



**Viroides em crisântemo: levantamento, identificação,
caracterização, avaliação de fontes de resistência e
desenvolvimento de métodos de diagnóstico**

DANIELLE GOBATTO

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: Sanidade vegetal, segurança alimentar e o ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**São Paulo
2013**

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**Viroides em crisântemo: levantamento, identificação,
caracterização, avaliação de fontes de resistência e
desenvolvimento de métodos de diagnóstico**

DANIELLE GOBATTO

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: Sanidade vegetal, segurança alimentar e o ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

**São Paulo
2013**

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

Gobatto, Danielle.

Viroides em crisântemo: levantamento, identificação, caracterização, avaliação de fontes de resistência e desenvolvimento de métodos de diagnóstico./ Danielle Gobatto. -- São Paulo, 2013. 89 p.

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

Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Linha de pesquisa: Virologia vegetal.

Orientador: Marcelo Eiras.

Versão do título para o inglês: Viroids in chrysanthemum: survey, identification, characterization, source of resistance evaluation and development of diagnostic methods.

1. Chrysanthemum stunt viroid 2. CSVd 3. Pospiviroid 4. Dendranthema 5. RT-PCR I. Gobatto, Danielle II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2013/017



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
secretariagg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato

Título:

Orientador(a):

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:

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

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

*Instituição:

Assinatura:

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

*Instituição:

Assinatura:

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

*Instituição:

*Deixe todos os campos em branco para serem preenchidos no dia do exame de Defesa da Dissertação

Dedico este trabalho aos meus pais, Deborah e Eliandro, minhas eternas fontes de inspiração, e aos meus amores Mariah, Mario e Teco. Muito obrigada pelo apoio, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de Mestrado é uma experiência enriquecedora e de plena superação. Sentimos uma renovação a cada tentativa de buscar respostas às nossas aflições de ‘pesquisador’. Para aqueles que compartilham conosco desse momento, parece uma tarefa interminável e enigmática que só se torna realizável graças a muitas pessoas que participam, direta ou indiretamente, mesmo sem saber realmente *o que e para que* estamos envolvidos nessas atividades. A essas pessoas gostaria de agradecer.

Primeiramente, quero agradecer a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Deborah e Eliandro pelos momentos de plenitude e apoio familiar incondicional. A vocês, minha eterna gratidão.

À minha eterna professora Andrea Dantas por sempre me incentivar, acreditar em mim e me tornar uma pessoa apaixonada pela Fitopatologia.

Ao meu orientador, Marcelo Eiras, pela confiança, e dedicação.

Ao Dr. José Antonio Darós Arnau por me receber em seu laboratório no IBMCP – Espanha – Valência; sempre muito paciente. Sem a sua compreensão e calma seria impossível não somente realizar parte deste projeto em seu laboratório, mas aprender o castelhano.

Ao Alexandre L. R. Chaves por nos acompanhar nas viagens de campo, por me auxiliar nas correções da dissertação e por todos os momentos de alegria e risadas rechedos de piadas.

Ao Ricardo Harakava por nos ajudar nos sequenciamentos, nas correções da dissertação, mas também por sempre ter muita paciência e calma para tirar minhas dúvidas com relação ao trabalho.

À Janaína M. Marque por nos auxiliar nas viagens de campo, nos apresentando aos produtores e por tornar as nossas viagens ainda mais divertidas.

À Valdenice Novelli, Ricardo Harakava, Alexandre L.R. Chaves e Nelson A. Wullf por aceitarem participar de minha banca de defesa de Dissertação de Mestrado e pelas valiosas sugestões.

Aos colaboradores Gisele Wigman (Terra Viva) e Maurício João Mattar (Rica Flor). À Marineide A. Siqueira (pragueira da Terra Viva) que sempre com um sorriso no rosto, gentilmente nos acompanhou nas coletas de material para nossa pesquisa. Aos produtores Gino Jun Shinkawa (Sítio Shinkawa), Katsutoshi Sonoda (Flora Sonoda), Marcos Zucheratto (Rancho Raíces) por fornecerem material para esta pesquisa.

A todos os amigos pesquisadores do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia do Instituto Biológico: Ligia M. L. Duarte, Alexandre L. R. Chaves, Maria Amélia Vaz Alexandre, Marcos C. Gonçalves, Eliana B. Rivas e Addolorata Colariccio. E em especial aos meus amigos Renata Maia Garcêz, Leonardo Assis da Silva, Armando Toshikatsu Tomomitsu e Maisa Sant’Ana pelos bons e maus momentos compartilhados e pelas inesquecíveis e divertidas viagens para Campinas.

Às minhas queridas colegas de laboratório Veronica Aragonés (“mi oráculo”) e Tereza Cordero pela amizade, momentos de descontração e por ajudarem nos afazeres do laboratório na Espanha. Sem vocês também seria impossível à realização de parte deste projeto.

À minha querida amiga Eszter Majer. Agradeço a Deus por ter colocado um anjo tão especial em meu caminho que tornou minha viagem à Espanha tão especial.

À minha querida amiga Leilane Karam Rodrigues (PINK) que me acompanha desde o período da Faculdade. Tenho só uma coisa a dizer pra você: "Eu jamais me engano. Só me enganei uma vez, quando achei que estava enganada". Obrigada por me fazer rir todos os dias.

Ao Instituto Biológico de São Paulo, nas pessoas de seus diretores, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço à FAPESP pelas bolsas de estudos, tanto em território nacional, como pela bolsa BEPE para a realização de estágio na Espanha.

Ao CNPQ por financiar este projeto.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

“A excelência é obtida quando você se importa mais do que os outros julgam ser necessário, se arrisca mais do que os outros julgam ser seguro, sonha mais do que os outros julgam ser prático, e persiste mais do que os outros julgam ser possível”.

(Vince Lombardi)

GOBATTO, D. VIROIDES EM CRISÂNTEMO: LEVANTAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DE FONTES DE RESISTÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO. São Paulo-SP. 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Resumo

No Brasil, o mercado de flores e plantas ornamentais movimentada, anualmente, cifras superiores a quatro bilhões de reais. O crisântemo (*Dendranthema* spp., Asteraceae) se destaca por seu alto valor comercial, sendo produzido em mais de 100 municípios do estado de São Paulo. As doenças causadas por vírus e viroides têm se tornado um problema nos sistemas de produção de crisântemo devido, principalmente, à propagação vegetativa, que facilita a disseminação desses patógenos. Os viroides causam prejuízos à cultura, destacando-se: o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) que induz amarelecimento generalizado das plantas; e o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), que causa nanismo, retarda o florescimento, podendo, em muitas situações, não induzir sintomas visíveis, facilitando sua disseminação no campo, além de passar despercebido ao cruzar fronteiras internacionais. No Brasil, há somente um relato da possível ocorrência do CSVd em crisântemo no estado de São Paulo. O presente projeto teve como objetivos: (i) realizar levantamento, identificar e caracterizar os viroides presentes em cultivos de crisântemo no estado de São Paulo; (ii) desafiar variedades de crisântemo com um isolado do CSVd; (iii) desenvolver métodos de diagnóstico para fortalecer os programas de quarentena e indexação. O levantamento indicou que o CSVd encontra-se amplamente disseminado nos cultivos de crisântemo no estado de São Paulo. As variedades de crisântemo avaliadas mostraram-se suscetíveis, apesar de não apresentarem sintomas. Das técnicas de diagnóstico utilizadas, sPAGE se mostrou eficiente, apesar de ser trabalhosa e requerer treinamento para a obtenção e interpretação dos resultados. O desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para RT-PCR convencional e RT-qPCR permitiu o emprego dessas técnicas para diagnóstico do CSVd com sensibilidade 100.000 vezes maior que sPAGE. A hibridização *dot-blot* também se mostrou sensível e útil para o diagnóstico de um grande número de amostras. O sequenciamento do genoma de um isolado do CSVd revelou elevada identidade de nucleotídeos quando comparado com outros isolados depositados no *GenBank* apresentando pouca variabilidade genética. Esta é a primeira identificação e caracterização molecular de um isolado de CSVd no Brasil.

Palavras-chave: *Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd, *Pospiviroid*, *Dendranthema*, RT-PCR, *dot-blot*, *Northern-blot*

GOBATTO, D. VIROIDS IN CHRYSANTHEMUM: SURVEY, IDENTIFICATION, CHARACTERIZATION, SOURCE OF RESISTANCE EVALUATION AND DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHODS. São Paulo-SP. 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Abstract

In Brazil, the ornamental flowers and plants industry represents in the wholesale and retail more than 2 billion dollars, annually. The *Chrysanthemum* (*Dendranthema* spp., Asteraceae) stands out as one of the most valuable commercial ornamental, being produced in more than 100 municipalities in the State of São Paulo, Brazil. Diseases caused by viruses and viroids have become a serious problem in chrysanthemum production systems, mainly due to the vegetative propagation, which facilitates the spread of these pathogens. Viroids can damage the culture, highlighting: *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd, *Pelamoviroid*, *Avsunviroidae*), inciting a generalized yellowing of plants; and *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd, *Pospiviroid*, *Pospiviroidae*), which causes dwarf, retards flowering and may, however, in many situations, not induce visible symptoms, which also facilitates its spread in the field, in addition to being able to pass unnoticed when crossing international borders. In Brazil, there are few studies on these pathogens, with a report of the possible occurrence of CSVd in chrysanthemum in the State of São Paulo, Brazil. This project aimed to: (i) perform a survey, identify and characterize viroids present in chrysanthemum crops in the State of São Paulo; (ii) challenge of chrysanthemum varieties with a CSVd isolate; and (iii) develop diagnostic methods to strengthen quarantine and indexing programs. The survey indicated that the CSVd is widely disseminated in chrysanthemum in São Paulo State. All varieties of chrysanthemum evaluated were susceptible, although not presenting symptoms. sPAGE was efficient despite being labor intensive and requiring training to obtain and interpret the results. The development of specific oligonucleotides for both conventional RT-PCR and RT-qPCR allowed the use of these techniques for diagnosis with high sensitivity, showing sensitivity 100.000x higher than sPAGE. Dot-blot was sensitive and useful for the diagnosis of a large number of samples. The complete genome sequencing of a CSVd isolate showed nucleotide identity between 95% and 100% when compared with other isolates deposited in GenBank, showing low genetic variability. This is the first identification and molecular characterization of a CSVd isolate in Brazil.

Keywords: *Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd, *Pospiviroid*, *Dendranthema*, RT-PCR, dot-blot, Northern-blot.

Lista de tabelas

- Tabela 1 - Participação percentual relativa em valores exportados, em 2008 dos diferentes segmentos no comércio internacional dos produtos da floricultura, no mundo e no Brasil.....5
- Tabela 2 - Classificação taxonomica dos viroides e suas respectivas acrônimas e tamanho do RNA em número de nucleotídeos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV)*. Os gêneros tipo de cada família e as espécies tipo de cada gênero encontram-se sublinhados. As espécies sombreadas em cinza seguidas do algarismo (1) infectam naturalmente plantas de crisântemo. As espécies sombreadas e seguidas de algarismo (2) infectam experimentalmente plantas de crisântemo.....17
- Tabela 3 - Característica e propriedades dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação parcial e/ou completa do CSVd.....22
- Tabela 4 - Comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico avaliados no presente trabalho quanto à sensibilidade para a detecção do CSVd.....50
- Tabela 5 - Avaliação por meio de sPAGE, RT-PCR e análise visual dos sintomas de diferentes espécies da família Asteraceae e Solanaceae inoculadas experimentalmente com o CSVd [isolado 'Puritan'-Hol(1) 2214*52
- Tabela 6 - Avaliação da presença do CSVd em diferentes variedades de crisântemo e uma amostra de dália por meio dos métodos de diagnóstico sPAGE, RT-PCR e *dot-blot*.....54
- Tabela 7 - Avaliação da resistência e/ou tolerância de variedades de crisântemo ao CSVd, 120 dias após a inoculação com o CSVd isolado 'Puritan'-Hol(1) 2214, por meio de análise visual dos sintomas e RT-PCR.....55

Lista de figuras

- Figura 1 - Principais tipos de crisântemo (*Dendranthema* spp.): “margarida” (A); “girassol” (B); “pompom” (C); “decorativa” (D); “spider” (E); “globosa” (F).
Imagens: Danielle Gobatto.....8
- Figura 2 - Representação das estruturas secundárias dos RNA dos viroides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*: **(A)** *Pospiviroid*, gênero tipo da família *Pospiviroidae* com os cinco domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e Terminal Direito (TR), além do *Loop* E; **(B)** Gêneros *Avsunviroid* e *Pelamoviroid* apresentando, respectivamente, moléculas com estrutura secundária de “quase-bastão” e fortemente estruturada. Figura adaptada de Eiras (2012).....11
- Figura 3 - Cronologia das principais descobertas relacionadas ao RNA, incluindo a descrição dos viroides (Diener 1971a; 1971b). Figura adaptada de Rinn & Chang (2012).....12
- Figura 4 - Principais municípios produtores do estado de São Paulo, visitados para a realização de coletadas das amostras de crisântemo com suspeita de infecção por viroides.....18
- Figura 5 - Plantas de Asteraceae inoculadas com CSVd: (A) zínia (*Zinnia elegans*); (B) girassol dobrado (*Helianthus annuus*); (C) dália (*Dahlia* sp.); (D) gynura (*Gynura aurantiaca*). Fotos: Danielle Gobatto.....19
- Figura 6 - Representação da estrutura secundária da molécula de RNA circular do CSVd com a localização dos diferentes *primers* utilizados na amplificação via RT-PCR. Os *primers* CSV-1M(c) e CSV-1P(s) indicados em azul, foram descritos por Nakahara *et al.* (1999). Os primers CSVd-II(s)/CSVdI(c) em verde, e RF74_CSVd(c)/RF75_CSVd(s) em vermelho, foram desenhados no presente trabalho para a amplificação do genoma completo do CSVd. *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’.....23

- Figura 7 - Experimento da avaliação da resistência e/ou tolerância de variedades comerciais de crisântemo ao CSVd conduzido em casa de vegetação da empresa 'Terra Viva', no município de Artur Nogueira, SP. Observam-se as plantas de diferentes variedades de crisântemo (*Dendranthema* spp.) em diferentes estádios de desenvolvimento, que foram desafiadas quanto à resistência e/ou tolerância ao CSVd. Da esquerda para a direita: (i) 30 dias após o plantio quando as plantas foram inoculadas (14/08/2012), (ii) pré-florescimento (11/09/2012), (iii) indução dos botões florais (27/09/2012); (iv) florescimento (26/10/2012). Fotos: Danielle Gobatto.....26
- Figura 8 - Crisântemo da variedade 'Pelle' com suspeita de infecção viroidal proveniente do município de Holambra (SP). As flores alaranjadas e desenvolvidas correspondem às amostras consideradas normais por meio da avaliação visual. Flores com coloração amarelo pálido (quebra de coloração) provenientes de ramos com nanismo, foram inicialmente consideradas suspeitas sendo posteriormente confirmadas como infectadas pelo CSVd. Foto: Marcelo Eiras.....28
- Figura 9 - Amostra de crisântemo variedade 'Puritan' com suspeita de infecção por viroide proveniente do município de Holambra. À esquerda, observam-se flores da variedade 'Puritan' em canteiro de produção comercial, em Holambra, SP; à direita, pode-se observar a diferença entre uma flor considerada normal e infectada pelo CSVd, apresentando tamanho reduzido. Fotos: Danielle Gobatto.....29
- Figura 10 - Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Pelle – HOL (2)'; 2= 'Puritan' – HOL (1); 3= 'Pelle' – HOL (1); 4= 'Puritan' – HOL (2). Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.....30

Figura 11 - Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Cool Time' – ATB (1); 2= 'Sandra' – ATB (1); 3= 'Cool Time' – ATB (2); 4= 'Sandra' – ATB (2). Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.....32

Figura 12 - Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 bp DNA ladder;; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Venice' - ARN; 2= 'Zembla' – ARN (1); 3= (+); 4= (-). Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.....33

Figura 13 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd (Nakahara *et al.*, 1999.) a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo ('Puritan' – HOL (1)). M = 100 pb DNA ladder; 1 = 1,0 µL (1:10); 2 = 3,0 µL (1:10); 3 = 1 µL; 4 = RT (-); 5 = PCR (-). As setas vermelhas correspondem aos fragmentos de DNA amplificados com tamanho esperado de cerca de 350pb. *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....35

Figura 14 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd (Nakahara *et al.*, 1999. J. Virol. Methods) a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo: 1 = variedade 'Pelle' – HOL (2); 2 = 'Cool Time' – ATB (1); 3 = 'Sandra' – ATB (1); 4 = 'Venice - ARN'; 5 = 'Zembla' – ARN (1); 6= RT(-); 7= PCR(-); M = 100 pb DNA ladder;; *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....36

Figura 15 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo: M = 100 pb DNA ladder; 1 = 'Puritan' – HOL (1) - 2214 amplificado com *primers* descritos por Nakahara *et al.* (1999); 2 = 'Puritan' – HOL (1) - 2214 ; 3 = RT1(-); 4 = PCR1(-); 5 = RT2(-); 6 = PCR2(-); *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....37

Figura 16 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo e dália infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= 'Dália'-ATB; 2= 'Pelle'-HOL(1); 3= 'Pelle'-HOL(2); 4= 'Puritan'-HOL(1); 5= RT-PCR (-),*(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....38

Figura 17 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= 'Sandra'-ATB(1); 2= 'Cool Time'-ATB(2) ; 3= 'Cool Time'-ATB(1); 4= 'Sandra'-ATB(2); 5= 'Sandra'-ATB(3); 6= RT-PCR (-),*(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....38

Figura 18 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= 'Cool Time'-ARN; 2= 'Puritan'-ARN; 3= 'Zembla'-ARN(1); 4= 'Puritan'-ATB(2); 5= 'Kalazoo'-PAR; 6= RT-PCR(-),*(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'.....39

- Figura 19 - Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo. M = 100 pb DNA ladder; 1= Consulta/Laudo (1); 2= 'Pelle'- ARN(1); 3= 'Venice' - ARN; 4= 'Pelle'- ARN(2); 5= RT-PCR (-),*(s) - 'Senso' e (c) - 'Complementar'.....40
- Figura 20 - Estrutura secundária de mínima energia livre a 24 °C, obtida com os programas mFold e RNAviz, para o CSVd (isolado 'Puritan'-HOL(1) - 2214), proveniente do município de Holambra, SP, com 354 nucleotídeos. As alterações de resíduos entre o isolado 2214 caracterizado neste trabalho (acesso *GenBank*: JX909290) e o CSVd sequenciado por Gross *et al.* (1982) (Cód *GenBank* M19506) estão indicadas em vermelho.....41
- Figura 21 - Curva de amplificação do RNA 'Puritan'-HOL(1) - 2214 (variedade 'Puritan', proveniente do município de Holambra) com diluições seriadas onde, A=1:10; B=1:100; C=1:1000; D=1:10000; E=1:100000 e F= controle (-)...42
- Figura 22 - Curva de amplificação do RNA do CSVd do isolado 'Puritan'-HOL(1) - 2214 com diluições seriadas. Onde: A=1:10; B=1:100; C=1:1000; D=1:10000; E=100000.....42
- Figura 23 - Curva de amplificação do RNA 'Puritan'-HOL(1) - 2214 (crisântemo 'Puritan' proveniente do município de Holambra) com diluições seriadas onde, A=1:10; E=1:100000 e F= controle (-).....43
- Figura 24 - Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose (2%) em TAE 1x a 65volts por 75 min, em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA viroidal do isolado 2214 da variedade 'Puritan'. M = 100 pb DNA ladder; 1= (-); 2= 'Puritan'-HOL(1) - 2214.....44

- Figura 25 - Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose 1% (TAE 1x a 75volts por 90 min), em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, dos insertos (CSVd isolado 2214) liberados do plasmídeo pBSΔE[P8], após digestão com *Xba* I. M = 1kb DNA ladder.....44
- Figura 26 - Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose (1%) em TAE 1x a 65volts por 75 min, em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta onde M = 1kb DNA Ladder, 1= plasmídeo não linearizado 2= plasmídeo digerido com *Xba* I.....45
- Figura 27 - Análise do resultado da hibridização *Northern-blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das amostras: 1= 'Puritan'-HOL(1) - 2214; 2= 'Dália'-ATB; 3= 'Pelle'-HOL(1); 4= 'Pelle'-HOL(2); 5= 'Puritan'-ATB(1); 6= 'Sandra'-ATB(1); 7= 'Cool Time'-ATB(2); 8= 'Cool Time'-ATB(1); 9= 'Sandra'-ATB(2) e 10= 'Sandra'-ATB(3).....46
- Figura 28 - Análise do resultado da hibridização *Northern-Blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das amostras: 1= 'Cool Time'-ARN; 2= 'Puritan'-ARN (1); 3= 'Zembla'-ARN(1); 4= 'Puritan'-ATB (2); 5= 'Kalazoo'-PAR; 6= Consulta/Laudo (1); 7= 'Pelle'-ARN(1); 8= 'Venice'-ARN e 9= 'Pelle'-ARN(2).....47
- Figura 29 - Análise do resultado da hibridização *dot-blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das seguintes amostras: 1= 'Puritan'-HOL(1) - 2214; 2= 'Dália'-ATB; 3= 'Pelle'-HOL(1); 4= 'Pelle'-HOL(2); 5= 'Puritan'-ATB(1); 6= 'Sandra'-ATB(1); 7= 'Cool Time'-ATB(2); 8= 'Cool Time'-ATB(1); 9= 'Sandra'-ATB(2) e 10= 'Sandra'-ATB(3), 11= 'Cool Time'-ARN; 12= 'Puritan'-ARN(1); 13= 'Zembla'-ARN(1); 14= 'Puritan'-ARN(2); 15= 'Kalazoo'-PAR; 16= Consulta/Laudo (1); 17= 'Pelle'-ARN(1); 18= 'Venice'-ARN e 19= 'Pelle'-ARN(2) , onde A=1/10; B=1/100; C=1/1000; D=1/10.000 e E=1/100.000.....48

- Figura 30 - Análise do resultado de hibridização *Northern-blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) a partir de RNA viroidal purificado da amostra 'Puritan'-HOL(1) - 2214 infectada pelo CSVd preparado em diferentes diluições: 1=1/10; 2=1/100; 3=1/1.000; 4=1/10.000 e 5=1/100.000.....49
- Figura 31 - Sintomas observados em espécies de *Asteraceae* e *Solanaceae* desafiadas com o isolado 'Puritan'-Hol(1) 2214: mosaico leve e distorção foliar em *Dahlia* spp. (A), epinastia em *Gynura aurantiaca* (C) e distorção foliar em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Rutgers' (E) após a inoculação experimental com um isolado de CSVd. À direita (B, D, F) observam-se as plantas saudáveis (não inoculadas) das respectivas espécies. Fotos: Danielle Gobatto.....52

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O crisântemo e sua importância econômica no Brasil e no mundo	4
2.2. O crisântemo: classificação botânica, origem, cultivo e principais doenças e pragas	6
2.3 Viroides: características gerais, classificação e taxonomia	10
2.4. Viroides em crisântemo	13
2.4.1. O “nanismo do crisântemo” induzido pelo <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd)	13
2.4.2. <i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (CChMVd)	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Coleta das amostras e local de realização dos experimentos	17
3.2. Determinação do círculo de hospedeiras experimental do CSVd por inoculação mecânica	18
3.3. Extração de RNA	19
3.4. Eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE)	21
3.5 RT-PCR	21
3.6. Eluição dos fragmentos de DNA	23
3.7. Sequenciamento e análise das sequências	23
3.8. Análise quantitativa por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)	23
3.9. Clonagem	24
3.10. Síntese da sonda, hibridização <i>Northern-</i> e <i>dot-blot</i>	25
3.11. Avaliação da resistência de variedades de crisântemo ao CSVd	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. Identificação e caracterização dos isolados do CSVd	27
4.1.1. Extração de RNA e identificação via sPAGE	27
4.1.2. RT-PCR	33
4.1.3. Sequenciamento e análise das sequências	40
4.2. Análise quantitativa por RT-qPCR em tempo real	41
4.3. Clonagem	43
4.4. Hibridização <i>Northern-</i> e <i>dot-blot</i>	45
4.5. Círculo de hospedeiros e avaliação da resistência	51
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados referentes à produção e comercialização de flores e plantas ornamentais, publicados no Anuário da Agricultura brasileira (AGRIANUAL, 2013), o mercado mundial desse segmento encontra-se fortemente aquecido e, conseqüentemente, em constante expansão. O Brasil está entre os maiores consumidores deste mercado em relação ao volume, e seu abastecimento vem de sua própria produção interna. A floricultura comercial, entendida como a atividade profissional e empresarial de produção, do comércio e de distribuição de flores e plantas cultivadas com finalidade ornamental, representa um dos mais promissores segmentos do agronegócio brasileiro contemporâneo. No ano de 2011, o mercado de plantas ornamentais movimentou cerca de R\$ 4 bilhões e, em 2012, teve perspectiva de atingir entre R\$ 4,8 e 5 bilhões. A atividade é focada para o mercado interno que representa 97% dos valores anuais da comercialização. Este fato reduz os impactos negativos da crise econômica e financeira mundial sobre o desempenho desta atividade no Brasil. Observa-se que, no período de 2009 a 2011, as exportações da floricultura brasileira apresentaram quedas nos valores comercializados, após o período de 9 anos de recordes ininterruptos. A distribuição atacadista das flores e plantas ornamentais concentra-se basicamente no estado de São Paulo, e conta com uma notável participação das cooperativas, as quais respondem por 37% a 40% do total movimentado anualmente. No mercado internacional, o Brasil não responde por volumes ou valores relevantes. Neste contexto o setor é liderado pelas exportações de estacas de crisântemos seguidas de outras mudas de diferentes plantas ornamentais.

Pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae (Compositae), o crisântemo, gênero *Dendranthema* (ex. *Chrysanthemum* sp.), possui mais de 100 espécies e 800 variedades e híbridos comercializados mundialmente. Esta planta ornamental está entre as espécies de maior aceitação no mercado, sendo que os cultivares atuais compreendem linhagens originárias da Ásia, em especial da China. Planta de ciclo curto, o crisântemo apresenta grande variedade de formas e cores, podendo ser cultivada em ambiente protegido ou no campo, tanto para flor de vaso, quanto de corte e jardim (Olivetti *et al.*, 1994). Com diferentes características e morfologia das inflorescências destacam-se como os mais cultivados os tipos: margarida, girassol, pompom, decorativa, *spider* ou *spaghetti* e bola (globosa) (Gruszynski *et al.*, 2001).

A produção de flores, no Brasil, concentra-se nas regiões Sudeste e Sul. O estado de São Paulo se destaca como o principal produtor nacional de plantas ornamentais, devido à diversidade de espécies produzidas concentradas em seis pólos produtores, responsáveis por cerca de 60% da comercialização do país. O Ceará se destaca também como um dos principais pólos de expansão da floricultura, principalmente com o cultivo de rosas e

crisântemos. A partir de 2003, o valor das exportações dos produtos da floricultura brasileira tem apresentado um importante crescimento, enquanto a importação tem caído continuamente. Há mais de 5000 mil produtores de flores e plantas ornamentais, no Brasil, gerando, anualmente, empregos diretos e indiretos que movimentam cifras em torno de bilhões de reais. Plantas de crisântemo apresentam flores com grande aceitação de mercado, sendo considerada uma das espécies ornamentais de maior valor comercial. Atualmente, devido à diversidade de variedades o mercado nacional expande 20% ao ano, sendo que sua produção interna tem crescido devido aos novos produtos disponíveis e tecnificação dos produtores, principalmente novas regiões de cultivo, o que vem permitindo uma relativa descentralização da produção que se concentra no estado de São Paulo (cerca de 70% da produção nacional) em particular nos municípios de Holambra, Campinas e Atibaia (Gruszynski *et al.*, 2001). A produção em vaso ocupa o primeiro lugar no mercado nacional, respondendo por aproximadamente 80% da produção total de crisântemo comercializada, sendo o segundo lugar ocupado pelo cultivo de variedades “de corte” (Kiyuna *et al.*, 2007; SEBRAE, 2010; Agriannual, 2013).

Dentre as doenças que acometem o crisântemo estão as de origem fúngica, bacteriana, as causadas por nematoides e aquelas induzidas por vírus e viroides. Quanto aos viroides, no Brasil há somente um relato da possível ocorrência de um viroide (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), que induz a doença conhecida como nanismo do crisântemo, descrita previamente em plantas oriundas de cultivos de crisântemo no estado de São Paulo (Dusi *et al.*, 1990). O CSVd é considerado praga quarentenária A2 na Europa (OEPP/EPPO, 1989), sendo a sua distribuição relatada em praticamente todos os países e regiões em que o crisântemo é cultivado como: Ásia, África, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania. O CSVd pode afetar seriamente o desenvolvimento das plantas e das flores de diversos cultivares de crisântemo, impossibilitando sua comercialização (Bouwen & Van Zaayen, 2003).

Devido à sua elevada estabilidade, o CSVd é facilmente transmitido experimentalmente, por inoculação mecânica a partir da fricção de extrato de plantas infectadas sobre plantas hospedeiras sadias. Além disso, pode ser também transmitido por contato foliar, enxertia e ferramentas de corte (canivete, tesoura, etc.). Esse viroide, assim como a grande maioria dos viroides já descritos, não é transmitido por insetos vetores, sendo que a transmissão via sementes verdadeiras ainda não foi confirmada. A exceção, no caso de transmissão por sementes, se faz para as espécies *Avocado sunblotch viroid* (ASVd), *Coconut cadang cadang viroid* (CCCVd) e *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Batista *et al.*, 1995). Porém, o principal modo de dispersão está relacionado ao intercâmbio mundial de material vegetal, tanto de crisântemo como de outras espécies botânicas

relacionadas, sendo o homem considerado o principal agente de dispersão da doença (Bouwen & Van Zaayen, 2003).

As medidas primárias de controle do CSVd baseiam-se na implantação de métodos preventivos, visando principalmente à desinfecção de ferramentas, evitando a entrada do patógeno no sistema de produção de mudas e matrizes. Programas eficientes de indexação, empregando métodos moleculares, com elevada especificidade e sensibilidade, são fundamentais para o sucesso na produção de mudas e comercialização de plantas de crisântemo livres de viroides. Essas plantas podem ser obtidas por cultura de meristemas combinada com termoterapia. Porém, a proporção de plantas isentas de viroides é baixa, o que faz dessa opção uma alternativa laboriosa, cara e, na maioria das vezes, ineficiente (OEPP/EPPO, 1990). É interessante comentar que, no caso do CSVd, a termoterapia aliada à cultura de meristemas teve eficiência quando as plantas foram mantidas a temperatura de 5°C por um período de 6 meses, resultando em 50 % de plantas livres do viroide (Paludan, 1984; Paduch-Cichal & Kryczynski, 1987). A quimioterapia também já foi utilizada, e com sucesso visando à obtenção de plântulas de crisântemo livres do CSVd em cultura de tecidos, com o antiviral amantadina (Horst & Cohen, 1980).

No Brasil, há carência de estudos sobre a ocorrência, distribuição e potencial de danos induzidos pelos viroides em plantas ornamentais. Vale ressaltar que muitas anomalias de etiologia desconhecida podem ser causadas por viroides. Segundo Singh (1983), os viroides se replicam com maior eficiência em condições de temperaturas elevadas. Assim, regiões de clima quente provavelmente devem conter uma maior diversidade de espécies desses patógenos. Diante disso, os viroides podem ser considerados riscos em potencial diante de um cenário pessimista de futuro aquecimento da atmosfera. Além disso, plantas originalmente de clima temperado, cultivadas em condições tropicais e subtropicais, também podem tornar-se hospedeiras de novos viroides.

Os viroides estão entre os patógenos mais importantes do crisântemo, principalmente devido à sua propagação vegetativa, o que facilita a perpetuação desses patógenos no campo. A identificação e o conhecimento da diversidade genética dos viroides são fatores importantes para o estabelecimento de estratégias de detecção e controle. Há poucos estudos sobre esses patógenos no Brasil e, em outros países da América do Sul, os viroides ainda não receberam a devida atenção (Bartolini & Salazar, 2003).

Portanto, esta dissertação teve como objetivos: (i) realizar um levantamento da presença de viroides em cultivos de crisântemo no estado de São Paulo; (ii) identificar e caracterizar os viroides presentes nas amostras coletadas em diferentes áreas de cultivo de crisântemo; (iii) desafiar variedades comerciais de crisântemo por meio de inoculação mecânica com um isolado do CSVd (caracterizado neste trabalho); e (iv) desenvolver e estabelecer um método de diagnóstico molecular que apresente elevada especificidade e

sensibilidade a fim de fortalecer os programas de quarentena e indexação de materiais propagativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O crisântemo e sua importância econômica no Brasil e no mundo

A floricultura é um setor competitivo que exige a utilização de tecnologia avançada, conhecimento técnico e um sistema eficiente de distribuição e comercialização (Matsunaga, 1995). A baixa demanda em área cultivada e o ciclo curto de produção são vantagens na floricultura, pois permitem giro rápido do capital. O mercado mundial de flores e plantas ornamentais está em plena expansão e tem a Holanda como principal país exportador seguido pela Colômbia e Itália. O mercado mundial de flores e plantas ornamentais, incluindo o mercado interno dos diferentes países e suas exportações, está avaliado em € 75 bilhões anuais, sendo que, deste total, € 60 bilhões são do setor de flores e plantas, €14 bilhões do mercado de mudas e o restante da produção e circulação de bulbos, conforme apontado pelo *Flower Council of Holland* (Merino-Pacheco, 2009). Segundo o *International Trade Centre* (ITC), em 2008, o fluxo no comércio internacional dos produtos da floricultura, foi de US\$ 17,8 bilhões, com concentração de importações na Alemanha, Reino Unido, Estados Unidos da América, Holanda, França, Itália, Bélgica, Suíça, Japão, Áustria, Dinamarca, Suécia, Canadá, Espanha e Noruega. Deste total, de acordo com o ITC e MDIC (2009), as flores e botões cortados frescos representaram 43,0%; plantas e mudas, 41,2%; bulbos, tubérculos e raízes, 8,4% e as folhagens, folhas e ramos cortados frescos, 7,4% (Tabela 1). No Brasil, o consumo de flores e plantas ornamentais, em 2008, foi estimado em R\$17,46 per capita/ano, ou o equivalente a US\$7,49 per capita/ano. Atualmente, o mercado consumidor nacional cresce cerca de 20% ao ano, refletindo diretamente na produção interna que tem se expandido e se diversificado, incorporando não apenas novos produtos e produtores, mas também novas regiões de cultivo, o que vem permitindo uma relativa descentralização da cultura de crisântemo que se concentra no estado de São Paulo, representando cerca de 70% da produção nacional que abastece o mercado interno. Neste contexto, o estado do Ceará vem se destacando no cenário nacional como um dos principais polos de expansão da floricultura, graças aos grandes projetos que o governo estadual está implantando, com ênfase nos cultivos de rosas e crisântemos. A estrutura comercial nacional é constituída por cerca de 12.000 pontos de vendas e 400 pontos atacadistas que adquirem seus produtos em oito grandes centros de comercialização:

VEILING-Holambra, FLORANET, CEASA-Campinas, CEAGESP, AGRAFLORES, CADEG, MERCAFLOR e CEASA-Porto Alegre (Junqueira & Peetz, 2002).

Entre as plantas ornamentais, o crisântemo se destaca, sendo produzido e comercializado por 131 municípios do estado de São Paulo, particularmente nos municípios de Holambra, Campinas e Atibaia (Arruda *et al.*, 1996; 1997). Esta espécie apresenta flores com grande aceitação de mercado, sendo, por isso, considerada uma das plantas ornamentais de maior valor comercial. A produção do crisântemo “em vaso” ocupa o primeiro lugar no mercado nacional, respondendo por aproximadamente 80% do total de flores comercializadas; o segundo lugar é ocupado pelo cultivo de variedade de flores de crisântemo “de corte” (Faria *et al.*, 2004).

Desde o final da década de 1990, o Brasil vem apresentando um desempenho crescente na participação no mercado internacional de flores e plantas ornamentais, exportando valores recordes sucessivos. A partir de 2008, devido à crise financeira que abalou o mercado mundial, especialmente dos países que se caracterizam como os maiores consumidores de flores e plantas ornamentais na Europa e América do Norte, os valores embarcados para importação passaram a mostrar um efetivo decréscimo e somaram apenas US\$ 35,50 milhões/ano, com um modesto crescimento de apenas 0,64% em relação ao período anterior à crise de 2007 (Junqueira & Peetz, 2008).

TABELA 1 – Participação percentual relativa em valores exportados, em 2008 dos diferentes segmentos no comércio internacional dos produtos da floricultura, no mundo e no Brasil.

Segmentos	MUNDO (%)	BRASIL (%)
Flores de corte e seus botões	43	6,7
Plantas e mudas	41,2	42,6
Bulbos, tubérculos, rizomas e raízes	8,4	45
Folhagens de corte	7,4	5,7
TOTAL	100	100

Fonte: HÓRTICA CONSULTORIA E TREINAMENTO, a partir de estatísticas básicas do *International Trade Centre* (ITC), 2009 e Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior do Brasil (MDIC), 2009.

Os produtos mais importantes com relação a exportações da floricultura brasileira são aqueles que compreendem materiais de propagação vegetativa, tais como mudas e bulbos. O setor nacional é liderado pelas exportações de estacas de crisântemos (*Dendranthema* spp.), seguidas de outras mudas de diferentes plantas ornamentais (Agriannual, 2013). Em 2008, os valores exportados foram de US\$ 15,78 milhões em bulbos, tubérculos e rizomas

em repouso vegetativo e US\$ 14,64 milhões em mudas de plantas ornamentais que representaram 41,23% do total das exportações, respectivamente. O terceiro grupo de importância econômica, nas exportações da floricultura brasileira é representado pelas flores de corte que, em 2008, atingiu o total de US\$ 2,39 milhões comercializados, representando 6,72% no total dos valores exportados. A análise dos dados relativos à produção de plantas ornamentais, no primeiro semestre de 2009, mostra que os diferentes grupos de produtos apresentaram baixas alterações em suas posições no *ranking* nacional das exportações. As principais mercadorias exportadas foram àquelas incluídas entre mudas de outras plantas ornamentais, que somaram o valor de comercialização aproximado de US\$ 8,10 milhões, ou o equivalente a 57,60% do total das exportações. Em segundo lugar vieram os bulbos, tubérculos e rizomas em repouso vegetativo, com vendas de US\$ 3,95 milhões no mercado internacional, que representaram 28,08% do comércio exterior. As flores de corte mostraram resultado comercial de vendas de US\$ 883 mil, com participação de 6,29% do mercado, enquanto que o segmento de folhagens cortadas ficou com 4,31% da participação do mercado com US\$ 605 mil comercializados (Junqueira & Peetz, 2008).

Os principais países compradores dos produtos da floricultura brasileira, em 2012, foram Holanda (58,31%), EUA (17,49%), Itália (9,42%), Bélgica (3,29%) e Japão (2,83%), sendo os principais estados brasileiros produtores de flores e plantas ornamentais: São Paulo (64,59%), Ceará (17,74%), Rio Grande do Sul (9,42%), Minas Gerais (4,07%) (Agriannual, 2013).

2.2. O crisântemo: classificação botânica, origem, cultivo e principais doenças e pragas

Pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae (Compositae), o gênero *Dendranthema* (*Chrysanthemum*), popularmente denominado de crisântemo, possui mais de 100 espécies identificadas e 800 variedades e híbridos comercializadas mundialmente. O crisântemo é uma das principais flores comercializadas no Brasil e no mundo. De origem subtropical, tem como principal exigência climática períodos de dias curtos antes e durante a floração. A maioria das espécies que compõem as linhagens e cultivares, atualmente comercializados, é originária da Ásia, em especial da China. O crisântemo é uma planta de ciclo curto com grande variedade de formas e cores, podendo ser mantida em diferentes condições de cultivo, ambiente protegido ou campo, sendo utilizada tanto como flor de vaso quanto de corte e jardim (Olivetti *et al.*, 1994). Existem relatos de seu cultivo há mais de 2.000 anos como flor de jardim na Ásia, sendo considerada a flor nacional do Japão. Foi cultivado na Europa pela primeira vez por volta de 1688-89,

pelo mercador holandês Jacob Breynius. Porém, somente por volta de 1789 é que a sua comercialização realmente teve início pela França e, no ano seguinte, no *Kew Gardens* da Inglaterra. Por sua vez, a introdução nos Estados Unidos ocorreu por volta de 1764, por intermédio do *Chelsea Physical Garden*. Desde então, o crisântemo tem sido melhorado e selecionado, somente quanto ao formato e cor, mas também quanto à adequação do cultivo durante o ano todo, adaptação e resistência ao frio e calor e também quanto a sua resistência pós-colheita. Com técnica desenvolvida inicialmente por Laurie e seus colaboradores em 1930, a partir da década de 1950 os produtores comerciais iniciaram o controle da produção pelo número de horas escuras, o que permitiu a colheita durante o ano todo. A produção foi voltada inicialmente para corte e, posteriormente, para plantas envasadas (Gruszynski *et al.*, 2001).

Atualmente, existem centenas de variedades adaptadas às diferentes condições de cultivo e ao uso como flor de vaso, corte ou jardim. O crisântemo é uma inflorescência composta, com minúsculas flores desenvolvidas a partir de um receptáculo ou capítulo. Conhecida como margarida, apresenta uma inflorescência simples onde estão presentes as flores externas consideradas como pétalas, são alongadas e possuem somente pistilo (parte feminina) e as flores centrais, conhecidas como olho de margarida, são bissexuais (masculino e feminino) e geralmente férteis (Souza & Lourenzi, 2012). Dentre as variedades comerciais, destacam-se os tipos: (i) “simples” ou “margarida” (Figura 1A), composto por uma ou duas filas de flores pistiladas externas (pétalas) e flores internas em um disco achatado central, sendo que as pétalas podem ser em formato normal ou em forma de quilha ou em forma de colher; (ii) “anêmona” ou “girassol” (Figura 1B), similar à margarida, porém as flores do disco central são alongadas e tubulares, sendo que muitas variedades com esse formato possuem dois tons de cor, sendo também popularmente chamadas de “olho-de-gato”; (iii) “pompon” (Figura 1C), com inflorescências globulares, formadas por pequenas pétalas, as flores do disco interno não são aparentes; (iv) “decorativas” (Figura 1D), similares aos pompons, compostas basicamente de flores pistiladas, porém as pétalas externas são mais longas que as internas, dando uma aparência achatada; (v) “spider”, “Fuji” e “spaghetti” (Figura 1E), com inflorescências similares às decorativas, porém mais achatadas e com as pétalas externas tubulares e bastante longas, sendo que em alguns casos pode alternar pétalas mais longas e mais curtas; (vi) inflorescências globosas tipo “bola” (Figura 1F), tipo decorativo com as pétalas encurvadas dando um aspecto globoso (Gruszynski *et al.*, 2001).

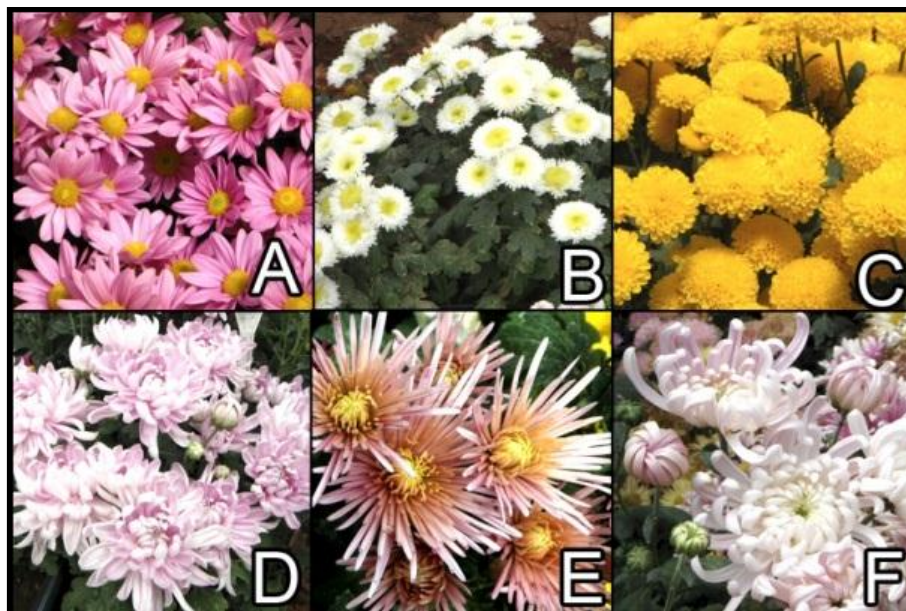


Fig. 1 – Principais tipos de crisântemo (*Dendranthema* spp.): “margarida” (A); “girassol” (B); “pompon” (C); “decorativa” (D); “spider” (E); “globosa” (F). Imagens: Danielle Gobatto

O crisântemo, por ser uma planta de dias curtos, floresce naturalmente no inverno. Para obter um ciclo de produção anual é necessário realizar o plantio em condições de estufa durante o verão, onde técnicas de escurecimento permitem a indução do florescimento. Dependendo da estação do ano e da variedade, o ciclo produtivo pode ser de 12 a 14 semanas. As mudas são obtidas de estacas provenientes das ponteiros das plantas matrizes. Após duas semanas, as estacas enraizadas seguem para a área de plantio definitivo. Dependendo da variedade e da época do ano, as plantas devem receber iluminação noturna por dias a quatro semanas para estimular o crescimento vegetativo. Quando atingirem cerca de 40 cm (vaso) ou 80 cm (corte), inicia-se a indução do florescimento em ambiente escuro, durante algumas horas do dia. Esta fase pode ser de três a seis semanas, até que as flores abram completamente (Gruszynski *et al.*, 2001).

Existem duas classificações da forma de condução das plantas durante seu cultivo: (i) de acordo com a quantidade de flores que ficam em cada haste ou "galho"; e (ii) de acordo com o número de hastes ou "galhos" por muda plantada. Quanto ao número de flores por haste, os crisântemos são cultivados de duas formas básicas: de acordo com a demanda de mercado e a variedade, (i) ‘Disbuds’ ou com a retirada das flores secundárias, quando em cada haste é deixada somente a flor terminal retirando-se os botões florais laterais; e (ii) ‘Spray’ quando somente é retirada da flor central, que usualmente abrirá antes das demais, permitindo assim que as outras inflorescências se desenvolvam mais uniformemente. Quanto ao número de hastes por muda, a condução pode ser de duas formas, de acordo com o objetivo do cultivo, o custo/benefício da muda, a demanda de mercado e a variedade: (i) haste única onde há somente uma haste por muda plantada e (ii)

hastes múltiplas onde há diversas hastes, em geral de 3 a 5 hastes principais por muda plantada, o que é obtido pela brotação lateral estimulada pela retirada do meristema apical (a ponta da muda), também denominada como 'Pinch' (Gruszynski *et al.*, 2001).

Com relação ao fotoperíodo, o crisântemo é uma planta quantitativa de dias curtos (a condição fotoperiódica favorece a indução floral, mas não é essencial), que irá eventualmente florescer mesmo em situação de dias longos. Por essa razão as plantas são sempre despontadas para eliminar os brotos desenvolvidos, mesmo que esses não venham a ser utilizados para a propagação. A iluminação noturna também é diferenciada, sendo constante ou intermitente por um período superior ao utilizado para a produção da flor (Gruszynski *et al.*, 2001).

O crisântemo é suscetível a diversas doenças de origem fúngica, tais como: ferrugens causadas por *Puccinia tanacetii* e *P. horiana*, tombamentos e podridões de raízes e hastes (*Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia* sp.), murchas (*Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* e *Verticillium dahliae*), manchas (*Septoria* spp. e *Alternaria* spp.), oídio pulverulento (*Erysiphe cichoracearum*) e bolor cinza (*Botrytis cinerea*). Das doenças bacterianas assinaladas no Brasil, podem ser citadas: as manchas de *Pseudomonas marginalis* e *P. cichorii*, as galhas induzidas por *Agrobacterium tumefaciens* e as podridões e murchas de *Erwinia chrysanthemi*. Os nematoides *Aphelenchoides ritzmabosi*, *Pratylenchus penetrans* e *Meloidogyne incognita* são os mais importantes. Entre as pragas, as principais são: moscas-minadoras (*Liriomyza trifolii* e *L. sativae*), tripes (*Thrips palmi*, *T. tacaci* e *Frankliniella occidentalis*), ácaros (*Tetranychus urticae*), moscas-brancas (*Bemisia tabaci* e *B. argentifolli*) e pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*). Com relação aos vírus que já foram descritos mundialmente em crisântemo, podem ser citados: o Chrysanthemum virus B (CVB, gênero *Carlavirus*), que induz em alguns cultivares um mosqueado fraco e clareamento de nervuras; o *Cucumber mosaic virus* (CMV, gênero *Cucumovirus*), causador de manchas cloróticas, clorose difusa e necrose foliar; o *Tomato aspermy virus* (TAV, *Cucumovirus*); e o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*), que induz clorose nas folhas (Horst & Nelson, 1997; Song *et al.*, 2012). No Brasil, já foram descritos os seguintes vírus: (i) Um *Rhabdoviridae* não identificado, que induz sintomas foliares de faixas cloróticas; (ii) um *Potyvirus*, que causa nanismo e declínio em *Chrysanthemum frutescens*; (iii) *Ilarvirus*, vírus de partículas isométricas transmitidos por tripes que induzem desenhos cloróticos em folhas de *Chrysanthemum morifolium*; (iv) *Tospovirus*, com duas espécies descritas, TSWV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). O TSWV induz manchas cloróticas e distorção em folhas de *Chrysanthemum leucathemum* e necrose em folhas e caules de *Dendranthema grandiflora*. O CSNV é uma espécie de tospovírus descrita pela primeira vez no Brasil, sendo já relatada na Holanda devido ao intercâmbio de materiais de propagação vegetativa entre os dois países (Duarte

et al., 1995), que induz em *Chrysanthemum morifolium*, manchas necróticas circundadas por halo clorótico nas folhas, necrose de caule e necrose da haste floral, conhecida popularmente pelos produtores por “canela-preta” (Imenes & Alexandre, 1996; Horst & Nelson, 1997).

2.3 Viroides: características gerais, classificação e taxonomia

Os viroides são os menores sistemas genéticos capazes de se replicar no interior de uma célula e, até o momento, estão inseridos no Reino Vegetal. São desprovidos de proteínas e não necessitam de um vírus auxiliar para estabelecer a infecção nas plantas hospedeiras, o que os diferencia dos satélites e RNA defectivos interferentes (Eiras, 2012). Seu gênero é constituído por um RNA de fita simples, circular, com forte estrutura secundária (devido aos pareamentos entre bases nitrogenadas) e tamanho que oscila entre 246 e 401 nucleotídeos (nt) que, por não codificar proteínas próprias, é totalmente dependente do hospedeiro para sua replicação, movimento e patogênese (Flores *et al.*, 2005a; Eiras *et al.*, 2006a; Flores & Owens, 2008; Ding, 2009; Eiras *et al.*, 2009; 2011; Wang & Ding, 2010, Gómez & Pallás, 2013). Por possuírem um genoma mínimo e total dependência da maquinaria de transcrição celular para a sua replicação, apresentam, entre as entidades biológicas conhecidas, as maiores taxas de mutação (Gago *et al.*, 2009).

A moderna taxonomia agrupa os viroides, de acordo com suas propriedades biológicas e moleculares, em duas famílias: *Pospiviroidae*, cujos membros apresentam replicação no núcleo da célula por um meio de mecanismo de círculo rolante assimétrico, sem atividade ribozimática; e *Avsunviroidae*, cujas espécies replicam-se nos cloroplastos por meio de um mecanismo de círculo rolante simétrico, com atividade de ribozimas nas moléculas de ambas as polaridades (Owens *et al.*, 2011). A molécula de RNA dos viroides da família *Pospiviroidae* apresenta cinco domínios denominados: C – que contém a Região Central Conservada (CCR); P – relacionado com a patogênese em alguns viroides; V – onde se encontra a maior variabilidade entre os viroides similares; TL e TR – localizadas nos extremos esquerdo e direito da molécula, respectivamente, e provavelmente relacionados com a replicação. Por outro lado, as espécies da família *Avsunviroidae* não possuem CCR e seus RNA se autoclivam por meio de ribozimas do tipo “cabeça-de-martelo” (Keese & Symons, 1985; Flores *et al.*, 2005a; 2005b, Ding, 2009; Eiras *et al.*, 2006a; 2009; Gago *et al.*, 2009; Wang & Ding, 2010; Owens *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2013) (Figura 2).

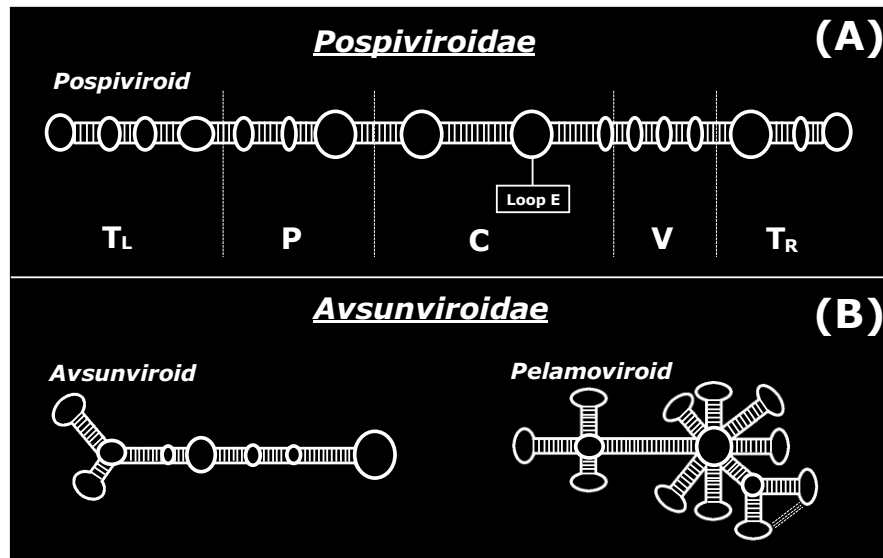


Fig. 2 – Representação das estruturas secundárias dos RNA dos viroides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*: **(A)** *Pospiviroid*, gênero tipo da família *Pospiviroidae* com os cinco domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e Terminal Direito (TR), além do Loop E; **(B)** Gêneros *Avsunviroid* e *Pelamoviroid* apresentando, respectivamente, moléculas com estrutura secundária de “quase-bastão” e fortemente estruturada. Figura adaptada de Eiras (2012).

Apesar dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) terem sido descobertos no final do século XIX, e a participação do RNA na síntese proteica ter sido desvendada em meados do século XX (Rinn & Chang, 2012); o primeiro RNA patogênico a plantas com propriedades únicas (mais tarde nomeado viroide) somente foi apresentado à comunidade científica no final da década de 1960 (Diener & Raymer, 1967) (Figura 3). O *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), identificado causando a doença do “tubérculo afilado da batatinha” foi identificado e caracterizado por Diener (1971a; 1971b) e, posteriormente, sequenciado por Gross *et al.* (1978). Nos anos seguintes, outros viroides associados à doenças importantes foram caracterizados em diversas espécies de plantas cultivadas, como o “exocorte em citros” (*Citrus exocortis viroid*, CEVd), o “nanismo do crisântemo” (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd), o “cadang-cadang do coqueiro” (*Coconut cadang cadang viroid*, CCCVd), o “nanismo do lúpulo” (*Hop stunt viroid*, HSVd), o “cálico do pessegueiro” (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd), entre outros (Hadidi *et al.*, 2003; Flores & Owens, 2008). Atualmente, de acordo com Owens *et al.* (2011) e Verhoeven *et al.* (2013), há mais de 30 diferentes espécies de viroides descritas sendo 29 espécies pertencentes à cinco gêneros da família *Pospiviroidae*, e 4 espécies descritas como pertencentes à 3 gêneros pertencentes à família *Avsunviroidae* (Tabela 2).

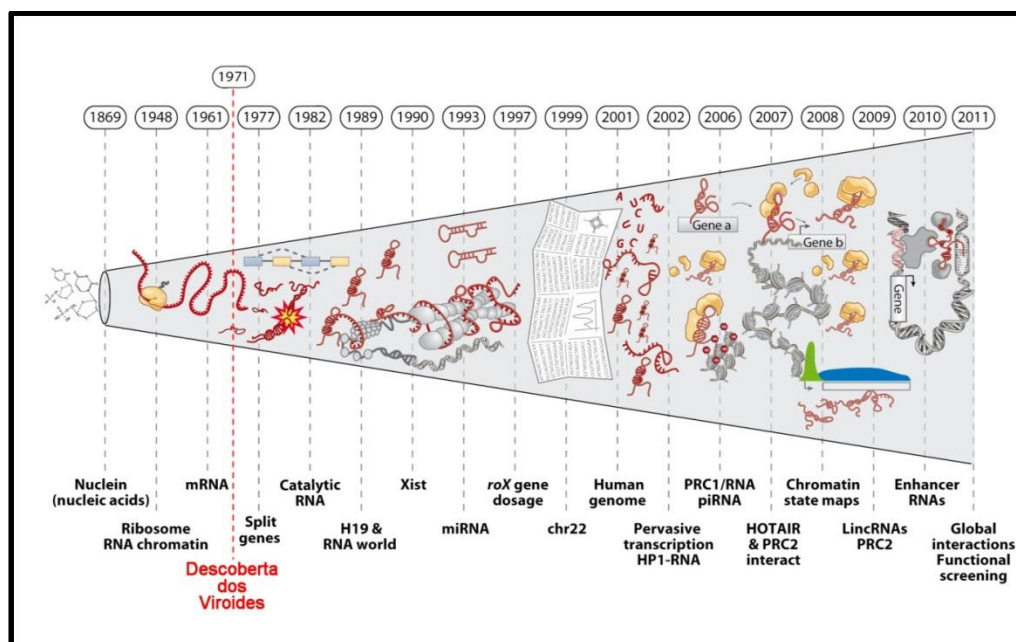


Fig. 3 – Cronologia das principais descobertas relacionadas ao RNA, incluindo a descrição dos viroides (Diener 1971a; 1971b). Figura adaptada de Rinn & Chang (2012)

Os primeiros estudos sobre os viroides foram indiretos, à partir dos sintomas observados em hospedeiros naturais e mediante o emprego de inoculação mecânica em hospedeiros herbáceos, que respondiam à infecção com sintomas específicos. Causam, nas folhas, malformações, epinastia, rugosidade e manchas cloróticas e necróticas; no caule de plantas lenhosas, induzem encurtamento dos entrenós, descoloração, caneluras, exsudação, descoloração e necrose; na planta como um todo, podem induzir nanismo, amarelecimento e, no caso de espécies lenhosas, definhamento da copa e morte (Eiras *et al.*, 2006a). Esta suposta especificidade e levando-se em conta que o PSTVd e o CEVd induziam sintomas similares em alguns de seus hospedeiros (tomateiro e *Gynura*, respectivamente), foi proposto que esses viroides eram isolados de um mesmo agente. Por sua vez, os sintomas induzidos pelos viroides são semelhantes àqueles induzidos por vírus, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico. Com o advento das técnicas moleculares comprovou-se que o PSTVd e o CEVd eram viroides distintos (similaridade de 60%). A identificação atual de novos viroides é feita mediante hibridização “Northern-blot” com sondas específicas a partir de preparações de RNA separadas por eletroforese em géis desnaturantes de poliacrilamida (PAGE), que possibilitam estimar o seu tamanho, sendo a caracterização obtida pelo sequenciamento completo do genoma (Hanold *et al.*, 2003; Mühlbach *et al.*, 2003).

2.4. Viroides em crisântemo

2.4.1. O “nanismo do crisântemo” induzido pelo *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)

Durante muitos anos, a doença conhecida por “nanismo do crisântemo”, apesar de não ter seu agente etiológico identificado, foi atribuída a uma possível virose, principalmente devido aos sintomas similares aos induzidos por vírus, à fácil transmissão mecânica e ao não conhecimento, naquela ocasião, de um agente biológico subviral. Essa doença foi reconhecida primeiramente nos EUA, ocasionando uma importante epidemia que durou de 1945 até 1947 (Brierley & Smith, 1951). Disseminou-se rapidamente até o Canadá, em 1950, e depois para o mundo, principalmente em regiões produtoras de crisântemo, provavelmente devido ao trânsito informal de material vegetal e também pelo comércio legal de mudas (Lawson, 1987). Somente trinta anos mais tarde, na década de 1980, demonstrou-se que o agente causal do “nanismo do crisântemo” era um viroide, então denominado *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (Diener & Lawson, 1973). Quase 10 anos mais tarde, o CSVd teve sua sequência de nucleotídeos desvendada e sua estrutura secundária proposta (Palukaitis & Symons, 1980; Haseloff & Symons, 1981). Atualmente, o CSVd é classificado, de acordo com suas propriedades biológicas e moleculares, como pertencente ao gênero *Pospiviroid*, família *Pospiviroidae* (Owens *et al.*, 2011). O CSVd é, portanto, constituído por um RNA de fita simples, circular, fortemente estruturado em forma de bastão (devido aos pareamentos entre as bases nitrogenadas) com tamanho que, dependendo do variante de sequência, oscila entre 354 e 356 nucleotídeos (Bouwen & Zaayen, 2003).

O CSVd pode afetar seriamente as plantas e as flores de diversos cultivares de crisântemo, impossibilitando sua comercialização. Como exemplo, podem ser citadas as perdas causadas pelo CSVd, em 1987, na Austrália, que chegaram a aproximadamente 3 milhões de dólares (Hill *et al.*, 1996). A intensidade dos sintomas induzidos pelo CSVd, em crisântemo, têm grande variação e, normalmente, depende da base genética do hospedeiro e das condições de cultivo pode apresentar diferentes graus de severidade. Cultivares de crisântemo “pompom”, por exemplo, parecem ser mais sensíveis em comparação aos demais tipos, considerados “padrão”. O sintoma mais comum é o subdesenvolvimento da planta, com a redução do porte (nanismo). Esse efeito é mais facilmente reconhecido quando plantas saudáveis crescem ao lado de plantas infectadas. As folhas também podem se apresentar mais afiladas e amareladas que o normal, e o tamanho das flores é afetado,

podendo o peso fresco de uma flor ser reduzido a 65% (Brierley & Smith, 1951; Horst *et al.*, 1977). O círculo de hospedeiros que podem ser experimentalmente infectados pelo CSVd abrange espécies de diferentes famílias botânicas, incluindo plantas de importância econômica como a batatinha (*Solanum tuberosum*), o tomate (*Solanum lycopersicum*), o pimentão (*Capsicum annuum*), alguns cultivares de pepino (*Cucumis sativus*), espécies ornamentais do gênero *Dendranthema* (ex *Chrysanthemum*), *Dahlia* e *Petunia*, além de espécies da vegetação espontânea como *Emilia sagittata* e *Nicandra physaloides* (Runia & Peters, 1980). Matsushita & Penmetcha (2009) demonstraram que RNA lineares transcritos do CSVd são infectivos e podem induzir doença em crisântemo e que este viroide se replica eficientemente em um grande número de hospedeiros, o que explica, em parte, a ocorrência frequente da doença em cultivos de crisântemo.

O CSVd é considerado praga quarentenária A2 na Europa (OEPP/EPPO, 1989). Pode ser encontrado em praticamente todos os países e regiões em que o crisântemo é cultivado, já tendo sido descrito em todos os continentes [Ásia, África, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania (Bouwen & Van Zaayen, 2003)]. No Brasil, há somente um relato da possível ocorrência do CSVd em plantas oriundas de plantios de crisântemo do estado de São Paulo (Dusi *et al.*, 1990). Após a extração de RNA e eletroforese em gel de poli(acrilamida) reverso (em condições desnaturantes), os autores identificaram a presença de uma banda de RNA circular, possivelmente de um viroide, provavelmente o CSVd. Porém, não houve a confirmação da sua identidade. Recentemente, Gobatto *et al.* (2012b) confirmaram, por meio de eletroforese sequencial em géis de poli(acrilamida) (*sequential Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, sPAGE), *Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e sequenciamento completo do genoma, a ocorrência do CSVd em cultivos de crisântemo no estado de São Paulo. Devido à sua elevada estabilidade e por alcançar elevadas concentrações na planta hospedeira, o CSVd é facilmente transmitido experimentalmente por inoculação mecânica a partir da fricção de extrato de plantas infectadas sobre a superfície de folhas de plantas hospedeiras sadias. Além disso, é também transmitido por contato foliar, enxertia e ferramentas de corte contaminadas (canivete, tesoura, etc.). Esse viroide, assim como a grande maioria das outras espécies descritas, não é transmitido por insetos vetores. A sua transmissão via sementes verdadeiras ainda não foi confirmada. O principal modo de disseminação, porém, está relacionado ao trânsito mundial de material vegetal, tanto de crisântemo como de outras espécies vegetais, sendo o homem o principal agente de dispersão (Bouwen & Van Zaayen, 2003).

O controle do “nanismo do crisântemo” causado pelo CSVd, é extremamente difícil devido a uma série de fatores, tais como: (i) facilidade de transmissão na natureza; (ii) período latente, extremamente longo (tempo que a planta leva, após a infecção, para exibir

os sintomas); (iii) propagação vegetativa do crisântemo, que favorece a perpetuação de patógenos intracelulares sistêmicos; e (iv) número limitado de espécies de crisântemo que apresentam resistência ou tolerância natural ao CSVd. Assim, como são recomendados para os vírus de plantas, as medidas preventivas são as mais importantes e efetivas para o controle dos viroides. A utilização de material de propagação vegetativa sadio é fundamental, porém, a não infecção está relacionada ao bom desempenho de outras medidas, tais como: redução do trânsito de materiais propagativos a partir das áreas de ocorrência do patógeno; programas de indexação e certificação; serviços quarentenários que sejam rigorosos e que tenham como primícia a utilização de métodos de detecção que apresentem elevada especificidade e sensibilidade; acompanhamento da cultura e eliminação de plantas infectadas (*Rouging*); e a desinfecção de ferramentas utilizadas durante os tratamentos culturais. O emprego de métodos moleculares de diagnóstico com elevada especificidade e sensibilidade são fundamentais para o sucesso na produção de mudas e comercialização de plantas de crisântemo livres de viroides (Eiras, 2012). Plântulas de crisântemo podem ser obtidas a partir da cultura de meristemas combinada com termoterapia, porém, a proporção de plantas isentas de viroides pode ser baixa, além de ser esta opção uma alternativa cara e laboriosa (Paludan, 1974; OEPP/EPPO, 1990).

2.4.2. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)

Nos Estados Unidos, no final da década de 1960, Dimock & Geissinger (1969) descreveram uma nova virose no cultivar 'Yellow Delaware' de *Dendrathera grandiflora*, denominada "mosqueado clorótico do crisântemo". Os sintomas dessa doença incluíam um mosqueado leve, clorose e diminuição do tamanho das folhas e flores, menor desenvolvimento da planta e atraso no florescimento. Em condições naturais, os sintomas eram confundidos com problemas nutricionais e muitas vezes havia recuperação das plantas, o que podia mascarar a doença (Dimock *et al.*, 1971).

Em 1975, Romaine & Horst sugeriram tratar-se de um possível viroide, o agente etiológico da doença do "mosqueado clorótico do crisântemo". Porém, somente 22 anos mais tarde, Navarro & Flores (1997) sequenciaram o genoma completo, caracterizaram e descreveram a estrutura secundária em detalhes da molécula de RNA dessa doença, confirmando tratar-se de uma nova espécie de viroide, denominada *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd). Esse viroide, em função de suas propriedades biológicas e moleculares, principalmente devido à presença de estruturas ribozimáticas em ambas as polaridades e a capacidade de se autoclivar *in vitro* e *in vivo* por meio dessas ribozimas (do

tipo cabeça-de-martelo, *hammerhead*), foi classificado no gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*. O CChMVd é, portanto, constituído por um RNA de fita simples, circular, fortemente estruturado com tamanho que oscila entre 398 e 401 nucleotídeos (Flores *et al.*, 2005b).

A distribuição geográfica desse viroide parece limitada, pois após a primeira constatação nos EUA, houve relatos da doença somente na Dinamarca, França e Índia. É provável, porém, que isolados assintomáticos do CChMVd passem despercebidos por barreiras fitossanitárias e estejam presentes em outros países e regiões produtoras do mundo. Ao contrário do CSVd, o círculo de hospedeiros do CChMVd é bastante restrito, infectando somente alguns cultivares de *Dendranthema grandiflora* como 'Bonnie Jean', 'Deep Ridge' e 'Yellow Delaware' e a espécie *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* cultivar 'Clara Curtiss' (Horst, 1987). A transmissão experimental do CChMVd pode ser realizada por meio de inoculação mecânica com extrato de folhas infectas sobre folhas de plantas saudáveis, sendo porém mais eficiente por meio da inoculação de preparações de RNA purificados (Romaine & Horst, 1975). Com relação ao controle do "mosqueado clorótico do crisântemo", assim como para o "nanismo do crisântemo" induzido pelo CSVd, as medidas preventivas são essenciais e devem estar aliadas ao monitoramento de plantas infectadas por meio de métodos moleculares de diagnóstico específicos e sensíveis.

Deve-se ressaltar que alguns cultivares de crisântemo podem ser infectados por outras duas espécies de viroides: o PSTVd e o CEVd, até hoje, relatados em crisântemo somente via inoculação experimental. Esses viroides têm amplo círculo de hospedeiros e seus sintomas, que dependerão fundamentalmente da variante de sequência viroidal, podem ser diferenciados do CSVd e do CChMVd, quando inoculados no cultivar 'Bonnie Jean' (Horst & Nelson, 1997).

TABELA 2 – Classificação taxonomica dos viroides e suas respectivas acrônimos e tamanho do RNA em número de nucleotídeos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV)*. Os gêneros tipo de cada família e as espécies tipo de cada gênero encontram-se sublinhados. As espécies sombreadas em cinza seguidas do algarismo (1) infectam naturalmente plantas de crisântemo. As espécies sombreadas e seguidas de algarismo (2) infectam experimentalmente plantas de crisântemo.

Família	Gênero	Espécie	Acrônimo	Tamanho	
Pospiviroidae	<u>Pospiviroid</u>	<u>Potato spindle tuber viroid</u> (2)	PSTVd	356-360	
		<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (1)	CSVd	354-356	
		<i>Citrus exocortis viroid</i> (2)	CEVd	368-374	
		<i>Columnnea latent viroid</i>	CLVd	370-375	
		<i>Iresine viroid</i> 1	IrVd-1	370	
		<i>Mexican papita viroid</i>	MPVd	359-360	
		<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd	360-363	
		<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd	360	
		<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd	360	
		<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd	295-303	
	Cocadviroid	<u>Coconut cadang-cadang viroid</u>	CCCVd	246-301	
		<i>Citrus bark cracking viroid</i>	CBCVd	284	
		<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTiVd	254	
	Apscaviroid	<u>Apple scar skin viroid</u>	ASSVd	329-330	
		<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd	306-307	
		<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd	369	
		<i>Citrus dwarfing viroid</i>	CDVd	294-297	
		<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd	318	
		<i>Grapevine yellow speckle viroid</i> 1	GYSVd-1	366-368	
		<i>Grapevine yellow speckle viroid</i> 2	GYSVd-2	363	
		<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd	315-316	
		<i>Citrus viroid</i> V**	CVd-V	293-294	
		<i>Citrus viroid</i> VI**	CVd-VI	329	
	Coleviroid	<u>Coleus blumei viroid</u> 1	CbVd-1	248-251	
		<i>Coleus blumei viroid</i> 2	CbVd-2	301-302	
		<i>Coleus blumei viroid</i> 3	CbVd-3	361-364	
	Avsunviroidae	<u>Avsunviroid</u>	<u>Avocado sunblotch viroid</u>	ASBVd	246-250
		<u>Pelamoviroid</u>	<u>Peach latent mosaic viroid</u>	PLMVd	335-338
			<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (1)	CChMVd	398-401
		<u>Elaviroid</u>	<u>Eggplant latent viroid</u>	ELVd	332-335

*Owens *et al.* (2011); ** Novas espécies: CVd-V (Serra *et al.*, 2008); PVd (Nakaune & Nakano, 2008), CVd-VI (Ito *et al.*, 2001); ***DLVd, recentemente identificada como uma nova espécie não definida se pertence ao gênero *Pospiviroid* ou *Hostuviroid* (Verhoeven *et al.*, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras e local de realização dos experimentos

Durante o período de abril de 2011 a março de 2012 foram realizadas visitas à produtores de crisântemo nos principais municípios produtores do estado de São Paulo, Atibaia (ATB), Holambra (HOL) e Artur Nogueira (ARN), para a coleta de materiais vegetais com suspeita de infecção por viroides (Figura 4). As propriedades Sítio Shinkawa (Proprietário Gino Jun Shinkawa) e Flora Sonoda (Proprietário Katsutoshi Sonoda), localizadas no município de Atibaia, são caracterizadas como produtoras de crisântemo em

vaso, assim como o Rancho Raízes (Responsável Marcos Zucheratto), localizado no município de Holambra. As propriedades Terra Viva (Responsável Gisele Wigman) e Rica Flor (Proprietário Maurício João Mattar), localizadas no município de Artur Nogueira, são produtoras de mudas de crisântemo. Nestas propriedades foram coletadas folhas sintomáticas de diferentes variedades de crisântemo cultivados em vasos, suspeitos de infecção por viroides, apresentando sintomas de: nanismo, mosaico, deformação foliar e quebra de coloração nas flores. Amostras foliares das variedades 'Puritan', 'Cool Time', 'Sandra', 'Pelle', 'Zembla' e 'Venice' foram coletadas e armazenadas a -20°C para posterior extração de RNA.



Fig. 4 – Principais municípios produtores do estado de São Paulo, visitados para a realização de coletadas das amostras de crisântemo com suspeita de infecção por viroides

3.2. Determinação do círculo de hospedeiras experimental do CSVd por inoculação mecânica

Para determinar as espécies suscetíveis a um isolado do CSVd, plantas pertencentes às famílias Asteraceae e Solanaceae foram inoculadas mecanicamente com um isolado de CSVd, previamente identificado. As plantas indicadoras foram obtidas pela semeadura em bandejas, e transplantadas, aproximadamente 15 dias após a germinação,

para vasos com capacidade de 350 mL e mantidas em casa de vegetação. O extrato vegetal para inoculação foi obtido por meio da trituração de folhas de crisântemo, previamente identificado como infectado, em almofariz na presença de solução de sulfito de sódio 0,5%, pH 6,0 na proporção de 1:5 (g:mL), adicionando-se carbureto de silício (“carborundum” – 400 mesh) como agente abrasivo. As transmissões foram realizadas friccionando o inóculo obtido com o auxílio de um pistilo de porcelana (previamente esterilizados) sobre a superfície adaxial das folhas das plantas indicadoras. Os controles constaram de plantas da mesma espécie com mesmo estágio de desenvolvimento, cujas folhas foram friccionadas apenas com a solução de sulfito de sódio 0,5% e abrasivo. Após as inoculações, as plantas foram lavadas com água e mantidas em casa de vegetação para observação do surgimento dos sintomas. Foram inoculadas as seguintes espécies Asteraceae: zínia (*Zinnia elegans*), girassol dobrado (*Helianthus annuus*), dália (*Dahlia* sp.), gynura (*Gynura aurantiaca*), emília (*Emilia* sp.) e cinerária (*Senecio cruentus*) (Figura 5). Foram também inoculadas plantas de tomateiros (*Solanum lycopersicum*) ‘Santa Cruz’ e ‘Rutgers’, pertencentes à Solanaceae. Após 30 dias da inoculação mecânica, amostras de folhas das plantas desafiadas foram coletadas e mantidas a -20°C para a extração de RNA.

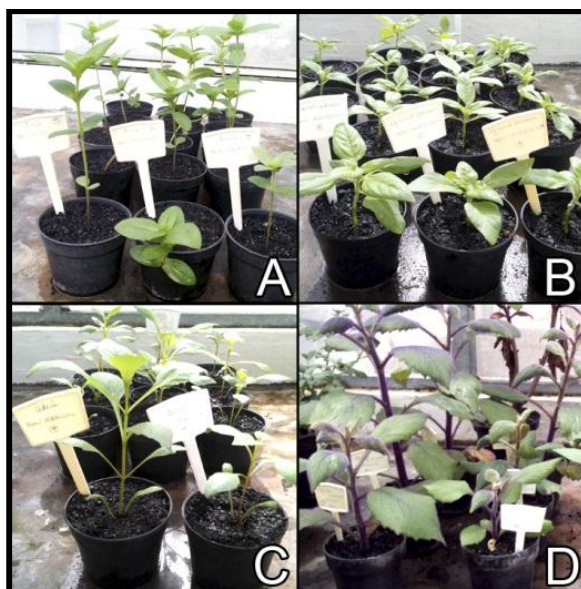


Fig. 5 – Plantas de Asteraceae inoculadas com CSVd: (A) zínia (*Zinnia elegans*); (B) girassol dobrado (*Helianthus annuus*); (C) dália (*Dahlia* sp.); (D) gynura (*Gynura aurantiaca*). Fotos: Danielle Gobatto

3.3. Extração de RNA

As extrações dos RNA viroidais das amostras coletadas nas diferentes localidades monitoradas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Flores *et al.* (1985)

com modificações, baseando-se no emprego de agentes orgânicos desproteinizantes. O procedimento utilizou 5g de tecido fresco ou congelado de folhas jovens de crisântemos com suspeita de infecção virolal macerados em almofariz esterilizado por autoclavagem em presença de nitrogênio líquido a fim de se obter um produto com aspecto de um pó fino. Em seguida, foram adicionados as amostras 5 mL de Tris HCl 0.2M (pH 8,9), 1,25 mL de SDS 5%, 1,25 mL de EDTA 0,1M (pH 7,0), 20 mL de Fenol e 0,625 mL de 2-mercaptoetanol. As amostras foram submetidas à agitação vigorosa em *Vortex Mixer BV1000* por um minuto e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 8000 rpm. Processou-se a separação dos sedimentos vegetais da fase aquosa que cuidadosamente foi transferida para tubos previamente esterilizados, sendo, em seguida, adicionados 5 mL de fenol equilibrado (pH 8,0). As amostras foram novamente submetidas a agitação e centrifugação por 15 minutos a 8000 rpm. Os ácidos nucleicos, presentes na fase aquosa, foram transferidos para tubos 'Falcon', sendo adicionado um volume de água estéril suficiente para igualar as amostras com um volume final de 20 mL. Em seguida, foram adicionados para cada amostra 3,7 mL de STE (10X), 13,5 mL de Etanol (96%), e 1,25 g de celulose não iônica (CF-11, Whatman). Os tubos, contendo as amostras, foram selados com parafilme e submetidos à agitação por 3 horas em *Fine PCR Rotator-AG* a temperatura ambiente. A celulose presente nas amostras processadas foram lavadas por 3 vezes com uma solução contendo 30 mL de STE (1X) + EtOH 35% e submetidos à centrifugação (*Sorval RC2-B*) por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado e eluído com 20 mL de STE (1X) por 5 minutos a 3000 rpm, e transferido para um tubo córex. Às amostras foram adicionados 5 mL de isopropanol (1 volume), seguida de agitação por inversão. Após serem mantidas 12 horas a -20°C, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 8000 rpm para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após descartar o isopropanol, os RNA contidos no precipitado, foram ressuspendidos com 250 mL de água estéril e armazenados em microtubos (livres de RNase) e mantidos a -80°C.

Especificamente para a clonagem, síntese de sonda de RNA (ribosonda) e hibridizações *Northern-blot* e *dot-blot* foi utilizado um isolado de CSVd de crisântemo 'Puritan' desidratado em Cloreto de Cálcio (CaCl₂), denominado 2214 e proveniente do município de Holambra, SP. Este procedimento foi realizado por cromatografia com coluna de gel de sílica "Zymo" (*Zymo-Spin I columns, Zymo Research, C1003-250*). O tecido desidratado (0,2 g de folhas) foi macerado em almofariz com pistilo na presença de nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado ao material vegetal ao material vegetal 1 mL de TEX (4M tiocianato de guanidínio, 0.1M acetato de sódio pH 5,5, 10 mM EDTA, 0.1M 2 mercaptoetanol [47.3g tiocianato de guanidina + H₂O para 100 mL]) que foi vertido em microtubos com capacidade para 1,5 mL de volume que foram submetidos a agitação vigorosa e posterior centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm, em temperatura ambiente.

Transferiu-se o volume de aproximadamente 0,6 mL do sobrenadante para um novo microtubo com capacidade de 1,5 mL e adicionou-se 0,39 mL de etanol (96%). Os tubos foram submetidos a agitação vigorosa em vórtex e posterior centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, em temperatura ambiente. Transferiu-se o volume de aproximadamente 0,7 mL do sobrenadante para a coluna *Zymo* sobre um microtubo com capacidade de 2 mL. Procedeu-se a centrifugação por 1 minuto a 13000 rpm, em temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, a coluna foi lavada com 0,5 mL de TLA (70% etanol, 10 mM acetato sódico pH5,5 [0.33 mL 3M NaAc pH 5,5 + 73 mL 96% etanol + H₂O para 100 mL], e centrifugada por 30 segundos a 13000 rpm, em temperatura ambiente. Est operação foi repetida por mais uma vez, transferindo cuidadosamente a coluna para um novo microtubo com capacidade para 1,5 mL. Procedeu-se a eluição da coluna com 10 µL de TEL (20mM Tris-HCl, pH 8,5 [200 µL 0.1M Tris-HCl pH 8,5 + H₂O para 1 mL], seguido de incubação a 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugando por 2 minutos a 13000 rpm em temperatura ambiente.

3.4. Eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE)

Os RNA extraídos das amostras de crisântemo foram visualizados mediante dupla eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE). Inicialmente, os RNA foram evidenciados em um gel nativo (PAGE 5% não desnaturante), corado com brometo de etídeo. A região de interesse, delimitada por marcadores moleculares entre 250 e 400 nucleotídeos, foi cortada e cuidadosamente transferida para um segundo gel 5% desnaturante, contendo ureia 8M. Após a segunda eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo revelando os RNAs circulares que foram identificados pela migração diferencial característica. Viroides purificados a partir de tomateiro infectado pelo CEVd (375 nucleotídeos) e de abacateiro infectado pelo ASBVd (246 nucleotídeos), foram utilizados como padrões de comparação nas eletroforeses (*viroid range*).

3.5 RT-PCR

Para a RT-PCR foi utilizado 2 µL da preparação contendo aproximadamente 100ng de RNA que foi transferido para um microtubo contendo 1 µL (50 pmoles/µL) do oligonucleotídeo (*primer*) antisense, desenhado para anelar especificamente na parte superior da CCR do CSVd. Após incubação por 3 min a 95°C, o conteúdo foi resfriado em gelo, e adicionado a 2,5 µL de tampão da enzima transcriptase reversa (Roche), 0,5 µL de

dNTPs (10 mM), 200 unidades (1 µL) da enzima transcriptase reversa (Roche). Esta mistura foi incubada por 60 min a 37°C. Em seguida foi realizada a PCR, adicionando 1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (Roche) na concentração de 5 unidades/ µL, dNTPs (10 mM), tampão recomendado pelo fabricante e os oligonucleotídeos específicos para o CSVd. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em géis de agarose 1,5% e/ou poliacrilamida 5% corados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta (Sambrook & Russel, 2001). Para tanto, foram empregados diferentes pares de *primers* (Nakahara *et al.* 1999) que permitiram a amplificação de todo o genoma do CSVd com aproximadamente 349-351 pares de bases (Tabela 3). Os fragmentos amplificados, após serem sequenciados, foram alinhados e comparados com 31 genomas de CSVd depositados no *GenBank*.

TABELA 3 – Característica e propriedades dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a amplificação parcial e/ou completa do CSVd.

<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Polaridade	Tamanho dos produtos (pb)
RF75_CSVd(s)	GGGGAAACCTGGAGGAAG	+	354-356
RF74_CSVd(c)	GGGGATCCCTGAAGGACTTCT	-	
CSVd-II(s)	AGTCCGACGAGATCGCG	+	111
CSVd-I(c)	AGACCTCTCCAGGAGAGGAAG	-	
CSV-1P(s)*	CTTAGGACCCCACTCCTGCG	+	348-350
CSV-1M(c)*	CCGCGATCTCGTCGGACTTC	-	

**Primers* descritos por Nakahara *et al.* (1999)

Os RNA purificados foram transferidos para um microtubo em presença de oligonucleotídeo complementar onde em termociclador, submeteu-se à incubação por 1 minuto e 30 segundos a 98°C seguido de 45 minutos a 42°C, quando foram rapidamente aplicados a cada microtubo 3,5 µL da mistura de 2 µL de tampão da enzima M-MuLV RT(5x) [250 mM Tris-HCl, pH8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT], 1 µL de dNTP's (10 nM), 0,25 µL de inibidor de RNase *Ribolock* (~40U/µL) e 0,25 µL de enzima RT M-MuLV *Revert Acid RT* (200U/ µL). As amostras foram mantidas por 10 minutos a 50°C e 5 minutos a 60°C. Para a PCR, utilizou-se a enzima DNA polimerase *Phusion* (Finnzymes, F-530s, 100U), com taxa de erro de $4,4 \times 10^{-7}$, sintetizando produtos com extremidades abruptas (sem adição de nucleotídeos adicionais no terminal 3'). O par de *primers* imediatamente opostos específicos para o CSVd, que permite a amplificação do genoma completo do viroide, está representado em vermelho na Figura 6.

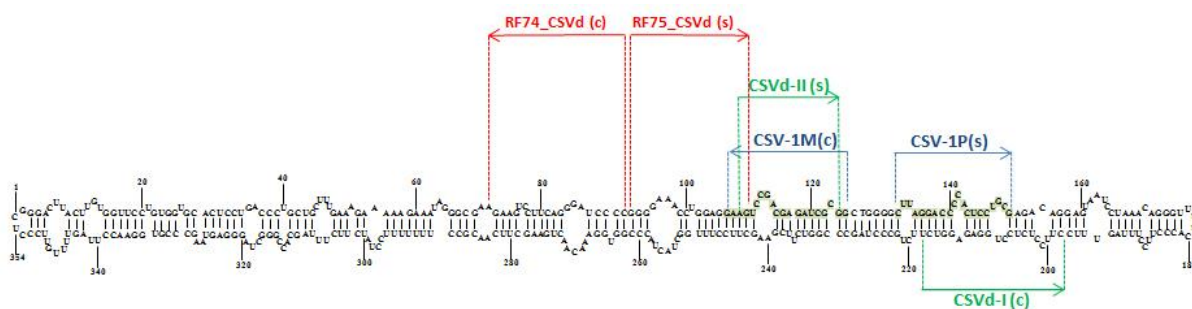


Fig. 6 – Representação da estrutura secundária da molécula de RNA circular do CSVd com a localização dos diferentes *primers* utilizados na amplificação via RT-PCR. Os *primers* CSV-1M(c) e CSV-1P(s) indicados em azul, foram descritos por Nakahara *et al.* (1999). Os *primers* CSVd-II(s)/CSVd-I(c) em verde, e RF74_CSVd(c)/RF75_CSVd(s) em vermelho, foram desenhados no presente trabalho para a amplificação do genoma completo do CSVd. *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’

3.6. Eluição dos fragmentos de DNA

As bandas correspondentes aos DNA amplificados via RT-PCR foram dissociadas dos géis de agarose utilizando-se dois kits de eluição de produtos de PCR: *Concert Gel Extraction Systems* (Life Technologies) e *Zymo-Spin I columns* (Zymo Research, C1003-250), seguindo as recomendações dos fabricantes.

3.7. Sequenciamento e análise das seqüências

Os fragmentos de DNA amplificados do CSVd foram clonados e enviados para sequenciamento automático de DNA (método de Sanger) em sequenciador ABI-377 (Applied Biosystem). As comparações com outras seqüências, existentes no *GenBank*, foram realizadas com o auxílio do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponíveis na internet. Alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa *Clustal X 1.8* e os cálculos das porcentagens de identidade com o programa *GeneDoc* (Nicholas *et al.*, 1997). As seqüências de RNA foram analisadas com o auxílio dos programas mFold para moléculas circulares (Zuker, 1989) e visualizadas com o programa *RNAviz* (De Rijk & Wachter, 1997).

3.8. Análise quantitativa por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR)

As análises da concentração de produto sintetizado, no caso do genoma do CSVd, foi obtida por RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) utilizando aparelho *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Para as reações de RT-qPCR foram utilizados 2 µL de cDNA

de cada amostra e 10 μM de cada *primer* [CSVd-II(s)/CSVd-I(c)], de acordo com a Figura 6. Foram acrescentados à mistura, 5,2 μL de água deionizada esterilizada, 7,5 μL de *FastStart Universal SYBR Green Master* (ROX) (2x concentrado) (Roche® Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), 0,3 μL dos *primers* específicos {*forward-F* [(CSVd-II(s)) e *reverse-R* [CSVd-I(c)]] (10 μM). O volume final da reação foi de 15 μL . Em seguida, foi realizada uma diluição seriada de 1:10 até 1:100.000 a partir do cDNA, para estimar o limiar de detecção da RT-qPCR. As amplificações das diluições seriadas também permitiram realizar o cálculo da eficiência de amplificação pela equação $E=10^{(-1/\text{declividade})} - 1$, onde 'declividade' corresponde à declividade da reta obtida pela regressão linear dos valores de Cts (*cycle thresholds*) obtidos para as diferentes diluições do cDNA. A eficiência de amplificação foi confirmada pela obtenção de curvas de dissociação para cada reação.

3.9. Clonagem

Os produtos amplificados via RT-PCR, dissociados dos géis, foram ligados em vetor pBS Δ E [P8] (derivado de pPBSIIKS + [H17] -X52327, com mutação do sítio *EcoRI* na ORF da β -lactamasa), em sítio de *EcoRV* e tampão apropriado. Os produtos da ligação foram purificados com o kit de purificação de ácidos nucleicos *Zymo* (*Zymo-Spin I columns*, *Zymo Research*, C1003-250), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, os ácidos nucleicos purificados foram utilizados para transformar, por eletroporação, células competentes de *Escherichia coli* (DH5- α). As células transformadas permaneceram em agitação por 1h a 37°C na presença de 1 mL de SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extrato e levedura, 0,5 g/L NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂). Em seguida estas células foram repicadas em placas de Petri contendo meio sólido LB (15 g de ágar, 5 g de extrato de levedura, 10 g de triptona e 10 g de NaCl por litro) com ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e X-Gal (30 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e incubadas a 37°C por 12 h. Após o crescimento das colônias, com o auxílio de palitos de madeira, recolheu-se as colônias que apresentavam coloração branca que foram transferidas para tubos contendo 3 mL de meio líquido LB com ampicilina (1mL de LB para cada 1 μL de ampicilina), e mantidas por 24 h a 37°C. Para as mini-preparações, os tubos foram submetidos a uma cromatografia em coluna (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos resultantes da cromatografia foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose TAE (1%), a 65 volts por 75 minutos, aplicando para cada poço 10 μL (2 μL de tampão de carga (5x) [5g de SDS+3,85g DTT+35g glicerol(87%)+0,025g AB+15mL Tris-HCl (1M), pH 6.8 +H₂O para completar 50mL] + 2 μL de plasmídeo com inserto).

3.10. Síntese da sonda, hibridização *Northern- e dot-blot*

Para a obtenção da sonda radioativa foram adicionados em microtubo: 1 µL de plasmídeo linearizado com enzima *Xba I*, 2 µL de tampão (10x), 0,4 µL de DTT (0,5M), 1 µL de ATP, CTP, GTP (10mM), 1 µL de UTP [α - 32 P] (800 Ci/mmol), 0,5 µL de inibidor de RNase (~40U/µL), 1µL de pirofosfatase inorgânica (0,1U/µL), 1µL de T3 RNA polimerase (~50U/µL) e H₂O para completar um volume final de 20 µL. A preparação permaneceu por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,4 µL de DNase (livre de RNase) (50U/µL) seguido de incubação por 10 minutos a 37°C. A seguir, a preparação foi transferida para uma minicoluna Sephadex G-50 (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante (Obs.: essas colunas são utilizadas para purificar sondas radioativas por exclusão molecular, que visa eliminar nucleotídeos radioativos não incorporados). Após a purificação, a radioatividade da sonda foi estimada por meio de leitura em contador de cintilações (*Liquid Scintillation Counter*, Wallac 1409, Pharmacia). O valor obtido foi de 3.200.000 cpm/µL.

Para a hibridização *Northern-blot*, após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), nativo ou desnaturante, os RNA foram transferidos para membranas de náilon (carregadas positivamente) que foram envolvidas por papéis de filtro específicos (*Gel Blotting Paper 005*, Schleicher and Schull). Após este procedimento, feito com o auxílio de aparato para eletrotransferência *Semiphor* (Hofer), as membranas foram fixadas com luz ultravioleta (*UV crosslinker UVC500* [Hofer] com um pulso de 1200 [$\times 100\mu\text{J}/\text{cm}^2$]) por 1 minuto. A pré-hibridização (bloqueio) foi realizada em solução de hibridização (0,25 V de SSC 2X+ 0,1 V de SDS 0,1%+ 0,5 V de formamida + 10 mg/mL de DNA de esperma de salmão + 0,1 V de Ficoll 0,1% + 0,1 V de PVP 0,1%) por 2 horas a 70°C. As hibridizações foram realizadas adicionando-se 1 µL da sonda de RNA (ribosonda), previamente desnaturada a 100°C por 2 minutos e imediatamente colocada em gelo, junto com a solução de hibridização, permanecendo a 55°C por 12 h. Após esse período as membranas foram lavadas três vezes em presença de SSC 2X e 0,1% de SDS durante 15 min a temperatura ambiente, e uma vez com SSC 0,1X e 0,1% SDS a 55°C. Em seguida, as membranas foram mantidas em contato com filmes de raio-X (Kodak) e, finalmente, reveladas de acordo com as recomendações do fabricante.

Na técnica de *dot-blot*, os RNA purificados foram adicionados e fixados à membrana de náilon e mantidos em contato com a sonda marcada (hibridização). O processo de hibridização corresponde ao pareamento das duas moléculas (sonda e RNA alvo), as quais devem apresentar porcentagem de complementariedade suficiente para estabilizarem-se. Os RNA foram cuidadosamente aplicados em membranas de náilon [previamente

quadriculadas (1 cm²), sendo aplicados 5 µL de RNA de cada amostra no centro de cada quadrado.

3.11. Avaliação da resistência de variedades de crisântemo ao CSVd

Foram desafiadas, quanto à resistência e/ou tolerância, as variedades comerciais de crisântemo ‘Puritan’, ‘Rage’, ‘Pelle’, ‘Cool Time’, ‘Fine Time’ e ‘Indianópolis’ (*Dendranthema* spp.). Cada parcela foi constituída por 40 plântulas de cada variedade, com 10 vasos e em cada vaso 4 plântulas, sendo 4 vasos deixados como testemunhas e 6 vasos corresponderam aos tratamentos, que foram inoculados com um isolado do CSVd e mantidos em casa de vegetação. As plântulas utilizadas foram fornecidas pela parceria firmada com a ‘Terra Viva’, produtora de mudas de crisântemo e mantidas em vasos com substrato recomendado para o bom desenvolvimento das mudas (Figura 7). As inoculações foram realizadas de acordo com o item 3.2, sendo aplicados 200 µL de extrato vegetal na concentração de 1:10 em cada folha, sendo inoculadas 2 folhas por planta. As plantas inoculadas foram avaliadas, visualmente, por meio de acompanhamento da evolução dos tipos e intensidade dos sintomas, por um período de até 120 dias após a inoculação. Após este período as plantas foram indexadas, via RT-PCR, com *primers* específicos para o CSVd e de acordo com o descrito no item 3.5.



Fig. 7 – Experimento da avaliação da resistência e/ou tolerância de variedades comerciais de crisântemo ao CSVd conduzido em casa de vegetação da empresa ‘Terra Viva’, no município de Artur Nogueira, SP. Observam-se as plantas de diferentes variedades de crisântemo (*Dendranthema* spp.) em diferentes estádios de desenvolvimento, que foram desafiadas quanto à resistência e/ou tolerância ao CSVd. Da esquerda para a direita: (i) 30 dias após o plantio quando as plantas foram inoculadas (14/08/2012), (ii) pré-florescimento (11/09/2012), (iii) indução dos botões florais (27/09/2012); (iv) florescimento (26/10/2012). Fotos: Danielle Gobatto

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e caracterização dos isolados do CSVd

4.1.1. Extração de RNA e identificação via sPAGE

Os viroides, por serem pequenas moléculas de RNA circular, apresentam características peculiares quando submetidos à eletroforese. Sua migração em géis de poliacrilamida nativos tem um comportamento similar aos de DNA de fita dupla. Essa característica, em parte, pode ser explicada devido os viroides apresentarem moléculas de RNA altamente estruturadas, que apesar de serem de fita simples, comportam-se como fita dupla devido à elevada porcentagem de pareamento entre as bases. Porém, quando são submetidos a uma eletroforese em condições desnaturantes, que acarretam nas perdas das ligações por pontes de hidrogênio, que garantem a sua forte estrutura secundária, o RNA viroidal passa a apresentar uma conformação circular “relaxada”. Em função disso, ocorre um retardo na migração, que os mantém separados dos demais pequenos RNA lineares presentes na planta hospedeira e dos monômeros e oligômeros lineares viroidais (Eiras, 2012). Portanto, identificou-se nas amostras de crisântemo provenientes dos municípios de Atibaia, Holambra e Artur Nogueira, por meio de sPAGE, a presença de bandas de RNA circulares, entre 350 e 360 nucleotídeos, características daquelas normalmente observadas para os viroides. Após a realização da técnica de dupla eletroforese em géis de poliacrilamida (Hanold *et al.*, 2003), observou-se a separação de bandas de RNA circulares e RNA lineares. Por tanto, o marcador utilizado foi uma combinação de RNA purificado de dois viroides conhecidos, CEVd (375 nucleotídeos) e o ASBVd (246 nucleotídeos). Este procedimento permite determinar a porção do gel correspondente à migração eletroforética das moléculas dos viroides, ou seja, bandas que migraram entre os marcadores foram consideradas moléculas de RNA circulares, provavelmente viroidais. A presença dessas bandas foram características para os viroides proveniente das amostras de crisântemo das variedades ‘Pelle’ – HOL (2) e ‘Puritan’ – HOL (1) (Figura 10), ‘Cool Time’ – ATB (1) e ‘Sandra’ – ATB (1) (Figura 11), ‘Venice - ARN’ e ‘Zembla’ – ARN (1) (Figura 12).

A amostra com suspeita de infecção por viroide pertencente à variedade ‘Pelle’ – HOL (2), foi obtida em uma propriedade que cultiva exclusivamente crisântemo para comercialização em vaso. Observou-se que, no mesmo vaso onde foram inseridas 5 mudas, duas apresentaram sintomas típicos aos induzidos pelo CSVd como: nanismo e quebra de coloração das flores. Outras 3 plantas apresentaram aspecto sadio (Figura 8). Simultaneamente, foram extraídos separadamente, RNA das folhas jovens das plantas amostradas aparentemente sadias e RNA das folhas jovens das plantas suspeitas de

infecção. Quando estes RNA foram submetidos à eletroforese (sPAGE), pôde-se observar a presença de uma banda específica de RNA circular com aproximadamente 350 nucleotídeos somente na amostra com suspeita de infecção viroidal, não sendo observadas bandas na amostra sem sintomas. O mesmo resultado foi observado para a variedade 'Puritan', adquirida de um lote comercial de vasos, que apresentava todas as plantas com aspecto suspeito de infecção por viroide (Figura 9). Desta amostra foram selecionadas folhas jovens de plantas que apresentavam sintomas de nanismo e partes da massa de matéria fresca da planta com nanismo, bem como folhas jovens de plantas que apresentavam aspecto sadio. Os RNA foram extraídos, separadamente, e também submetidos à sPAGE de acordo com o descrito para a variedade 'Pelle'. Desta análise constatou-se a presença de uma banda de RNA circular nas amostras suspeitas e a ausência de banda para as amostras consideradas sadias, ou sem sintomas (Figura 10). Ressalta-se que, tanto a amostra da variedade 'Pelle' como da variedade 'Puritan' foram provenientes do município de Holambra.



Fig. 8 – Crisântemo da variedade 'Pelle' com suspeita de infecção viroidal proveniente do município de Holambra (SP). As flores alaranjadas e desenvolvidas correspondem às amostras consideradas normais por meio da avaliação visual. Flores com coloração amarelo pálido (quebra de coloração) provenientes de ramos com nanismo, foram inicialmente consideradas suspeitas sendo posteriormente confirmadas como infectadas pelo CSVd. Foto: Marcelo Eiras



Fig. 9 – Amostra de crisântemo variedade ‘Puritan’ com suspeita de infecção por viroide proveniente do município de Holambra. À esquerda, observam-se flores da variedade ‘Puritan’ em canteiro de produção comercial, em Holambra, SP; à direita, pode-se observar a diferença entre uma flor considerada normal e infectada pelo CSVd, apresentando tamanho reduzido. Fotos: Danielle Gobatto

As variedades ‘Sandra’ e ‘Cool Time’ foram coletadas em uma propriedade localizada no município de Atibaia. Esta propriedade, que comercializa mudas de crisântemo, conta com a colaboração de funcionários, também conhecidos por pragueiros, que treinados por uma equipe de chineses, passam observando as plantas nas estufas, uma vez por semana, para recolher plantas que apresentam suspeita de infecção viroidal. Uma destas funcionárias coletou amostras de folhas jovens de plantas destas variedades que apresentavam suspeita de infecção por viroides, além de amostras de folhas jovens de plantas que pareciam estar sadias, as quais foram utilizadas como controle negativo.

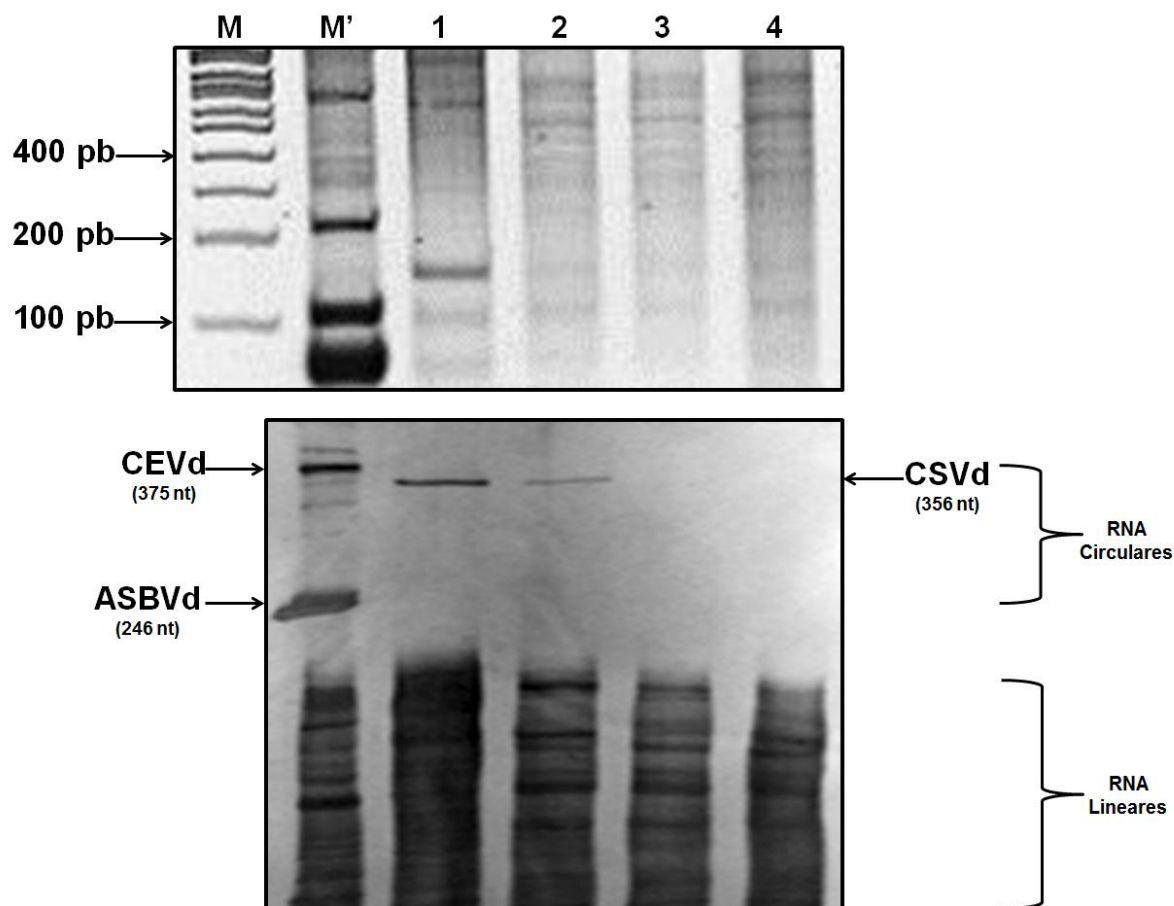


Fig. 10 – Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliácridamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Pelle – HOL (2)'; 2= 'Puritan' – HOL (1); 3= 'Pelle' – HOL (1); 4= 'Puritan' – HOL (2). Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.

O mesmo procedimento de sPAGE, aplicado para as amostras de crisântemos das variedades 'Pelle' e 'Puritan', provenientes do município de Holambra, foram utilizadas para as amostras das variedades 'Cool Time - ATB' e 'Sandra – ATB', provenientes do município de Atibaia (Figura 11). Porém, constatou-se que neste sistema de avaliação visual apresentam latência, o que contribui para a disseminação de viroides em áreas de produção intensiva (Bouwen & van Zaayen, 2003). Devido à sua elevada estabilidade e concentração nos tecidos nas variedades de crisântemo, o CSVd é facilmente transmitido experimentalmente, por inoculação mecânica, a partir da fricção de extrato de plantas infectadas sobre plantas hospedeiras sadias. Em condições naturais ou de cultivo os viroides são transmitidos por contato foliar, enxertia e ferramentas de corte contaminadas (canivete, tesoura, etc.). O CSVd, assim como a grande maioria dos viroides, não é transmitido por insetos vetores, assim como sua transmissão via sementes verdadeiras

ainda não foi confirmada. Porém, o principal modo de sua disseminação, está relacionado ao trânsito internacional de material vegetativo propagativo, tanto de crisântemo como de outras espécies suscetíveis, sendo o homem o principal agente de dispersão (Bouwen & Van Zaayen, 2003). Como o controle do nanismo do crisântemo baseia-se em métodos preventivos, principalmente visando à desinfecção de ferramentas e por meio de legislações aplicadas nas barreiras fitossanitárias para evitar a entrada do patógeno nos sistemas de produção de mudas e matrizes, o incremento de sistemas eficientes de diagnóstico é fundamental para o desempenho produtivo e comercial da cultura. Portanto, os programas de indexação, com métodos que apresentem elevada especificidade e, principalmente, elevada sensibilidade são fundamentais para o sucesso na produção de mudas e plantas de crisântemo livres de viroides (Bouwen & Van Zaayen, 2003).

Resultados positivos também foram obtidos, para infecção viroidal, em amostras das variedades 'Venice – ARN' e 'Zembla – ARN(1)', coletadas em propriedade destinada ao cultivo de crisântemo localizada no município de Artur Nogueira (SP). Os RNA de folhas jovens de mudas com suspeita de infecção por viroides foram extraídos separadamente. Porém neste caso, foram utilizados como controle positivo e negativo, RNA purificados obtidos a partir de plantas diagnosticadas como positiva e negativa para a infecção pelo CSVd (Figura 12).

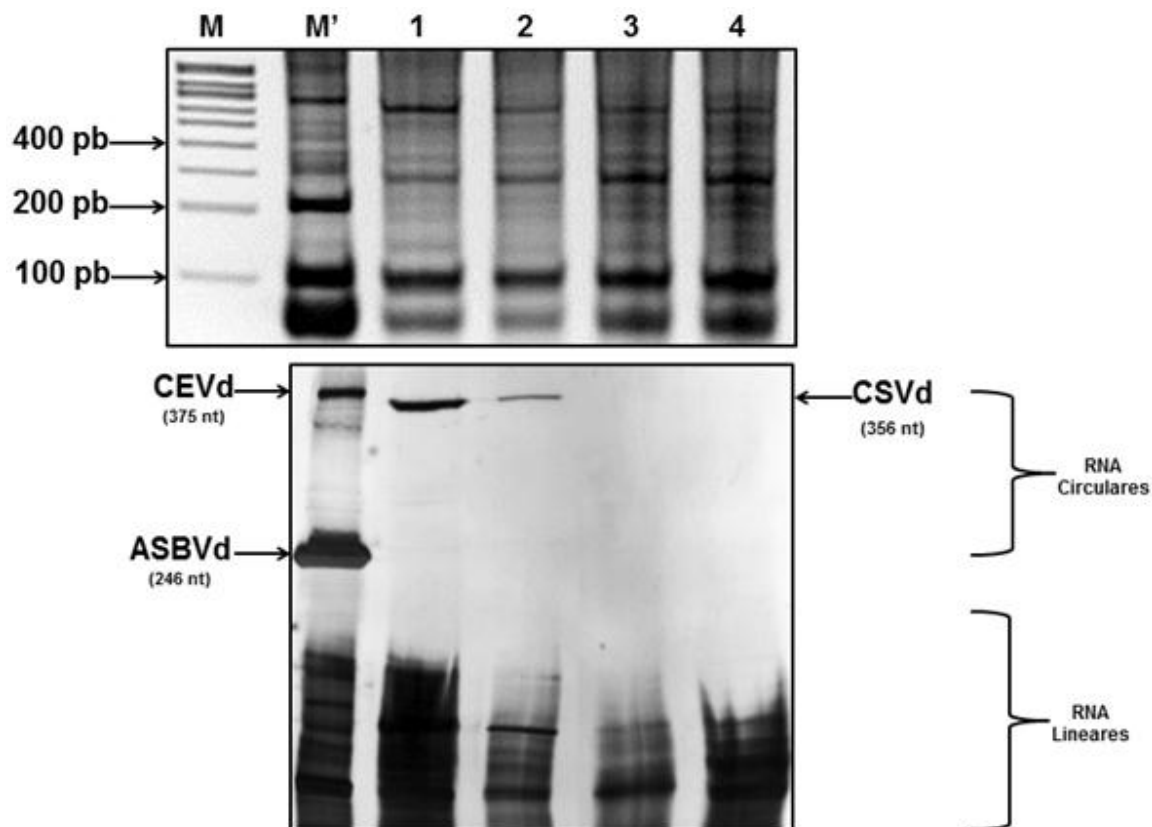


Fig. 11 – Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Cool Time' – ATB(1); 2= 'Sandra' – ATB(1); 3= 'Cool Time' – ATB(2); 4= 'Sandra' – ATB(2). Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.

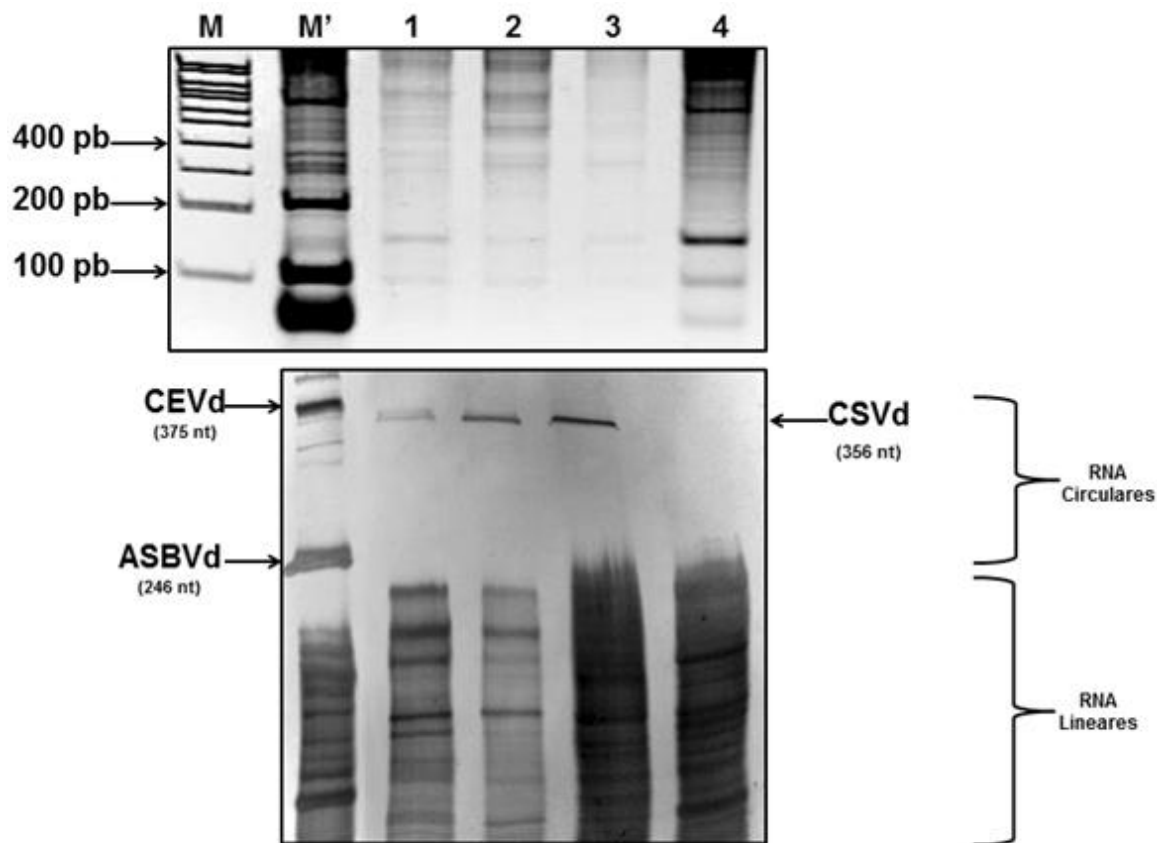


Fig. 12 – Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante. Amostras: M=100 bp DNA ladder;; M'=CEVd + ABSVd; 1= 'Venice' - ARN; 2= 'Zembla' – ARN(1); 3= controle (+); 4= controle (-). Observa-se, no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd.

4.1.2. RT-PCR

Os produtos de DNA, amplificados por meio de RT-PCR, foram avaliados em perfis eletroforéticos de géis de agarose, sendo considerados como resultados negativo ou positivo, respectivamente, a ausência ou presença de bandas com tamanho esperado em torno de 354-356 pb (em comparação aos marcadores moleculares de 100 a 400 pb). Há poucos relatos na literatura referentes à detecção do CSVd, utilizando-se *primers* específicos para amplificação via RT-PCR (Nakahara *et al.*, 1999; Matsushita & Penmetcha, 2009). Hosokawa *et al.* (2007) desenvolveram um sistema de RT-PCR multiplex para a detecção simultânea do CSVd e CChMVd, sugerindo uma redução nos custos e maior facilidade de implementação em sistemas de produção de mudas de crisântemo livres de viroides.

Durante as avaliações moleculares de amostras de crisântemo, realizadas neste trabalho, observou-se a amplificação de parte do genoma, de um viroide isolado de

crisântemo da variedade 'Puritan' – HOL (1), previamente submetido à sPAGE e considerado positivo, a partir da utilização de um par de *primers* descrito por Nakahara *et al.* (1999). Este par de *primers* permitiu a amplificação de um fragmento de aproximadamente 350 pares de bases, correspondente quase que a totalidade do genoma do CSVd (Figura 13). A partir desta amplificação procedeu-se a diluição da banda obtida na proporção de 1:10 do RNA, que foi utilizada na síntese do cDNA (1 µL de RNA total, 1 µL de RNA 1:10 e 3 µL de RNA 1:10). Este procedimento permitiu avaliar a sensibilidade e eficiência da RT-PCR com os *primers* recomendados para a detecção do CSVd. Observou-se que nas três concentrações avaliadas houve eficiência na amplificação do genoma viroidal via RT-PCR. Destes géis as bandas foram eluídas e encaminhadas para sequenciamento. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com outras 30 sequências de genomas do CSVd depositados no *GenBank* (dados não disponibilizados). Regiões com 100% de identidade entre todos os isolados foram selecionadas para se obter o desenho de três pares de *primers* que foram utilizados com a finalidade de amplificar o genoma completo do viroide alvo, ou seja, o CSVd.

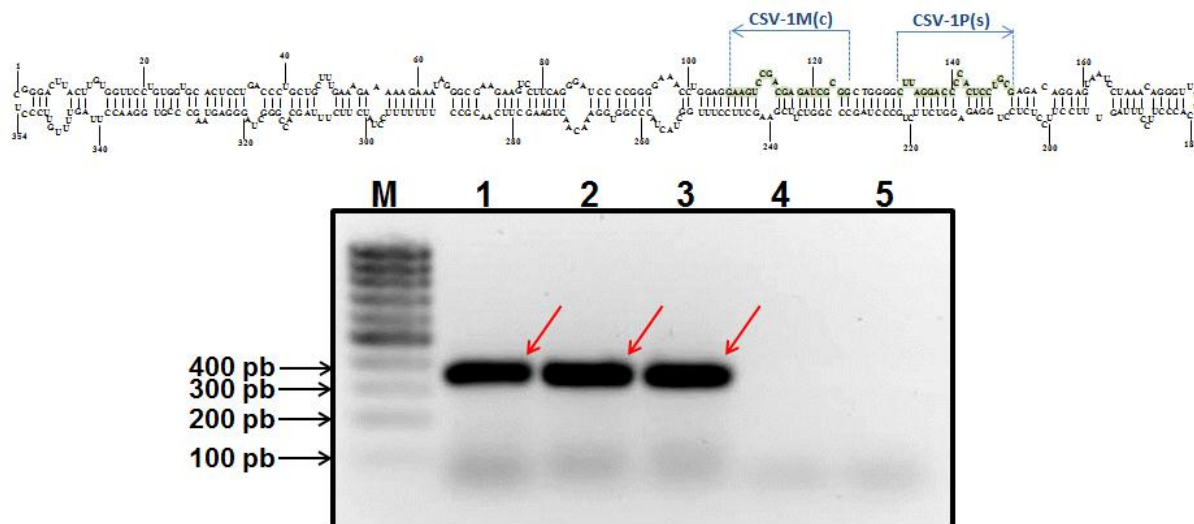


Fig. 13– Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd (Nakahara *et al.*, 1999.) a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo ('Puritan' – HOL (1)). M = 100 pb DNA ladder; 1 = 1,0 μ L (1:10); 2 = 3,0 μ L (1:10); 3 = 1 μ L; 4 = RT (-); 5 = PCR (-). As setas vermelhas correspondem aos fragmentos de DNA amplificados com tamanho esperado de cerca de 350pb. *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'

Dos seis isolados de viroides originários de diferentes variedades de crisântemo amostrados e que apresentaram bandas de mesma altura em sPAGE, cinco foram amplificados com o par de *primers* descritos por Nakahara *et al.* (1999), resultando na obtenção de quase a totalidade do genoma viroidal com amplificação de fragmentos de 349-351 pares de bases. Desta forma constatou-se que todos os isolados provenientes das variedades de crisântemo 'Pelle' – HOL (2), 'Puritan' – HOL (1), 'Cool Time' – ATB (1), 'Sandra' – ATB (1), 'Venice - ARN' e 'Zembla' – ARN (1), suspeita de infecção viroidal, por meio de avaliação visual de sintomas, estavam infectados pelo CSVd (Figura 14).

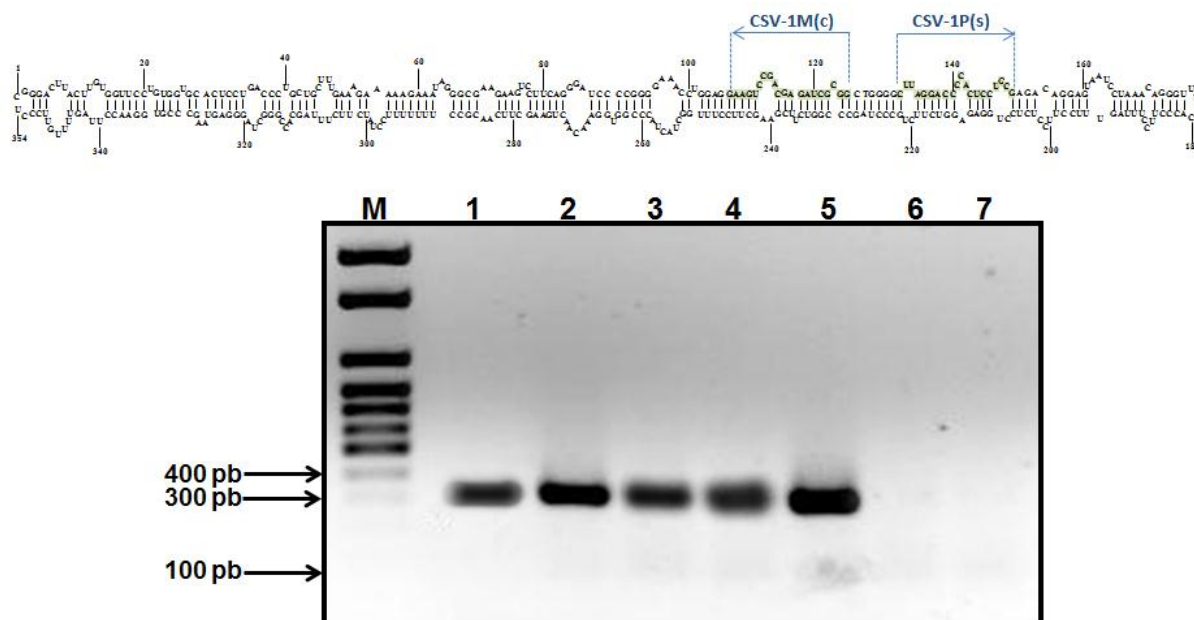


Fig. 14 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd (Nakahara *et al.*, 1999.) a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo. M = 100 pb DNA ladder; 1 = variedade Pelle' – HOL(2); 2 = 'Cool Time' – ATB(1); 3 = 'Sandra' – ATB(1); 4 = 'Venice - ARN'; 5 = 'Zembla' – ARN(1); 6= RT(-); 7= PCR(-). *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'

A partir dos *primers* desenhados foi possível a amplificação de uma pequena porção do genoma do CSVd com 111 pb, porção não complementada pelos *primers* descritos por Nakahara *et al.* (1999). Diante deste fato, o isolado do CSVd denominado "Puritan – HOL (1) - 2214", previamente analisado em sPAGE, teve seu genoma totalmente amplificado por RT-PCR (Figura 15).

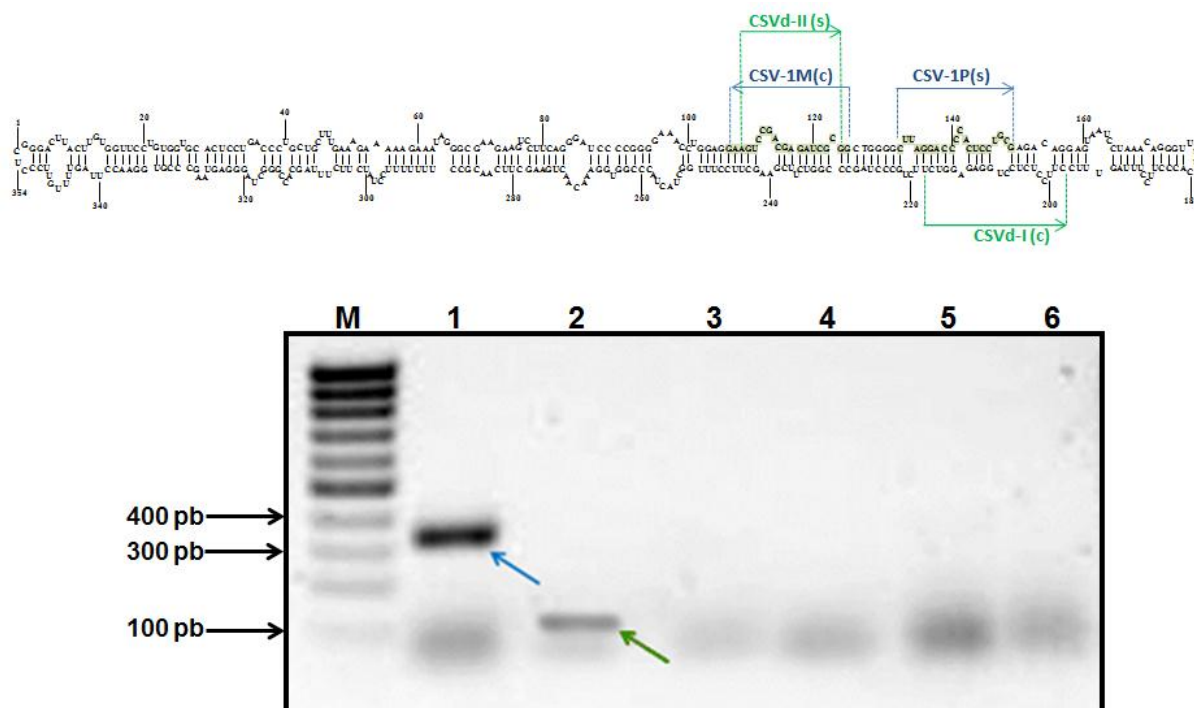


Fig. 15 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd (Nakahara *et al.*, 1999.) a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo. M = 100 pb DNA ladder; 1 = Puritan – HOL(1) - 2214 amplificado com *primers* descritos por Nakahara *et al.* (1999); 2 = Puritan – HOL(1) - 2214 ; 3 = RT1(-); 4 = PCR1(-); 5 = RT2(-); 6 = PCR2(-). *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’

Esta combinação de *primers* foi utilizada também para a amplificação dos isolados de crisântemo selecionados e de outros isolados adquiridos em outros municípios produtores de São Paulo. Destas análises foram observadas bandas de tamanho esperado (354-356 pb), resultantes das amplificações com o par de *primers* RF74_CSVd(c) e RF75_CSVd(s) (Figura 16 e 17). Os resultados correspondentes ao CSVd, foram obtidos para as amostras das variedades ‘Pelle’-HOL(2) e ‘Puritan’-HOL(1), provenientes do município de Holambra (Figura 16). Bandas de mesmo tamanho também foram observadas em isolados das variedades ‘Sandra’-ATB(1) e ‘Cool Time’-ATB(1), provenientes de produtores de vasos de crisântemo fixados no município de Atibaia (Figura 17).

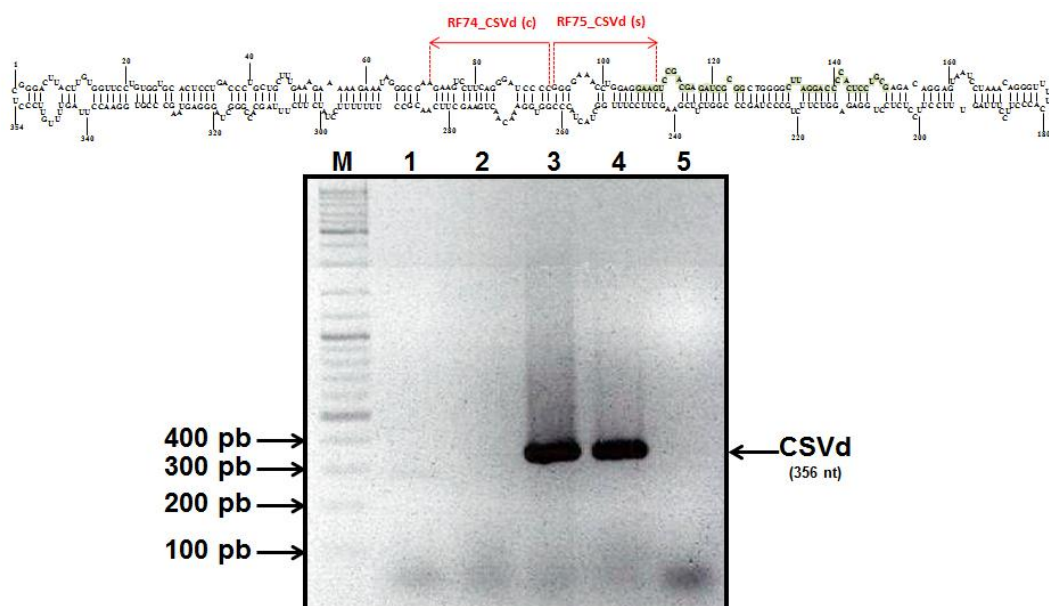


Fig. 16 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo e dália infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= ‘Dália’-ATB; 2= ‘Pelle’-HOL(1); 3= ‘Pelle’-HOL(2); 4= ‘Puritan’-HOL(1); 5= RT-PCR (-), *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’

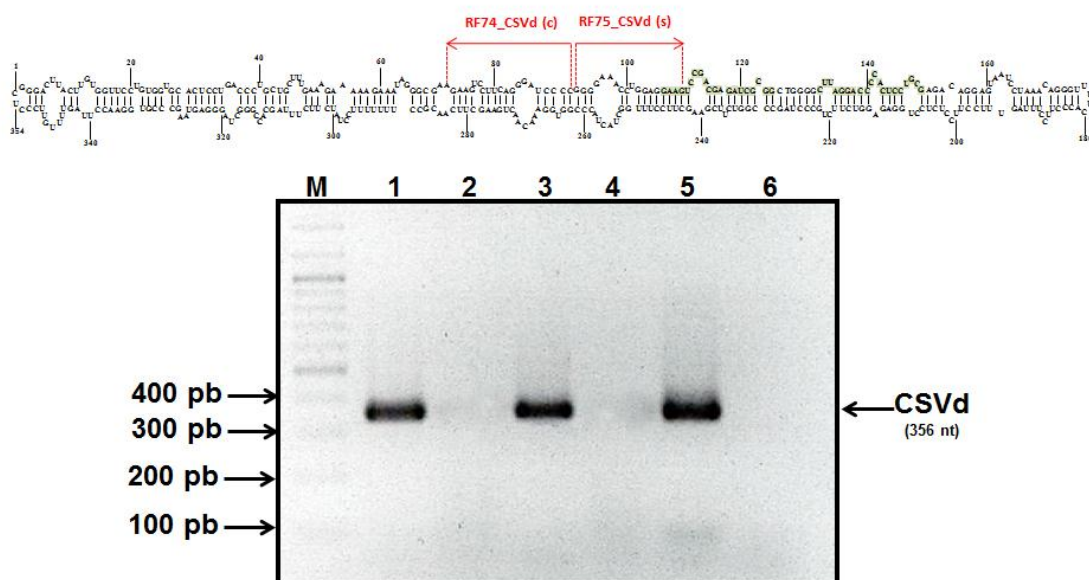


Fig. 17 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= ‘Sandra’-ATB(1); 2= ‘Cool Time’-ATB(2); 3= ‘Cool Time’-ATB(1); 4= ‘Sandra’-ATB(2); 5= ‘Sandra’-ATB(3); 6= RT-PCR (-), *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’

Quando foram analisados os isolados provenientes das variedades de crisântemo 'Cool Time'-ARN, 'Puritan'-ARN e 'Zembla'-ARN(1) obteve-se o mesmo padrão eletroforético observado para as análises realizadas a partir das amostras coletadas em Atibaia (SP) e Holambra (SP) (Figura 18).

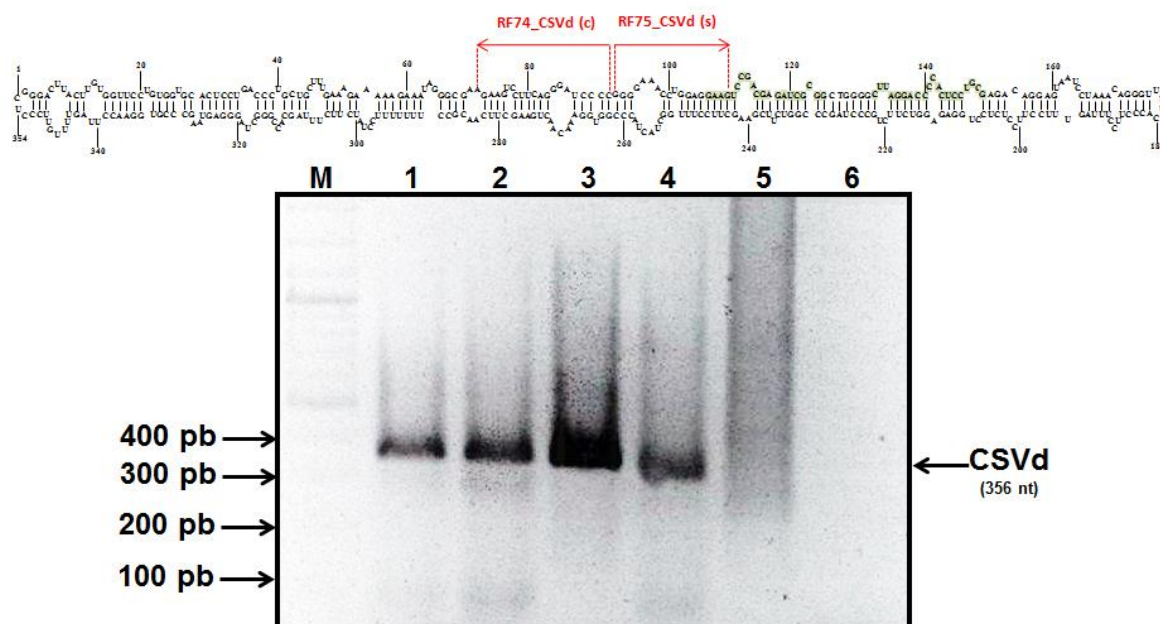


Fig. 18 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo infectadas e sadias. M = 100 pb DNA ladder; 1= 'Cool Time'-ARN; 2= 'Puritan'-ARN; 3= 'Zembla'-ARN(1); 4= 'Puritan'-ATB(2); 5= 'Kalazoo'-PAR; 6= RT-PCR(-),*(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'

Para os isolados de crisântemo da variedade 'Pelle'- ARN(1); 'Venice' –ARN e 'Pelle'- ARN(2), foram constatados resultados positivos da amplificação, via RT-PCR, do genoma do CSVd com bandas de tamanho esperado de 356 pb (Figura 19).

^[1]Nota: Algumas amostras incluídas no presente trabalho (indicadas por Consulta, C, ou Laudo, L) são oriundas de análises, prestação de serviço, realizadas pelos técnicos do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF) do Instituto Biológico.

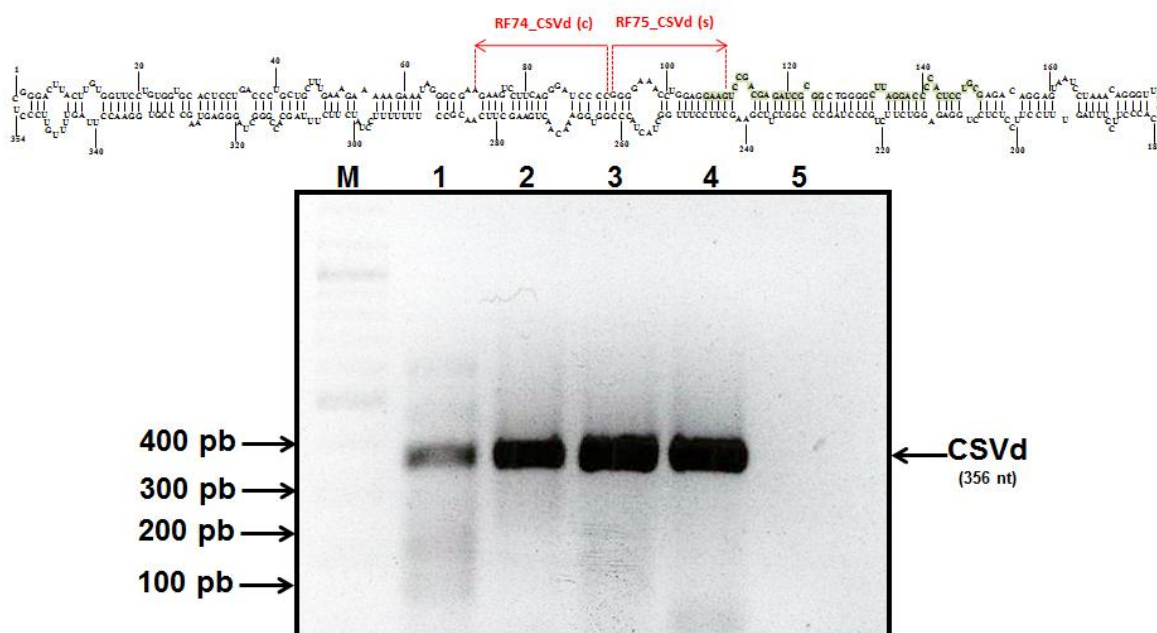


Fig. 19 – Análise do resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45 volts), em presença de brometo de etídeo e visualizado, sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de crisântemo. M = 100 pb DNA ladder; 1= Consulta/Laudo (1); 2= ‘Pelle’- ARN(1); 3= ‘Venice’ -ARN; 4= ‘Pelle’- ARN(2); 5= RT-PCR (-),*(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’.

4.1.3. Sequenciamento e análise das seqüências

Com a amplificação genômica do isolado ‘Puritan’-HOL(1) – 2214, por RT-PCR com os dois pares de *primers* específicos para o CSVd (Figura 15), procedeu-se a eluição do seus produtos em gel de agarose que foram, encaminhados para sequenciamento. A seqüência obtida foi alinhada com 30 seqüências de isolados do CSVd depositados no *GenBank* (dados não mostrados). O isolado brasileiro, depositado no *GenBank*, com o código JX909290 (Gobatto *et al.*, 2012a), apresentou uma porcentagem de identidade de nucleotídeos que variou de 95 a 100%, quando comparada às outras seqüências de CSVd depositadas no *GenBank*. Com o auxílio do programa mFold e RNAviz, obteve-se a estrutura secundária de mínima energia livre para o isolado brasileiro de CSVd, confirmando-se tratar de uma estrutura em forma de bastão, típica dos viroides da família *Pospiviroidae*. Quando comparada à estrutura secundária de mínima energia livre (mFold) do isolado ‘Puritan – HOL (1)’, com a primeira variante do CSVd descrita por Gross *et al.* (1982), observou-se que houve poucas modificações de resíduos na molécula de RNA. Na região correspondente ao motivo de patogenicidade (P), observou-se a substituição de uma

‘Adenina’ por uma ‘Uracila’ na posição 299 e a inserção de uma ‘Adenina’ na posição 64, enquanto que na região Central (C) observou-se uma substituição de uma ‘Adenina’ por uma ‘Uracila’ na posição 254. Vale ressaltar que as mutações observadas ocorreram em regiões da molécula não pareadas (*loops*), o que não afeta a estrutura secundária da molécula (Figura 20). Resultados semelhantes foram observados por Matsushita & Penmetcha (2009) ao inocularem, por meio de enxertia, isolados de CSVd em plantas de petúnia e batata. Os autores observaram que as mutações (inserções, deleções e trocas de bases) concentraram-se nas porções genômicas não pareadas.

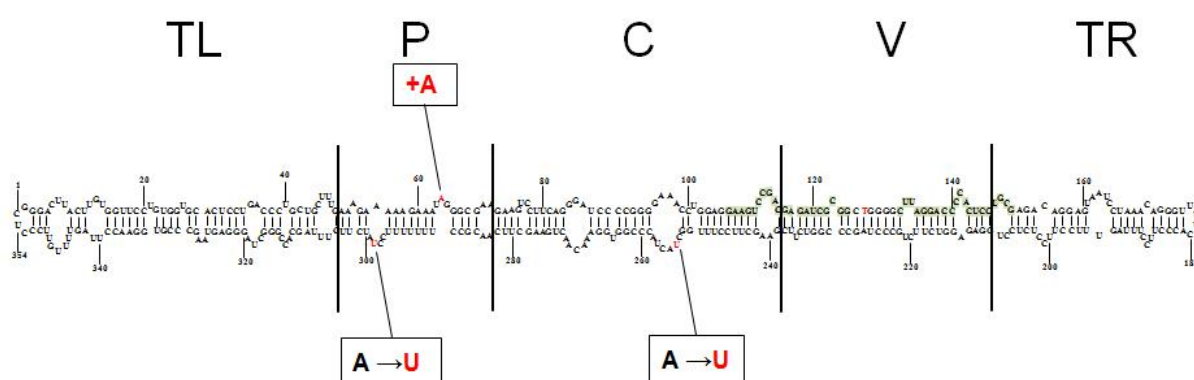


Fig. 20 – Estrutura secundária de mínima energia livre a 24 °C, obtida com os programas mFold e RNAviz, para o CSVd (isolado ‘Puritan’-HOL(1) - 2214), proveniente do município de Holambra, SP, com 354 nucleotídeos. As alterações de resíduos entre o isolado 2214 caracterizado neste trabalho (acesso *GenBank*: JX909290) e o CSVd sequenciado por Gross *et al.* (1982) (Cód *GenBank* M19506) estão indicadas em vermelho

4.2. Análise quantitativa por RT-qPCR em tempo real

Para a análise quantitativa (RT-qPCR) em tempo real foi utilizado o RNA purificado da amostra Puritan’-HOL(1) - 2214. Após a síntese das moléculas de cDNA, foi feita uma diluição seriada de até 1:100.000, em triplicata: 1:10 (“A”), 1:100 (“B”), 1:1000 (“C”), 1:10000 (“D”), 1:100000 (“E”) e controle negativo (-) (“F”). A eficiência de amplificação obtida foi de 102% o que significa que houve duplicação da quantidade de cópias de DNA a cada ciclo. Foi observada a amplificação até a maior diluição de cDNA (1:100000) (Figura 21). Resultados semelhantes em ensaios utilizando *real-time* RT-PCR foram demonstrados por Botermans *et al.* (2013) com elevada eficiência na detecção de diferentes viroides do gênero *Pospiviroid*, confirmando que esta técnica também se mostra adequado para análise de um grande número de amostras. Song *et al.* (2012) e Hajizadeh *et al.* (2012), utilizando multiplex-PCR para detectar simultaneamente vírus e viroides em crisântemo e videira,

obtiveram alta eficiência e sensibilidade, demonstrando que a técnica tem potencial para diagnóstico de rotina laboratorial.

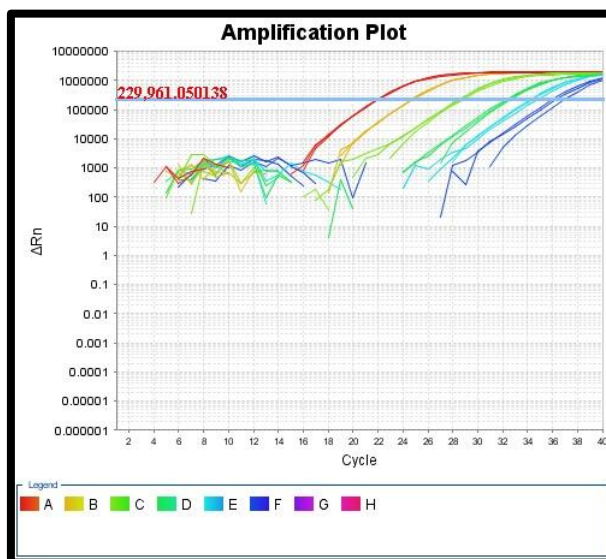


Fig. 21 – Curva de amplificação do RNA do CSVd ‘Puritan’-HOL(1) - 2214 com diluições seriadas. Onde: A=1:10; B=1:100; C=1:1000; D=1:10000; E=1:100000 e F= controle (-)

Com as curvas de desnaturação (*Melt*), pôde-se demonstrar que a amplificação para as diluições 1:10 (“A”), 1:100 (“B”), 1:1000 (“C”), 1:10000 (“D”), 1:100000 (“E”) confirmaram a especificidade das reações (Figura 22).

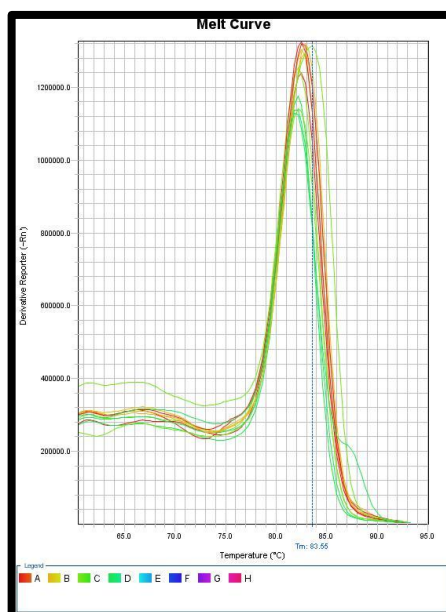


Fig. 22 – Curva de amplificação do RNA do CSVd do isolado ‘Puritan’-HOL(1) - 2214 com diluições seriadas. Onde: A=1:10; B=1:100; C=1:1000; D=1:10000; E=100000.

Comparando-se a curva de desnaturação (*Melt*), correspondente à diluição inicial de 1:10 (A) com a de 1:100000 (E), foi possível observar que mesmo com uma grande diluição, houve amplificação específica na amostra representada pela curva (E). Sendo assim, a RT-qPCR se mostrou sensível para a detecção do CSVd mesmo em baixas concentrações (Figura 23).

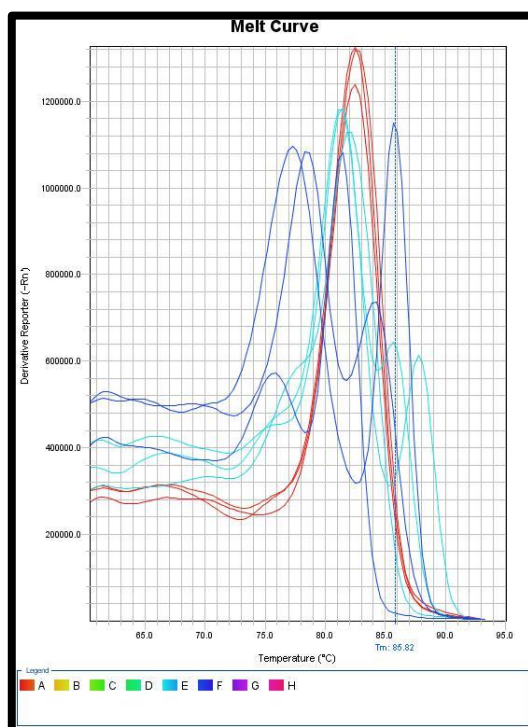


Fig. 23 – Curva de amplificação do RNA do CSVd ‘Puritan’-HOL(1) - 2214 com diluições seriadas onde, A=1:10; E=1:100000 e F=controle (-)

4.3. Clonagem

Os RNA purificados de folhas do isolado ‘Puritan’-HOL(1) – 2214, infectado pelo CSVd (previamente desidratadas em CaCl_2), foram utilizados como molde para as reações de RT-PCR. Foi observado, em gel de agarose, a amplificação de uma banda com tamanho aproximado de 350 pb, correspondente ao CSVd (Figura 24).

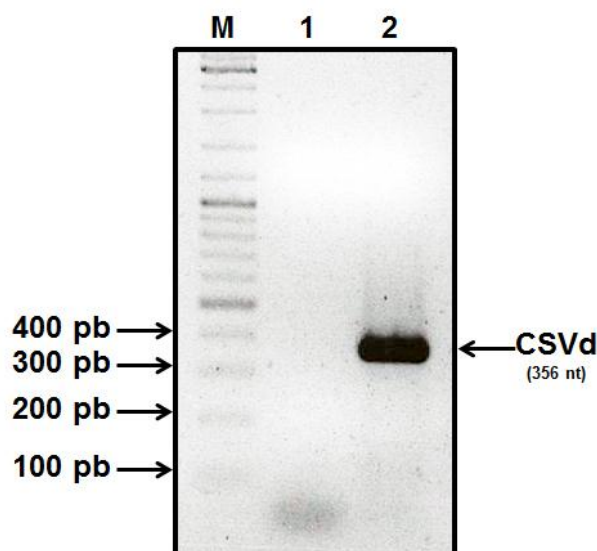


Fig. 24 – Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose (2%) em TAE 1x a 65volts por 75 min, em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com *primers* específicos para o CSVd a partir de RNA viroidal do isolado 2214 da variedade ‘Puritan’. M = 100 pb DNA ladder; 1= (-); 2= ‘Puritan’-HOL(1) – 2214

Após a eluição do gel, os produtos amplificados do isolado ‘Puritan’-HOL(1) – 2214 foram ligados em vetor pBSΔE [P8] e utilizados para transformar células competentes de *Escherichia coli* (DH5-α). Um total de 24 colônias de coloração branca foram selecionadas e submetidas, após crescimento em meio líquido, às minipreparações dos plasmídeos. Os insertos foram avaliados por meio de eletroforese. Constatando a presença de bandas dos insertos, sendo que, três delas apresentaram o dobro do tamanho esperado, cerca de 700 pb (Figura 25), provavelmente “dímeros” (poços 5, 15 e 20). Esses clones foram selecionados para serem sequenciados e posteriormente utilizados para a síntese das ribosondas.

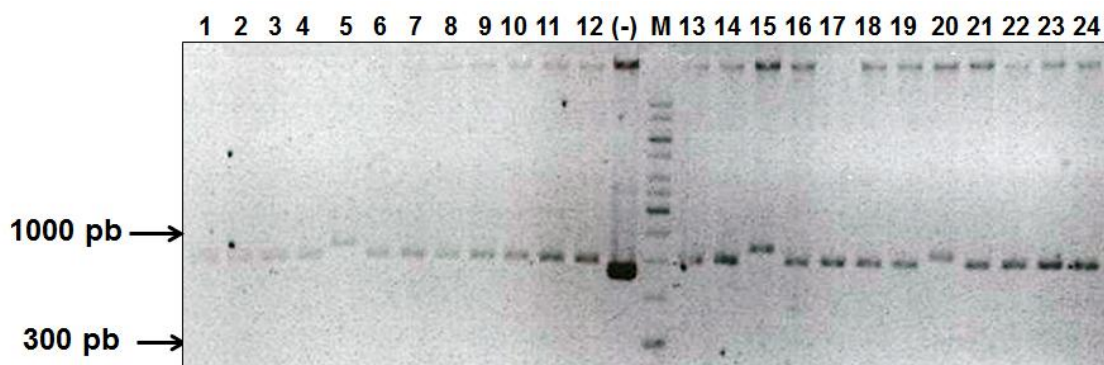


Fig. 25 – Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose 1% (TAE 1x a 75volts por 90 min), em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta, dos insertos (CSVd isolado 2214) liberados do plasmídeo pBSΔE[P8], após digestão com *Xba* I. M = 1kb DNA ladder

4.4. Hibridização Northern- e dot-blot

As técnicas de hibridização de ácidos nucleicos se baseiam na complementaridade entre a sequência a se detectar (alvo) e uma sequência complementar à sequência alvo, porém marcada, denominada de sonda. Essas técnicas têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes estratégias de diagnóstico de vírus e viroides apresentando elevada sensibilidade e especificidade (Eiras, 2012). A hibridização *dot-blot* foi a primeira técnica a ser desenvolvida para a hibridização de ácidos nucleicos. Os pioneiros que desenvolveram esta técnica foram Owens & Diener (1981), para o diagnóstico de viroides utilizando sondas marcadas com isótopos radioativos. Dois anos mais tarde, Maule *et al.* (1983) empregaram a mesma técnica para a detecção de vírus de plantas. A partir de então, uma série de trabalhos abordando diferentes estratégias para a detecção de vírus, viroides e outros patógenos por hibridização *dot-blot* foram publicados (Pallas *et al.* 1998).

Após o sequenciamento dos clones, dímeros do isolado 2214, selecionou-se a banda de número 5 para ser digerido com a enzima *Xba* I por 1 hora a 37°C. Submetendo-se esta amostra à eletroforese em gel de agarose (1%) foi observada uma banda com mais de 3000 pb, correspondente ao plasmídeo contendo o inserto, dímeros com cerca de 700 pb (Figura 26).

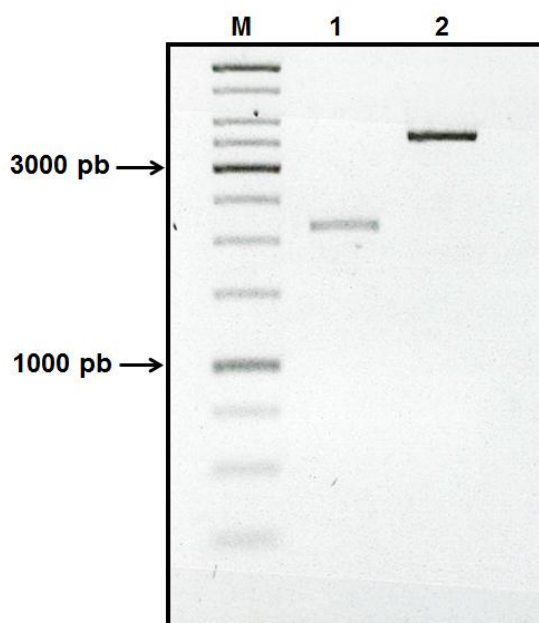


Fig. 26 – Análise do resultado da eletroforese em gel de Agarose (1%) em TAE 1x a 65volts por 75 min, em presença de brometo de etídeo, e visualizado sob luz ultravioleta onde M = 1kb DNA Ladder, 1= plasmídeo não linearizado 2= plasmídeo digerido com *Xba* I

Das 19 amostras submetidas à hibridização *Northern-blot* resultados positivos de hibridização, com a ribosonda marcada radioativamente, para os seguintes isolados: 'Puritan'-HOL(1) - 2214; 'Pelle'-HOL(2); 'Puritan'-ATB(1); 'Sandra'-ATB(1); 'Cool Time'-ATB(1); 'Sandra'-ATB(3); Cool Time'-ARN; 'Puritan'-ARN; 'Zembla'-ARN(1); 'Puritan'-ARN; Consulta/Laudo (1); 'Pelle'-ARN(1); 'Venice'-ARN e 'Pelle'-ARN(2) (Figura 27 e 28).

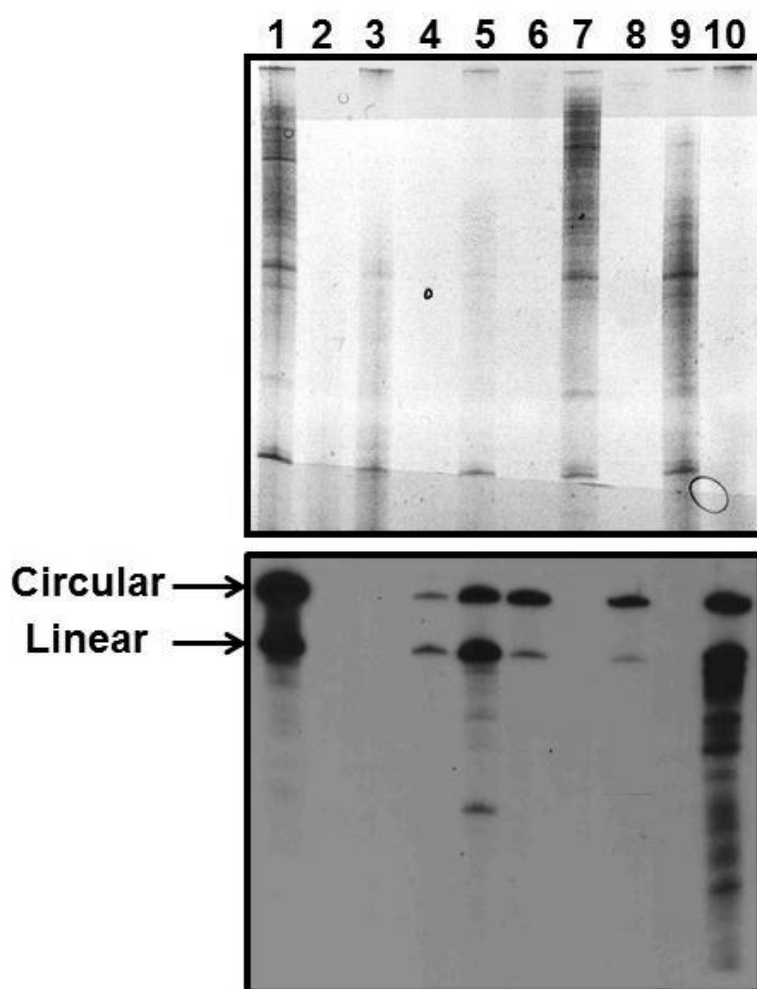


Fig. 27 – Análise do resultado da hibridização *Northern-blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das amostras: 1= 'Puritan'-HOL(1) - 2214; 2= 'Dália'-ATB; 3= 'Pelle'-HOL(1); 4= 'Pelle'-HOL(2); 5= 'Puritan'-ATB(1); 6= 'Sandra'-ATB(1); 7= 'Cool Time'-ATB(2); 8= 'Cool Time'-ATB(1); 9= 'Sandra'-ATB(2) e 10= 'Sandra'-ATB(3)

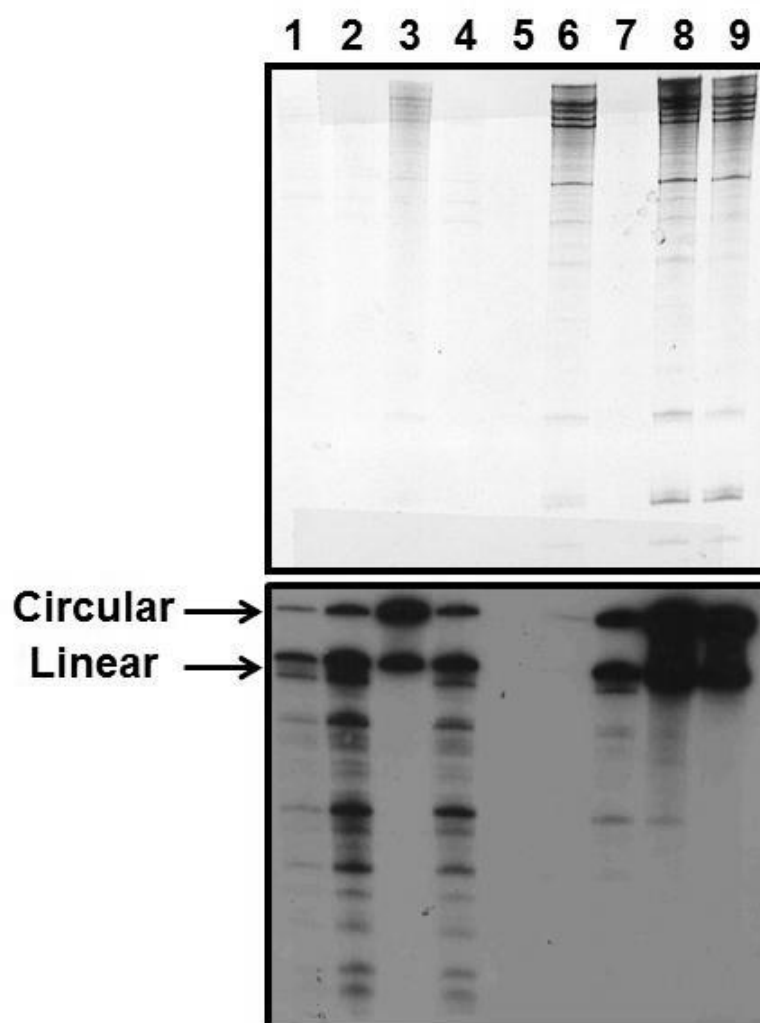


Fig. 28 – Análise do resultado da hibridização *Northern-Blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das amostras: 1= 'Cool Time'-ARN; 2= 'Puritan'-ARN (1); 3= 'Zembla'-ARN(1); 4= 'Puritan'-ATB (2); 5= 'Kalazoo'-PAR; 6= Consulta/Laudo (1); 7= 'Pelle'-ARN(1); 8= 'Venice'-ARN e 9= 'Pelle'-ARN(2)

Quando foi utilizada a técnica de dot-blot reafirmou-se a sua característica de ser extremamente sensível, permitindo a detecção dos isolados do CSVd em preparações de RNA diluídas em até 10.000 vezes, como pode ser observado para as variedades de crisântemo 'Venice'-ARN (Figura 29, 18D) e 'Pelle'-ARN(2) (Figura 29, 19D). Para a amostra de RNA da variedade 'Venice'-ARN, pode-se observar que a detecção foi possível até em uma diluição de 100.000 vezes, porém com um sinal de hibridização mais fraco (Figura 29, 18E). Para as demais amostras consideradas positivas, pôde-se detectar o RNA de polaridade positiva do CSVd em diluições de até no máximo 1.000 vezes (Figura 29), com exceção para a amostra de RNA da variedade 'Puritan'-HOL(1) - 2214 cujo o sinal de hibridização, apesar de fraco, foi visível a uma diluição de 10.000 vezes (Figura 29, 1D).

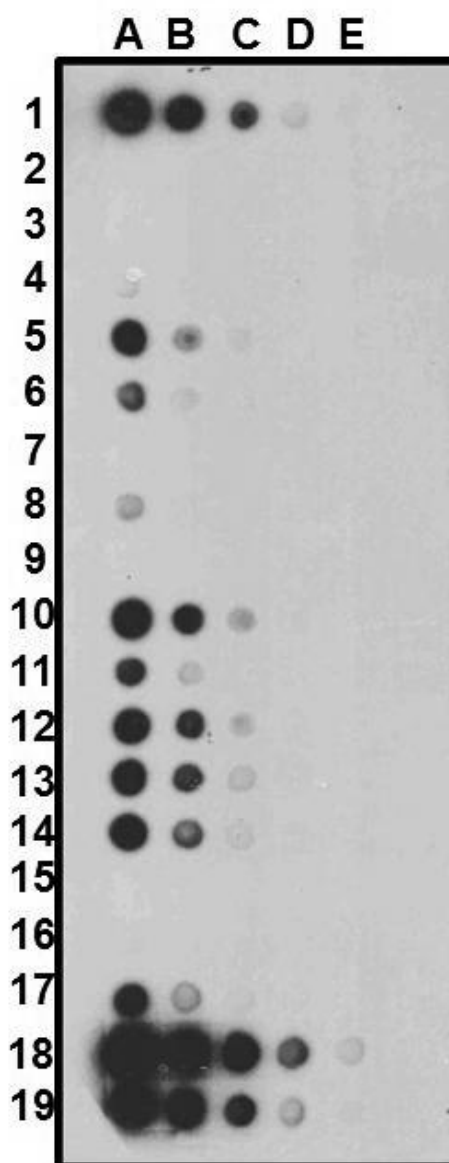


Fig. 29 – Análise do resultado da hibridização *dot-blot* utilizando uma ribosonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) das seguintes amostras: 1= 'Puritan'-HOL(1) - 2214; 2= 'Dália'-ATB; 3= 'Pelle'-HOL(1); 4= 'Pelle'-HOL(2); 5= 'Puritan'-ATB(1); 6= 'Sandra'-ATB(1); 7= 'Cool Time'-ATB(2); 8= 'Cool Time'-ATB(1); 9= 'Sandra'-ATB(2) e 10= 'Sandra'-ATB(3), 11= 'Cool Time'-ARN; 12= 'Puritan'-ARN(1); 13= 'Zembla'-ARN(1); 14= 'Puritan'-ARN(2); 15= 'Kalazoo'-PAR; 16= Consulta/Laudo (1); 17= 'Pelle'-ARN(1); 18= 'Venice'-ARN e 19= 'Pelle'-ARN(2), onde A=1/10; B=1/100; C=1/1000; D=1/10.000 e E=1/100.000

As mesmas diluições, utilizadas para o método de diagnóstico *dot-blot*, foram utilizadas para a hibridização *Northern-blot* utilizando o isolado 'Puritan'-HOL(1) – 2214, visando à detecção do CSVd com a ribosonda marcada radiotivamente. Constatou-se a elevada sensibilidade do teste, sendo possível detectar a presença do CSVd em diluições de até 10.000 vezes. Uma banda fraca, quase imperceptível, ainda pôde ser visualizada, indicando que em algumas situações a sensibilidade da técnica pode chegar a 100.000 vezes (Figura 30).

Diante dos resultados obtidos, o objetivo inicial do trabalho que visava desenvolver sondas não radioativas para aplicação no diagnóstico de rotina do CSVd por meio de *dot-blot* foi substituída pela técnica de RT-qPCR, que apresentou maior eficiência e sensibilidade. Porém, foi possível concluir que a sua utilização pode ser útil e muito interessante quando da necessidade de se analisar um grande número de amostras (Eiras, 2012; Pallas *et al.*, 2008).

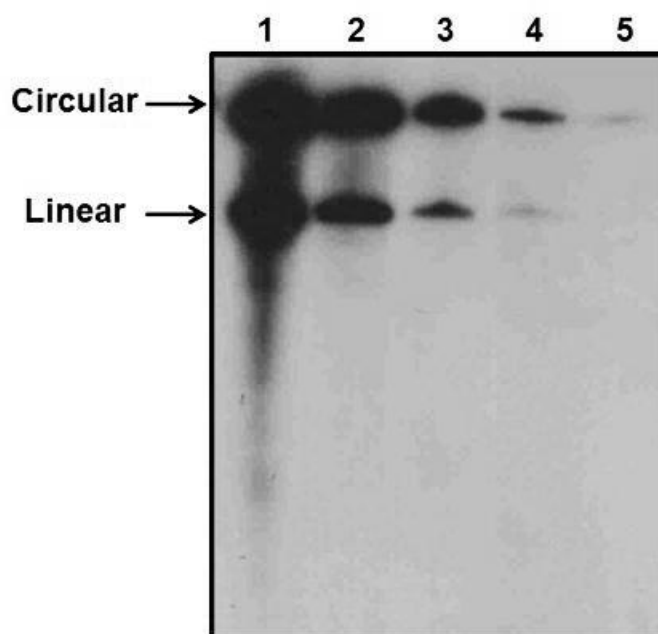


Fig. 30 – Análise do resultado de hibridização *Northern-blot* utilizando uma ribossonda de polaridade negativa (dímero do CSVd) a partir de RNA viroidal purificado da amostra 'Puritan'-HOL(1) - 2214 infectada pelo CSVd preparado em diferentes diluições: 1=1/10; 2=1/100; 3=1/1.000; 4=1/10.000 e 5=1/100.000

Comparando os diferentes métodos de diagnóstico desenvolvidos para o CSVd (Tabela 4), observou-se que ambos procedimentos apresentaram eficiência na detecção de RNA viroidal partindo de 1,0 g de material vegetal infectado. A RT-qPCR permitiu maior rapidez e sensibilidade quando comparada com os demais métodos avaliados, com potencial para a detecção da presença do CSVd em até 0,001 mg de tecido vegetal, o que correspondeu a uma diluição de RNA de 1/100.000. As técnicas de hibridização apresentaram elevada sensibilidade, chegando também à ordem de 100.000 vezes, porém, não foi regra. Recentemente, Torchetti *et al.* (2012) desenvolveram uma polissonda de RNA (denominada *POSPprobe*) para detecção por hibridização *dot-blot* de oito espécies de viroides do gênero *Pospiviroid*, incluindo o CSVd. Os autores demonstraram que a técnica apresentou elevada sensibilidade, sendo útil em programas de certificação e quarentena.

Dentre os métodos de diagnóstico utilizados na detecção do CSVd, sPAGE mostrou-se com menor especificidade e sensibilidade. Porém, apesar de ser um método laborioso (requer treinamento e experiência para manipulação e também para a interpretação dos resultados) e apresentar menor sensibilidade e especificidade, quando comparado aos métodos baseados em PCR e hibridização, é mais indicado por ser relativamente barato e bastante eficiente para o diagnóstico de viroides que se acumulam em concentrações elevadas nos tecidos vegetais, como é o caso do CSVd em crisântemo (Matsushita & Penmetcha, 2009). Além disso, sPAGE tem a vantagem de não requerer nenhuma informação sobre a sequência de nucleotídeos. Os resultados obtidos são lineares, sem a necessidade de ampliações exponenciais, o que muitas vezes pode gerar contaminações indesejadas e resultados falso-positivos (Eiras, 2012). Recentemente, Botermans *et al.* (2013) desenvolveram e validaram um sistema de diagnóstico por meio de RT-qPCR para a detecção de todas as espécies de viroides do gênero *Pospiviroid*, incluindo o CSVd. O método se mostrou sensível, sendo capaz de detectar RNA diluídos até 770 vezes. Além de ser extremamente específico, uma vez que não possibilita a detecção inespecífica de RNA de planta, vírus e outras espécies de viroides. Os autores demonstraram também que o sistema é reproduzível, rápido e robusto, o que o torna adequado também para sistemas de indexação e quarentena.

TABELA 4 – Comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico avaliados no presente trabalho quanto à sensibilidade para a detecção do CSVd

	Quantidade equivalente de tecido (mg)						
	1000	100	10	1	0,1	0,01	0,001
sPAGE*	x						
RT-PCR	x	x	x	x	x		
RT-qPCR	x	x	x	x	x	x	x
<i>Dot-blot</i>	x	x	x	x	x	x	
<i>Northern-blot</i>	x	x	x	x	x	x	
Diluições	10	1	1:10	1:100	1:1.000	1:10.000	1:100.000

*sPAGE corando os géis com nitrato de prata

4.5. Círculo de hospedeiros e avaliação da resistência

O isolado CSVd ['Puritan'-Hol(1) 2214], empregado nos experimentos de avaliação biológica, para obtenção do círculo de hospedeiros, reproduziu a lista de espécies suscetíveis ao CSVd apresentada por Horst & Nelson (1997). Folhas das espécies: zínia (*Zinnia elegans*), girassol dobrado (*Helianthus annuus*), dália (*Dahlia sp.*), gynura (*Gynura aurantiaca*), emília (*Emilia sp.*), cinerária (*Senecio cruentus*), tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Santa Cruz' e 'Rutgers', além de diferentes variedades de crisântemo, avaliadas em experimento conduzido em casa de vegetação na empresa Terra Viva, 'Puritan', 'Rage', 'Pelle', 'Cool Time', 'Fine Time' e 'Indianápolis', 30 dias após a inoculação mecânica, foram coletadas e mantidas a -20°C para as posteriores extrações de RNA. Observou-se que das quinze plantas de tomateiro 'Rutgers' inoculadas, somente cinco apresentaram sintomas de distorção foliar induzida pelo CSVd. Fato confirmado por meio de sPAGE e RT-PCR. O mesmo foi observado em plantas de dália, que apresentaram sintomas de distorção foliar. Porém, os resultados foram negativos em RT-PCR e sPAGE (Tabela 5, Figura 31). Todas as plantas de gynura inoculadas apresentaram sintomas severos de epinastia foliar, porém não foi possível a detecção do RNA viroidal por meio de sPAGE e RT-PCR, provavelmente devido à extração ineficiente de RNA. No caso das plantas de emília, houve a indução de sintomas em duas das cinco plantas inoculadas, porém a presença do CSVd não foi avaliada por sPAGE e RT-PCR. Vale ressaltar que esse resultado é muito importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que plantas do gênero *Emilia* encontram-se amplamente disseminadas no Brasil, principalmente nas regiões onde se cultiva crisântemo no estado de São Paulo, podendo atuar como reservatórios naturais do CSVd no campo. Portanto, faz-se necessário avaliar um grande número de plantas, devido ao fato desta espécie ser propagada a partir de sementes verdadeiras, o que promove uma grande variabilidade genética natural, que pode se traduzir em diferentes níveis de suscetibilidade a pragas e patógenos, incluindo o CSVd.

O isolado 'Puritan'-Hol(1) 2214 desenvolveu sintomas de mosaico leve com distorção foliar em dália, epinastia em gynura e distorção foliar em tomateiro 'Rutgers', confirmando a eficiência da transmissão mecânica do isolado CSVd brasileiro. Além disso, foi evidenciada a importância das plantas de tomateiro e dália também podem atuar como potenciais hospedeiras do CSVd no campo (Figura 31).

TABELA 5 – Avaliação por meio de sPAGE, RT-PCR e análise visual dos sintomas de diferentes espécies da família Asteraceae e Solanaceae inoculadas experimentalmente com o CSVd [isolado ‘Puritan’-Hol(1) 2214]*

Amostras	sPAGE	RT-PCR	Sintomas	Sintomas/ Inoculadas
<i>Dahlia</i> sp.	-	-	+	3/9
<i>Emilia</i> sp.	N	N	+	2/5
<i>Gynura aurantiaca</i>	-	-	+	4/4
<i>Helianthus annuus</i>	N	N	-	0/4
<i>Senecio cruentus</i>	N	N	-	0/4
<i>Solanum lycopersicum</i> Rutgers’	+	+	+	5/15
<i>S. lycopersicum</i> ‘Sta. Cruz’	N	N	-	0/4
<i>Zinnia elegans</i>	N	N	-	0/4

*Análises realizadas 30 dias após a inoculação
N = Testes não realizados

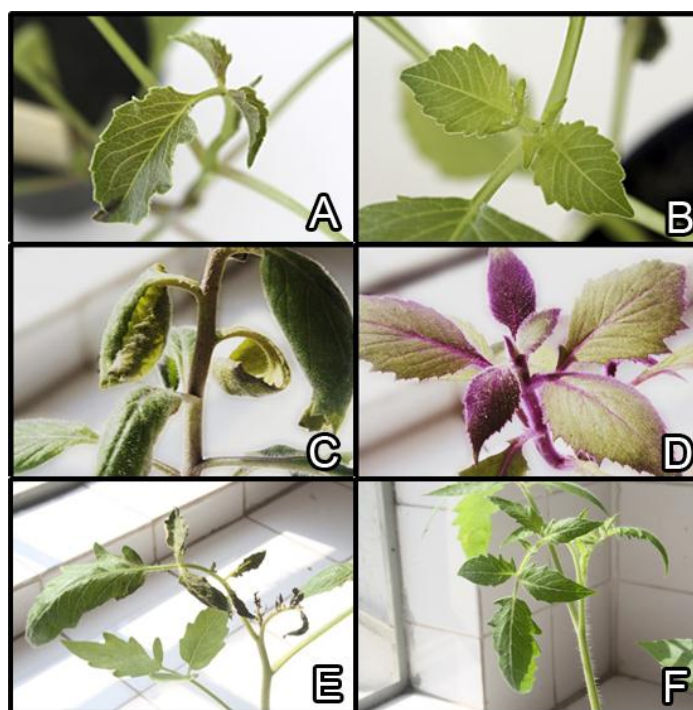


Fig. 31 – Sintomas observados em espécies de Asteraceae e Solanaceae desafiadas com o isolado ‘Puritan’-Hol(1) 2214: mosaico leve e distorção foliar em *Dahlia* spp. (A), epinastia em *Gynura aurantiaca* (C) e distorção foliar em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) ‘Rutgers’ (E) após a inoculação experimental com um isolado de CSVd. À direita (B, D, F) observam-se as plantas saudáveis (não inoculadas) das respectivas espécies. Fotos: Danielle Gobatto

O controle do “nanismo do crisântemo” em áreas de cultivo extensivo é extremamente difícil devido a uma série de fatores como: (i) facilidade de transmissão do CSVd; (ii) período latente extremamente longo; (iii) propagação vegetativa, que favorece a perpetuação de patógenos como vírus e viroides; (iv) limitada oferta de espécies de crisântemo que apresentam resistência natural. Avaliando a resistência e a tolerância de diferentes variedades de crisântemo, observou-se que não houve indução de sintomas visíveis nas variedades inoculadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Matsushita *et al.* (2012), que observaram, em um experimento realizado com diferentes variedades de crisântemo inoculadas, com um isolado de CSVd, a indução de sintomas aos 30, 60 e 210 dias após a inoculação. Os sintomas surgiram em variedades suscetíveis somente a partir de 60 dias após a inoculação, sendo a infecção pelo CSVd confirmada por meio de RT-PCR.

Resultados semelhantes foram observados no trabalho desenvolvidos por Matsushita & Penmetcha (2009), que inocularam um isolado japonês de CSVd de crisântemo, em *Ageratum houstonianum* e *Solanum lycopersicum*. Estes mesmos autores observaram que poder infectivo do CSVd variou de acordo com a espécie e o estágio de desenvolvimento da planta. Esse resultado pode ser comparado com os resultados apresentados na Tabela 5, uma vez que as amostras foram avaliadas 30 dias após a inoculação. Matsushita & Penmetcha (2009) ainda demonstraram que plantas de petúnia e batata expressaram sintomas típicos da infecção pelo CSVd quando foram enxertadas com material vegetativo proveniente de tomateiros infectados, após um ano de enxertia. Esse resultado pode ser comparado com os representados na Tabela 5 onde, espécies da família Asteraceae e Solanaceae inoculadas com o isolado padrão do CSVd, não apresentaram sintomas, podendo estar infectadas. Matsushita & Penmetcha (2009) sugeriram também que as plantas da família Solanaceae podem servir como um reservatório natural, auxiliando na disseminação do CSVd para uma grande variedade de espécies de plantas.

Com relação às coletas das variedades de crisântemo realizadas em diferentes municípios produtores do estado de São Paulo, o CSVd foi detectado por meio de sPAGE, *dot-blot* e RT-PCR com *primers* específicos (Nakahara *et al.*, 1999), nas seguintes amostras: ‘Sandra’, ‘Cool Time’, ‘Puritan’ e ‘Zembla’ provenientes de Artur Nogueira (ARN); ‘Sandra’, ‘Cool Time’ e ‘Puritan’ provenientes de Atibaia (ATB); ‘Pelle’ e ‘Puritan’ provenientes de Holambra (HOL). Das amostras de crisântemo analisadas no presente trabalho, foi observado que dentre aquelas identificadas como suspeita inicial de infecção por viroides por meio da observação de sintomas de sintoma como quebra de coloração nas pétalas ou nanismo foram positivas por sPAGE, *dot-blot* e RT-PCR (Tabela 6). Apenas para a amostra de dália, proveniente do município de Atibaia, o resultado de RT-PCR foi negativo, enquanto observou-se uma banda característica de RNA circular em sPAGE. Porém, como a banda

de RNA circular da amostra de dália apresentou um tamanho ligeiramente menor ao esperado para o CSVd (dados não mostrados), é possível sugerir que esta amostra possa estar infectada por outro viroide.

TABELA 6 – Avaliação da presença do CSVd em diferentes variedades de crisântemo e uma amostra de dália por meio de diferentes métodos de diagnóstico: sPAGE, RT-PCR e *dot-blot*

Local de coleta	Amostra (sigla)	sPAGE	RT-PCR	<i>Dot-blot</i>
Artur Nogueira	'Sandra'-ARN	+	+	N
Artur Nogueira	'Cool Time'-ARN*	+	+	+
Artur Nogueira	'Puritan'-ARN (1)*	+	+	+
Artur Nogueira	'Puritan'-ARN (2)	+	+	+
Artur Nogueira	'Zembla'-ARN (1)*	+	+	+
Artur Nogueira	'Zembla'-ARN (2)	-	-	N
Artur Nogueira	'Anastasia'-ARN	-	-	N
Artur Nogueira	'Venice'-ARN*	+	+	+
Artur Nogueira	'Pelle'-ARN (1)*	+	+	+
Artur Nogueira	'Pelle'-ARN (2)	+	+	+
Atibaia	Dália-ATB*	+	-	-
Atibaia	'Sandra'-ATB (1)	+	+	+
Atibaia	'Sandra'-ATB (2)	-	-	-
Atibaia	'Sandra'-ATB (3)	+	+	+
Atibaia	'Cool Time'-ATB(1)	+	+	+
Atibaia	'Cool Time'-ATB(2)	-	-	-
Atibaia	'Cool Time'-ATB(3)	+	+	N
Atibaia	'Splash Meadow'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Breeze Purple Due'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Breeze Yellow'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Breeze Velvet'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Splash Sweety'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Pom pom'-ATB	-	-	N
Atibaia	'Puritan'-ATB(1)	+	+	+
Atibaia	'Puritan'-ATB(2)	+	+	+
Holambra	'Puritan'-HOL(1) – 2214*	+	+	+
Holambra	'Puritan'-HOL(2)	+	+	N
Holambra	'Pelle'-HOL(1)*	-	-	-
Holambra	'Pelle'-HOL(2)	+	+	+
Paranapanema	'Kalazoo'-PAR	-	-	-
Consulta/Laudo	1**	-	-	N
Consulta/Laudo	2**	+	+	N
Consulta/Laudo	3**	+	+	+
Consulta/Laudo	4**	-	-	N

*Plantas sintomáticas

**Indexação e/ou certificação fitossanitária de amostras (mudas ou matrizes) de crisântemo destinadas à exportação, realizada pelo serviço de diagnóstico fitossanitário do Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia (LFF), Instituto Biológico, São Paulo.

+ = resultado positivo

- = resultado negativo

N = análise não realizada

Com relação à avaliação da resistência e/ou tolerância, das variedades comerciais de crisântemo desafiadas ('Puritan', 'Rage', 'Pelle', 'Cool Time', 'Fine Time' e 'Indianápolis'), as variedades de crisântemo avaliadas foram suscetíveis ao isolado do CSVd 'Puritan'-Hol(1) 2214. Estes resultados foram confirmados por RT-PCR, em análises realizadas a partir de folhas jovens coletadas 120 dias após inoculações (Tabela 7). As plantas não apresentaram sintomas durante o período avaliado, confirmando o risco constante da comercialização de mudas e matrizes sem a devida certificação fitossanitária.

Matsushita *et al.* (2012), analisando um grande número de variedades de crisântemo, observaram que o cruzamento de plantas suscetíveis com plantas resistentes, o fator resistência tende a ser hereditário, indicando a probabilidade de obtenção de variedades resistentes por melhoramento genético convencional, alternativa para o controle do CSVd.

TABELA 7 – Avaliação da resistência e/ou tolerância de variedades de crisântemo ao CSVd, 120 dias após a inoculação com o CSVd isolado 'Puritan'-Hol(1) 2214, por meio de análise visual dos sintomas e RT-PCR

Variedade	Sintomas	RT-PCR*
'Puritan'	-	+ (6/6)
'Rage'	-	+ (6/6)
'Pelle'	-	+ (6/6)
'Cool Time'	-	+ (6/6)
'Fine Time'	-	+ (6/6)
'Indianápolis'	-	+ (5/6)

*Número de plantas infectadas (positivas em RT-PCR) sobre o número de plantas inoculadas

As moléculas de RNA do CSVd, além de extremamente estáveis, são facilmente transmitidas por inoculação mecânica, por contato foliar, enxertia e ferramentas de corte. Além disso, o crisântemo é propagado vegetativamente, o que facilita o acúmulo e disseminação de viroides. Portanto, o principal modo de dispersão desses patógenos está relacionado ao intercâmbio de material vegetal, sendo o homem e suas práticas agrícolas, os agentes responsáveis pela manutenção e dispersão da doença no campo, que frequentemente ultrapassa fronteiras internacionais (Bouwen & Van Zaayen, 2003).

As medidas básicas que visam ao controle do CSVd se baseiam na implantação de métodos preventivos, principalmente aqueles que minimizam a entrada e disseminação do viroide nos sistemas de cultivo, seja para produção de mudas ou de flores de vaso ou de corte. Nesse sentido, a desinfecção de ferramentas é uma das medidas importantes, pois evita a entrada e/ou a disseminação do patógeno, principalmente nos sistemas de produção de mudas e matrizes (Bouwen & Van Zaayen, 2003). Porém, durante as visitas realizadas às empresas produtoras de mudas, constatou-se que não há uma grande preocupação com

o controle do CSVd, pois dentre as práticas agrícolas realizadas, como a desbrota, não é realizada a devida descontaminação ou troca dos instrumentos de corte utilizados. Algumas empresas que produzem mudas de crisântemo contam com os funcionários denominados de pragueiros, que são treinados para identificar plantas suspeitas de infecção pelo CSVd. Esses profissionais, ao identificarem uma planta suspeita, imediatamente a eliminam do sistema de produção, minimizando ou impedindo a disseminação do patógeno. Porém, por mais eficiente que sejam esses profissionais, o diagnóstico visual não tem a mesma eficiência quando comparado a sistemas efetivos de indexação por técnicas moleculares.

Programas de indexação, empregando métodos moleculares, com elevada especificidade e sensibilidade, são fundamentais para o sucesso na produção de mudas e comercialização de plantas de crisântemo livres de viroides (OEPP/EPPO, 1990). Os resultados obtidos no presente trabalho, principalmente com o estabelecimento de um sistema de RT-qPCR para a detecção do CSVd com elevada sensibilidade, pode fortalecer os sistemas de indexação empregados pelos laboratórios que trabalham com diagnóstico e nos programas quarentenários e de certificação fitossanitária. Aliar a prática dos pragueiros na identificação visual de plantas suspeitas com métodos moleculares de diagnóstico com elevada sensibilidade, como a RT-qPCR, poderá incrementar sobremaneira os sistemas de diagnóstico preventivo, com a eliminação prévia de plantas infectadas.

A maioria dos viroides, incluindo o CSVd, replicam-se com maior eficiência em condições de temperaturas elevadas. Além disso, plantas de clima temperado, cultivadas em condições tropicais também podem se tornar hospedeiras de novos viroides (Singh, 1983). O Brasil apresenta potencial e condições climáticas para abrigar uma grande diversidade genética desses patógenos, principalmente com a recente introdução de cultivos de crisântemo na região Nordeste. O levantamento realizado no presente trabalho restringiu-se aos cultivos de crisântemo em municípios do estado de São Paulo. Além disso, somente um isolado do CSVd foi totalmente sequenciado, permanecendo, ainda assim, alguns questionamentos sobre o conhecimento da variabilidade genética dessa espécie de viroide no Brasil. Recentemente, Yoon & Palukaitis (2013) avaliaram a composição e variabilidade genética de variantes de sequência do CSVd de 16 países e verificaram que há pouca variabilidade genética entre isolados de um mesmo país. Eles verificaram também que há variabilidade distribuída aleatoriamente ao longo do genoma, sem haver concentração de mutações em regiões específicas da molécula como costuma ocorrer em outras espécies de viroides (Yoon *et al.*, 2012). Portanto, levantamentos da ocorrência e análise da diversidade genética do CSVd, e de outras espécies de viroides, nos cultivos de crisântemo nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, principalmente nos Estados em que o cultivo de ornamentais vem crescendo nos últimos anos, como é o caso do Ceará, poderão fornecer o panorama nacional do *status* desses minúsculos, mas desafiadores fitopatógenos.

Na Europa, o CSVd é considerado praga quarentenária A2 (Bouwen & Van Zaayen, 2003; OEPP/EPPO, 1990). De acordo com o levantamento realizado no presente trabalho, o CSVd encontra-se disseminado nos cultivos de crisântemo no estado de São Paulo e provavelmente está presente em cultivos de crisântemo em outros estados da federação. Como ainda não houve relatos desse patógeno em outras plantas hospedeiras comerciais, tais como tomateiro e batatinha, esse patógeno deve estar, de certa forma, restrito aos cultivos de crisântemo, o que devido à sua grande importância pelas perdas econômicas que causa nessa cultura, o enquadraria como uma potencial praga quarentenária A2.

5. Conclusões

O levantamento indicou que o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), praga quarentenária A2 na Europa, encontra-se amplamente disseminado nos cultivos de crisântemo no estado de São Paulo. Com estes resultados, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento deverá ser notificado para a inclusão do CSVd na lista de pragas quarentenárias A2 do Brasil. Somente o CSVd foi identificado.

O sequenciamento do genoma do isolado do CSVd, 'Puritan'-Hol(1) 2214 (*GenBank*: JX909290), revelou elevada identidade de nucleotídeos quando comparado com outros isolados de CSVd depositados no *GenBank*.

Todas as variedades de crisântemo foram suscetíveis ao CSVd, mesmo não apresentando sintomas, evidenciando o constante risco na comercialização de mudas e matrizes sem a devida certificação fitossanitária.

Plantas de *Emilia sp.* foram infectadas pelo CSVd. Esse resultado, mesmo que não tenha sido confirmado por sPAGE e RT-PCR, é muito importante do ponto de vista epidemiológico, uma vez que plantas do gênero *Emilia* podem atuar como reservatório do CSVd e encontram-se amplamente disseminadas no Brasil, principalmente nas regiões onde se cultiva crisântemo no estado de São Paulo.

Das técnicas moleculares empregadas, a eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE) se mostrou eficiente para o diagnóstico do CSVd, apesar de ser trabalhosa e requerer treinamento para a interpretação dos resultados. sPAGE tem a vantagem de não requerer informação sobre a sequência de nucleotídeos e apresentar resultados lineares, sem ampliações exponenciais. Porém, sua utilização como método de diagnóstico de rotina é limitada a poucas amostras.

As técnicas de hibridização *dot-* e *Northern-blot* e RT-qPCR apresentaram maior eficiência na detecção do CSVd quando comparado ao sPAGE detectando o CSVd em preparações de RNA diluídas 100.000 vezes.

Esta é a primeira caracterização do CSVd no Brasil, confirmando sua forte presença nos cultivos de crisântemo no estado de São Paulo, o que reforça a necessidade de monitoramento constante da produção, indexação e certificação fitossanitária para controle do trânsito de crisântemo tanto para exportação como importação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2013. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2013. 480p.

ARRUDA, S.T.; MATSUNAGA, M.; VALERO NETO, J. Sistema de cultivo e custos de produção do crisântemo de vaso: um estudo de caso. **Informações Econômicas**, v.26, p.31-38, 1996.

ARRUDA, S.T.; MATSUNAGA, M.; GRAZIANO, T.T.; MATTHES, L.A.F. **Cadeia produtiva de flores e plantas ornamentais do Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1997. 18p.

BARTOLINI, I.; SALAZAR, L.F. Viroids in South America. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Ed.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p.265-267.

BATISTA, M.F.; MARINHO, V.L.; FONSECA, M.E.N. Detection methods for pests in plant germplasm introduced into Brazil for research purposes. **EPPO Bulletin**, v.25, p.411-417, 1995.

BOTERMANS, M.; VAN DE VOSSENBERG, B.T.; VERHOEVEN, J.T.; ROENHORST, J.W.; HOOFTMAN, M.; DEKTER, R.; MEEKES, E.T. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. **Journal of Virological Methods**, v. 187, p. 43-50, 2013.

BOUWEN, I.; VAN ZAAZEN, A. *Chrysanthemum stunt viroid*. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p. 218-223.

BRIERLEY, P.; SMITH, F.F. Chrysanthemum stunt. Control measures affective against virus in florists' crops. **Florists' Review**, v.107, p.27-30, 1951.

DE RIJK, P.; WATCHER, R. RNA Viz, a program for the visualization of RNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4679-4684, 1997.

DIENER, T.O. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exit in extracts or in situ. **Virology**, v.43, p.75-89, 1971a.

DIENER, T.O. Potato spindle tuber 'virus'. IV. A replicating, low molecular weight RNA. **Virology**, v.45, p.411-428, 1971b.

DIENER, T.O.; LAWSON, R.H. Chrysanthemum stunt: a viroid disease. **Virology**, v.51, p.94-101, 1973.

DIENER, T.O.; RAYMER, W.B. Potato spindle tuber 'virus': a plant virus with a properties of a free nucleic acid. **Science**, v. 158, p. 378-381, 1967.

DIMOCK, A.W.; GEISSINGER, C.M. A newly recognized disease of chrysanthemum caused by a graft-transmissible agent. **Phytopathology**, v.59, p.1024, 1969.

DIMOCK, A.W.; GEISSINGER, C.M.; HORST, R.K. Chlorotic mottle: A newly recognized disease on chrysanthemum. **Phytopathology**, v.61, p.415-419, 1971.

DING, B. Viroids: Small Probes for Exploring the Vast Universe of RNA Trafficking in Plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, p. 28–39, 2010.

DING, B. The Biology of Viroid-Host Interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v.47, p.105-131, 2009.

DUARTE, L. M. L.; RIVAS, E. B.; ALEXANDRE, M. A. V.; ÁVILA, T.; NAGATA, T.; CHAGAS, C. M. Chrysanthemum Stem Necrosis Caused by a Possible Novel Tospovirus. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 569-571, 1995.

DUSI, A.N.; FONSECA, M.E.N.; DE ÁVILA, A.C. Occurrence of a viroid in chrysanthemum in Brazil. **Plant Pathology**, v.39, p.636-637, 1990.

EIRAS, M.; DARÒS, J.A.; FLORES, R.; KITAJIMA, E.W. Viroides e vírusóides: relíquias do mundo de RNA. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.229-246, 2006a.

EIRAS, M.; SILVA, S.R.; STUCHI, E.S.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A. Viroides em citros. **Tropical Plant Pathology**, v.34, p.275-296, 2009.

EIRAS, M.; NOHALES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; FLORES, R.; DARÓS, J.A. Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind *in vitro* specifically *Potato spindle tuber viroid* RNA. **Archives of Virology**, v.156, p.529-533, 2011.

EIRAS, M. Viroides. In: EIRAS, M. & GALETTI R.S. (Eds.). **Técnicas de Diagnóstico de Fitopatógenos**, São Paulo: Devir Livraria. p.137-154. 2012.

FARIA, M. F.; SAAD, J.C.C.; VILLAS BÔAS, R.L. Manejo da irrigação na cultura do crisântemo em vaso, cultivar rage, cultivado em ambiente protegido. **Engenharia Agrícola**, v.24, p.51-56, 2004.

FLORES, R.; DURAN-VILA, N.; PALLÁS, V.; SEMANCIK, J.S. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines. **Journal of General Virology**, v.66, p.2095-2102, 1985.

FLORES, R.; DE LA PEÑA, M.; NAVARRO, J.A. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p.224-227.

FLORES, R.; HERNANDEZ, C.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; DARÓS, J.A.; DI SERIO, F. Viroids and viroid-host interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, p.117-139, 2005a.

FLORES, R.; RANGLES, J.W.; OWENS, R.A.; BAR-JOSEPH, M.; DIENER, T.O. Viroidae. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER U.; BALL, A.L. (Eds.) **Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier/Academic Press, p.1145-1159, 2005b.

FLORES, R.; OWENS, R.A. Viroids. In: MAHY, B.W.J.; VAN REGENMORTEL (Eds.) **Encyclopedia of Virology**. Oxford: Elsevier, p.332-342, 2008.

GAGO, S.; ELENA, S.F.; FLORES, R. SANJUÁN, R.; Extremely High Mutation Rate of a Hammerhead Viroid. **Science**, v.323, p.1308, 2009.

GOBATTO, D., CHAVES, A.L.R., HARAKAVA, R.; EIRAS, M. GenBank Accession JX909290, 2012a.

GOBATTO, D.; CHAVES, A.L.R.; MARQUE, J.M.; HARAKAVA, R.; EIRAS, M. Identificação e caracterização molecular de isolados do *Chrysanthemum stunt viroid* na cultura do crisântemo no estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37 (Suplemento), p. 19, 2012b.

GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. 2013. Viroids: a light in the darkness of the lncRNA-directed regulatory networks in plants. **New Phytologist**. v.198, p. 10-15, 2013.

GROSS, H.J.; KRUPP, G.; DOMDEY, H.; RABA, M.; JANK, P.; LOSSOW, C.; ALBERTY, H.; RAMM, K.; SANGER, H.L. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. **European Journal of Biochemistry**, v.121, p. 249-257.1982.

GRUSZYNSKI, C. **Produção Comercial de Crisântemos, vaso, corte e jardim**, Editora Agropecuária, 2001. 166p.

HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. 370p.

HAJIZADEH M.; NAVARRO B.; BASHIR N.S.; TORCHETTI E.M.; DI SERIO, F. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. **Journal of Virological Methods**, v. 179, p. 62-69, 2012.

HANOLD, D.; SEMANCICK, J.S.; OWENS, R.A. Polyacrilamide gel electrophoresis. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p.95-102.

HASELOFF, J.; SYMONS R.H. Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v.9, p.2741-2752, 1981.

HILL, M.F.; GILES, R.J.; MORAN, J.R.; HEPWORTH, G. The incidence of chrysanthemum stunt viroid B carlavirus, tomato aspey virus, cucumovirus and tomato spotted wilt tospovirus in Australian chrysanthemum crops. **Australasian Plant Pathology**, v.25, p.74-178, 1996.

HORST, R.K. Detection of a latent infectious agent that protects against infection by chrysanthemum chlorotic mottle viroid. **Phytopathology**, v.65, p.1000-1003, 1975.

HORST, R.K.; LANGHANA, R.W.; SMITH, S.H. Effects of chrysanthemum stunt, chlorotic mottle, aspey and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. **Phytopathology**, v.67, p.9-14, 1977.

HORST, R.K.; COHEN, D. Amantadine supplement tissue culture medium: a method for obtaining chrysanthemum free of chrysanthemum stunt viroid. **Acta Horticulturae**, v.110, p.311-315, 1980.

HORST, R.K. Chrysanthemum chlorotic mottle In: DIENER, T.O. (Ed) **The viroids**. Plenum Press: New York. 1987. p.291-295.

HORST, R.K.; NELSON, P.E. **Compendium of chrysanthemum diseases**. St. Paul: APS Press, 1997. 62 p.

HOSOKAWA, M.; SHIBA, H.; KAWABE, T.; NAKASHIMA, A.; YAZAWA, S. A simple and simultaneous detection method for two different viroids infecting chrysanthemum by multiplex RT-PCR. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.76, p.60-65, 2007.

IMENES, S.L.; ALEXANDRE, M.A.V. **Aspectos fitossanitários do crisântemo**. (IB. Boletim Técnico 5), São Paulo: Instituto Biológico, 1996. p. 5-47..

INTERNATIONAL TRADE CENTRE – ITC. *Trade Map*: Trade statistics for international business development. Disponível em <http://www.trademap.org>. Acesso em 10/04/2013

ITO, T.; IEKI, H.; OZAKI, K.; ITO, T. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed citrus viroid OS. **Archives of Virology**, v.146, p.975-982, 2001.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.S. Os pólos de produção de flores e plantas ornamentais do Brasil: uma análise do potencial exportador. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 8, p.25-48, 2002.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio - econômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 14, p.37-52, 2008.

KEESE, P.; SYMONS, R.H. Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.82, p.4582, 1985.

KIYUNA, I; ÂNGELO, J. A.; COELHO, P. J. Floricultura: Desempenho do comércio exterior em 2006. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 1, n. 2, 2007.

LAWSON, R.H. (1987). Chrysanthemum stunt. In: DIENER, T.O. (Ed) **The viroids**. Plenum Press: New York. 1987. p.247-259.

MAULE, A. J.; HULL, R.; DONSON, J. The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. **Journal of Virological Methods**, v 6, p.215-224, 1983.

MATSUNAGA, M. Potencial da floricultura brasileira. **Agroanalysis**, v.15, p.56-57, 1995.

MATSUSHITA, Y.; PENMETCHA, K.K.R. In vitro-transcribed *Chrysanthemum stunt viroid* RNA is infectuous to *Chrysanthemum* and other plants. **Phytopathology**, v.99, p.58-66, 2009.

MATSUSHITA, Y.; AOKI, K.; SIMITOM, K. Selection and inheritance of resistance to *Chrysanthemum stunt viroid*. **Crop Protection**, v. 35, p. 1-4, 2012.

MERINO-PACHECO, M. Estructuras del comercio ornamental mayorista en Europa. **Horticultura Internacional**, ano XVI, n.69, p.26-29, 2009.

Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria de Comércio Exterior – disponível em: www.desenvolvimento.gov.br. Acesso em 10/04/2013.

MÜHLBACH, H.P.; WEBER, U.; GÓMEZ, G.; PALLÁS, V.; DURAN-VILA, N.; HADIDI, A. Molecular Hybridization. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p.103-114.

NAKAHARA, K.; HATAYA, T.; UYEDA, I. A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.77, p.47-58, 1999.

NAKAUNE, R.; NAKANO, M. Identification of a new *Apscaviroid* from Japanese persimmon. **Archives of Virology**, v. 153, p. 969-972, 2008.

NAVARRO, B.; FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.94, p.11262-11267, 1997.

NAVARRO, B.; GISEL, A.; RODIO, M.E.; DELGADO, S.; FLORES, R.; DI SERIO, F. Viroids: how to infect a host and cause disease without encoding proteins. **Biochimie**. v.94, p. 1474-80, 2013.

NICHOLAS, K.B.; NICHOLAS, H.B.; DEERFIELD, D.W. II. GeneDoc: Analysis and visualization of genetics variation, **EMBNEW News**, v.4, p.14, 1997.

OEPP/EPPO Quarantine Procedures No. 24, *Chrysanthemum stunt viroid*. **Bulletin OEPP/EPPO Bulletin**, v.19, p.161-164, 1989.

OEPP/EPPO Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. 1990.

OLIVETTI, M. P. A.; TAKAES, M.; MATSUNAGA, M. Perfil da produção das principais flores de corte no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.24, p.31-54, 1994.

OWENS, R.A.; FLORES, R.; DI SERIO, F.; LI, S.F.; PALLÁS, V.; RANGLES, J.W.; SANO, T.; VIDALAKIS, G. Viroids. In: 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**. London: Elsevier Academic Press. 2011. p. 1221-1234.

PADUCH-CICHAL, E.; KRYCZYNSKI, S. A low temperature therapy and meristem-tip culture for eliminating four viroids from infected plants. **Journal of Phytopathology**, v. 118, p. 341-346, 1987.

PALLAS, V.; SANCHEZ-NAVARRO, J. A.; MAS, P.; CANIZARES, M. C.; APARICIO, F.; MARCOS, J. F. Molecular diagnostic techniques and their potential role in stone fruit certification schemes. **Options Méditerranéennes**, v.19, p. 191-208. 1998.

PALUDAN, N. Chrysanthemum chlorotic mottle and stunt. Infection trials, thermotherapy and meristem tip culture. **Tidsskrift for Planteavl**, v.78, p. 85-90, 1974.

PALUDAN, N. Inactivation of viroids of chrysanthemum by low temperature and meristem tip culture. **Acta Horticulturae**, v.164, p. 181-186, 1984.

PALUKAITIS, P.; SYMONS, R.H. Purification and characterization of the circular and linear forms of chrysanthemum stunt viroid. **Journal of General Virology**, v.46, p. 477-489, 1980.

RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 145-166, 2012

ROMAINE, C.P.; HORST, R.K. Suggested viroid etiology for chrysanthemum chlorotic mottle disease. **Virology**, v. 64, p. 86-95, 1975.

RUNIA, W.T.H.; PETERS, D. The response of plant species used in agriculture and horticulture to viroid infections. **Netherland Journal of Plant Pathology**, v.86, p.135-146, 1980.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SEBRAE, 2010. Mercado de flores e plantas movimenta R\$ 3,8 bilhões no país. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/setor/floricultura/>. Agência SEBRAE de Notícias. Acesso em: 22 fev. 2011.

SERRA, P., EIRAS, M., BANI HASHEMIAN, S.M., MURCIA, N., DARÒS, J.A., FLORES, R., KITAJIMA, E.W., DURAN-VILA, N. *Citrus viroid V*: occurrence, host range, diagnosis and identification of new variants. **Phytopathology**, v.98, p.1199-1204, 2008.

SINGH, R.P. Viroids and their potential danger to hot climates. **Canadian Plant Disease Survey**, v.63, p.13-18, 1983.

SINGH, R.P.; READY, K.F.M.; NIE, X. Biology. In: HADIDI, A.; FLORES, R.; RANGLES, J.W.; SEMANCIK, J.S. (Eds.). **Viroids**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2003. p.30-48.

SONG, A.; YOU, Y.; CHEN, F.; LI, P.; JIANG, J.; CHEN, S. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of viruses and viroids in chrysanthemum. **Letters in Applied Microbiology**, v.56, p.8-13, 2012.

TORCHETTI, E.M.; NAVARRO, B.; DI SERIO, F. A single polyprobe for detecting simultaneously eight pospiviroids infecting ornamentals and vegetables. **Journal of Virological Methods**, v.186, p.141-146, 2012.

VERHOEVEN, J. T.; MEEKES, E.T.; ROENHORST, J.W.; FLORES, R.; SERRA, P. Dahlia latent viroid: a recombinant new species of the family *Pospiviroidae* posing intriguing questions about its origin and classification. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 711-719, 2013.

WANG, Y.; DING, B. Viroids: small probes for exploring the vast universe of RNA trafficking in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.52, p.28-39, 2010.

YOON, J.Y.; PALUKAITIS, P. Sequence comparisons of global *Chrysanthemum stunt viroid* variants: multiple polymorphic positions scattered through the viroid genome. **Virus Genes**, v.46, p.97-104, 2013.

YOON, J.Y., BAEK, E., PALUKAITIS, P. Are there strains of *Chrysanthemum stunt viroid*? **Journal of Plant Pathology**, v.94, p.697-701, 2012.

ZUKER, M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. **Science**, v.244, p.48-52, 1989.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

