes por semana.

Este ensaio teve duração aproximada de 400 dias e a adição de ribavirin foi realizada de maneira idêntica ao ensaio **(A)**, ou seja, após a fase de estabelecimento, que se constitui na diferenciação da gema em uma plântula com folhas visíveis. A avaliação da limpeza viral também foi realizada de maneira análoga, porém esta cultivar obteve melhor resposta ao método de micropropagação, sendo possível realizar a primeira amostragem aos 240 dias de cultivo, ou seja, com 200 dias de quimioterapia. A segunda amostragem foi realizada aos 330 dias de cultivo e terceira aos 380 dias de cultivo. Foram coletadas 10 plântulas de cada repetição (I, II e III), sendo cada uma constituída por três explantes, de cada um dos 4 tratamentos (0, 10, 30 e 50 ppm), totalizando 120 amostras (Figura 6). Todas as amostras foram indexadas por DAS-ELISA, nas duas últimas amostragens houve confirmação de resultados negativos por RT-PCR.



Figura 6 - Ordem cronológica das amostragens e da terapia com antiviral do ensaio (B), em dias.

3.3 - DAS-ELISA

Após serem analisadas 35 plantas para o ensaio **(A)** e 55 para o ensaio **(B)**, visando à detecção dos vírus CymMV e ORSV pelo teste sorológico do tipo “Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (DAS-ELISA) com antissoras da empresa Agdia (Indiana-EUA), foram mantidas como matrizes somente as plantas coinfetadas por ambos os vírus, iniciando-se assim o cultivo *in vitro*. Para a detecção desses vírus, através do teste DAS-ELISA, realizado em três etapas, utilizou-se uma proporção de 0,1 g de folhas para 1,0 ml de tampão de extração, cuja composição é: 1,3 g de Na_2SO_3 , 0,5 ml de Tween 20, 20 g de polivinilpirrolidona solúvel, 0,2 g de NaN_3 , 2 g de albumina de ovo, 0,8 g de NaCl, 0,02 g de KH_2PO_4 , 0,29 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e 0,02 g de KCl, por litro de água destilada, pH 7,4. As folhas foram maceradas e transferidas para micro tubos de 2,0 ml que foram centrifugados por 1 minuto a 10.000 g, sendo então armazenadas em freezer a -20°C . A primeira etapa, ou seja, a sensibilização da placa de DAS-ELISA, consistiu na aplicação de 50 μL de cada

antissoro/pocinho, preparado em tampão de cobertura (1,59 gramas de Na_2CO_3 , 2,93 g de NaHCO_3 e 0,2 NaN_3 por litro, pH 9,6). Após armazenamento a 37°C por duas horas a placa foi lavada três vezes em tampão PBS-Tween (0,8 g de NaCl , 0,02 g de KH_2PO_4 , 0,29 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de KCl , 0,5 ml de Tween 20 por litro). Na segunda etapa foram pipetados 50 μL de extrato vegetal em cada pocinho e a placa levada novamente à estufa por duas horas à 37°C e lavadas com PBS-Tween por três vezes. Os conjugados específicos para cada antissoro foram diluídos (1:200) em tampão conjugado (0,8 g de NaCl ; 0,02 g de KH_2PO_4 , 0,29 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de KCl , 0,5 ml de Tween 20, 2,0 g de soro albumina bovina, 20 g de polivinilpirrolidona solúvel e 0,2 g de NaN_3 por litro, pH 7,4). Na terceira etapa foram aplicados 50 μL /pocinho e incubando-se a placa de DAS-ELISA por duas horas, à 37°C . A revelação foi feita usando o substrato *p*-nitrofenilfosfato, diluído 0,001g:1000 μL em tampão substrato (97 ml de dietanolamina, 0,1 g de MgCl_2 , 0,2 g de NaN_3 /litro, pH 9,8). A placa de DAS-ELISA foi mantida em estufa por cinco minutos a 37°C e a leitura feita em leitor próprio para esse Teste. Os testes foram realizados para selecionar as matrizes coinfectadas por CymMV e ORSV e também, quando as plântulas atingiram tamanho suficiente para serem enraizadas *in vitro*. Os controles positivos e negativos utilizados foram os do próprio kit, sendo consideradas positivas as amostras cuja leitura teve valor mínimo duas vezes superior ao controle negativo. A sensibilidade do DAS-ELISA foi avaliada via diluição em série dos controles positivos fornecidos pela Agdia e de duas amostras coinfectadas pelos vírus CymMV e ORSV.

3.4 – Caracterização de isolados de ORSV e CymMV

3.4.1 – Extração de RNA

O RNA utilizado para caracterização dos vírus foi obtido de uma das matrizes indexadas por DAS-ELISA, com resultado positivo para CymMV e ORSV. A extração foi feita da seguinte maneira: 0,1 g de folha foi macerada em mortar com nitrogênio líquido (N_2) até que se tornasse um pó fino; em seguida adicionou-se 1 ml de Trizol® Reagent (Invitrogen). A amostra foi incubada por 5 minutos e armazenada em micro tubos RNA-free. Após incubação, 200 μL de clorofórmio foram adicionados, agitando-se em seguida para homogeneização, e foi incubada por 3 minutos sendo submetida à centrifugação a 10.000 g, 15 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e transferido para outro micro tubo RNA-free. Foram adicionados 500 μL de álcool isopropílico, sendo incubado por 10 minutos a temperatura ambiente; em seguida foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições. A fase aquosa foi descartada e o precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70%, homogeneizado em vortex e centrifugado a 6.000 g por 5 minutos A

4°C. Em seguida à temperatura ambiente por 15 minutos para a evaporação do álcool. O conteúdo foi ressuspensão em 40 µL de água destilada e deionizada e homogeneizado em vortex. Após, o material foi armazenado em freezer a -80°C.

3.4.2 - RT-PCR

Para realizar RT-PCR para CymMV e ORSV, foi utilizado 1 µL de RNA total, extraído da mesma matriz coinfectada. O RNA foi transferido para micro tubo contendo 1 µL de primer complementar, 50 pmoles/ml. O volume final foi mantido à 70°C por três minutos e mantido em gelo imediatamente após o ciclo. Acrescentou-se 1 µL enzima Transcriptase reversa M-MLV (Promega), 5 µL de tampão (5x) da enzima Transcriptase reversa (Promega) e 200 u/µL (1 µL) da enzima Transcriptase reversa M-MLV (Promega). A mistura foi incubada a 37°C por uma hora. A PCR foi realizada com 5 µL do produto da RT-PC. Foram adicionados 4 µL de enzima Taq-Polimerase (Invitrogen), 10 µL de tampão (recomendado pelo fabricante), 3 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (50mM), 1 µL de dNTPs (2,5 mM), 1 µL de *primer-r* e 1 µL de *primer-f* para cada vírus. O controle negativo da RT-PCR foi obtido substituindo-se o produto da RT-PCR por água. O volume foi completado para 45 µL com água RNA-free. O regime em termociclador PTC100 (MJ Research) constituiu-se de um ciclo a 42°C por 30 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos e 72°C por 55 segundos; finalizando com uma extensão a 72°C por 10 minutos. Os *primers* utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Professor Dr. Jorge Alberto Marques Rezende, Titular do Departamento de Nematologia e Fitopatologia da ESALQ/USP (trabalho ainda não publicado).

3.4.3 – Eletroforese em gel de agarose

Para a realização da eletroforese foram utilizados 10 µL dos produtos obtidos ao final da PCR. Os fragmentos de PCR foram separados em gel de ágarose 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetate-EDTA; Tris: 40 mM, Ácido Acético: 20 mM, EDTA: 1 mM) contendo 3 µL de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.4.4 - Sequenciamento

As bandas foram recortadas e tiveram o seu DNA purificado por kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System da empresa ProMega utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos de DNA purificados foram submetidos a sequenciamento direto pelo método de terminação em cadeia (SANGER *et al.*, 1977),

utilizando o kit Big Dye (Applied Biosystems) e o sequenciador ABI 377 – ABI Prism/Applied Biosystems, conforme instruções do fabricante.

3.5 - Cultivo *in vitro*

3.5.1- Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no protocolo de micropropagação, nomeados nesse trabalho como meio de estabelecimento e multiplicação, e meio de enraizamento; foram elaborados segundo Ichihachi (1997) e modificado por Lee Tseng Sheng Gerald, professor do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar) e cedidos a pedido; sendo o mesmo meio nas etapas de estabelecimento e multiplicação, e utilizando o segundo meio no enraizamento *in vitro*. As composições destes meios estão discriminadas no Apêndice E. Inicialmente, foram colocados 20 ml de meio de multiplicação em tubos de ensaio de 50 ml. Posteriormente, na fase de multiplicação, foram colocados 50 ml em frascos de vidro de 200 ml. Na fase de enraizamento, 50 ml também foram colocados em frascos de 200 ml (Apêndice E). Nas duas primeiras etapas (estabelecimento e multiplicação) foi utilizado o mesmo meio, nomeado neste trabalho como meio de estabelecimento e multiplicação. Na última fase de cultivo *in vitro* (enraizamento), foi utilizado meio específico, nomeado neste trabalho como meio de enraizamento. O preparo dos meios de cultura foi realizado dissolvendo os componentes minerais e orgânicos em metade do volume final, reservando o restante para dissolução do ágar. Nos tratamentos com antiviral, ribavirin foi acrescentado após ajuste do pH para 5,5. Neste trabalho, o antiviral foi acrescentado antes da esterilização dos meios em autoclave, mesmo havendo a possibilidade de acrescentá-lo após, através do uso de filtros Millipore. O antiviral tem eficiência comprovada em ambos os casos (FREITAS, 1996), pois sua temperatura de degradação é de 174-176°C (EMA, 2010). O ágar após ser dissolvido sob ebulição, foi acrescentado aos meios de cultura, sendo os mesmos distribuídos em frascos ou tubos de ensaio, conforme a necessidade. Após a distribuição, foram esterilizados em autoclave a 120°C, a 1 atm, por 20 minutos.

3.5.2 – Fase de Estabelecimento e início da quimioterapia

Visando a micropropagação para a obtenção de mudas, as hastes florais sofreram assepsia antes da inoculação. As hastes foram lavadas com água e sabão por três vezes, empregando-se uma esponja macia, detergente neutro e solução comercial de hipoclorito de sódio (10 ml/L), sendo, em seguida, enxaguadas em água corrente.

Após o último enxágue, feito com água destilada, as hastes foram divididas em segmentos de aproximadamente 3 cm. Cada segmento, contendo um nó, constituiu-se num explante. Para a desinfestação, foram colocadas de 10 a 15 explantes em solução comercial de dióxido de cloro estabilizado em solução aquosa (8%), na concentração de 30 ml/L, sendo acrescentadas três gotas de Tween 20. Os explantes ficaram imersos por 15 minutos e, após esse tempo, sendo enxaguados em água destilada para retirada do excesso de dióxido de cloro. A segunda etapa da assepsia foi realizada sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. Nesta etapa, foi realizada a imersão dos explantes em etanol 70% e em seguida, foi removida a bráctea e excisadas as extremidades do explantes. Após, os explantes foram imersos novamente em solução comercial de dióxido de cloro na concentração de 50 ml/L de água destilada e esterilizada, sendo acrescentadas três gotas de Tween 20; os explantes ficaram imersos nesta solução por 20 minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada e esterilizada, sendo novamente retiradas as extremidades. Após esse procedimento, os explantes foram inoculados na posição vertical em tubos de ensaio, contendo meio de estabelecimento e multiplicação. A inoculação foi realizada mantendo-se a gema em contato com o meio de cultura. Os tubos foram vedados com filme de PVC esticável, sendo levados para sala de crescimento onde foram mantidos sob fotoperíodo de 16h, intensidade luminosa de $40 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e temperatura em $22\pm 2^\circ\text{C}$, permanecendo nestas condições por 20 dias, período suficiente para que se iniciasse a brotação das gemas. Nesse período as brotações se desenvolveram com geotropismo negativo, semelhante a uma haste floral (TANAKA; SAKANISHI, 1978). Após esse período, foi realizado o primeiro subcultivo transferindo-se os explantes para os frascos de vidro, contendo o mesmo meio (de estabelecimento e multiplicação). As operações de transferência, também chamadas de subcultivos, foram realizadas sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, subdividindo as brotações e inoculando os fragmentos em frascos. Os frascos contendo esses fragmentos foram mantidos em sala de crescimento por mais 20 dias, totalizando 40 dias de cultivo *in vitro*. A etapa de estabelecimento se encerra quando ocorre o desenvolvimento do explante, originando um broto com formação de folhas, sem sistema radicular, por morfogênese direta. Nos tratamentos com antiviral, o ribavirin foi acrescentado nesse segundo subcultivo, ou seja, aos 40 dias, sendo o mesmo adicionado ao meio nas concentrações de 10, 30, 40 e 50 ppm conforme os ensaios, determinando o início da quimioterapia e o fim do estabelecimento. Cada concentração do antiviral foi considerada um tratamento e cada tratamento foi composto por três repetições (I, II e III). Cada repetição foi constituída por

três explantes, sendo que cada explante produziu número variável de brotações, entre 3 e 5, após 40 dias de cultivo. Todo o processo pode ser visualizado na Figura 7.

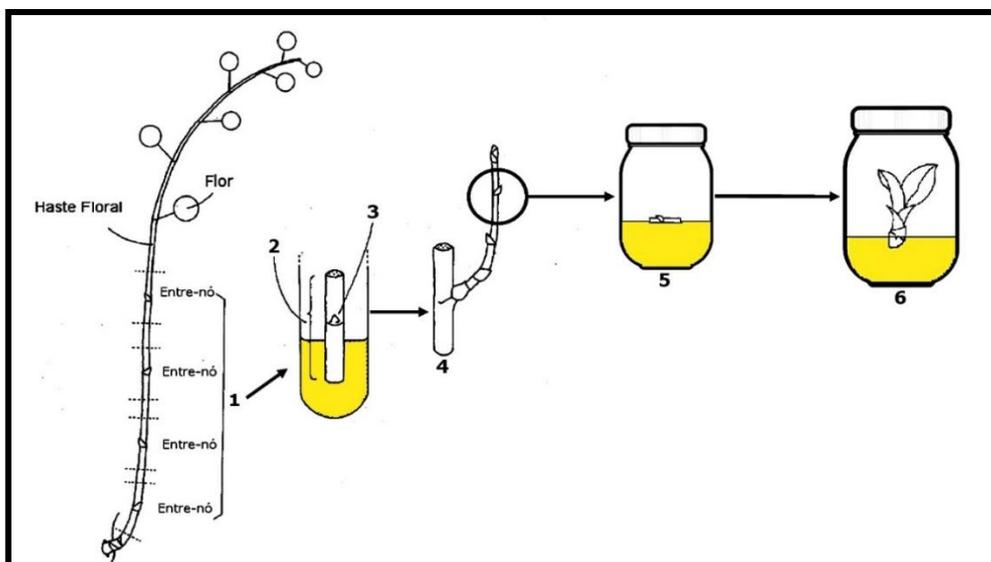


Figura 7- Sequência para a obtenção de plântulas: (1) Haste floral possuindo entre 4-5 nós para o cultivo *in vitro*; (2) secção da haste floral composta por nó e entre-nó; (3) posição da gema no explante; (4) Após 20 dias em sala de crescimento, vendo-se em destaque um nó; (5) Novas brotações subcultivadas individualizadas, na posição horizontal, sob quimioterapia com ribavirin; (6) Após 40 dias de subcultivo, as brotações se desenvolvendo em plântulas - fim da fase de estabelecimento (Imagens adaptadas de TANAKA e SAKANISHI, 1978).

3.5.3 – Multiplicação

O final da etapa de estabelecimento, quando cada brotação se desenvolveu em plântula, coincidiu com o início da quimioterapia em ambos os ensaios, **(A)** e **(B)**, foi adotado o intervalo de tempo de 20 dias entre cada subcultivo. Nesse período as plântulas foram mantidas em sala de crescimento sob condições ideais. Os subcultivos foram realizados individualizando-se cada brotação sendo que as plântulas produzidas foram divididas grosseiramente por tamanho: pequenas (8 plântulas/frasco) e grandes (5 plântulas/frasco). Para o ensaio **(A)** foram necessários 360 dias de cultivo, 18 subcultivos, para obter plântulas com tamanho ideal para o início da etapa de enraizamento, ou seja, com 2-4 folhas de 3 a 5 cm, enquanto que para o ensaio **(B)** foram necessários 240 dias, em idênticas condições. No início do enraizamento foi realizada a primeira amostragem de plântulas, visando avaliar a ação do antiviral, através do teste DAS-ELISA e o intervalo entre os subcultivos passou para 45 dias. As amostragens foram realizadas coletando-se 30 plântulas de cada repetição do único tratamento do ensaio **(A)** e 10 amostras de cada repetição de cada um dos 4 tratamentos do ensaio **(B)**. A segunda amostragem foi realizada 90 dias após a primeira com análise

das plântulas pelos testes DAS-ELISA, 11 plântulas com resultado negativo foram confirmadas por RT-PCR. A terceira amostragem foi realizada 50 dias após a segunda, 16 plântulas com resultados negativos provenientes do ensaio **(B)** foram confirmadas por RT-PCR. Durante a multiplicação foram feitas duas avaliações paralelas aos ensaios principais: **(a)** Avaliar se há regeneração espontânea de plântula livres de vírus sem o acréscimo de antiviral e **(b)** se plântulas expostas a maiores concentrações de antiviral apresentam sinais de fitotoxicidade. Para ambos foram selecionadas plântulas com 100 dias totais de cultivo em meio de estabelecimento e multiplicação sem acréscimo de antiviral; para a primeira avaliação 13 plântulas e suas brotações foram indexadas separadamente por DAS-ELISA e na segunda avaliação as plântulas foram subcultivadas em meio contendo 50, 75 e 100 ppm de ribavirin, avaliadas visualmente para sintomas após 45 dias e indexadas por DAS-ELISA. O esquema da multiplicação está na Figura 8.

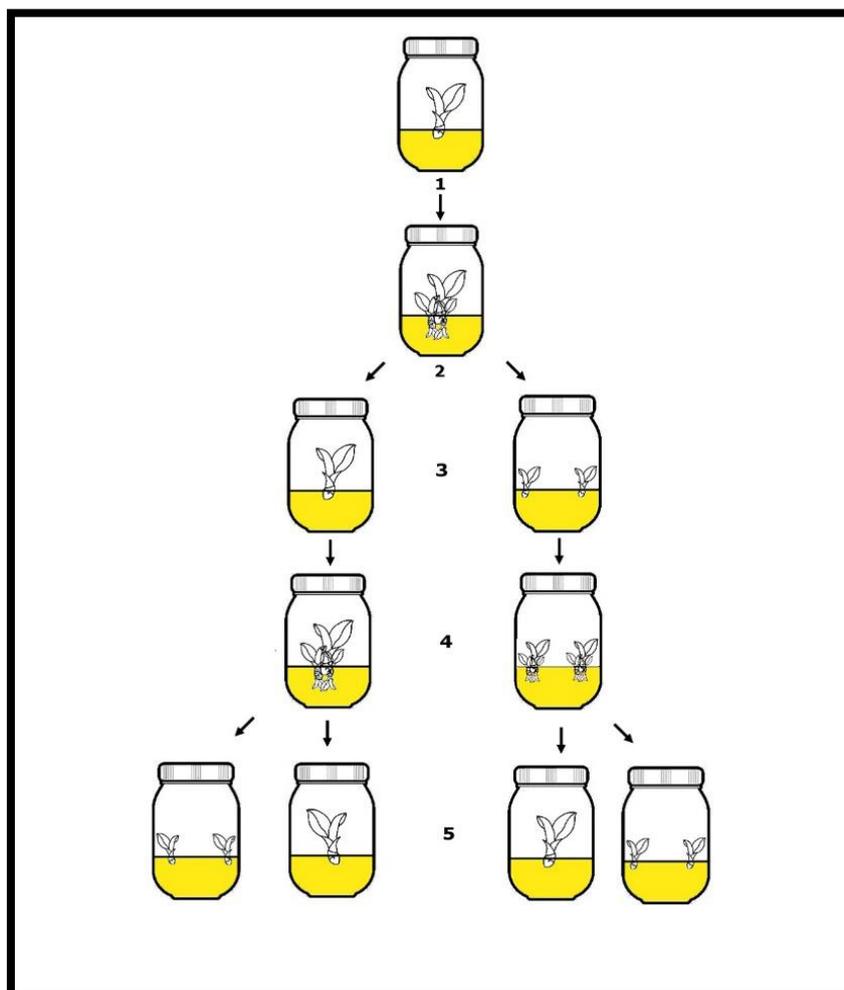


Figura 8 - (1) Plântula única obtida ao final do estabelecimento; (2) Após subcultivo e 20 dias em sala de crescimento, ela desenvolve brotações laterais ou imersas no meio; (3) Divisão grosseira das brotações em pequenas e grandes durante o subcultivo; (4) Após mais 20 dias em sala de cultivo, há formação de novas brotações; (5) Novo subcultivo e divisão das plântulas por tamanho, os subcultivos são realizados até que haja plântulas em tamanho ideal para iniciar enraizamento.

3.3.4 - Enraizamento *in vitro*

Em ambos os ensaios (A e B), o enraizamento *in vitro* constituiu-se na última etapa da micropropagação. O parâmetro utilizado para selecionar indivíduos foram as dimensões foliares e o número de folhas, adotando-se como padrão folhas com aproximadamente 3 cm. Segundo Lee (2011), é recomendado que a micropropagação dure em torno de ao menos 200 dias, ou 10 subcultivos, para que se obtenha um número expressivo de mudas, visando a comercialização. O enraizamento *in vitro* coincidiu com o final da quimioterapia, não sendo adicionado antiviral ao meio de enraizamento utilizado. A etapa de enraizamento tem duração aproximada de 90 dias, período no qual se formam as raízes e ocorre aumento na área foliar das plântulas, sendo necessário um subcultivo aos 45 dias de desenvolvimento; são inoculadas de duas a três plântulas por frasco contendo meio de enraizamento. Pode-se observar o processo na Figura 9. Ao iniciar o enraizamento *in vitro* foram realizadas três amostragens em ambos os ensaios para avaliar a limpeza viral. Na primeira, a indexação foi realizada somente por DAS-ELISA, na segunda e terceira, além do teste sorológico, houve confirmação de resultados negativos em DAS-ELISA por RT-PCR.

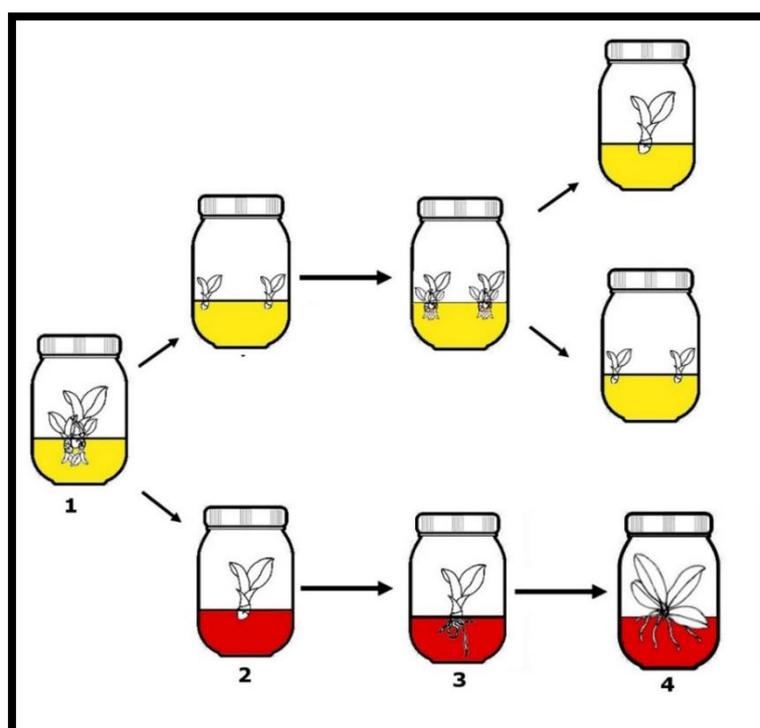


Figura 9 - (1) Após a multiplicação, plântulas com tamanho foliar próximo à 3 cm iniciam o enraizamento *in vitro*; (2) Plântulas selecionadas são subcultivadas em meio de enraizamento, as demais prosseguem em multiplicação; (3) É feito subcultivo aos 45 dias em meio de multiplicação, sendo possível observar o desenvolvimento do sistema radicular; (4) Com mais 45 dias de cultivo, o sistema radicular está plenamente formado e a orquídea está pronta para ser aclimatizada

3.6 – Aclimatização

A etapa de aclimatização é iniciada quando o sistema radicular está desenvolvido e a parte aérea apresentar ao menos 2 folhas com dimensões entre 5 e 8 cm, conforme o padrão comercial (ANTHURA, 2007) e tem duração aproximada de 90 dias, a partir do final do enraizamento *in vitro*. As plântulas foram aclimatizadas em bandejas, envolvendo as raízes em esfagno. A bandeja foi mantida em sala própria para aclimatização, que um microclima bastante úmido. Após aproximadamente um mês, as mudas são individualizadas e transplantadas envolvendo as raízes em esfagno. São realizadas duas regas semanais e adubação, uma vez por semana, com adubo solúvel em água N:P:K (18:18:18), diluído na proporção de 1,0 g/L.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Avaliação do nível de informação sobre as viroses e seu controle, de produtores paulistas de *Phalaenopsis*, por meio de questionário

Os resultados do questionário submetido aos produtores podem ser vistos na Tabela 3. Esses dados mostram que, em relação à produção de mudas, 50% dos entrevistados possuem biofábrica na sua propriedade, mas 25% relataram que também compram mudas de empresas especializadas, complementando a sua produção. Daqueles que não possuem biofábrica e adquirem a totalidade das mudas, mais de 50% importam principalmente da Holanda, sendo a maioria adquirida com atestado de fitossanidade, ou seja, isentas de vírus. O restante importa mudas produzidas em países asiáticos, tais como Índia, Tailândia e Taiwan, sendo que, na maioria, essas mudas são primeiramente remetidas à Holanda e posteriormente revendidas a outros países, incluindo o Brasil. As mudas asiáticas têm um custo menor em decorrência da não indexação viral. Ao adquirir esse tipo de muda, os produtores brasileiros correm o risco de estar introduzindo as viroses desde as etapas iniciais do cultivo, comprometendo totalmente a produção.

As empresas exportadoras holandesas separam as mudas em duas categorias: **(a)** isentas de vírus e **(b)** possivelmente infectadas. No primeiro caso, se os patógenos são detectados, há possibilidade de reembolso. Do total, apenas 20% dos produtores entrevistados obtêm suas mudas de empresas nacionais, apesar de não confirmarem se possuem atestado de fitossanidade. Como o mercado brasileiro não é exigente, as plantas infectadas são comercializadas mesmo assim, mas alcançam valor inferior em relação às aquelas produzidas a partir de mudas certificadas. É dessa maneira que as viroses são perpetuadas nos cultivos comerciais.

Como existe a convivência dos produtores brasileiros com essa prática, 90% tinham ciência e reconheceram os sintomas, associando-os aos patógenos. Nenhum entrevistado, porém, conhecia especificamente os sintomas causados pelos vírus ORSV e CymMV, classificando-os como sintomas de viroses em geral. Em caso de plantas sintomáticas, 40% dos produtores as mantêm na casa de vegetação; o que pode acarretar em potencial fonte de inóculo para as orquídeas sadias. Ainda, 80% relataram ter conhecimento sobre o modo de disseminação, porém não houve consenso em relação à importância e aos métodos de assepsia, talvez por falta de informação. A preocupação mais comum foi com a existência de insetos vetores nas estufas, induzindo-os à instalação de telas protetoras, o que é realizado por 60% dos

entrevistados. Foi relatado apenas um caso de reutilização de substrato, mas o produtor empregava a esterilização com vapor d'água; sabe-se que tal procedimento elimina alguns patógenos, porém CymMV e ORSV são bastante estáveis e provavelmente resistem a esse tratamento. Vasos são reutilizados por 40% dos entrevistados, e destes, metade não promove a assepsia.

Foi relatado que algumas cultivares apresentam maior susceptibilidade às infecções virais ou, ao menos, apresentam sintomas e perdem vigor rapidamente. Essa susceptibilidade é mais notada durante o período de indução floral, que é consequência da diminuição da temperatura, induzida artificialmente ou decorrente do clima, dependendo do produtor. Por ser em período tão próximo à comercialização o prejuízo se torna bastante significativo pelo tempo que os vegetais permaneceram em cultivo. Em alguns casos pode ocorrer o descarte, quando o mercado não absorve essas plantas, sendo que a diferença de preço pode atingir 25% do valor total ou mais. Outra questão relatada foi relativa à presença de bactérias fitopatogênicas, em especial *Erwinia* spp. (Apêndice D), podendo levar à perda total em uma estufa. Em relação à compra de mudas, foi relatado que a diferença de preço entre as produzidas em países asiáticos e o custo de produzir mudas no Brasil leva os produtores a cessar a produção de mudas, fechando suas biofábricas e adquirir mudas importadas.

A produção de vasos e de flores de orquídeas vêm crescendo bastante no Brasil, nos últimos anos, porém o nível de tecnificação dos produtores ainda é baixo. Enquanto alguns empregam técnicas adequadas de cultivo e gerenciamento, outros, normalmente pequenos produtores, empregam mão-de-obra familiar e detém pouco conhecimento de métodos preventivos contra patógenos de modo geral. As práticas culturais inadequadas ou insuficientes evidenciadas por meio deste trabalho apontam o motivo para CymMV e ORSV serem encontrados em todo o estado de São Paulo atualmente. Deve ser salientado que, por parte das autoridades, não existe fiscalização nem referente à importação e nem mesmo quanto à instalação de viveiros e produção de mudas, sendo que a legislação também não atende as necessidades de se promover maior controle dessas doenças.

Por parte dos produtores e dos laboratórios de produção de mudas, deveria ser feita maior ingerência sobre o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para que se criem leis e normas mais rígidas para a importação e para a produção de mudas de orquídeas, bem como disponibilizar aos produtores informações e medidas de controle que, num primeiro momento, ao menos amenizem o problema.

Ao todo foram entrevistados 10 produtores estando distribuídos pelas cidades de Holambra, três produtores, e Atibaia, Artur Nogueira, Arujá, Ibiúna, Itu, Mogi das Cruzes e São José dos Campos, um produtor cada. A localização das cidades encontra-se na Figura 10. Em visita as unidades produtoras foram encontrados outros sintomas de infecção, que estão dispostos no Apêndice C.

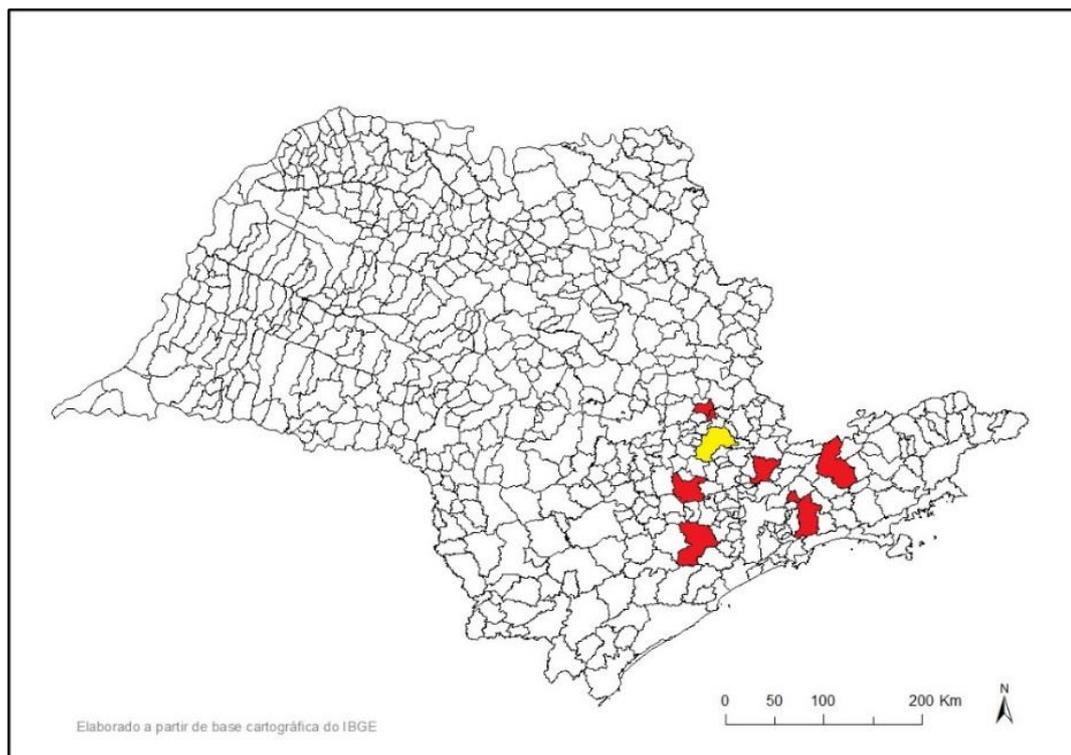


Figura 10 - Mapa do Estado de São Paulo. Em vermelho estão os municípios de Artur Nogueira, Arujá, Atibaia, Holambra, Ibiúna, Mogi das Cruzes e São José dos Campos; correspondentes aos produtores entrevistados. Em Amarelo está Campinas onde é localizado o CEASA. Ao todo foram entrevistados 10 produtores.

Tabela 3 - Respostas do questionário que avaliou o nível de conhecimento dos produtores de orquídeas no Estado de São Paulo, sobre a ocorrência, detecção e medidas profiláticas no controle de fitovirose.

| Perguntas | Resultados |
|---|----------------------------------|
| Possuem biofábrica | (5/10) |
| Compram mudas de empresas nacionais | (2/10) |
| Número de cultivares | Variável entre 5 e 30 |
| Tem conhecimento sobre fitovirus | (9/10) |
| Conhece o método de disseminação | (4/10) |
| Existem plantas sintomáticas na empresa | (6/10) |
| Percebe susceptibilidade nas cultivares | (8/10) |
| Conhece ORSV e CymMV | (0/10) |
| Descarte de plantas infectadas | (6/10) |
| | (3/10) etanol |
| | (0/10) sódio |
| Desinfecção de ferramentas | (0/10) térmico |
| | (3/10) outros compostos |
| | (4/10) sem desinfecção |
| Tela contra inseto | (6/10) |
| | (0/10) autoclavagem |
| Manejo de substrato | (1/10) reutilização* |
| | (9/10) descarte |
| | (2/10) reutilização com assepsia |
| Manejo de vasos | (2/10) reutilização** |
| | (6/10) descarte |
| Treinamento de pessoal | (6/10) |
| Treino envolve Fitossanidade | (4/10) |
| Manejo de vegetais*** | (6/10) por grupos separados |
| | (4/10) conforme necessidade |
| Estima em perda pelas viroses**** | Entre 1 e 30% |

*Reutilização de substratos feita após esterilização em caldeira.

**Não responderam sobre processo de limpeza.

***Grupos manejados por idade, estufa ou dia de trabalho.

**** Muitos produtores não souberam estimar suas perdas exclusivamente por viroses.

4.2 - Indexação de matrizes

Das orquídeas indexadas no ensaio **(A)**, 11,42% apresentaram resultados positivos para ORSV, 42,85% para CymMV e 17,14% de infecção mista. No ensaio **(B)**, os índices de infecção foram: 21,81% para ORSV, 14,54% para CymMV e 50,90% de infecção mista. Ao todo, 90 *Phalaenopsis* foram indexadas. Somente 18,89% das orquídeas tiveram resultado negativo para ambos os vírus. Entre as infectadas 34 estavam coinfectadas, correspondendo a 37,78% do total, sendo estas selecionadas como as matrizes de ambos os ensaios *in vitro*. Essas porcentagens reforçam os dados obtidos por Freitas (1996), de um levantamento sobre a incidência de viroses em orquídeas cultivadas, mostrando que há uma prevalência de CymMV, próxima a 11%, no Estado de São Paulo, em relação às outras viroses.

Em estudo semelhante, realizado por Moraes (2013), foram constatados índices de 71,16% para CymMV e de 15,85% para ORSV. Entre as plantas infectadas por ORSV, 65,57% estavam simultaneamente infectadas por CymMV. Ainda neste levantamento, outras viroses como CMV (*Cucumber mosaic cucumovirus*) e CymRSV (*Cymbidium ringspot tombus virus*) não foram detectadas, porém algumas plantas analisadas encontravam-se infectadas por OFV (*Orchid fleck virus*), provenientes das regiões de Atibaia e Piracicaba.

O drástico aumento na incidência de CymMV e ORSV pode ser justificado pelo aumento na produção de orquídeas na década passada, em especial de cultivares de *Phalaenopsis* (CHONE, 2005). Além de falhas na fiscalização do comércio e transporte de vegetais pelo Estado, a importação de mudas sem atestado de sanidade pode ter contribuído para a disseminação desses patógenos.

A indexação das matrizes utilizadas neste trabalho confirma a situação atual dessas viroses. Os resultados do DAS-ELISA estão discriminados na Tabela 4, os resultados em detalhes estão no Apêndice G.

Tabela 4 - Resultados da indexação por meio de DAS-ELISA para os ensaios (A) e (B) visando identificar matrizes coinfectadas por ORSV e CymMV

| | ORSV (%) | CymMV (%) | Coinfectadas (%) | Negativo (%) | Amostragem* |
|-------------------|-------------|-------------|------------------|--------------|-------------|
| Ensaio (A) | 4 (11,42%) | 15(42,85%) | 6(17,14%) | 10 (28,59%) | 35 |
| Ensaio (B) | 12 (21,81%) | 8 (14,54%) | 28(50,90%) | 7 (12,75%) | 55 |
| TOTAL | 16 (17,78%) | 23 (25,55%) | 34 (37,78%) | 17 (18,89%) | 90 |

Legenda - * Total de plantas analisadas por DAS-ELISA nas estufas

4.3 - Caracterização de isolados de ORSV e CymMV

A seleção de matrizes por DAS-ELISA específico para CymMV e ORSV obteve resultados positivos para a presença de ambos, o RNA de uma orquídea coinfectedada foi extraído. Quando realizada RT-PCR, do RNA extraído previamente, com oligonucleotídeos complementares específicos para CymMV e ORSV, foi possível visualizar, em gel de ágarose (0,75%) sob luz ultravioleta, as bandas correspondentes ao tamanho esperado (681 bp para CymMV; 218 bp para ORSV). O sequenciamento das bandas obteve fragmentos da sequência de cDNA de ambos os vírus que ao serem comparadas com sequências já depositadas no “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) resultaram em índices de identidade superiores à 95% para ambos, confirmando desse modo a identidade dos vírus nesse trabalho. Os resultados do sequenciamento estão no Apêndice F.

4.4 - Cultivo *in vitro*

4.4.1 – Estabelecimento

Hastes das plantas indexadas positivamente para infecção mista de CymMV e ORSV foram coletadas, possuindo gemas em número variável de três a sete (Figura 11). Cada explante, constituído de uma gema ainda presa à um fragmento da haste floral, produziu de 2 a 5 brotações após ser inoculado e passar 20 dias em sala de crescimento sob condições ideais. Em *Phalaenopsis*, a posição da gema influencia o tipo de desenvolvimento. Gemas próximas a base tendem a crescer vegetativamente, formando uma nova planta, enquanto gemas próximas ao ápice tendem a crescer reprodutivamente, formando uma nova haste (URATA; IWAGANAGA, 1965; KOCH, 1974).

Neste experimento, tais tendências de crescimento observadas por outros autores não foram observadas. Durante o estabelecimento poucas gemas permaneceram dormentes, não prejudicando a fase inicial de cultivo e nenhuma teve crescimento vegetativo (formação de uma nova planta). Todavia, alguns entre-nós mais velhos, próximos ao ponto de inserção da haste na folha não apresentaram gemas após remoção da bráctea, portanto inúteis para iniciar o cultivo. Balilashak, *et al.* (2014) utilizando concentrações de 4.4 mg e 5 mg de BAP e mantendo NAA a 1 mg obtiveram maior índice de crescimento reprodutivo, independentemente da posição da gema na haste. Os autores concluem que a concentração de hormônios utilizada possui

capacidade de regenerar as gemas dormentes eliminando a influência da posição, fato já observado por Arditti (2008), o que justifica o comportamento dos explantes inoculados neste trabalho.

O tipo de explante, considerado grande em cultura de tecidos vegetais (aproximadamente 0,5 cm) é inoculado ainda preso à haste, possuindo xilema e floema desenvolvidos, o que não ocorre no cultivo de meristemas apicais. A presença do sistema vascular ocasiona, além do transporte dos vírus para o cultivo, a presença de bactérias endofíticas, dificultando o estabelecimento dos explantes por serem fontes de contaminação, gerando perdas de até 20% do material inoculado neste trabalho. O uso de meristemas, apesar de aplicado com sucesso para outros gêneros de orquídeas, não possui uso comum em *Phalaenopsis* devido à fragilidade do tecido neste gênero, difícil extração e alta taxa de oxidação. Termoterapia não possui uso comum em orquídeas, pois os explantes normalmente não sobrevivem ao tratamento, CymMV e ORSV em particular são bastante estáveis e provavelmente teriam dificuldades na eliminação por este método.

As brotações geradas após 20 dias em sala de crescimento foram subcultivadas no mesmo meio, e após mais 20 dias desenvolveram folíolos. Nesse período, 40 dias após a instalação do experimento, iniciou-se a quimioterapia na concentração de 40 ppm no ensaio **(A)** e de 0, 10, 30 e 50 ppm no ensaio **(B)**. Após 40 dias do início de ambos os ensaios foi possível visualizar a presença de folíolos, indicando a diferenciação do broto em uma nova plântula o que determina o fim da etapa o fim do estabelecimento *in vitro* e o início da etapa de multiplicação (Figura 12).



Figura 11 – (1) Haste de *Phalaenopsis* contendo 4 gemas, em destaque nos círculos vermelhos; (2) Seções de haste, em torno de 5 cm, antes de serem levadas ao fluxo laminar; (3) Frascos contendo em torno de 15 seções de haste em solução desinfetante (50ml/L de dióxido de cloro); (4) Haste após inoculação em tubo de ensaio de base reta, a gema está em destaque no círculo vermelho; após ser mantida por 20 dias em sala de crescimento apresentará crescimento reprodutivo.

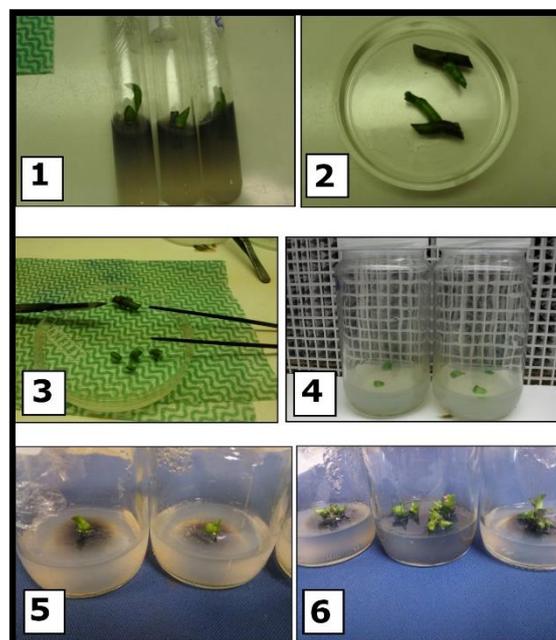


Figura 12 – (1) Hastes apresentando crescimento reprodutivo após 20 dias em sala de crescimento; (2) Hastes com 20 dias de crescimento dispostas em placas de Petri; (3) Brotações das hastes segmentadas; (4) Brotações individualizadas dispostas horizontalmente em frascos; (5) Após 20 dias de crescimento, é perceptível a formação de fólíolos; (6) Multiplicação das brotações originais, após mais 20 dias em sala de crescimento;

4.4.2 - Multiplicação

As brotações ao serem subcultivadas e mantidas em sala de crescimento por 20 dias desenvolvem-se em plantas únicas, encerrando a fase de estabelecimento e iniciando a multiplicação. O uso de meio de estabelecimento e multiplicação no segundo subcultivo das plantas únicas obtidas induz a formação de brotações laterais ou imersas no meio, em números variados de 2 a 5 brotações. Algumas não multiplicaram no segundo subcultivo, mas todas apresentaram crescimento foliar, e nos subcultivos posteriores todas multiplicaram.

Até o quarto subcultivo ocorreram perdas expressivas por bactérias endofíticas, estabilizando entre 5-10% nas manipulações seguintes. Durante todos os subcultivos observou-se que a base do vegetal se torna escura e oxidada, devendo ser excisada. Como é a região em que se encontram as brotações, estas também devem ter a base cortada, caso oxidadas, ao serem individualizadas.

O intervalo de 20 dias entre os subcultivos é suficiente para que haja acúmulo de compostos fenólicos no meio de cultura, tornando-o escuro; também é perceptível seu ressecamento. O acúmulo de fenóis é prejudicial ao crescimento do vegetal, por esta razão torna-se necessário o subcultivo. Carvão ativado é normalmente utilizado para complexar compostos fenólicos, pois adsorve os exsudados (CHUGH *et al.*, 2009). Optou-se em não o utilizar já que pode interferir com outros componentes do meio nutritivo e estimular a formação de raízes, indesejável nesta etapa (CHUGH *et al.*, 2009). Tanaka e Sakinishi (1978) relataram que o uso de carvão ativado pode inibir a multiplicação.

Em ambos os ensaios o padrão de crescimento foi idêntico, com brotações ocorrendo na região de contato com o meio nutritivo (Figura 13). A taxa de multiplicação é a razão entre as novas brotações e o número de plântulas originais, se mostrou bastante próxima em todos os tratamentos e repetições de ambos os ensaios e está discriminada na Tabela 5. Os resultados obtidos demonstram a eficiência do protocolo e dos meios de cultura utilizados. Kosir, *et al.* (2004), ao comparar seis diferentes meios de cultura que empregam o mesmo tipo de explante, obtiveram em seu melhor resultado, taxa de multiplicação de 0,54; neste trabalho foram entre 0,77 e 4,2 (Tabela 5). Os autores, após 160 dias de cultivo, conseguiram 117 plântulas das quais apenas 7 apresentavam raízes. A taxa média de multiplicação, considerando todos os tratamentos e repetições, neste trabalho foi de 2,31. O único tratamento com efeito

fitotóxico notável foi o de 50 ppm, a repetição II apresentou necrose nas plântulas em número prejudicial ao cultivo.

Tabela 5 – Número de plântulas obtidas ao final do experimento em ambos os ensaios e taxa de multiplicação entre repetições

| Repetições | Ensaio (A) | Ensaio (B) | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | 40 ppm (TM) | 0 ppm (TM) | 10 ppm (TM) | 30 ppm (TM) | 50 ppm (TM) |
| I | 184 (1,64) | 54 (1,35) | 39 (2,20) | 47 (1,34) | 31 (1,03) |
| II | 36 (1,43) | 90 (2,25) | 35 (1,75) | 108 (2,16) | 31 (0,77) |
| III | 80 (1,64) | 21(4,20) | 19 (1,90) | 96(1,92) | 57 (2,22) |
| Total | 300 | 165 | 93 | 251 | 119 |

Legenda – TM: Taxa de Multiplicação

$$\text{Taxa de multiplicação (TM)} = \frac{\text{Número de plantas novas}}{\text{Número de plantas originais}}$$

Foi realizada análise estatística do tipo teste Tukey para delineamento inteiramente casualizado (DIC) para avaliar se há diferença significativa da multiplicação conforme o acréscimo de antiviral. Apesar de se observar uma redução aparente entre os tratamentos, não houve diferença significativa entre as taxas de multiplicação dos tratamentos (Tabela 6). Conclui-se que até a concentração de 50 ppm o ribavirin pode ser utilizado sem prejuízo ao cultivo.

Tabela 6 – Resultado do teste de Tukey aplicado às taxas de multiplicação de ambos os ensaios

| Ensaio (A) | Ensaio (B) | | | |
|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 40 ppm | 0 ppm | 10 ppm | 30 ppm | 50 ppm |
| 1.57000 a | 2.60000 a | 1.95000 a | 1.80667 a | 1.34000 a |

Legenda - As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p > 0.05$.)

Durante a multiplicação, 13 plantas regeneradas, provenientes do ensaio (B) com 100 dias totais de cultivo, foram avaliadas por DAS-ELISA, visando identificar se não há produção de plantas livres de CymMV e ORSV sem acréscimo de antiviral. O número de brotações assim como as suas dimensões diferiram (Figura 13-2). As brotações estão identificadas pela letra “B”. Não houve amostras livres de quaisquer um dos dois vírus estudados, como esperado, sendo consideradas negativas as leituras inferiores a 0,200 nm. Esse resultado confirma a hipótese de que resultados obtidos na avaliação da limpeza viral entre os tratamentos decorrem exclusivamente da influência de ribavirin no meio de cultura (Tabela 7).

Tabela 7 – Indexação por DAS-ELISA de plântulas e suas brotações após 100 dias de cultivo *in vitro*, visando detectar a regeneração de plantas limpas na ausência de antiviral

| Plântula | Broto | ORSV | CymMV |
|-----------|-------|-------------|-----------|
| 1 | | (+)0.602 | (+)1.144 |
| | B1 | (+)0.745 | (+) 1.183 |
| 2 | | (+)0.577 | (+) 0.887 |
| | B1 | (+)0.253 | (+)1.187 |
| | B2 | (+)0.308 | (+)0.870 |
| 3 | | (+)0.799 | (+)0.873 |
| | B1 | (+)0.513 | (+)0.986 |
| | B2 | (+)0.863 | (+)0.722 |
| | B3 | (+)0.287 | (+)0.809 |
| 4 | | (+)0.481 | (+)0.833 |
| | B1 | (+)0.212 | (+)0.943 |
| 5 | | (+)0.203 | (+)0.937 |
| | B1 | (+)0.296 | (+)0.963 |
| | B2 | (+)0.548 | (+)0.790 |
| 6 | | (+)0.242 | (+)0.762 |
| | B1 | (+)0.309 | (+)0.603 |
| 7 | | (+)0.504 | (+)0.770 |
| | B1 | (+)0.432 | (+)0.949 |
| | B2 | (+)0.637 | (+)0.692 |
| | B3 | (+)0.407 | (+)0.723 |
| | B4 | (+)0.736 | (+)0.820 |
| 8 | | (+)0.427 | (+)0.565 |
| | B1 | (+)0.469 | (+)0.790 |
| | B2 | (+)0.372 | (+)0.728 |
| 9 | | (+)0.832 | (+)0.780 |
| | B1 | (+)0.958 | (+)0.733 |
| | B2 | (+)1.459 | (+)0.770 |
| 10 | | (+)0.405 | (+)0.787 |
| | B1 | (+)0.852 | (+)0.754 |
| | B2 | (+)0.894 | (+)0.710 |
| | B3 | (+)0.746 | (+)0.563 |
| 11 | | (+)0.852 | (+)0.757 |
| | B1 | (+)0.771 | (+)0.855 |
| 12 | | (+)0.733 | (+)0.730 |
| | B1 | (+)0.599 | (+)0.745 |
| 13 | | (+)0.526 | (+)0.572 |
| | B1 | (+)0.790 | (+)0.843 |
| | B2 | (+)0.815 | (+)0.744 |
| CymMV (+) | | 0.252-0.449 | |
| CymMV (-) | | 0.042 | |
| ORSV (+) | | 0.536-0.580 | |
| ORSV (-) | | 0.021-0.038 | |
| Branco | | 0.01-0.074 | |

Chien, *et al.* (2015), que fez uso de meristema apical de *Phalaenopsis* para regenerar PLBs e, dentre eles, nem todos estavam infectados. Através de indexação por DAS-ELISA e RT-PCR foi possível selecionar protocormos não infectados, que podem ser cultivados para se conseguir plântulas livres de vírus. Os autores fizeram uma ressalva, porém, pois os vírus apresentam um período de incubação, necessitando de sucessivas indexações para se obter PLBs livres de vírus. Os pontos negativos de tal metodologia são as grandes perdas durante a fase inicial devido à morte de explantes, que somada à morte das matrizes pode inviabilizar a implantação.

Para avaliar a fitotoxicidade, um total de 14 plântulas com 100 dias totais de cultivo sem acréscimo de antiviral foram subcultivadas em maiores concentrações de ribavirin. As concentrações utilizadas foram de 50 ppm (4 plântulas), 75 ppm (5 plântulas) e 100 ppm (5 plântulas), e o tempo de 45 dias para todos. Ao final, foi realizada indexação por DAS-ELISA, os resultados estão dispostos na Tabela 8.

As plântulas mantidas em tais condições, apesar de continuarem infectadas por ambos os vírus, não demonstraram sinais de fitotoxidez. Indicando que após ser formada a parte aérea, elas podem sobreviver a maiores concentrações do antiviral.

Tabela 8 – Indexação de 14 plântulas com 100 dias de cultivo ao final de 45 dias sob ação de 50, 75 e 100 ppm de ribavirin

| Tratamento | | ORSV | CymMV |
|------------|---|-------------|-----------|
| 50 ppm | 1 | (+) 0.948 | (+)1.223 |
| | 2 | (+) 0.857 | (+) 1.048 |
| | 3 | (+) 0.854 | (+) 0.967 |
| | 4 | (+)0.844 | (+) 1.152 |
| 75 ppm | 1 | (+) 0.832 | (+) 1.052 |
| | 2 | (+) 0.762 | (+) 0.894 |
| | 3 | (+) 0.917 | (+) 1.014 |
| | 4 | (+) 1.097 | (+) 0.444 |
| | 5 | (+) 0.942 | (+) 1.087 |
| 100 ppm | 1 | (+) 0.952 | (+) 1.275 |
| | 2 | (+) 0.784 | (+) 1.041 |
| | 3 | (+) 0.897 | (+) 0.839 |
| | 4 | (+) 0.887 | (+) 1.156 |
| | 5 | (+) 0.907 | (+) 1.156 |
| CymMV (+) | | 0.257-0.895 | |
| CymMV (-) | | 0.002-0.006 | |
| ORSV (+) | | 0.468-0.782 | |
| ORSV (-) | | 0.022-0.028 | |
| Branco | | 0.002-0.109 | |

A primeira amostragem para avaliação da limpeza viral foi realizada ao haver disponibilidade de plântulas para o início do enraizamento *in vitro*. O padrão comercial é de folhas em torno de 3 cm (ANTHURA, 2009). O tempo para obtenção de plântulas nessas condições diferiu, sendo de 360 dias para o ensaio **(A)**, ou seja, 320 dias de quimioterapia; e de 240 dias para o ensaio **(B)**, ou seja, 200 dias de quimioterapia; provavelmente por diferenças das próprias cultivares.

Ao final do experimento foram obtidas um total de 928 plântulas, utilizando-se 45 gemas inoculadas; uma produção média de 20,6 plântulas/gemas; quando somados os dois ensaios e todos os tratamentos.

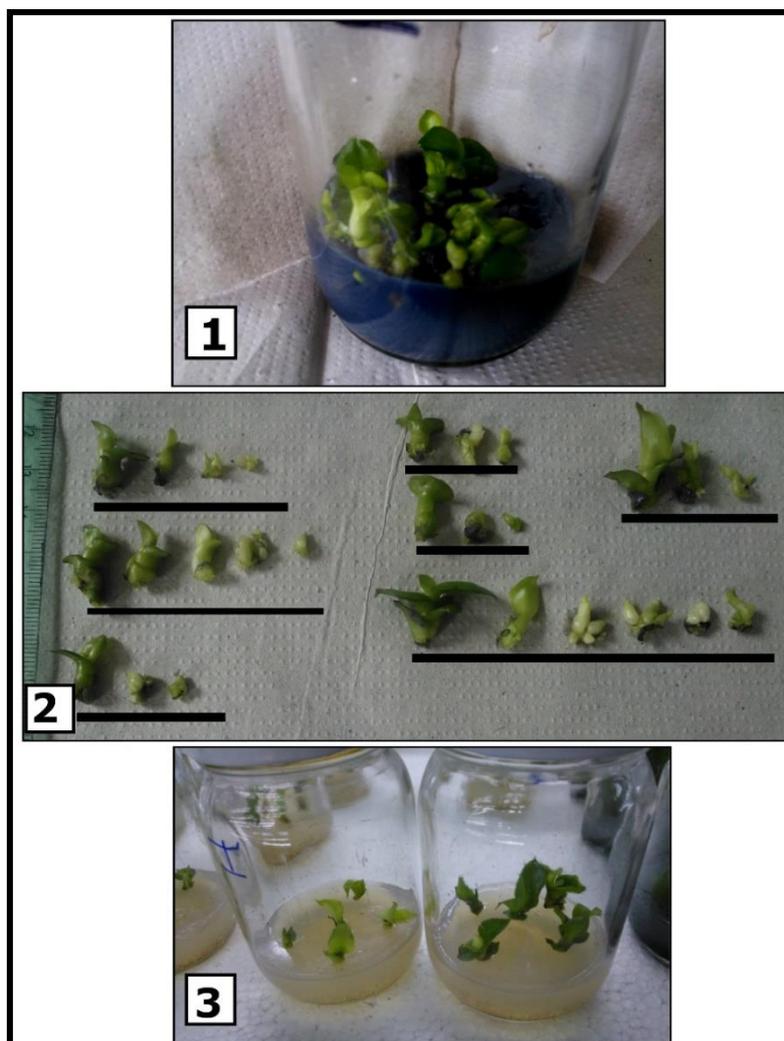


Figura 13 – (1) Plântulas de *Phalaenopsis* após 100 dias em estágio de multiplicação; (2) Plântulas e brotações indexadas visando identificar plantas limpas na ausência de antiviral; (3) Brotações após o subcultivo separadas por tamanho, frasco com brotações pequenas a esquerda e grandes a direita.

4.4.3 – Enraizamento *in vitro*

Para o ensaio **(A)** foram obtidas 11 plântulas em tamanho ideal para iniciar o enraizamento *in vitro* aos 360 dias de cultivo; no caso do ensaio **(B)** em 240 dias foi possível selecionar 22 plântulas. Esses tempos de cultivo marcaram a primeira amostragem para avaliação a limpeza viral e o tempo entre subcultivos alterado para 45 dias, visando maior desenvolvimento da parte aérea. Nos subcultivos seguintes foram obtidas entre 10-15 plântulas de tamanho ideal para iniciar o enraizamento *in vitro*, quando somados os tratamentos. Não houve acréscimo de ribavirin ao meio de enraizamento, marcando também o término da quimioterapia

Após 45 dias em meio de enraizamento, o sistema radicular iniciou o seu crescimento, porém as plântulas foram mantidas por mais 45 dias, totalizando 90 dias, visando estimular um crescimento adequado para suportar a próxima etapa, de aclimatização.

Esse protocolo provou ser eficiente para obtenção de mudas vigorosas com folhas de até 5 cm e 2 a 4 raízes de comprimento entre 3 a 5 cm, estando em concordância com o padrão comercial para comercialização de mudas de *Phalaenopsis* (ANTHURA, 2007).

A preferência em manter plântulas em quimioterapia resultou em apenas 100 plântulas em enraizamento *in vitro*, ao final do experimento. Porém a eficiência do método de micropropagação foi comprovada pelo desenvolvimento das plântulas, ao final do trabalho, em mudas plenamente formadas, como pode ser observado na Figura 14 abaixo. Não houve diferença no desenvolvimento do sistema radicular das plântulas, independentemente da concentração de antiviral utilizada em sua multiplicação.

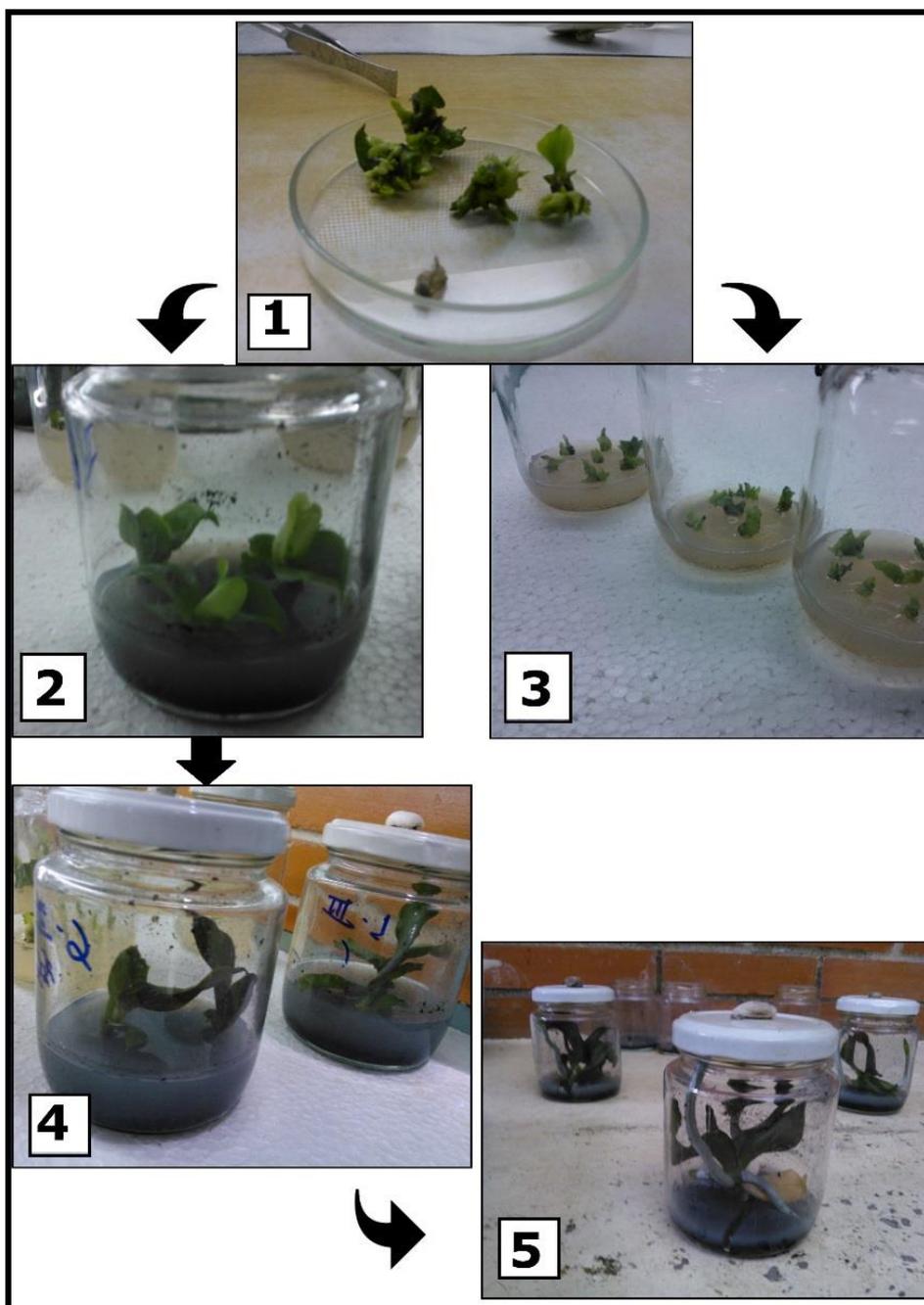


Figura 14 – De (1)→(2): Seleção de plântulas com folhas de aproximadamente 3 cm para início do enraizamento *in vitro*; de (1) →(3): Plântulas não aptas para iniciar o enraizamento *in vitro* prosseguem em meio de estabelecimento e multiplicação; de (2) →(4): Após 45 dias em sala de crescimento é perceptível o alongamento foliar, porém as raízes necessitam de um subcultivo e outros 45 dias em sala de crescimento (4)→(5) Após 90 dias totais de enraizamento *in vitro*, e com sistema radicular plenamente formado as plântulas estão aptas a iniciar a aclimatização;

4.4.4 – Aclimatização

Ao final de 450 dias de cultivo *in vitro* 30 plântulas foram aclimatadas no ensaio (A). A aclimatização foi realizada em sala especializada da *Perfect Liberty* que possui umidade elevada. As raízes das mudas devem ser limpas, retirando qualquer resto de meio de cultura para que não cresçam fungos. Elas foram envolvidas em esfagno e depositadas em bandejas subdivididas; o manejo de duas regas semanais e adubação do tipo N:P:K (18;18;18) acompanhando uma delas. As mudas apresentaram de duas a quatro raízes com tamanho entre 2 e 6 cm e folhas de 3 a 5 cm (Figura 15).

Apesar do número pouco expressivo de plantas, resultado da preferência por um longo período de quimioterapia, ou seja, em multiplicação; sua boa qualidade associada ao número e tamanho de raízes atestam que o método de cultivo é adequado para qualquer produtor que o utilize.

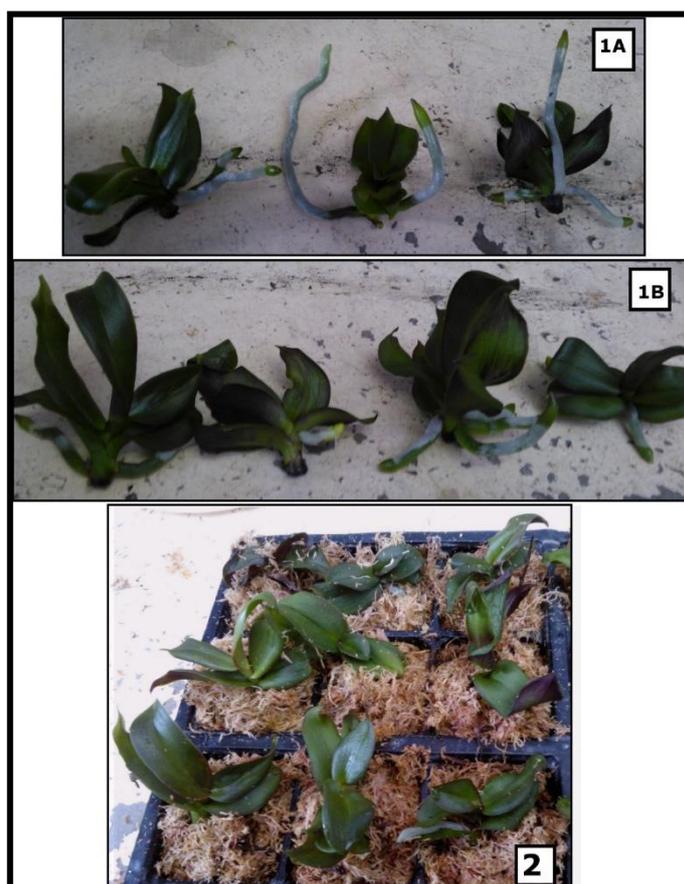


Figura 15 – Plântulas no início da etapa de aclimatização em (1A e 1B) apresentando sistema radicular com 2 a 4 raízes e área foliar de até 5 cm; (2) Plântulas em bandeja subdivididas em células, indicada para a etapa de aclimatização, mostrando o sistema radicular envolto em esfagno.

4.5 - Avaliação da limpeza viral

A primeira coleta foi realizada após 360 dias do início do cultivo *in vitro*, 300 dias de quimioterapia, para o ensaio **(A)**, e 240 dias, 200 dias de quimioterapia, após o início do ensaio **(B)**; de modo que algumas plântulas atingissem desenvolvimento ideal para início de enraizamento *in vitro*. Durante todo o experimento foi priorizada a manutenção de plântulas em estágio de multiplicação, ou seja, em quimioterapia, resultando em poucas plântulas no tamanho estimado.

A amostragem para o ensaio **(A)** foi realizada coletando-se 30 plântulas de cada repetição (I, II e III) do único tratamento (40 ppm); totalizando 90 plântulas. Para o ensaio **(B)**, de cada tratamento (0, 10, 30 e 50 ppm) foram coletadas 10 plântulas de cada repetição (I, II e III); totalizando 120 plântulas.

A primeira avaliação da limpeza viral, assim como a seleção de matrizes, foi realizada pelo teste DAS-ELISA, com controles positivos e negativos. Durante a primeira amostragem, foram retiradas aleatoriamente 30 plântulas de cada repetição para o ensaio **(A)** e 10 de cada repetição, dos tratamentos de 0, 10, 30 e 50 ppm, de antiviral para o ensaio **(B)**. As amostras foram indexadas para ORSV e CymMV, sendo considerado um resultado negativo o que obteve leitura inferior a 0.200 nm após a realização do teste DAS-ELISA. Os resultados dessa primeira amostragem estão descritos nas Tabelas 9 e 10 abaixo.

Tabela 9 – Primeira amostragem do Ensaio **(A)** após 360 dias de cultivo *in vitro*, 300 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| I | 1 (3,3%) | 15 (50%) | 5 (16,7%) | 9 (30%) |
| II | 1 (3,3%) | 16 (53,4%) | 9 (30%) | 4 (13,3%) |
| III | 0 (0%) | 15 (50%) | 6 (20%) | 9 (30%) |
| TOTAL | 2 (2,2%) | 46 (51,1%) | 20 (22,2%) | 22 (24,5%) |

Tabela 10 - Primeira amostragem do Ensaio **(B)** após 240 dias de cultivo *in vitro*, 200 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|----------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 10 ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 30 ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 50 ppm | I | 0 (0%) | 6 (60%) | 4 (40%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 2 (20%) | 8 (80%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 8 (26,67%) | 22 (73,33%) | 0 (0%) |
| TOTAL | | 0 (0%) | 8 (6,67%) | 112 (93,33%) | 0 (0%) |

Em ambos os ensaios foi possível indexar plântulas livres de vírus, demonstrando a eficiência da quimioterapia, porém CymMV e ORSV respondem de maneira diferente ao ribavirin. No ensaio **(A)**, somando-se as repetições, foram obtidas um total de 2,2% de plântulas livres para ORSV; 51,1% livres de CymMV e 24,5% livres de ambos os vírus.

Não se obtiveram plântulas livres de ORSV na primeira amostragem do ensaio **(B)**, enquanto as limpas de CymMV foram todas originárias do tratamento de 50 ppm, distribuídas nas repetições **I**, 6 plantas, e **III**, 2 plântulas. Foram obtidas 8 (26,67% do total de amostras do tratamento de 50 ppm) plântulas livres de CymMV, totalizando 6,67% da amostragem. Por serem todos provenientes do mesmo tratamento, a concentração de antiviral foi o fator limitante. As concentrações de 0, 10 e 30 ppm resultaram em infecção mista para todos os indivíduos amostrados, possivelmente necessitando de maior tempo de quimioterapia.

A segunda amostragem por DAS-ELISA foi realizada 90 dias após a primeira, com dois subcultivos de 45 dias, totalizando 450 dias de cultivo para o ensaio **(A)** e 330 dias para o ensaio **(B)**. A indexação foi realizada por DAS-ELISA e 5 amostras com resultados negativos para CymMV e 6 para ambos os vírus tiveram seus resultados confirmado por RT-PCR. Os resultados estão nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11 – Segunda amostragem do Ensaio **(A)** após 450 dias de cultivo *in vitro*, 410 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| I | 5 (16,7%) | 2 (6,6%) | 2 (6,6%) | 21 (70%) |
| II | 1(3,3%) | 11(36,7%) | 12 (40%) | 6 (20%) |
| III | 2 (6,6%) | 11 (36,7%) | 14 (46,7) | 3 (10%) |
| TOTAL | 8 (8,9%) | 24 (26,7%) | 28 (31,1%) | 30 (33,3%) |

Tabela 12 - Segunda amostragem do Ensaio **(B)** após 330 dias de cultivo *in vitro*, 290 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|--------------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 10 ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 30ppm | I | 0 (0%) | 1 (10%) | 9 (90%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 4 (40%) | 6 (60%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 3 (30%) | 7 (70%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 8 (26,67%) | 22 (73,33%) | 0 (0%) |
| 50ppm | I | 0 (0%) | 6 (60%) | 4 (40%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 3 (30%) | 7 (70%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 4 (40%) | 6 (60%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 13 (43,34%) | 17 (56,66%) | 0 (0%) |
| TOTAL | | 0 (0%) | 21 (17,5%) | 99 (82,5%) | 0 (0%) |

A terceira amostragem por DAS-ELISA foi realizada aproximadamente 50 dias após a segunda, correspondendo a realização do subcultivo, totalizando 490 dias de cultivo para o ensaio **(A)** e 380 dias para o ensaio **(B)**. Após a indexação por DAS-ELISA, 16 amostras com resultados negativos para CymMV provenientes do tratamento de 50 ppm do ensaio **(B)** foram confirmadas por RT-PCR. Os resultados estão discriminados nas tabelas 13 e 14 abaixo. Os resultados do teste DAS-ELISA das três amostragens selecionadas estão no Apêndice H.

Tabela 13 - Terceira amostragem do Ensaio **(A)** após 490 dias de cultivo *in vitro*, 450 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| I | 3 (10%) | 6 (20%) | 1 (3,33%) | 20 (66,67%) |
| II | 1 (3,33%) | 17 (56,67%) | 4 (13,33%) | 8 (26,67%) |
| III | 1 (3,33%) | 17 (56,67%) | 5 (16,67%) | 7 (23,33%) |
| TOTAL | 5 (5,56%) | 40 (44,44%) | 10 (11,11%) | 35 (38,89%) |

Tabela 14 - Terceira amostragem do Ensaio **(B)** após 380 dias de cultivo *in vitro*, 340 dias de quimioterapia, (%) em plântulas livres de CymMV, ORSV ou de ambos (CymMV +ORSV)

| | | - ORSV + CymMV | + ORSV - CymMV | + ORSV + CymMV | - CymMV - ORSV |
|-----------------|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 0 ppm | I | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 0 (0%) | 10 (100%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 0 (0%) | 30 (100%) | 0 (0%) |
| 30 ppm | I | 0 (0%) | 2 (20%) | 8 (80%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 2 (20%) | 8 (80%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 1 (10%) | 9 (90%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 5 (16,67%) | 25 (83,33%) | 0 (0%) |
| 50 ppm | I | 0 (0%) | 6 (60%) | 4 (40%) | 0 (0%) |
| | II | 0 (0%) | 2 (20%) | 8 (80%) | 0 (0%) |
| | III | 0 (0%) | 9 (90%) | 1 (10%) | 0 (0%) |
| Subtotal | | 0 (0%) | 17 (56,67%) | 13 (43,33%) | 0 (0%) |
| TOTAL | | 0 (0%) | 22 (24,45%) | 68 (75,55%) | 0 (0%) |

Em ambos os ensaios o número de plântulas com resultado negativo em DAS-ELISA aumentou com o tempo entre as amostragens. No Ensaio **(A)**, entre a primeira e terceira amostragem, as plântulas negativas para ORSV passaram de 2,2% do total para 5,56%, e a limpeza para ambos os vírus passou de 24,5% para 38,89. Em contrapartida, a limpeza somente para CymMV caiu de 51,1% para 44,44%. É possível que, no intervalo entre as amostragens, as plântulas anteriormente limpas exclusivamente para CymMV tenham sido limpas também para ORSV; o que explicaria a mudança na porcentagem esperada ao tratamento com ribavirin. No ensaio **(B)**, não houve plântulas livres para ORSV em nenhuma amostragem, porém as limpas para CymMV aumentaram de 6,67% do total de plântulas para 24,45%. Nota-se que na primeira amostragem todas as plântulas limpas para CymMV encontravam-se no tratamento de 50 ppm, distribuídas entre as repetições I e III. Os resultados da segunda e terceira amostragem evidenciaram plântulas livres de CymMV também no tratamento de 30 ppm. O maior número de plantas limpas constatada entre as amostragens e o intervalo entre as três sugere que o tempo de exposição ao antiviral é um fator importante na obtenção de plantas limpas. A sensibilidade de ambos os testes foi analisada e os resultados obtidos estão na Figura 16. A sensibilidade do teste DAS-ELISA foi realizada por diluição seriada do controle positivo fornecido com o kit. Para a RT-PCR foram realizadas diluições seriadas de RNA extraído de uma matriz sabidamente infectada. Em ambos os casos a quantidade relativa de tecido vegetal utilizado foi de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} g; para o ELISA também foi realizada uma diluição de 10^{-6} . A comparação entre eles evidencia a maior sensibilidade da RT-PCR, tanto para CymMV quanto para ORSV, sendo possível visualizar a banda em todas as concentrações testadas, enquanto a leitura para o teste DAS-ELISA foi negativa a partir de 10^{-3} g para ORSV e 10^{-4} g para CymMV.

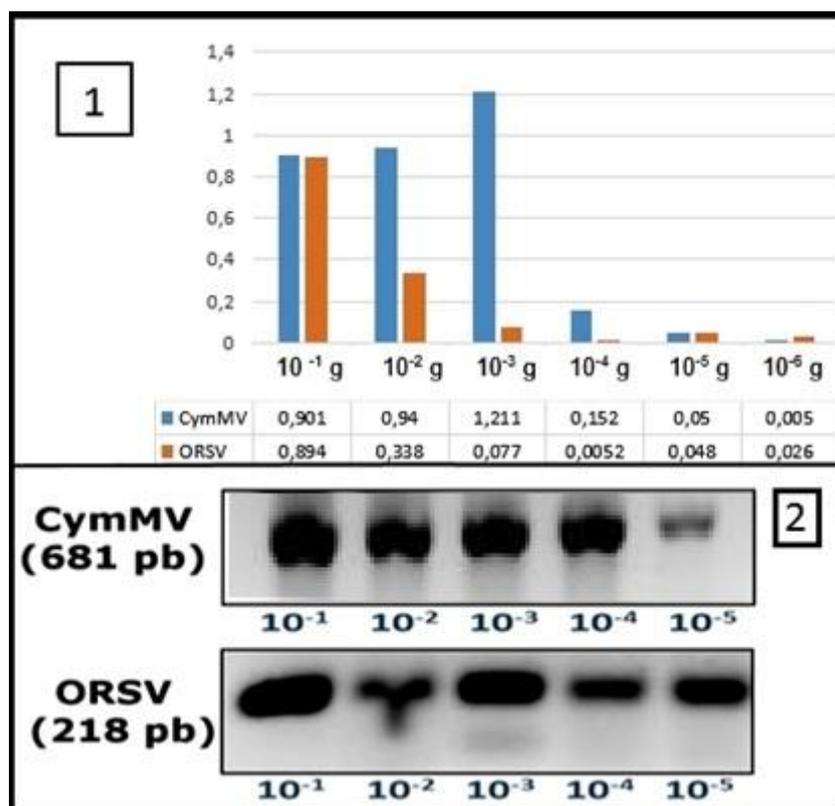


Figura 16 – (1) Resultado do DAS-ELISA, em nm, obtido por diluição seriada do extrato, leituras inferiores a 0.200 nm foram consideradas negativas, simulando as quantidades iniciais de material vegetal em contraste com a leitura obtida; (2) Resultado da diluição seriada do RNA total extraído, simulando as quantidades iniciais de material vegetal, após reação de RT-PCR; visualização das bandas em gel de ágarose (0,75%) sob luz ultravioleta.

Para confirmar os resultados negativos obtidos por ELISA para CymMV e ORSV, o RNA de 11 amostras foi extraído e submetido à RT-PCR, nas amostras 11, 12, 13, 14, 15 e 16, provenientes do ensaio **(A)**, correspondendo a 400 dias após o início da adição da ribavirin e para as plântulas I-1, I-8, I-9, II-6, II-10 do tratamento de 50 ppm, 330 dias após o começo da quimioterapia, empregando o mesmo procedimento adotado para o sequenciamento; com cada amostra correspondendo à uma plântula coletada. Foram escolhidas 6 amostras do ensaio **(A)** com ELISA negativo para ambos os vírus e 5 amostras do ensaio **(B)** com resultado negativo para CymMV, o resultado de ambas é proveniente da segunda amostragem e estão na Tabela 15.

Tabela 15- Resultados da indexação DAS-ELISA, em nm, para as amostras que tiveram confirmação por RT-PCR na segunda amostragem

| | CymMV | ORSV |
|-------|-----------|-----------|
| 11 | (-) 0.017 | (-) 0.012 |
| 12 | (-) 0.095 | (-) 0.011 |
| 13 | (-) 0.006 | (-) 0.002 |
| 14 | (-) 0.169 | (-) 0.003 |
| 15 | (-) 0.056 | (-) 0.003 |
| 16 | (-) 0.039 | (-) 0.004 |
| I-1 | (-) 0.021 | (+) 0.881 |
| I-8 | (-) 0.015 | (+) 0.826 |
| I-9 | (-) 0.192 | (+) 0.826 |
| II-6 | (-) 0.123 | (+) 0.607 |
| II-10 | (-) 0.102 | (+) 0.838 |

Os resultados do teste PCR, feito para as amostras negativas para DAS-ELISA, são mostrados nas Figuras 17 e 18. Pela visualização das bandas percebe-se que as amostras 16, I-1 e I-8 permanecem infectadas por CymMV (681 bp). Para ORSV (218 bp), as amostras 11, 12, 13, 14 e 15 permanecem infectadas; somente a 16 está isenta do vírus. A intensidade das bandas é bem menor nas amostras infectadas por CymMV quando comparadas ao controle positivo, fato que também ocorre nas amostras 13 e 15, no teste RT-PCR para ORSV. A diminuição na intensidade das bandas indica uma menor concentração do vírus.

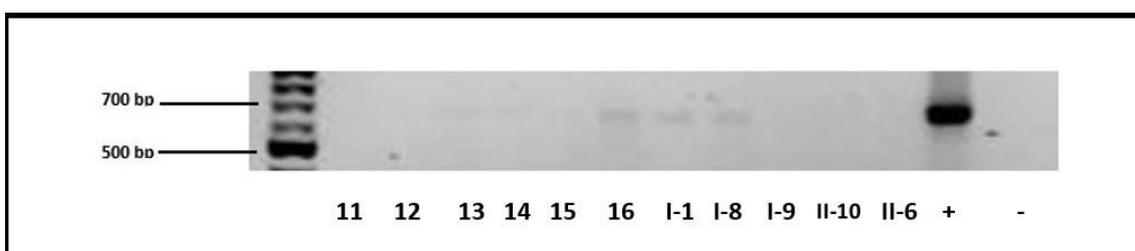


Figura 17 – Resultado das ampliações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 681 bp, obtidos com *primers* específico para o CymMV, a partir de RNA total extraído de 11 amostras, inicialmente consideradas negativas para o CymMV em DAS-ELISA. Os fragmentos de tamanho esperado podem ser observados nas amostras 16, I-1 e I-8; estando os controles positivo e negativo identificados por (+) e (-).

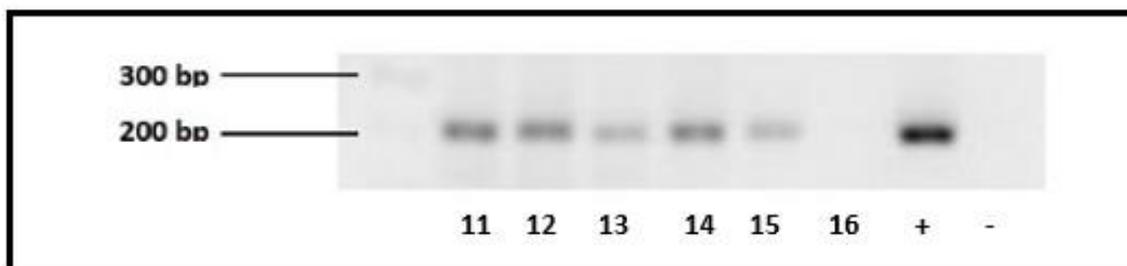


Figura 18 – Resultado das amplificações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 218 bp, obtidos com *primers* específico para o ORSV, a partir de RNA total extraído de 6 amostras, inicialmente consideradas negativas para o ORSV em DAS-ELISA. Os fragmentos de tamanho esperado podem ser observados nas amostras 11, 12, 13, 14 e 15; estando os controles positivo e negativo identificados por (+) e (-).

Na terceira amostragem, 16 plântulas com resultado negativo para CymMV provenientes do tratamento de 50 ppm do ensaio **(B)** foram confirmadas por RT-PCR. Não houve plântulas com resultado negativo para CymMV nesta análise. Foram usados três controles positivos e dois negativos. O resultado obtido após DAS-ELISA está discriminado na tabela 16 e o resultado da RT-PCR na figura 19.

Tabela 16 - Resultados da indexação DAS-ELISA, em nm, para as amostras que tiveram confirmação por RT-PCR na terceira amostragem

| | CymMV | ORSV |
|----|-----------|-----------|
| 1 | (-) 0.108 | (+) 1.281 |
| 2 | (-) 0.049 | (+) 1.171 |
| 3 | (-) 0.050 | (+) 1.261 |
| 4 | (-) 0.037 | (+) 1.143 |
| 5 | (-) 0.078 | (+) 1.071 |
| 6 | (-) 0.044 | (+) 0.875 |
| 7 | (-) 0.034 | (+) 1.113 |
| 8 | (-) 0.036 | (+) 0.980 |
| 9 | (-) 0.035 | (+) 1.015 |
| 10 | (-) 0.039 | (+) 0.790 |
| 11 | (-) 0.048 | (+) 0.825 |
| 12 | (-) 0.087 | (+) 1.045 |
| 13 | (-) 0.044 | (+) 1.089 |
| 14 | (-) 0.045 | (+) 1.113 |
| 15 | (-) 0.044 | (+) 0.870 |
| 16 | (-) 0.091 | (+) 1.226 |

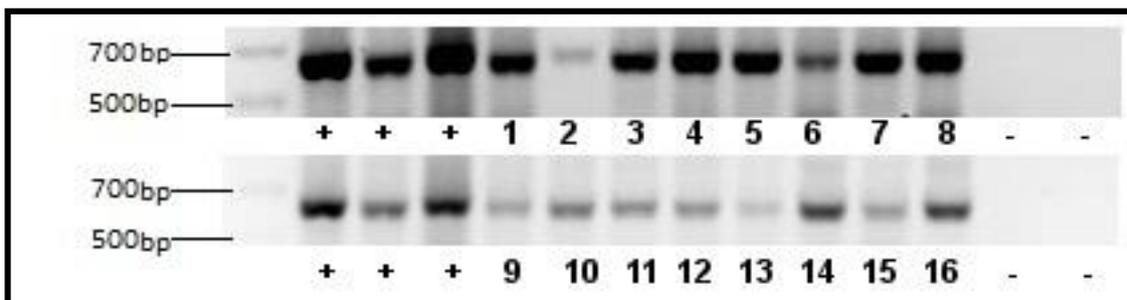


Figura 19 - Resultado das amplificações via RT-PCR, visualizadas em gel de ágarose 0,75%, de fragmentos de DNA com 681 bp, obtidos com *primers* específico para o CymMV, a partir de RNA total extraído de 16 amostras, inicialmente consideradas negativas para o CymMV em DAS-ELISA. Nenhuma amostra obteve resultado negativo.

A quimioterapia em orquídeas normalmente é feita associando-se as técnicas de cultivo *in vitro* que utilizam meristema apical como explante. Tal fonte de explante possui tamanho pequeno, normalmente variando entre 0,1 e 0,3 mm. Mesmo que transportem partículas virais, seu título é menor, possibilitando limpeza com maior êxito por meio de quimioterapia.

Neste trabalho, como a prioridade foi obter mudas livres de vírus, a partir de matrizes infectadas empregando plântulas obtidas por morfogênese direta, o foco foi a avaliação da ação do ribavirin na eliminação total dos vírus CymMV e ORSV, utilizando um explante que transporta os vírus. Quando se comparam as duas técnicas de micropropagação, a obtenção de plântulas pela retirada do meristema apresenta questões adicionais, uma vez que necessita de mão-de-obra treinada e é uma estrutura mais frágil e sujeita a uma série de fatores, como oxidação e alto percentual de morte do meristema *in vitro*.

Ishii (1972), obteve êxito parcial na limpeza de CymMV e ORSV de cultivares de *Cattleya*, através do cultivo de meristema. O uso de meristema com dimensões inferiores a 0,5 mm obteve sucesso na limpeza de CymMV, porém a infecção por ORSV persistiu nas plântulas obtidas. A indexação foi feita utilizando plantas indicadoras como a *Cassia occidentalis* para o CymMV e *Chenopodium amaranticolor* para ORSV. O método de cultivo resultou em grandes perdas, somente 5% dos explantes cultivados sobreviveram.

Albouy (1988), utilizando protocormos obtidos através do cultivo de meristemas apicais de *Cymbidium*, obteve até 95% de limpeza dos vírus, ao utilizar 25 ppm de ribavirin adicionado ao meio de cultura por 90 dias; sendo a indexação feita pelo teste ELISA. As plântulas obtidas mostraram-se livres de ORSV e CymMV, mas ao serem

subcultivadas em meio sem o antiviral, a taxa de plântulas infectadas por *Tobamovirus* aumentou, indicando que a carga viral era inferior àquela possível de ser detectada pelo método sorológico de indexação. O cultivo de meristemas apicais não é adequado ao cultivo de *Phalaenopsis* e seu uso acarreta em morte da planta matriz.

Lim *et al.* (1993) testaram dois métodos para a obtenção de mudas saudáveis do cultivar “Mokara Char Kuan ‘Pink’”, ou seja, o cultivo de meristema apical e de seções de células de plântulas originárias de meristema axilar. O primeiro método indicou baixa taxa de sobrevivência, em torno de 1%. O cultivo de seções finas de células também apresentou baixa taxa de sobrevivência, em torno de 20%, e com a adição do antiviral ao meio de cultura, essa taxa se reduziu drasticamente. Quimioterapia em meio de cultura com antiviral, na concentração de 10 mg/L, foi eficaz para a obtenção de PLBs livres de CymMV e ORSV. É interessante notar que esses autores conseguiram 100% da eliminação para CymMV e 90% para ORSV, sem a adição de antiviral ao meio de cultura. Porém, ao confirmar a indexação negativa feita pelo teste ELISA para todos os protocormos, para CymMV, somente 20% delas apresentaram resultado negativo para o teste PCR.

Freitas-Ástua e Rezende (1998), utilizaram o cultivo de meristemas apicais de *Cymbidium* associado à quimioterapia para obtenção de mudas livres de vírus. Utilizando concentrações diferentes (0, 15, 20, 25, 30 ppm) e adicionando o antiviral antes da esterilização ou depois, conseguiram diferentes quantidades de mudas saudáveis, em função do tratamento empregado, variando de 8,3% a 100%. A indexação das mudas foi feita pelo teste PTA-ELISA. Os melhores resultados foram obtidos quando o antiviral é adicionado após a esterilização do meio de cultura, através da filtração da solução com o antiviral. A adição anteriormente à autoclavagem também se mostrou eficiente.

Porter e Kuehnle (1997) também obtiveram mudas de *Dendrobium* livres de vírus através de quimioterapia. Utilizando os antivirais ribavirin e “dithiouracil”, durante a multiplicação de protocormos em meio líquido, ou na diferenciação em meio sólido, constataram que em ambos os casos ocorreu a inibição da multiplicação dos vírus porém, a taxa de explantes necrosados aumentou durante a fase de multiplicação. O tempo necessário para a eliminação dos vírus variou entre 17 e 76 semanas, de acordo com o tratamento, atingindo 100% de eliminação dos vírus quando empregou 0,1 mM de ribavirin durante 36 a 38 semanas em meio sólido, sendo a indexação, feita através do teste DAS-ELISA.

Até antes da realização deste trabalho não existiam relatos do emprego de ribavirin para a obtenção de mudas de *Phalaenopsis* livres de CymMV e ORSV, empregando um protocolo de morfogênese direta. A adição do antiviral é normalmente associada aos métodos indiretos de cultivo, muitas vezes com a formação de PLBS. Tais metodologias dispõem de maior taxa de multiplicação, porém, normalmente esbarram em dificuldades referentes a extração do meristema, morte da planta matriz, baixa taxa de sobrevivência dos PLBs e a ocorrência de mutação durante o cultivo.

Os testes de indexação são cruciais na confirmação de infecção por CymMV e ORSV, sendo que, em trabalhos anteriores empregavam o teste ELISA, e suas variações. No presente trabalho, além do emprego do teste DAS-ELISA, os resultados obtidos foram ratificados por RT-PCR, indicando que usar somente testes sorológicos não é garantia de resultado negativo na limpeza dos vírus. Resultados semelhantes foram obtidos por Lim, *et al.* (1993), que confirmaram através de PCR a limpeza para CymMV por ELISA. A indexação negativa mostrada pelo teste ELISA não se confirmou em todas as amostras indexadas por PCR.

Como na produção comercial de orquídeas os métodos de diagnose devem ser de fácil aplicabilidade e apresentar rapidamente a resposta, muitos produtores optam pela indexação empregando testes do tipo *Immunostrip*. Tal teste consiste em um kit contendo anticorpos específicos para o vírus a serem detectados e anticorpos marcados; o resultado é obtido instantaneamente. Sua comercialização é feita por empresas como a *Mukoyama Orchids* no Japão, *Forsite Diagnostics* na Grã-Bretanha e pela Agdia nos EUA (BATCHMAN, 2008).

Liebenberg, *et al.* (2009), realizaram testes visando comparar três métodos de indexação para *Grapevine fanleaf virus* (GFLV): *Immunostrip*, DAS-ELISA e RT-PCR. Os autores comprovaram que a sensibilidade do teste *Immunostrip* é maior que o DAS-ELISA, podendo ser utilizado para substituí-lo. Porém os autores ressaltam que o teste por RT-PCR fornece resultados mais precisos, sensíveis e confiáveis para detecção de GFLV. Outros pontos a serem considerados são: o alto custo do *Immunostrip* em relação ao DAS-ELISA, e o tempo de análise para o teste é de dois dias, no caso de DAS-ELISA, enquanto que para o *Immunostrip* é de 30 minutos.

Através do método de micropropagação utilizado neste trabalho, aliado a quimioterapia, é possível obter mudas livres de ORSV e CymMV, sendo os resultados comprovados pela análise por RT-PCR, sendo mais fácil obter mudas livres de CymMV do que para ORSV, numa razão de 8:1. Os resultados negativos obtidos por DAS-ELISA

nas amostras e a confirmação por RT-PCR se fez necessária, tendo em vista que o teste sorológico DAS-ELISA é incapaz de detectar baixos títulos virais.

Em resumo, apesar de não se conseguir plantas livres de vírus a partir de matrizes de *Phalaenopsis* coinfectadas por CymMV e ORSV, foi possível obter plantas “limpas” para um ou outro vírus. Foram obtidas amostras com resultado negativo para ambos os vírus por DAS-ELISA, porém ao serem confirmadas por RT-PCR algumas plantas ainda se encontravam infectadas, principalmente por ORSV. Pode-se inferir pelo contraste entre as análises, e pela sensibilidade das mesmas, que a não detecção por DAS-ELISA decorre do menor título viral presente nas amostras, muito provavelmente devido ao uso do antiviral. Nas concentrações de 40 e 50 ppm de antiviral, obtiveram-se resultados negativos na primeira amostragem, enquanto na concentração de 30 ppm houve resultados negativos somente na segunda amostragem. O número de plantas com resultado negativo entre a primeira e segunda amostragem aumentou, evidenciando que o tempo de tratamento influenciou diretamente nos resultados. O contraste entre ambos os ensaios sugere que diferenças genotípicas entre as cultivares possa influir sobre o tratamento, pois matrizes distintas geneticamente (“irmãs”) apresentaram os melhores resultados quando comparadas às cultivares clonadas.

5 – Conclusões

-Utilizando matrizes coinfetadas, por CymMV e ORSV, somente foi possível obter plântulas livres de um ou outro vírus por meio de micropropagação utilizando gemas da haste floral como explante e regeneração por morfogênese direta, nos tratamentos quimioterápicos nas concentrações de 30, 40 ou 50 ppm de ribavirin (nome comercial Virazole) adicionado anteriormente à esterilização do meio de cultura;

-A confirmação de resultados obtidos por DAS-ELISA utilizando RT-PCR foi essencial para a validação do método, pois plantas que apresentaram resultados negativos em DAS-ELISA, foram positivas em RT-PCR, confirmando que ainda estavam infectadas, o que indica que, muito provavelmente, o tratamento com antiviral reduziu o título viral;

-A amostragem realizada com maior tempo de exposição resultou em maior número de plântulas negativas em DAS-ELISA em ambos os ensaios, concluindo-se que o maior tempo de exposição influi na queda do título viral para ambos os vírus;

-Os efeitos fitotóxicos referentes ao uso do antiviral não foram prejudiciais ao cultivo *in vitro*, não sendo observadas diferenças significativas nas taxas de multiplicação entre os tratamentos.

6 - Referências Bibliográficas

- AJJIKUTTIRA, P. A.; LIM-HO, C. L.; WOON, M. H.; RYU, K. H.; CHANG, C. A.; LOH, C. S.; WONG, S. M. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **Archives of virology**, v. 147, n. 10, p.1943-1954. 2002.
- AJJIKUTTIRA, P.A. **Genetic variability and interactions of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus***, 2003. 166p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – National University of Singapore, Cingapura, 2003.
- ALBOUY, J.; FLOUZAT, C.; KUSIAK, C.; TRONCHET, M. Eradication of orchid viruses by chemotherapy from in-vitro culture of *Cymbidium*. **Acta Horticulturae**, v. 234, p.413-419, 1988.
- ALEXANDRE, M. A M.; DUARTE, L. M. L. *Cymbidium mosaic virus* e *Odontoglossum ringspot virus*: vírus mais frequentes em orquídeas. **Biológico**, São Paulo, v. 75. p.1-4, jun. 2013.
- ALEXANDRE, M. A. V.; RIVAS, E. B.; TOZETTO, A. R. P.; DUARTE, L. M. L. **Lista comentada sobre a ocorrência natural de vírus em plantas ornamentais no Brasil**. São Paulo: Instituto Biológico, 2005. 55p.
- ALEXANDRE, M. A. V.; DUARTE, L. M. L.; RIVAS, E. B. **Aspectos fitossanitários das orquídeas**. São Paulo: Instituto Biológico, 2012. 84 p.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III". **Botanical Journal of the Linnean Society** v.161 p.105–121, 2009.
- ANTHURA. **Cultivation Guidelines: *Phalaenopsis* Pot Plant**. 2007. Disponível em: <<http://www.anthura.nl/uploads/downloads/manuals/en/Manual Phalaenopsis pot plants ENG.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2014
- ARDITTI J. **Micropropagation of Orchid**. Oxford: Wiley-Blackwell (Ed.). pp. 564-843. 2008.
- BALILASHAKI, K.; NADERI, R.; KALANTARI, S.; SOORNI, A. Micropropagation of *Phalaenopsis amabilis* cv. Cool 'Breeze' with using of flower stalk nodes and leaves of sterile obtained from node cultures. **International Journal Of Farming And Allied Sciences**, v. 7, n. 3, p.823-829, 2014.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F. F.V. A.; FRAGA, C.N. Orchidaceae. In R.C. Forzza, *et al.* (org.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v.2., p.1344- 1426. 2010.
- BATCHELOR, S.R. *Phalaenopsis*. Part 1. **American Orchid Society Bulletin** v.51 n.12 p.1267–1275. 1982.
- BATCHMAN, L. Detecting Virus in Orchids. **Orchids**, v. 1, n. 5, p.342-343, 2008. Disponível em: <http://www.aos.org/images/img_content/PDFs/Detecting_Virus.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2015.
- BELARMINO, M.M.; MII, M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 5, p.435-442. 2000.

- BROADBENT, L.; FLETCHER, J. T. 1963. The epidemiology of *Tomato mosaic* IV. Persistence of virus on clothing and glasshouse structures. **Annals of Applied Biology**. v.52 p.233-241
- BROCK, R.D. The use of trisodium phosphate as an inactivating agent for plant viruses. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, v. 18, p. 41-43, 1952.
- CAI, *et al.* The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. **Nature Genetics**, v. 47, n. 1, p.65-72, jan. 2015.
- CASSELLS, A. C.; LONG, D. The regeneration of virus free plants from *Cucumber mosaic virus* and *Potato virus Y* infected tobacco explants cultured in the presence of virazole. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v.35. p.350-351. 1980.
- CHAN, Y.L.; LIN, K.H.; SANJAYA; LIAO, L.J.; CHEN, W.H. CHAN, M.T. Gene stacking in *Phalaenopsis* orchid enhances dual tolerance to pathogen attack. **Transgenic Research**. v.14. n.3. p.279–288.2005.
- CHANG, C.; CHEN, Y.C.; HSU, Y.H.; WU, J.T.; HU, C.C.; CHANG, W.C.; LIN, N.S. Trans-genic resistance to Cymbidium mosaic virus in Dendrobium expressing the viral capsid protein gene, **Transgenic Resistance**. V.14.p.41-46.2005.
- CHEN, C. Z.; BECK-TAN, N. C.; DHURJATI, P.; van DYK, T. K.; LAROSSA, R. A.; COOPER, S. L. Quaternary Ammonium Functionalized Poly (propylene imine) Dendrimers as Effective Antimicrobials: Structure-Activity Studies. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 3, p.473-480, jun. 2000.
- CHIEN, K. W.; AGRAWAL, D. C.; TSAY, H. S.; CHANG, C. A. Elimination of mixed 'Odontoglossum ringspot' and 'Cymbidium mosaic' viruses from *Phalaenopsis* hybrid 'V3' through shoot-tip culture and protocorm-like body selection. **Crop Protection**, v. 67, n. 1, p.1-6, jan. 2015.
- CHEN, T.H.; LU, Y.T. Application of ribavirin in tissue culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro) for elimination of *Bamboo mosaic virus*. **Plant Protocols Bulletin** v.42. p.159-168. 2000.
- CHONE, R. M. S. **Desenho e análise da cadeia produtiva do gênero Phalaenopsis no Brasil**. 2005. 56 f. TCC (Graduação) - Curso de Administração de Negócios, Universidade Presbiteriana Mackenzie, Campinas, 2005.
- CHRISTENSON, E. A. 2001. **Phalaenopsis: A Monograph**. Timber Press, Portland, Oregon.
- CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, I. U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 4, p.507-520. 2009.
- CIESLINSKA, M. Elimination of *Strawberry mottle virus* (SMoV) from *Fragaria virginiana* UC-11 indicator plants by thermotherapy and chemotherapy. **Phytopathologia Polonica** v.30. p.51-59. 2003.
- COEBETT, M.K. Purification by density-gradient centrifugation, electron microscopy, and properties of *Cymbidium mosaic virus*. **Phytopathology**. v. 50. n. 5 p. 346-351 1960.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas I: insetos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.6. p. 105-171. 1998.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas II: fungos, nematoides e ácaros. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.6. p. 105-171. 1999.

COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of diversity? **Trends In Ecology & Evolution**. v. 20. p.487-494, set. 2005.

DE FAZIO, G.; CANER, J.; VICENTE, M. Effect of virazole (ribavirin) on *Tomato spotted wilt virus* in two systemic hosts, tomato and tobacco. **Archives of Virology** v.63. p.305-309. 1980.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Distribution of bacilliform virus particles in Lasaki disease and *Cymbidium ringspot* disease. **Annals of Phytopathological Society of Japan, Tokyo**, v.35, p. 388, 1969.

DRESSLER, R.L. **The Orchids - Natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press. 332p. 1981.

DUGGAR, B. M.; ARMSTRONG J. K. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juices of various plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** v.12. p.359-366. 1925.

EIRAS, M.; BOARI, A. J.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A. L. R.; BRIONES, M. R. S.; FIGUEIRA, A.; HARAKAVA, R. Characterization of isolates of the *Cucumovirus cucumber mosaic virus* present in Brazil. **Journal of Plant Pathology**. v. 86. p.61-69. 2004.

European Medicines Agency (EMA). Evaluation of medicines for Human Use. **Assessment Report**. Londres. 2010. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000092.jsp&mid=WC0b01ac0580028a43>. Acesso em 28/05/2105;

ENGELMANN, J.; HAMACHER, J. Plant virus diseases: Ornamental plants. In: MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. **Encyclopedia of virology**. 3. ed. V. 4. Elsevier. p. 207-229. 2008.

EUN, A. J. C.; WONG, S. M. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* using immuno-capillary zone electrophoresis. **Phytopathology**. v. 89 n.6. p.522-528.1999.

EUN, A. J. C.; WONG, S. M. Molecular beacons: A new approach to plant virus detection. **Phytopathology**.v.90 p.269-275. 2000.

FAN, S. Development of transgenic *Phalaenopsis* resistant to two viral infections, in: Biomedical Engineering and Informatics (BMEI), **4th International Conference**. pp. 1963–1966. 2011.

FRANCKI, R. I. B. ***Cymbidium mosaic virus***. Kew: C.M.I/C.A.B/A.A.B. n.p. (C.M.I/A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, 27). 1970.

FREITAS, J. C. **Incidência e controle de viroses em orquídeas no Estado de São Paulo**. 94p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J. A. M. Obtenção de *Cymbidium* livre do vírus da mancha anelar do *Odontoglossum* através de quimioterapia de meristemas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 2, p.158-160, jun. 1998

GRIESBACH, R. J. Potted *Phalaenopsis* orchid production: History, Present Status, and Challenges for the Future. **Hortechology**, v. 10, p.429-429, 2000.

GUIĂ, I. C.; BUCIUMEANU, E. C. Grapevine chemotherapy for elimination of multiple virus infection. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, p.6535-6539, 2011.

HANSEN, A. J.; LANE, W. D. Elimination of *Apple chlorotic leafspot* virus from apple shoot cultures by ribavirin. **Plant Disease**. v. 69, p.134-135. 1985.

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

HAYES, A. J. **Greenhouse sanitation: efficacy of disinfectants on cutting blades using tobacco mosaic virus on petunia as a model**. 2008. 38 f. TCC (Graduação). "Graduation With Research Distinction", College Of Food, Agriculture, And Environmental Sciences Of The Ohio State University, Ohio, 2008. Disponível em: <https://kb.osu.edu/dspace/bitstream/handle/1811/35862/HAYES_AMANDA_THESIS.pdf;jsessionid=73AC1E0E5AFC2227B7F0D256B92F001B?sequence=1>. Acesso em: 27 nov. 2014.

HOLLINGS. M. Disease Control Through Virus-Free Stock. **Annual Review Of Phytopathology**. v. 3, n. 1, p.367-396, set. 1965.

HU, J. S.; FERREIRA, S.; XU, M. Q. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus* and Potyviruses infecting orchids in Hawaii. **Plant Disease**. v. 77. p.464-468, dez. 1992

HU, J. S.; FERREIRA, S.; XU, M. Q.; LU, M.; IHA, M.; PFLUM, E.; WANG M. Transmission, movement and inactivation of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **Plant Disease**, v. 78, p.633-636, 1994.

HU, W.W.; WONG, S. M. The use of DIG labeled cRNA probes for the detection of *Cymbidium mosaic* Potex virus and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* in orchids. **Journal of Virological Methods**, v.70 p.193-199, 1998.

HU, G. J.; HONG, N.; WANG, L.P.; HU, H. J.; WANG, G. P. Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. **Crop Protection**, v.37 p.20-25, 2012.

IBRAFLOR. Brasil. **Release Imprensa**. 2013. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=213>>. Acesso em: 06 ago. 2014.

IBRAFLOR. **Informativo Ibraflor** – Janeiro de 2014. v.40. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=216>>. Acesso: 09/06/2014.

ICHIHASHI, S. Research on micropropagation of *Cymbidium*, nobile-type *Dendrobium*, and *Phalaenopsis* in Japan. In: ARDITTI, J.; PRIDGEON, A. M. (Ed.). **Orchid Biology: Reviews and Perspectives**, VII. Springer, 1997. Cap. 7. p. 285-316.

INOUYE, N. Virus diseases of orchids. II. Symptoms and properties of viruses in *Cymbidium*. **Japan Orchid Society Bulletin**. v.11.p.1-6. 1965.

INOUYE, N. Some experiment on transmission of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **Nogaku Kenkyu**. v.52. p.89-97. 1968.

ISHII, M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explant culture. In: **III International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants 36**. 1972. p. 229-234.

JAYARAM H.N.; GRUSCH M.; COONEY D.A.; KRUPITZA G. Consequences of IMP dehydrogenase inhibition and its relationship to cancer and apoptosis. **Curent Medicinal Chemistry** v.6 p.561-574. 1999.

JUERGEN HANSEN A.; STACE-SMITH R. Antiviral chemicals for plant disease control, **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.8, p.45-88, 1989.

- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. D. Boletim de análise conjuntural do mercado de flores e plantas ornamentais no Brasil. São Paulo: **Hórtica Consultoria e Treinamento**, 2011. 5 p. Disponível em: <<http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=161>>. Acesso em: 07 ago. 2011.
- KADO, C.I.; VAN REGENMORTEL, M.H.V.; KNIGHT, C.A. Studies on some strain of tobacco mosaic virus in orchids. I. Biological, chemical and serological studies. **Virology**, v.34. p.17-24. 1968.
- KING, A. M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (eds). **Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Vol. 9. Elsevier, 2012.
- KOCH, L. Erbgleiche Vermehrung von *Phalaenopsis* in vitro. **Gartenwelt**. v.74, 482–484. 1974.
- KOH, K. W.; LUA, H.C.; CHAN, M. T. Virus resistance in orchids. **Plant Science**. v. 228, n. 1, p.26-38.2014
- KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, v.87, p.2413-2421, 2006.
- KOSIR, P.; SKOF, S.; LUTHAR, Z. Direct shoot regeneration from nodes of *Phalaenopsis* orchids. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 83, n. 2, p.233-242, nov. 2004.
- KUBO, K. S. **Detecção e variedade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha da orquídea (Orchid fleck virus - OFV)**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Área de Concentração: Fitopatologia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2006.
- LA, Y. J.; HAN, J. H.; SIM, G.B.; KIM, B.D. Detection of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ring spot virus in orchid plants by tissue blot Immuno assay. **Korean Journal of Horticultural Science & Technology**. v.40. p.481-484.1999.
- LAWS, N. "Orchid commerce around the world." **FloraCulture International**. 2004. <[Http://www.floracultureintl.com/archive/articles/293](http://www.floracultureintl.com/archive/articles/293)>. (Acesso em 09/08/14).
- LEE, L. L. Biofábrica de *Phalaenopsis*. **Biofábrica de Plantas - Produção industrial de plantas in vitro**. Lee Tseng Sheng Lee (coord.). Antiqua (Ed.), Capítulo 9. p.150-175. 2011.
- LEE, S.C.; CHANG, Y. C. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. **Plant Pathology Bulletin**. v.15, p.186-196, 2006.
- LIAO, L.J.; PAN, I.C.; CHAN, Y.L.; HSU, Y.H.; CHEN, W.H.; CHAN, M.T. Transgenesilencing in *Phalaenopsis* expressing the coat protein of *Cymbidium* mosaic virus is a manifestation of RNA-mediated resistance. **Molecular Breeding**. V.13 p.229–242. 2004.
- LIEBENBERG, A.; FREEBOROUGH, M. J.; VISSER, C. J.; BELLSTEDT, D. U.; BURGER, J. T. Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. **Virus research**, v.142 n.1, p.28-35. 2009.
- LIM, S. T.; WONG, S. M.; GOH, C. J. Elimination of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus from orchids by meristem culture and thin section culture with chemotherapy. **Journal of Phytopathology**, v. 122, p.289-297, 1993.

- MACNAB, A.A.; SHERF A. F.; SPRINGER J. K. **Identifying Diseases of Vegetables**. The Pennsylvania State University. 61 p. 1983.
- MARKHAM, R.; SMITH K. M. S. Studies on the virus of turnip yellow mosaic. **Parasitology**, 39, pp 330-342. 1949.
- MOHR, H.; SHOPFER, P. **Plant physiology**. Springer. 629p. 1995.
- MORAES, L. A. D. **Incidência e caracterização dos vírus infectando orquídeas no estado de São Paulo**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Proteção de Plantas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2013.
- MOREL, G. Producing virus-free *Cymbidiums*. **American Orchid Society Bulletin**, v. 29, p. 495-497, 1960.
- NESTER, M.T.; ANDERSON, D.G.; ROBERTS Jr., C.E. **Microbiology, A Human Perspective**. USA, McGraw-Hill Science Engineering. 864p. 1995.
- NÓBREGA, N.R. Uma doença de vírus em orquídea. **O Biológico**, v.13, p.62, 1947.
- OANA, D.; ERDEI, L.; LIVIA, V.; DANCI, M.; ANCA, B.; DAVID, I.; BERBENTEA, F. Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication. **Journal Of Horticulture, Forestry And Biotechnology** v. 95, n. 1, p.421-425, jan. 2009. Disponível em: <http://www.journal-hfb.usabtm.ro/romana/Lucrari_2009_paginate/95.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2014.
- PAESHUYSE, J.; DALLMEIER, K.; NEYTS, J. Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. **Current opinion in virology**, v.1. p. 590-598. 2011
- PANATTONI, A. LUVISI, A.; TRIOLO, E. Review: Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal of Agricultural Research**. V.11, p. 173-178, 2013.
- PANT, R. P.; DAS MRINAL; PUN, K. B.; RAMACHANDRAN, P.; MEDHI, R. P. Occurrence of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses in orchid germplasm of Sikkim and Darjeeling hills, their identification and diagnosis. **Indian Phytopathology**. v. 63, n. 3, p.326-332. 2010.
- PANT, R. P.; MEDHI, R. P. Technological Development for Production of Vegetatively Propagated Plants: Virus diseases and development of diagnostics in orchids.p. In: Singh, H.P. *et.al.*, (Eds). **Quality seeds and planting material in Horticultural crops**, SPH, IHR, CHAI & NHB. Indian Institute of Horticultural Research. p.64-78. 2012.
- PARK, W.M. KIM, W.G., RYU, K.H., YOON, K.E., KWACK, B.H. AND SO, I.S. Detection of *Odontoglossum ringspot virus* and *Cymbidium mosaic virus* from cultivated orchids by Immuno-sorbent electron microscopy. **Korean Journal of Horticultural Science and Technology**. v. 31. p.417-422. 1990.
- PATEGAS, K. G.; SHUERGER, A. C.; WETTER, C. Management of *Tomato mosaic virus* in Hydroponically Grown Pepper (*Capsicum anuum*). **Plant Disease**, v. 73, n. seven, p.570-573.1989. Disponível em: <http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BacKIssues/Documents/1989Articles/PlantDisease73n07_570.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2014.
- PHILLIPSON, B.; WEEKES, R. **Containment of GM plant viruses being developed as gene technology vectors**. 2005. Prepared by Central Science Laboratory for the

Health and Safety Executive. Disponível em: <<http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr378.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2014.

PORTER, K. G.; KUEHNLE, A. R. Using dithiouracil and ribavirin to eliminate *Cymbidium mosaic virus* during micropropagation of "Uniwai Mist" *Dendrobium* orchid. **Horttechnology**, v. 2, p.161-164, 1997.

QUAK, F. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication, in meristem culture to obtain virus-free plants. **Advances in horticultural science**. v.1 p.144-148. 1961.

RAM, R.; VERMA, N.; SINGH, A.K.; SINGH, L.; HALLAN, V.; ZAIDI, A.A. Indexing and production of virus-free chrysanthemums. **Biologia Plantarum**, v.49, p.149-152, 2005.

RAM, R.; VERMA, N.; SINGH A.K.; ZAIDI, A.A. Virus-free chrysanthemums: production and quality management. **Archives of Phytopathology and plant protection**. v.42, p.940-949, 2009.

RAMÍREZ-MALAGÓN, R.; PÉREZ-MORENO L.; BORODANENKO A.; SALINAS-GONZÁLEZ, G. J.; OCHOA-ALEJO N. Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture**, v. 86, p.103-110, 2006.

ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. **Current Biology**, Londres, v. 18. p.325-329.2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982208001723>>. Acesso em: 16 dez. 2013.

RODRIGUES, V. T. **ORCHIDACEAE JUSS**: Aspectos morfológicos e taxonômicos. 2011. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Orchidaceae_Juss_Aspectos_Morfologicos_e_Taxonomicos_Vinicius_Trettel_Rodrigues.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2014.

ROTOR, G. Jr. A method of vegetative propagation of *Phalaenopsis* species and hybrids. Proceedings. **American Society for Horticultural Science**, v. 55, p. 434. 1949.

RYU, K. H.; PARK, W. M. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Odontoglossum ringspot tobamovirus* RNA. **Archives Of Virology**, v. 140, n. 10, p.1577-1587. 1995.

SALAS, F. J. S.; CHAVES, A. L. R.; GONÇALVES, M. C.; EIRAS, M.; BARRADAS, M. M. Princípios de vírus em plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos vegetais**. Brasília: Embrapa, 2010. Cap. 8. p. 347-392.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**. 2 ed. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy of the Science**, v.74, p.5463-5467, 1977.

SCHULZE S.; KLUGE S, The mode of inhibition of TMV and PVX-induced RNA-dependent RNA polymerase by some antiphytoviral drugs. **Journal of Phytopathology**, v.141. p. 77-85. 1994.

SIDWELL R. W.; HUFFMAN J. H.; SHARE G. P.; ALLEN L. B.; WITKOWSKI J. T.; ROBINS R. K. Broad spectrum antiviral activity of virazole 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. **Science**, v. 177, p.705-706, 1972.

SIEGMAN, B. J.; ELLIOT, M. S.; ZETTLER, F. W. Relative incidences of CymMV, ORSV and CYMRV in commercial, private and public orchid collections. **Florida State Horticultural Society**. v. 111, n. 1, p.41-43, 1998.

SILVA, W. **Cultivo de orquídeas no Brasil**. São Paulo: Nobel. 100p. 1986.

SMITH, R. A.; KIRKPATRICK, W. **Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent**. Academic Press. 237 p. 1980.

SOARES-WEISER, K.; THOMAS, S.; THOMSON, G.; GARNER, P. Ribavirin for Crimean-Congo hemorrhagic fever: systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**. v.10, p.207-216, 2010.

TAN, S. W.; WONG, S.; KINI, R. Manjunatha. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI-mass spectrometry. **Journal Of Virological Methods**.v. 85. n. 2. p.93-99. 2000.

TANAKA, M.; SAKANISHI, Y. Factors affecting the growth of in vitro cultured lateral buds from phalaenopsis flower stalks. **Scientia Horticulturae**. v. 8, n. 2, p.169-178. 1978.

TANAKA, S., NISHII, H., ITO, S., KAMEYA-IWAKA, M.; SOMMARTYA, P. Detection of *Cymbidium mosaic potexvirus* and *Odontoglossum ringspot tobamovirus* from Thai orchids by Rapid Immuno-filter paper assay. **Plant Disease**. v.81. p.167-202. 1997.

TANG, C. W.; CHEN, W.H. Breeding and development in new varieties in *Phalaenopsis*. **Orchid Biotechnology**. CHEN W.H.; CHEN, H. H. (ed). World Scientific. 277p. 2007.

TEVIOTDALE, B.L.; M.F. WILEY; D.H. HARPER. 1991. How disinfectants compare in preventing transmission of fire blight. *California Agriculture*. V.45 p.21-23. 1991.

THOMALE, H. Neue Wege der Orchideenvermehrung. **Orchidee**, v.7, p.104–105. 1956.

THOMPSON, A. D.; SMIRK, A. A. An unusual strain of tobacco mosaic virus from orchids. **New Zealand Journal of Botany**.v.5. n.2 p.197-70. 1967

URATA, U.; IWANAGA, E.T. The use of Ito-type vials for vegetative propagation of *Phalaenopsis*. **American Orchid Society Bulletin**. v.35, p.410–413. 1965.

VAN DER PIJL, L.; DODSON, C.H. **Orchid flowers, their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables. 214 p. 1966.

VAN UFFELEN, R. L. M.; DE GROOT, N. S.P. Floriculture world wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges. **Agricultural Economics Research Institute (LEI) Paper Series**, 2005.

XU W.Y.; CHEN Z. Y.; LIAO H. X. Effects of sulphates on ribavirin inhibition to tomato virus disease. **Journal of Fujian Agriculture and Forestry University**, v.33. p.162-165, 2004.

XU, P.; NIIMI, Y.; ARAKI, H. Production of virus-free bulblets from callus induced from scale culture of *Lilium longiflorum* "Georgia". **Journal of Japan Society for Horticultural Science**, v. 69, p.97-102, 2000.

YAM, T. W.; ARDITTI, J. History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology. **Plant Biotechnology Reports**, v. 3, p. 1-56, 2009.

YU, H.H.; WONG S.M. A DNA clone encoding the full-length infectious genome of *Odontoglossum ringspot tobamovirus* and mutagenesis of its coat proteingene. **Archives of Virology**. v.143. n.1. p.163–171, 1998.

WANG, H. I.; WANG, Y.T.; LIAO, L.J. Detection of *Cymbidium mosaic* Potexvirus by hybridization with cDNA probes or RT-PCR. **Plant Protection Bulletin Taipei**, v.42 p.25-42, 2000.

WEBSTER, R. D.; GRANOFF A. Tobamoviruses. In: **Encyclopedia of Virology** Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, New York. p.1436-1441, 1994.

WEILAND, C.M.; CANTOS, M.; TRONCOSO A.; PEREZ-CAMACHO F. Regeneration of virus-free plants by in vitro chemotherapy of GFLV (Grapevine fanleaf virus) infected explants of *Vitis vinifera* L. cv "Zalema". **Acta Horticulturae**, v.652, p.463-466, 2004.

WISLER, G. C.; ZETTLER, F.W.; PURCIFULL, D.E. A serodiagnostic technique for detecting *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **Phytopathology**.v. 72. p.835-37. 1982.

WONG, S. M.; CHANG, C. G.; LEE, Y. H.; TAN, K.; ZETTLER, F. W. Incidence of *Cymbidium mosaic* and *Odontoglossum ringspot* viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. **Crop Protection**. v. 13, n. 3, p.235-239, 1994.

WONG S.M.; MAHTANI P.H.; LEE, K.C.; YU H.H.; TAN Y.; NEO K.K.; CHAN Y.; WU M.; CHNG, C.G. *Cymbidium mosaic potexvirus* RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. **Archives of Virology**. v.142, p.383-391, 1997.

Apêndices

Apêndice A

| Questionário sobre a incidência de viroses | |
|---|---|
| Programa de Pós-Graduação em Sanidade, segurança alimentar e ambiental no agronegócio | |
| Discente: Renato Brogia Ferreira | |
| Orientador: Marcelo Eiras Co-Orientador: Giulio Cesare Stancato | |
| Nome da Empresa | |
| Cidade | |
| Tamanho da empresa (em número de vasos vendidos) | |
| Possui biofábrica própria? | Sim () Não () |
| Em caso negativo, compra mudas de empresa nacional? | Sim () Não () |
| Quantas variedades trabalha? | |
| Sobre viroses | |
| Reconhece os sintomas? | Sim () Não () |
| Tem conhecimento sobre vírus? | Sim () Não () |
| Sabe como eles se disseminam? | Sim () Não () |
| Encontram-se na empresa? | Sim () Não () |
| Em caso positivo, qual o destino das plantas infectadas? | Descarte () Isolamento () Permanecem na estufa () Chama alguém () Produto () |
| Conhece os vírus ORSV e CyMV? | Sim () Não () |
| Quantas variedades apresentam sintomas de viroses? | |
| Percebe susceptibilidade em alguma(s)? Quais? | |
| Nas estufas | |
| Cuidados na desinfecção das ferramentas | Álcool () Sódio () Outros compostos () Térmico () |
| Qual outro composto ou técnica utilizados? | |
| Existem telas contra insetos instaladas? | Sim () Não () |
| Cuidados com substratos | Autoclavagem () Reutilização () |
| Limpeza de vasos | Reutilização () Assepsia () |
| Treinamento de pessoal | Sim () Não () |
| Envolve fitossanidade/assepsia | Sim () Não () |
| Quais recomendações segue? | |
| Há algum tipo de treinamento? | () Na própria empresa () Contrata alguém |
| Quais recomendações ao manusear plantas? | Grupos em dias alternados () Assepsia () Ordem de trabalho () Plantas de diversas idades () |
| No CEASA | |
| Qual o valor das plantas vendidas (em reais)? | () mais cara () mais barata |
| Quanto se estima de perdas pelas viroses? | () porcentagem/vasos/valor |
| Qual o custo que isso representa? | () valor/porcentagem |
| Acredita que as plantas poderiam ter um valor maior? | Sim () Não () |

Figura 1 - Questionário apresentado aos produtores do Estado de São Paulo que comercializam no CEASA/Campinas, junto com fotos dos principais sintomas causados por ORSV e CymMV.

Apêndice B

Fotos dos principais sintomas causados por CymMV e ORSV em infecção mista em *Phalaenopsis*, apresentadas aos produtores do CEASA-Campinas juntamente ao questionário

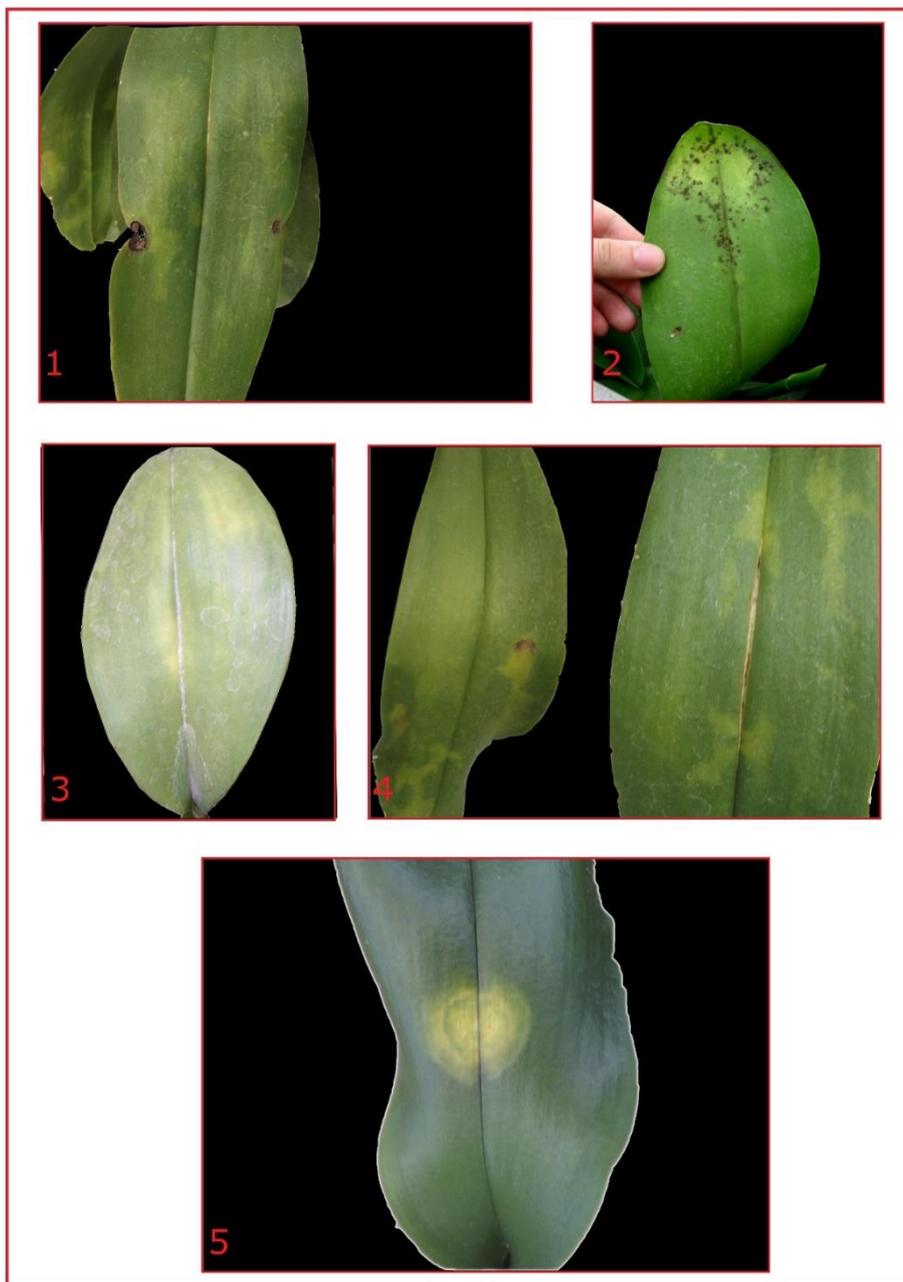


Figura 1 - Exemplos de *Phalaenopsis* coinfetados por CymMV e ORSV apresentando sintomas: (1) Folha apresentando manchas cloróticas com necrose nas bordas. (2) Folha com mancha clorótica e pontos necróticos nas bordas. (3 e 4) manchas cloróticas em folhas. (5) Anéis cloróticos bastante característicos de infecção viral.

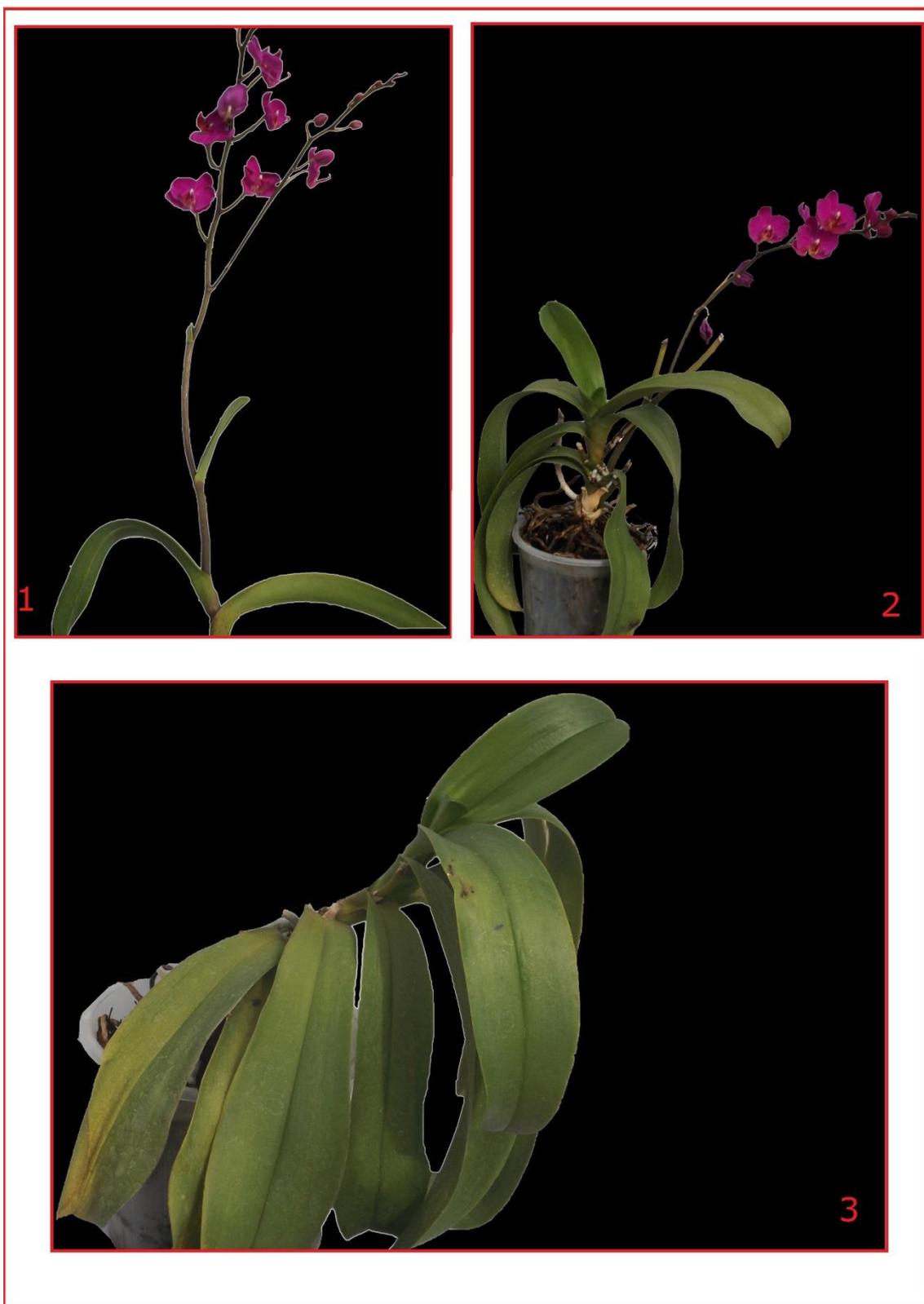


Figura 2 - Exemplos de *Phalaenopsis* coinfetados por CymMV e ORSV apresentando sintomas: (1) Alteração morfológica, haste crescendo em posição atípica, provavelmente por influência da infecção viral. (2) Produção de haste sem grande valor comercial, curta e com poucas flores, além de perda generalizada de vigor pela planta. (3) Planta com perda de vigor generalizada, não produziu hastes durante o cultivo.

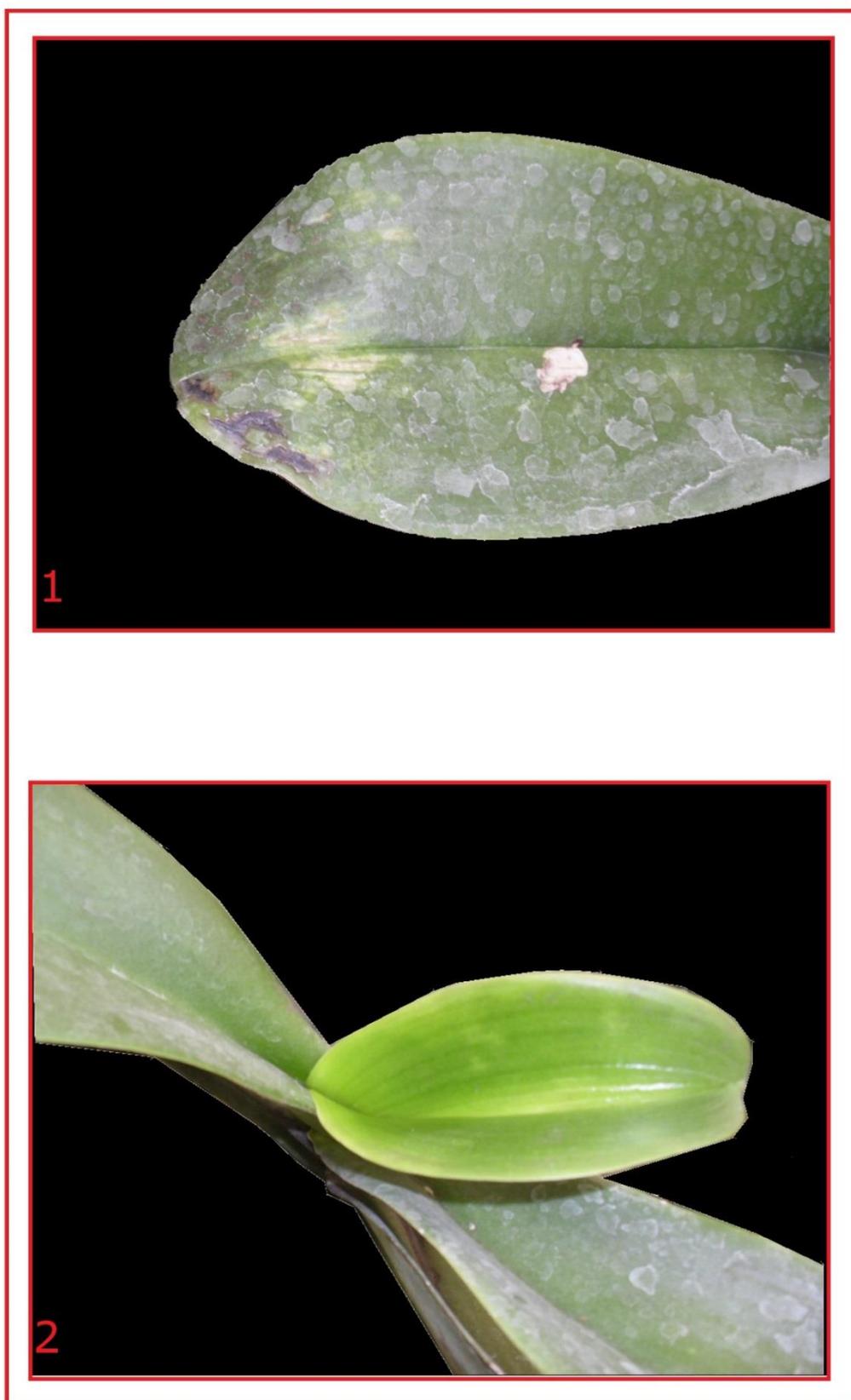


Figura 3 - Exemplos de *Phalaenopsis* coinfetados por CymMV e ORSV apresentando sintomas: (1) Necrose nas pontas das folhas e manchas cloróticas. (2) Folha nova já apresentando manchas cloróticas.

Apêndice C

Outros sintomas encontrados mediante visita aos locais de produção



Figura 1 - Em visita a produtores em Holambra foram facilmente notadas formações de anéis cloróticos, sintoma bastante característico de CymMV e ORSV em meio a produção de *Phalaenopsis*. Em (1) localizado na parte inferior da folha e em (2) e (3) na parte superior, nos três casos podem ser considerados sintomas bastante severos.



Figura 2 - Sintomas prováveis de infecção viral em *Phalaenopsis*. (1) Clorose e necrose em estado avançado, tomando quase a folha inteira. (2) Manchas acentuadas de clorose na folha com uma região necrótica. Nota-se os sintomas em folhas de duas plantas próximas. (3) Manchas cloróticas em folha com provável picada de inseto ao centro, observa-se que a clorose se espalha a partir do ponto de infecção.

Apêndice D

Sintomas de infecção por *Erwinia* spp. em *Phalaenopsis*

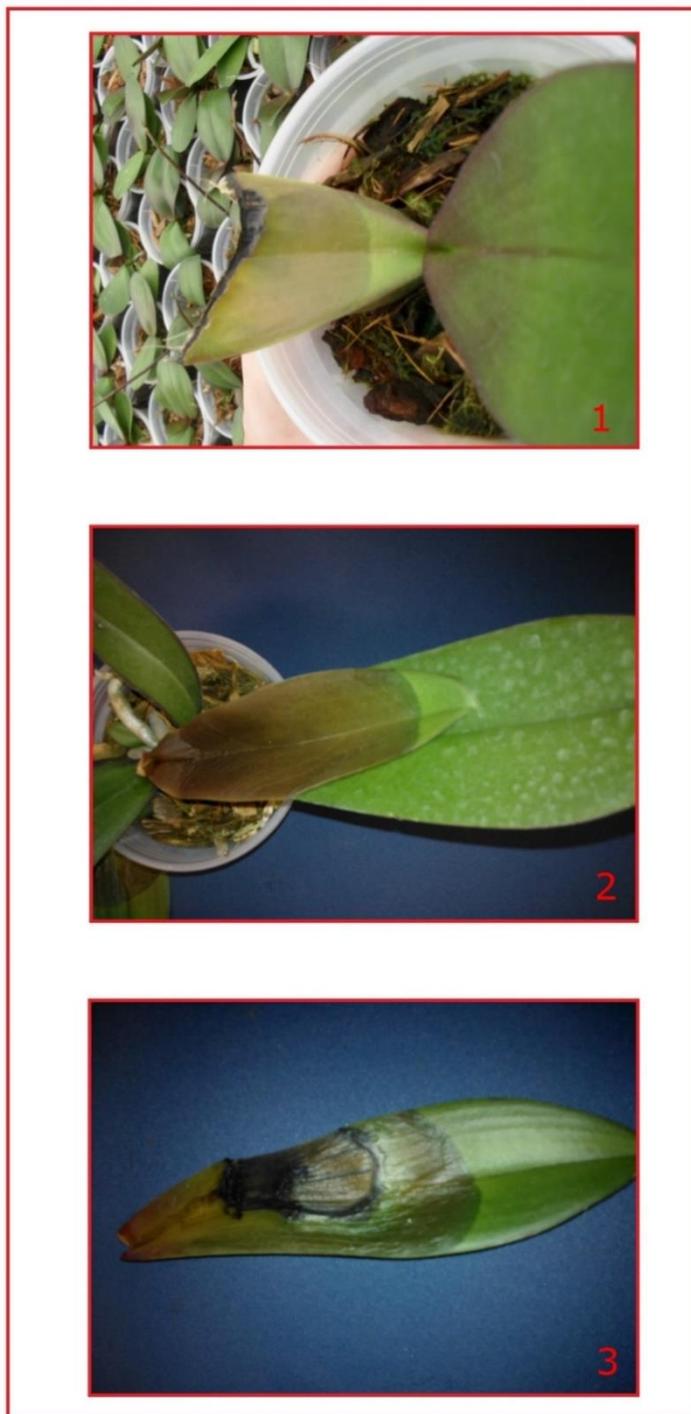


Figura 1 - Durante as entrevistas, houve relatos de *Erwinia* spp. infectando orquídeas causando grandes prejuízos aos produtores. Alguns sintomas: (1) Folha com sintoma originalmente em sua ponta. Teve uma parte cortada pelo produtor e, mesmo assim, o sintoma reapareceu; inutilizando a planta. (2) Folha tomada quase inteiramente pelo avanço da infecção bacteriana. (3) Folha destacada de planta infectada. Pode-se observar a origem do sintoma na região mais escura e sua gradual migração para as regiões mais claras.

Apêndice E

Tabela 1 - Componentes minerais e orgânicos dos meios de cultura utilizados

| Solução estoque | Componente(s) | Estabelecimento e multiplicação (g/L) | Enraizamento (g/L) |
|-----------------|---|---------------------------------------|--------------------|
| | Macronutrientes | | |
| | KNO ₃ | 0,95 | 0,95 |
| | NH ₄ NO ₃ | 0,297 | 0,33 |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,119 | 0,12 |
| | MgSO ₄ •7H ₂ O | 0,259 | 0,26 |
| | CaCl ₂ •2H ₂ O | 0,44 | 0,31 |
| (A) | FeSO ₄ •7H ₂ O + EDTA | 27,8 mg + 38,3 mg | 27,8 mg + 38,3 mg |
| (B) | Micronutrientes | | |
| | Mn SO ₄ •7H ₂ O | 22,3 mg/L | 22,3 mg/L |
| | H ₃ BO ₃ | 6,2 mg/L | 6,2 mg/L |
| | CuSO ₄ •5H ₂ O | 0,025 mg/L | 0,025 mg/L |
| | CoCl ₂ •6H ₂ O | 0,025 mg/L | 0,025 mg/L |
| | NaMoO ₄ •2H ₂ O | 0,25 mg/L | 0,25 mg/L |
| | KI | 0,83 mg/L | 0,83 mg/L |
| | NaH ₂ PO ₄ | 36 mg/L | 8,6 mg/L |
| | ZnSO ₄ •7H ₂ O | 8,6 mg/L | 22,3 mg/L |
| (C) | Componentes orgânicos | | |
| | inositol | 0,1 | 0,1 |
| | piridoxina | 0,5 mg/L | - |
| | ácido nicotínico | 0,5 mg/L | - |
| | Glicina | 2,0 mg/L | - |
| | Tiamina | 10,0 mg/L | - |
| | Hormônios | | |
| (D) | BAP | 5,0 mg | 10,0 mg/L |
| (E) | NAA | 1,0 mg | 0,5 mg/L |
| | Demais componentes | | |
| | sacarose | 10,0 | 20,0 |
| | água de coco | 200 ml | - |
| | extrato de banana nanica | - | 50,0 |
| | carvão ativo | - | 2,0 |
| | Caseína | 1,0 | 2,0 |
| | Adenina | 10,0 mg | - |
| | Ágar | 6,0 | 6,0 |

Apêndice F

CymMV (Proteína Capsidial – 681 pb)

```

ATGGGAGAGCCCCTCCAACCTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCTGACCCCACTTCATCACCCTAAGCTAG
CCGACCTCGCCGCCATCAAGTACTCACCGGTCACCTCATCAATTGCCACCCCGAAGAGATCAAGACCAT
AACCAGTTGTGGGTAAACAACCTTGGCCTCCCCGCCGACACTGTAGGTACCGCAGCCATTGATTTGGCT
CGTGCCCTACGCTGACGTCGGGGCTTCCAAGTCTGCTACCCTGCTTGGTGTCTGTCCCACGAAACCAGATG
TCCGCCCGCGCCGCTCTTGCCGCGCAGATCTTCGTGGCCAGTGTCACTCCCCGCCAGTTTTGCGCTTATTA
CGAAAAGTGGTGTGGAACCTGATGCTAGCCACCAATGATCCGCCGCCAATTGGGCCAAGGCTGGTTTC
CAGGAGGACACCCGGTTTGCCGCCTTTGACTTCTTCGACGCTGTGCGACTCCACCGCCGCTTTGGAACCCG
CTGAATGGCAACGTCGCCCTACCGACCGTGAGCGTGCCGCCACTCTATCGGGAAGTACGGCGCTCTTGC
CCGCCAGCGCATCCAGAACGGCAACCTCATCACCAACATTGCCGAGGTTACCAAGGGCCATCTTGGCTCC
ACCAACACCCCTCTATGCTCTGCCTGCACCCCTACTGAATAA-----

```

ORSV (Proteína Capsidial – 218 pb)

```

CCAAACACAACAAGCTCGAACAACTGTTCTACTGCAGTTTGCTGATGTTTGGCAGCCGGTCCCTACTTTG
ACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCGCTGGTTACTTCAGAGTTTATCGCTATGATCCTATATTAGATCCTTTAA
TAACTTTCTTAATGGGTACTTTTGATACTCGTAATAGAATAATCGAGGTAGAAAATCCGCAGAATCCGAC
AACTACGGA

```

Apêndice F - Resultados do sequenciamento para CymMV e ORSV após realização de RT-PCR com *primers* específicos. Foi utilizado RNA total extraído de uma planta infectada pelos dois vírus. Ambos os fragmentos amplicados possuem o tamanho esperado, e correspondem à da proteína capsidial de cada vírus.

Apêndice G

Resultados da seleção de matrizes para o ensaio (A) e (B)

Tabela 1 – Resultado do DAS-ELISA realizado para obtenção de matrizes de *Phalaenopsis* no ensaio (A), propagadas por sementes verdadeiras, para verificar a eficiência do antiviral ribavirin em explantes obtidos de matrizes coinfetadas por ORSV e CymMV.

| AMOSTRA | RESULTADOS | |
|------------------|-------------|-----------|
| | ORSV | CymMV |
| 1 | (+) 0.885 | (-) 0.063 |
| 2 | (+) 0.946 | (-) 0.016 |
| 3 | (-) 0.033 | (+) 0.537 |
| 4 | (+) 0.850 | (-) 0.293 |
| 5 | (-) 0.054 | (-) 0.039 |
| 6 | (-) 0.057 | (-) 0.084 |
| 7 | (-) 0.049 | (-) 0.067 |
| 8 | (-) 0.058 | (-) 0.045 |
| 9 | (-) 0.054 | (-) 0.098 |
| 10 | (-) 0.023 | (-) 0.027 |
| 11 | (-) 0.046 | (+) 0.975 |
| 12 | (-) 0.024 | (+) 2.604 |
| 13 | (-) 0.020 | (+) 1.626 |
| 14 | (-) 0.032 | (+) 1.247 |
| 15 | (-) 0.010 | (-) 0.207 |
| 16 | (-) 0.009 | (-) 0.135 |
| 17 | (+) 0.897 | (+) 1.201 |
| 18 | (-) 0.014 | (-) 0.224 |
| 19 | (-) 0.007 | (+) 1.724 |
| 20 | (+) 0.828 | (+) 1.748 |
| 21 | (+) 0.324 | (+) 1.140 |
| 22 | (-) 0.046 | (+) 1.344 |
| 23 | (-) 0.045 | (+) 1.638 |
| 24 | (-) 0.009 | (+) 1.806 |
| 25 | (-) 0.030 | (+) 1.389 |
| 26 | (+) 0.809 | (-) 0.042 |
| 27 | (-) 0.008 | (-) 0.143 |
| 28 | (-) 0.052 | (+) 0.572 |
| 29 | (-) 0.217 | (+) 0.964 |
| 30 | (-) 0.040 | (+) 1.102 |
| 31 | (-) 0.047 | (-) 0.093 |
| 32 | (+) 0.888 | (+) 0.798 |
| 33 | (-) 0.040 | (+) 0.966 |
| 34 | (+) 0.671 | (+) 0.739 |
| 35 | (-) 0.039 | (+) 0.812 |
| ORSV (+) | 0.711-1001 | |
| CymMV (+) | 0.608-0.756 | |
| ORSV (-) | 0.039-0.099 | |
| CymMV (-) | 0.043-0.181 | |
| Branco | 0.043-0.59 | |

Legenda: ORSV (+): Controles positivos para ORSV; CymMV (+): Controles positivos para CymMV; ORSV (-): Controles negativos para ORSV; CymMV (-): Controles negativos para CymMV;

BRANCO: Poços somente com tampões;

Em laranja, plantas negativas para CymMV; Em azul, plantas negativas para ORSV;

Em verde, plantas negativas para ambos os vírus.

Tabela 2 - Resultado do teste DAS-ELISA realizado para obtenção de matrizes de *Phalaenopsis* no ensaio (B), obtidas por propagação vegetativa, para verificar a eficiência do antiviral ribavirin em explantes obtidos de matrizes coinfetadas por ORSV e CymMV.

| AMOSTRA | RESULTADOS | |
|------------------|-------------|-----------|
| | ORSV | CymMV |
| 1 | (+) 1.283 | (-) 0.062 |
| 2 | (-) 0.032 | (-) 0.057 |
| 3* | (+) 0.506 | (+) 0.392 |
| 4 | (-) 0.143 | (-) 0.057 |
| 5 | (-) 0.199 | (-) 0.064 |
| 6 | (+) 1.007 | (-) 0.051 |
| 7* | (+) 1.907 | (+) 0.684 |
| 8 | (+) 1.174 | (-) 0.025 |
| 9 | (+) 0.684 | (-) 0.040 |
| 10 | (-) 0.052 | (-) 0.066 |
| 11* | (+) 0.264 | (+) 1.757 |
| 12 | (+) 0.822 | (-) 0.140 |
| 13* | (+) 0.934 | (+) 0.555 |
| 14 | (+) 1.488 | (-) 0.329 |
| 15 | (-) 0.076 | (-) 0.007 |
| 16 | (+) 0.903 | (-) 0.036 |
| 17 | (+) 1.408 | (-) 0.045 |
| 18 | (+) 1.269 | (-) 0.079 |
| 19 | (+) 0.826 | (+) 0.700 |
| 20* | (+) 0.364 | (+) 2.402 |
| 21* | (+) 0.606 | (+) 2.482 |
| 22* | (+) 1.451 | (+) 1.252 |
| 23* | (+) 0.800 | (+) 1.044 |
| 24* | (+) 1.068 | (+) 2.112 |
| 25* | (+) 1.488 | (+) 0.998 |
| 26 | (-) 0.094 | (+) 0.685 |
| 27 | (-) 0.227 | (+) 1.255 |
| 28* | (+) 1.399 | (+) 1.534 |
| 29 | (-) 0.144 | (-) 0.095 |
| 30* | (+) 0.919 | (+) 2.393 |
| 31 | (-) 0.165 | (+) 1.150 |
| 32* | (+) 0.913 | (+) 1.686 |
| 33* | (+) 0.845 | (+) 1.525 |
| 34* | (+) 1.319 | (+) 0.799 |
| 35 | (-) 0.061 | (+) 0.616 |
| 36 | (+) 1.386 | (-) 0.236 |
| 37* | (+) 1.686 | (+) 0.689 |
| 38 | (+) 1.004 | (-) 0.104 |
| 39* | (+) 1.173 | (+) 0.374 |
| 40* | (+) 0.854 | (+) 0.394 |
| 41* | (+) 0.685 | (+) 1.210 |
| 42 | (+) 0.816 | (-) 0.138 |
| 43* | (+) 1.221 | (+) 0.601 |
| 44* | (+) 0.799 | (+) 1.313 |
| 45 | (-) 0.074 | (+) 0.657 |
| 46* | (+) 1.025 | (+) 1.368 |
| 47 | (-) 0.098 | (+) 0.599 |
| 48 | (-) 0.201 | (+) 0.639 |
| 49* | (+) 1.602 | (+) 0.463 |
| 50* | (+) 0.995 | (+) 0.679 |
| 51* | (+) 1.286 | (+) 0.652 |
| 52* | (+) 1.465 | (+) 1.022 |
| 53* | (+) 1.148 | (+) 0.772 |
| 54* | (+) 1.165 | (+) 1.340 |
| 55 | (-) 0.165 | (+) 1.385 |
| ORSV (+) | 1.188-1.300 | |
| CymMV (+) | 0.228-2.153 | |
| ORSV (-) | 0.052-0.55 | |
| CymMV (-) | 0.057-0.061 | |
| Branco | 0.54-0.073 | |

Legenda: ORSV (+): Controles positivos para ORSV. CymMV (+): Controles positivos para CymMV.
 ORSV (-): Controles negativos para ORSV. CymMV (-): Controles negativos para CymMV.
 Branco: Poços somente com tampões.

Em laranja, plantas negativas para CymMV; Em azul, plantas negativas para ORSV; Em verde, plantas negativas para ambos os vírus.

Apêndice H

Resultados das amostragens para avaliação da limpeza viral

Tabela 1 – Resultado da indexação por DAS-ELISA da primeira amostragem no ensaio (A), realizado com matrizes irmãs e 40 ppm/L de antiviral, após 360 dias de cultivo *in vitro*.

| Amostra | Repetições | | | | | |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | I | | II | | III | |
| | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| 1 | (-) 0.004 | (-) 0.011 | (-) 0.052 | (+) 0.818 | (-) 0.012 | (-) 0.175 |
| 2 | (-) 0.001 | (-) 0.122 | (-) 0.012 | (+) 0.234 | (-) 0.004 | (-) 0.058 |
| 3 | (-) 0.001 | (-) 0.062 | (-) 0.006 | (+) 0.229 | (-) 0.016 | (+) 0.266 |
| 4 | (-) 0.012 | (+) 0.923 | (+) 0.909 | (+) 1.010 | (+) 0.618 | (+) 0.932 |
| 5 | (+) 0.273 | (-) 0.129 | (+) 0.815 | (+) 0.525 | (-) 0.104 | (+) 0.446 |
| 6 | (-) 0.148 | (+) 0.875 | (-) 0.158 | (+) 1.043 | (-) 0.084 | (+) 0.812 |
| 7 | (-) 0.013 | (+) 0.622 | (-) 0.011 | (-) 0.141 | (-) 0.174 | (+) 0.913 |
| 8 | (+) 0.222 | (+) 0.677 | (-) 0.009 | (-) 0.049 | (-) 0.016 | (+) 0.986 |
| 9 | (+) 0.257 | (+) 0.716 | (+) 0.433 | (+) 1.075 | (+) 0.654 | (+) 0.211 |
| 10 | (-) 0.104 | (+) 0.587 | (-) 0.016 | (+) 1.026 | (-) 0.168 | (+) 0.670 |
| 11 | (-) 0.015 | (+) 0.690 | (-) 0.013 | (-) 0.050 | (+) 0.494 | (+) 0.852 |
| 12 | (-) 0.006 | (+) 0.385 | (-) 0.011 | (+) 1.053 | (-) 0.004 | (-) 0.001 |
| 13 | (-) 0.000 | (+) 0.296 | (-) 0.067 | (+) 0.724 | (+) 0.774 | (+) 0.640 |
| 14 | (-) 0.004 | (-) 0.059 | (+) 0.247 | (+) 0.781 | (-) 0.037 | (+) 0.540 |
| 15 | (-) 0.006 | (+) 0.559 | (-) 0.008 | (+) 0.612 | (-) 0.014 | (+) 0.851 |
| 16 | (-) 0.004 | (+) 0.303 | (-) 0.007 | (+) 0.411 | (+) 0.255 | (+) 0.433 |
| 17 | (-) 0.000 | (-) 0.169 | (+) 0.499 | (+) 0.897 | (-) 0.037 | (+) 0.629 |
| 18 | (+) 0.209 | (+) 0.496 | (+) 0.658 | (-) 0.042 | (+) 0.294 | (+) 0.866 |
| 19 | (-) 0.013 | (+) 0.555 | (+) 0.874 | (+) 0.497 | (-) 0.123 | (+) 0.211 |
| 20 | (-) 0.012 | (+) 0.804 | (-) 0.168 | (+) 0.912 | (-) 0.057 | (+) 0.940 |
| 21 | (-) 0.018 | (-) 0.001 | (-) 0.002 | (+) 1.213 | (-) 0.062 | (-) 0.113 |
| 22 | (+) 0.355 | (+) 0.764 | (-) 0.019 | (-) 0.011 | (-) 0.003 | (+) 0.203 |
| 23 | (-) 0.044 | (+) 0.688 | (+) 0.506 | (+) 0.932 | (-) 0.082 | (+) 0.476 |
| 24 | (-) 0.185 | (+) 0.468 | (-) 0.018 | (+) 1.058 | (-) 0.022 | (-) 0.116 |
| 25 | (-) 0.001 | (-) 0.098 | (-) 0.014 | (+) 0.973 | (-) 0.197 | (+) 0.281 |
| 26 | (-) 0.020 | (-) 0.089 | (-) 0.005 | (+) 0.276 | (-) 0.017 | (+) 0.750 |
| 27 | (-) 0.022 | (+) 0.241 | (-) 0.084 | (+) 0.632 | (-) 0.015 | (-) 0.034 |
| 28 | (+) 0.687 | (+) 0.782 | (+) 0.811 | (+) 0.922 | (+) 0.530 | (+) 0.582 |
| 29 | (-) 0.087 | (+) 0.877 | (-) 0.154 | (+) 0.631 | (+) 0.436 | (+) 0.534 |
| 30 | (-) 0.001 | (-) 0.122 | (+) 0.543 | (+) 0.491 | (+) 0.396 | (+) 0.469 |
| Controle CymMV (+) | | | 0.727-0.732 | | | |
| Controle CymMV (-) | | | 0.004-0.007 | | | |
| Controle ORSV (+) | | | 0.711-0.770 | | | |
| Controle ORSV (-) | | | 0.006-0.008 | | | |
| Branco | | | 0.005-0.008 | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV; Em azul, plantas negativas para ORSV; Em verde, plantas negativas para ambos os vírus.

Tabela 2 - Resultado da indexação por DAS-ELISA da segunda amostragem no ensaio (A), realizado com matrizes irmãs e 40 ppm/L de antiviral, após 450 dias de cultivo *in vitro*.

| Amostra | Repetições | | | | | |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | I | | II | | III | |
| | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| 1 | (+) 0.323 | (-) 0.003 | (-) 0.026 | (+) 0.683 | (+) 0.304 | (+) 1.937 |
| 2 | (-) 0.001 | (-) 0.001 | (-) 0.005 | (+) 1.375 | (+) 1.148 | (-) 0.041 |
| 3 | (-) 0.009 | (-) 0.000 | (+) 1.519 | (+) 2.824 | (+) 0.431 | (+) 2.035 |
| 4 | (+) 0.383 | (-) 0.002 | (+) 0.886 | (+) 0.538 | (-) 0.007 | (-) 0.037 |
| 5 | (-) 0.182 | (-) 0.004 | (-) 0.005 | (+) 0.717 | (+) 0.543 | (+) 0.281 |
| 6 | (-) 0.037 | (-) 0.005 | (-) 0.035 | (-) 0.005 | (-) 0.005 | (+) 1.503 |
| 7 | (-) 0.001 | (-) 0.008 | (-) 0.004 | (+) 0.517 | (-) 0.145 | (-) 0.124 |
| 8 | (-) 0.002 | (-) 0.009 | (-) 0.012 | (-) 0.040 | (+) 1.525 | (+) 1.561 |
| 9 | (-) 0.002 | (-) 0.012 | (-) 0.175 | (+) 2.057 | (+) 0.546 | (+) 2.255 |
| 10 | (+) 0.367 | (-) 0.011 | (+) 0.217 | (+) 2.005 | (-) 0.025 | (+) 1.912 |
| 11 | (-) 0.017 | (-) 0.012 | (-) 0.003 | (+) 2.649 | (-) 0.059 | (+) 0.694 |
| 12 | (-) 0.095 | (-) 0.011 | (-) 0.121 | (+) 2.406 | (-) 0.029 | (+) 1.025 |
| 13 | (-) 0.006 | (-) 0.002 | (-) 0.010 | (+) 0.942 | (-) 0.049 | (+) 0.511 |
| 14 | (-) 0.169 | (-) 0.003 | (-) 0.002 | (+) 0.940 | (-) 0.019 | (-) 0.079 |
| 15 | (-) 0.056 | (-) 0.003 | (+) 0.572 | (+) 1.685 | (-) 0.021 | (+) 1.525 |
| 16 | (-) 0.039 | (-) 0.004 | (-) 0.009 | (-) 0.058 | (-) 0.014 | (+) 1.786 |
| 17 | (+) 2.003 | (+) 2.069 | (-) 0.005 | (-) 0.059 | (+) 0.407 | (+) 1.094 |
| 18 | (-) 0.001 | (-) 0.000 | (-) 0.057 | (-) 0.019 | (+) 1.174 | (+) 1.026 |
| 19 | (-) 0.166 | (-) 0.002 | (+) 1.732 | (+) 0.702 | (+) 0.819 | (+) 1.001 |
| 20 | (+) 0.887 | (-) 0.002 | (-) 0.002 | (+) 0.420 | (-) 0.016 | (+) 0.725 |
| 21 | (+) 1.283 | (-) 0.007 | (-) 0.006 | (+) 1.720 | (-) 0.018 | (+) 0.611 |
| 22 | (-) 0.006 | (-) 0.013 | (+) 1.195 | (+) 1.936 | (-) 0.190 | (+) 0.723 |
| 23 | (-) 0.001 | (+) 0.617 | (+) 1.693 | (+) 1.314 | (+) 1.297 | (+) 0.692 |
| 24 | (-) 0.034 | (-) 0.007 | (+) 1.973 | (-) 0.063 | (+) 1.245 | (+) 1.189 |
| 25 | (-) 0.010 | (-) 0.015 | (+) 1.045 | (+) 1.700 | (+) 1.500 | (+) 0.684 |
| 26 | (-) 0.016 | (-) 0.002 | (-) 0.090 | (-) 0.049 | (+) 0.406 | (+) 0.291 |
| 27 | (-) 0.019 | (-) 0.025 | (+) 0.433 | (+) 0.961 | (+) 1.019 | (+) 1.408 |
| 28 | (-) 0.059 | (-) 0.011 | (+) 0.810 | (+) 0.847 | (-) 0.018 | (+) 1.225 |
| 29 | (-) 0.080 | (+) 0.830 | (+) 1.778 | (+) 1.055 | (+) 0.791 | (-) 0.157 |
| 30 | (+) 0.814 | (+) 0.747 | (+) 1.878 | (+) 0.529 | (+) 1.075 | (+) 1.538 |
| Controle CymMV (+) | | | 1.385-1.753 | | | |
| Controle CymMV (-) | | | 0.004-0.009 | | | |
| Controle ORSV (+) | | | 1.924-2.366 | | | |
| Controle ORSV (-) | | | 0.008-0.014 | | | |
| Branco | | | 0.000-0.006 | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV; Em azul, plantas negativas para ORSV; Em verde, plantas negativas para ambos os vírus.

Tabela 3 - Resultado da indexação por DAS-ELISA da terceira amostragem no ensaio (A), realizado com matrizes irmãs e 40 ppm/L de antiviral, após 490 dias de cultivo *in vitro*.

| Amostra | Repetições | | | | | |
|--------------------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | I | | II | | III | |
| | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| 1 | (-) 0.003 | (-) 0.001 | (-) 0.043 | (+) 1.336 | (-) 0.008 | (-) 0.006 |
| 2 | (-) 0.076 | (-) 0.067 | (+) 0.371 | (-) 0.168 | (-) 0.006 | (-) 0.114 |
| 3 | (+) 0.323 | (-) 0.036 | (-) 0.001 | (+) 0.216 | (-) 0.200 | (+) 1.402 |
| 4 | (-) 0.031 | (-) 0.018 | (+) 1.263 | (+) 0.271 | (-) 0.020 | (+) 1.473 |
| 5 | (+) 0.511 | (-) 0.033 | (-) 0.032 | (+) 0.306 | (+) 0.214 | (+) 0.776 |
| 6 | (-) 0.017 | (-) 0.016 | (-) 0.003 | (-) 0.028 | (+) 0.245 | (+) 1.419 |
| 7 | (-) 0.012 | (-) 0.001 | (-) 0.000 | (+) 0.450 | (-) 0.029 | (+) 0.941 |
| 8 | (-) 0.006 | (+) 0.876 | (-) 0.000 | (-) 0.140 | (+) 0.215 | (-) 0.011 |
| 9 | (-) 0.006 | (-) 0.009 | (-) 0.010 | (+) 0.283 | (-) 0.003 | (+) 0.422 |
| 10 | (-) 0.006 | (+) 0.412 | (+) 0.844 | (+) 0.596 | (-) 0.006 | (+) 0.579 |
| 11 | (-) 0.004 | (-) 0.037 | (-) 0.005 | (+) 0.219 | (-) 0.003 | (-) 0.673 |
| 12 | (-) 0.001 | (-) 0.150 | (-) 0.000 | (-) 0.013 | (-) 0.006 | (-) 0.011 |
| 13 | (-) 0.006 | (-) 0.002 | (-) 0.025 | (+) 0.200 | (-) 0.029 | (+) 0.921 |
| 14 | (-) 0.003 | (-) 0.030 | (-) 0.002 | (+) 0.202 | (-) 0.021 | (-) 0.080 |
| 15 | (-) 0.009 | (-) 0.038 | (-) 0.001 | (+) 0.222 | (-) 0.016 | (-) 0.052 |
| 16 | (-) 0.000 | (-) 0.021 | (-) 0.006 | (+) 0.379 | (-) 0.018 | (+) 1.113 |
| 17 | (-) 0.004 | (+) 0.880 | (+) 0.240 | (+) 0.227 | (-) 0.082 | (-) 0.109 |
| 18 | (-) 0.001 | (-) 0.023 | (-) 0.001 | (+) 0.554 | (-) 0.120 | (-) 0.059 |
| 19 | (-) 0.054 | (-) 0.083 | (-) 0.002 | (+) 0.871 | (+) 0.394 | (+) 1.107 |
| 20 | (+) 1.956 | (-) 0.119 | (-) 0.001 | (-) 0.003 | (-) 0.013 | (+) 0.868 |
| 21 | (-) 0.006 | (-) 0.002 | (-) 0.150 | (+) 0.783 | (-) 0.023 | (+) 1.265 |
| 22 | (-) 0.008 | (-) 0.074 | (-) 0.034 | (+) 0.568 | (-) 0.047 | (+) 0.858 |
| 23 | (+) 0.330 | (+) 0.663 | (-) 0.283 | (-) 0.029 | (-) 0.020 | (+) 1.199 |
| 24 | (-) 0.016 | (+) 0.890 | (+) 0.797 | (+) 1.159 | (-) 0.048 | (+) 1.219 |
| 25 | (-) 0.009 | (-) 0.124 | (-) 0.045 | (-) 0.011 | (-) 0.107 | (+) 1.111 |
| 26 | (-) 0.011 | (+) 1.137 | (-) 0.180 | (-) 0.027 | (-) 0.068 | (+) 0.960 |
| 27 | (-) 0.010 | (-) 0.107 | (-) 0.003 | (+) 0.644 | (-) 0.010 | (+) 0.816 |
| 28 | (-) 0.015 | (+) 0.375 | (-) 0.001 | (+) 0.906 | (+) 0.316 | (+) 0.939 |
| 29 | (-) 0.007 | (-) 0.063 | (-) 0.001 | (-) 0.019 | (-) 0.031 | (+) 1.112 |
| 30 | (-) 0.034 | (-) 0.013 | (-) 0.005 | (+) 0.525 | (+) 0.558 | (+) 1.124 |
| Controle CymMV (+) | | | 1.070-0.784 | | | |
| Controle CymMV (-) | | | 0.002-0.010 | | | |
| Controle ORSV (+) | | | 0.970-1.071 | | | |
| Controle ORSV (-) | | | 0.004-0.009 | | | |
| Branco | | | 0.000-0.024 | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV; Em azul, plantas negativas para ORSV; Em verde, plantas negativas para ambos os vírus.

Tabela 4 - Resultado da indexação por DAS-ELISA da primeira amostragem no ensaio (B), realizado com clones da variedade "44611" em 0, 10, 30 e 50 ppm/L após 240 dias de cultivo *in vitro*.

| | | Tratamentos (ppm de ribavirin por litro de meio de cultura) | | | | | | | |
|--------------------|----------|---|-----------|-----------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 ppm | | 10 ppm | | 30 ppm | | 50 ppm | |
| Repetições | Amostras | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| I | 1 | (+) 0.937 | (+) 1.153 | (+) 1.148 | (+) 0.931 | (+) 0.843 | (+) 0.650 | (+) 0.519 | (+) 0.448 |
| | 2 | (+) 1.100 | (+) 0.484 | (+) 1.058 | (+) 0.847 | (+) 0.578 | (+) 0.439 | (-) 0.180 | (+) 0.449 |
| | 3 | (+) 0.970 | (+) 0.829 | (+) 1.089 | (+) 0.892 | (+) 0.719 | (+) 0.640 | (-) 0.013 | (+) 0.452 |
| | 4 | (+) 1.104 | (+) 0.725 | (+) 1.084 | (+) 0.814 | (+) 0.830 | (+) 0.672 | (+) 0.285 | (+) 0.544 |
| | 5 | (+) 1.170 | (+) 0.950 | (+) 1.087 | (+) 0.844 | (+) 0.494 | (+) 0.678 | (-) 0.043 | (+) 0.217 |
| | 6 | (+) 1.116 | (+) 0.921 | (+) 1.051 | (+) 0.874 | (+) 0.413 | (+) 0.809 | (-) 0.006 | (+) 0.447 |
| | 7 | (+) 1.116 | (+) 0.826 | (+) 1.333 | (+) 0.970 | (+) 0.272 | (+) 0.577 | (-) 0.003 | (+) 0.522 |
| | 8 | (+) 1.101 | (+) 0.781 | (+) 1.180 | (+) 0.967 | (+) 0.552 | (+) 0.459 | (+) 0.503 | (+) 0.556 |
| | 9 | (+) 1.131 | (+) 0.814 | (+) 1.130 | (+) 0.900 | (+) 0.775 | (+) 0.653 | (+) 0.482 | (+) 0.505 |
| | 10 | (+) 1.064 | (+) 0.822 | (+) 1.074 | (+) 0.823 | (+) 0.869 | (+) 1.180 | (-) 0.045 | (+) 0.633 |
| II | 1 | (+) 1.024 | (+) 0.937 | (+) 0.944 | (+) 0.865 | (+) 0.551 | (+) 0.725 | (+) 0.732 | (+) 0.625 |
| | 2 | (+) 1.090 | (+) 0.955 | (+) 1.093 | (+) 0.872 | (+) 0.633 | (+) 0.450 | (+) 0.803 | (+) 0.616 |
| | 3 | (+) 0.701 | (+) 0.610 | (+) 1.125 | (+) 0.854 | (+) 0.639 | (+) 0.483 | (+) 1.058 | (+) 0.523 |
| | 4 | (+) 0.831 | (+) 0.623 | (+) 0.954 | (+) 0.780 | (+) 0.678 | (+) 0.367 | (+) 0.834 | (+) 0.626 |
| | 5 | (+) 0.891 | (+) 0.672 | (+) 1.047 | (+) 0.830 | (+) 0.636 | (+) 0.329 | (+) 0.918 | (+) 0.610 |
| | 6 | (+) 1.063 | (+) 0.633 | (+) 0.896 | (+) 0.792 | (+) 0.780 | (+) 0.488 | (+) 0.885 | (+) 0.593 |
| | 7 | (+) 0.931 | (+) 0.708 | (+) 0.922 | (+) 0.600 | (+) 0.837 | (+) 0.597 | (+) 0.942 | (+) 0.581 |
| | 8 | (+) 1.147 | (+) 0.681 | (+) 1.031 | (+) 0.773 | (+) 0.559 | (+) 0.390 | (+) 0.818 | (+) 0.638 |
| | 9 | (+) 0.817 | (+) 0.698 | (+) 1.215 | (+) 0.998 | (+) 0.728 | (+) 0.595 | (+) 0.988 | (+) 0.633 |
| | 10 | (+) 0.870 | (+) 0.583 | (+) 1.123 | (+) 0.928 | (+) 0.686 | (+) 0.559 | (+) 0.683 | (+) 0.620 |
| III | 1 | (+) 0.410 | (+) 0.570 | (+) 1.120 | (+) 0.931 | (+) 0.713 | (+) 0.675 | (+) 0.684 | (+) 0.490 |
| | 2 | (+) 0.884 | (+) 0.614 | (+) 0.856 | (+) 0.804 | (+) 0.400 | (+) 0.537 | (-) 0.015 | (+) 0.583 |
| | 3 | (+) 1.004 | (+) 0.743 | (+) 1.002 | (+) 0.872 | (+) 0.282 | (+) 0.704 | (+) 0.623 | (+) 0.493 |
| | 4 | (+) 1.159 | (+) 0.625 | (+) 0.948 | (+) 0.912 | (+) 0.698 | (+) 0.402 | (+) 0.892 | (+) 0.379 |
| | 5 | (+) 0.221 | (+) 0.227 | (+) 0.956 | (+) 0.850 | (+) 1.051 | (+) 1.341 | (-) 0.169 | (+) 0.649 |
| | 6 | (+) 0.581 | (+) 0.779 | (+) 0.851 | (+) 0.848 | (+) 0.728 | (+) 1.185 | (+) 0.400 | (+) 0.354 |
| | 7 | (+) 0.890 | (+) 0.638 | (+) 0.861 | (+) 0.812 | (+) 0.655 | (+) 0.372 | (+) 0.392 | (+) 0.675 |
| | 8 | (+) 0.547 | (+) 0.585 | (+) 0.935 | (+) 0.852 | (+) 0.799 | (+) 0.411 | (+) 0.336 | (+) 0.447 |
| | 9 | (+) 0.717 | (+) 0.632 | (+) 0.842 | (+) 0.853 | (+) 0.515 | (+) 0.490 | (+) 0.403 | (+) 0.388 |
| | 10 | (+) 0.309 | (+) 0.433 | (+) 0.988 | (+) 0.782 | (+) 0.827 | (+) 0.472 | (+) 0.660 | (+) 0.397 |
| Controle CymMV (+) | | | | | | 0.257-0.895 | | | |
| Controle CymMV (-) | | | | | | 0.044-0.045 | | | |
| Controle ORSV (+) | | | | | | 0.468-0.782 | | | |
| Controle ORSV (-) | | | | | | 0.019-0.028 | | | |
| Branco | | | | | | 0.005-0.030 | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV;

Tabela 5 - Resultado da indexação por DAS-ELISA da segunda amostragem no ensaio (B), realizado com clones da variedade “44611” em 0, 10, 30 e 50 ppm/L após 330 dias de cultivo *in vitro*.

| Repetições | Amostras | 0 ppm | | 10 ppm | | 30 ppm | | 50 ppm | |
|------------|----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| I | 1 | (+) 1.946 | (+) 1.059 | (+) 1.156 | (+) 0,769 | (+) 0.877 | (+) 0.967 | (-) 0.021 | (+) 0.811 |
| | 2 | (+) 1.326 | (+) 0.940 | (+) 1.240 | (+) 1.199 | (+) 0.843 | (+) 0.833 | (+) 0.370 | (+) 0.937 |
| | 3 | (+) 1.252 | (+) 0.898 | (+) 1.105 | (+) 1.101 | (+) 0.866 | (+) 0.721 | (+) 0.361 | (+) 0.726 |
| | 4 | (+) 1.386 | (+) 1.025 | (+) 0.982 | (+) 1.159 | (+) 0.677 | (+) 0.664 | (-) 0.183 | (+) 0.764 |
| | 5 | (+) 1.262 | (+) 0.988 | (+) 1.056 | (+) 1.201 | (+) 0.295 | (+) 0.859 | (-) 0.002 | (+) 0.578 |
| | 6 | (+) 1.116 | (+) 0.959 | (+) 1.432 | (+) 1.189 | (+) 0.792 | (+) 0.613 | (+) 0.245 | (+) 0.650 |
| | 7 | (+) 1.179 | (+) 0.964 | (+) 1.318 | (+) 1.246 | (+) 0.777 | (+) 0.823 | (+) 0.467 | (+) 0.521 |
| | 8 | (+) 1.235 | (+) 0.868 | (+) 1.266 | (+) 1.256 | (+) 0.750 | (+) 0.700 | (-) 0.015 | (+) 0.826 |
| | 9 | (+) 1.278 | (+) 0.908 | (+) 1.358 | (+) 1.152 | (-) 0.010 | (+) 0.522 | (-) 0.192 | (+) 0.826 |
| | 10 | (+) 1.167 | (+) 0.518 | (+) 1.195 | (+) 0.570 | (+) 0.563 | (+) 0.759 | (-) 0.046 | (+) 0.929 |
| II | 1 | (+) 1.167 | (+) 0.933 | (+) 0.985 | (+) 1.055 | (-) 0.099 | (+) 0.408 | (+) 1.133 | (+) 0.980 |
| | 2 | (+) 1.174 | (+) 0.802 | (+) 1.060 | (+) 1.066 | (-) 0.124 | (+) 0.392 | (+) 0.886 | (+) 0.936 |
| | 3 | (+) 1.240 | (+) 1.044 | (+) 1.123 | (+) 1.022 | (+) 0.878 | (+) 0.965 | (+) 0.928 | (+) 1.122 |
| | 4 | (+) 1.159 | (+) 0.949 | (+) 1.121 | (+) 0.595 | (-) 0.140 | (+) 0.350 | (+) 0.419 | (+) 1.045 |
| | 5 | (+) 1.109 | (+) 0.895 | (+) 1.134 | (+) 1.093 | (+) 0.561 | (+) 0.711 | (+) 0.439 | (+) 0.984 |
| | 6 | (+) 1.185 | (+) 1.014 | (+) 1.074 | (+) 1.027 | (+) 0.774 | (+) 0.838 | (-) 0.123 | (+) 0.607 |
| | 7 | (+) 1.199 | (+) 0.898 | (+) 1.146 | (+) 1.030 | (+) 0.214 | (+) 0.753 | (+) 0.806 | (+) 1.006 |
| | 8 | (+) 1.128 | (+) 0.913 | (+) 1.239 | (+) 1.047 | (+) 0.525 | (+) 0.818 | (-) 0.002 | (+) 0.808 |
| | 9 | (+) 1.117 | (+) 0.866 | (+) 1.490 | (+) 1.153 | (-) 0.069 | (+) 0.456 | (+) 0.501 | (+) 0.953 |
| | 10 | (+) 1.075 | (+) 0.908 | (+) 1.264 | (+) 1.094 | (+) 0.701 | (+) 0.717 | (-) 0.102 | (+) 0.838 |
| III | 1 | (+) 1.209 | (+) 0.945 | (+) 1.277 | (+) 1.212 | (+) 0.629 | (+) 0.682 | (+) 0.611 | (+) 0.456 |
| | 2 | (+) 1.261 | (+) 0.878 | (+) 1.216 | (+) 1.220 | (-) 0.024 | (+) 0.358 | (-) 0.002 | (+) 0.377 |
| | 3 | (+) 1.188 | (+) 0.873 | (+) 1.075 | (+) 1.174 | (-) 0.129 | (+) 0.535 | (-) 0.137 | (+) 0.956 |
| | 4 | (+) 1.034 | (+) 0.716 | (+) 1.084 | (+) 0.739 | (+) 0.714 | (+) 0.780 | (+) 0.867 | (+) 0.853 |
| | 5 | (+) 1.288 | (+) 1.045 | (+) 1.073 | (+) 1.076 | (+) 0.768 | (+) 0.714 | (+) 0.825 | (+) 1.123 |
| | 6 | (+) 1.250 | (+) 1.031 | (+) 1.224 | (+) 1.150 | (+) 0.899 | (+) 0.912 | (-) 0.060 | (+) 1.059 |
| | 7 | (+) 1.214 | (+) 1.010 | (+) 1.040 | (+) 1.029 | (-) 0.033 | (+) 0.855 | (+) 0.482 | (+) 0.902 |
| | 8 | (+) 0.824 | (+) 0.931 | (+) 1.064 | (+) 1.018 | (+) 0.810 | (+) 0.760 | (+) 1.009 | (+) 0.971 |
| | 9 | (+) 1.153 | (+) 0.925 | (+) 1.060 | (+) 0.826 | (+) 0.806 | (+) 0.823 | (+) 0.679 | (+) 0.963 |
| | 10 | (+) 1.069 | (+) 0.982 | (+) 0.988 | (+) 1.017 | (+) 0.905 | (+) 0.522 | (-) 0.008 | (+) 0.753 |
| CymMV (+) | | | | | | | | | |
| CymMV(-) | | 0.257-0.895 | | | | | | | |
| ORSV (+) | | 0.002-0.019 | | | | | | | |
| ORSV (-) | | 0.468-0.787 | | | | | | | |
| BRANCO | | 0.028-0.022 | | | | | | | |
| | | 0.001-0.019 | | | | | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV;

Tabela 6 - Resultado da indexação por DAS-ELISA da terceira amostragem no ensaio (B), realizado com clones da variedade “44611” em 0, 30 e 50 ppm/L após 380 dias de cultivo *in vitro*.

| | | Tratamentos (ppm de “ribavirin” por litro de meio de cultura) | | | | | |
|------------|----------|---|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| Repetições | Amostras | 0 ppm | | 30 ppm | | 50 ppm | |
| | | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV | CymMV | ORSV |
| I | 1 | (+) 1.566 | (+) 1.552 | (+) 1.371 | (+) 1.083 | (-) 0.052 | (+) 1.074 |
| | 2 | (+) 1.667 | (+) 1.433 | (-) 0.162 | (+) 1.230 | (+) 0.277 | (+) 1.299 |
| | 3 | (+) 1.581 | (+) 1.546 | (+) 0.915 | (+) 0.925 | (-) 0.108 | (+) 1.281 |
| | 4 | (+) 1.061 | (+) 1.386 | (+) 1.065 | (+) 1.206 | (-) 0.049 | (+) 1.171 |
| | 5 | (+) 1.359 | (+) 1.412 | (+) 0.954 | (+) 1.145 | (-) 0.050 | (+) 1.261 |
| | 6 | (+) 1.309 | (+) 1.398 | (+) 0.817 | (+) 0.806 | (+) 1.130 | (+) 1.193 |
| | 7 | (+) 1.369 | (+) 1.129 | (+) 0.262 | (+) 1.016 | (+) 1.123 | (+) 1.031 |
| | 8 | (+) 1.556 | (+) 1.229 | (+) 0.668 | (+) 1.092 | (+) 0.855 | (+) 0.998 |
| | 9 | (+) 1.529 | (+) 1.156 | (+) 0.910 | (+) 1.114 | (-) 0.037 | (+) 1.143 |
| | 10 | (+) 1.401 | (+) 1.348 | (-) 0.007 | (+) 0.751 | (-) 0.078 | (+) 1.071 |
| II | 1 | (+) 1.551 | (+) 1.332 | (+) 0.881 | (+) 1.057 | (+) 0.236 | (+) 1.196 |
| | 2 | (+) 1.064 | (+) 1.202 | (-) 0.099 | (+) 0.210 | (+) 0.481 | (+) 1.006 |
| | 3 | (+) 1.429 | (+) 1.315 | (+) 1.410 | (+) 1.004 | (-) 0.044 | (+) 0.875 |
| | 4 | (+) 1.502 | (+) 1.154 | (+) 1.050 | (+) 0.625 | (+) 1.154 | (+) 1.140 |
| | 5 | (+) 1.686 | (+) 1.370 | (+) 0.865 | (+) 0.691 | (+) 0.731 | (+) 1.065 |
| | 6 | (+) 1.336 | (+) 1.350 | (+) 0.702 | (+) 0.593 | (+) 0.741 | (+) 1.067 |
| | 7 | (+) 1.541 | (+) 1.430 | (-) 0.019 | (+) 0.779 | (+) 0.919 | (+) 1.025 |
| | 8 | (+) 1.214 | (+) 1.345 | (+) 1.047 | (+) 1.003 | (+) 0.908 | (+) 1.029 |
| | 9 | (+) 1.417 | (+) 1.245 | (+) 1.014 | (+) 0.613 | (+) 0.741 | (+) 1.100 |
| | 10 | (+) 1.346 | (+) 1.186 | (+) 0.392 | (+) 1.011 | (-) 0.034 | (+) 1.113 |
| III | 1 | (+) 1.369 | (+) 1.137 | (+) 0.838 | (+) 1.028 | (-) 0.036 | (+) 0.980 |
| | 2 | (+) 1.290 | (+) 1.234 | (+) 0.301 | (+) 0.506 | (-) 0.035 | (+) 1.015 |
| | 3 | (+) 1.420 | (+) 1.259 | (+) 0.870 | (+) 1.010 | (+) 0.669 | (+) 0.642 |
| | 4 | (+) 1.431 | (+) 1.257 | (-) 0.147 | (+) 0.283 | (-) 0.039 | (+) 0.790 |
| | 5 | (+) 1.437 | (+) 1.415 | (+) 1.488 | (+) 0.723 | (-) 0.048 | (+) 0.825 |
| | 6 | (+) 1.542 | (+) 1.367 | (+) 0.895 | (+) 0.817 | (-) 0.087 | (+) 1.045 |
| | 7 | (+) 1.384 | (+) 1.271 | (+) 0.916 | (+) 0.620 | (-) 0.044 | (+) 1.089 |
| | 8 | (+) 1.432 | (+) 1.369 | (+) 0.738 | (+) 1.148 | (-) 0.045 | (+) 1.113 |
| | 9 | (+) 1.379 | (+) 1.276 | (+) 1.109 | (+) 1.107 | (-) 0.044 | (+) 0.870 |
| | 10 | (+) 1.281 | (+) 1.333 | (+) 0.834 | (+) 0.493 | (-) 0.091 | (+) 1.226 |
| CymMV (+) | | | | 1.027-1.084 | | | |
| CymMV (-) | | | | 0.001-0.033 | | | |
| ORSV (+) | | | | 0.966-1.054 | | | |
| ORSV (-) | | | | 0.021-0.052 | | | |
| BRANCO | | | | 0.000-0.035 | | | |

Legenda – Em laranja, plantas negativas para CymMV;



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

