



***Chrysanthemum stunt viroid*: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto na produção do crisântemo**

DANIELLE GOBATTO

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

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Eiras

Coorientador: Dr. José Antonio Daròs

**São Paulo
2018**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental
no Agronegócio**

***Chrysanthemum stunt viroid*: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto na produção do crisântemo**

Danielle Gobatto

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

São Paulo
2018

Danielle Gobatto

***Chrysanthemum stunt viroid*: diversidade genética, hospedeiras alternativas, análise econômica das perdas em cultivos de crisântemo e estudo de interações viroide-hospedeiro**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Marcelo Eiras

São Paulo

2018

Eu **Danielle Gobatto**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

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.

Chrysanthemum stunt viroid: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto na produção do crisântemo.

/ Danielle Gobatto - São Paulo, 2018.

137 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2018.T.DG011

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Marcelo Eiras.

Versão do título para o inglês: Chrysanthemum stunt viroid: genetic diversity, alternative hosts, viroid-host interactions and impact study on chrysanthemum production.

1. CSVd 2. Avsunviroidae 3. Dendranthema 4. Ornamental I. Gobatto, Danielle II. Eiras, Marcelo III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2018/011



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Danielle Gobatto

Título: Chrysanthemum stunt viroid: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto na produção do crisântemo

Orientador(a): Dr. Marcelo Eiras

Tese apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Doutor(a) em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

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

*Instituição: Instituto Biológico – São Paulo

Assinatura:

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

*Instituição: Instituto Biológico – São Paulo

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Valdenice Moreira Novelli

*Instituição: Instituto Agronômico de Campinas

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Renato de Oliveira Resende

*Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a): Daniel Andrade de Siqueira Franco

*Instituição: Instituto Biológico – Campinas

Dedico este trabalho aos meus pais, com muito carinho,
Deborah e Eliandro, e aos meus amores
Rafael, Mariah, Mario e Teco.
Muito obrigada pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Estes quatro anos em que realizei esta pesquisa foram de uma jornada de grandes desafios, porém de construção e amadurecimento.

Chegar ao mais alto grau acadêmico permite-me hoje ser mais crítica, a questionar a importância do meu conhecimento e o quão ele pode ser importante para contribuir com a sociedade.

Jamais imaginei que seria um período fácil, mas os inúmeros obstáculos que surgiram durante este processo de crescimento fizeram-me cada vez mais forte e obstinada.

Contudo, sem inúmeras contribuições, auxílios, amparo e amizade nada seria possível. Assim deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Deborah e Eliandro, por caminharem ao meu lado e por darem a mim todo o ensinamento, educação e valores. Sem eles concluir esta etapa da minha vida jamais seria possível.

Ao meu noivo Rafael, pela paciência, compreensão e ajuda, especialmente por apresentar sempre um sorriso, quando sacrificava os dias, as noites, os fins de semana e os feriados em prol da realização deste estudo.

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Eiras, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

Ao meu co-orientador, Dr. José Antonio Daròs Arnau por mais uma vez me receber em seu laboratório no Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas - Velência durante o período de intercâmbio. O ano em que pude ter a oportunidade de frequentar seu laboratório foi especialmente enriquecedor para minha formação e elaboração deste estudo.

À Dra. Valdenice Moreira Novelli, ao Dr. Ricardo Harakava, ao Dr. Daniel Andrade de Siqueira Franco, ao Dr. Renato de Oliveira Resende, ao Dr. Érico de Campos Dianese, a Dra. Addolorata Colariccio Trevizan e a Dra. Renata Martins Sampaio por participarem de minha banca de defesa de Tese de Doutorado. Agradeço imensamente a todos pelas valiosas sugestões.

Ao Maurício João Mattar, proprietário da Mudaflor, que desde o início de minha carreira foi um grande incentivador e colaborador de todo o projeto.

Ao Manuel Marin que por intermédio da Deliflor Chrysanthen pode contribuir com meu enriquecimento científico me proporcionando um período valioso de conhecimento na Colômbia.

A Dra. Nubia Yineth Velasquez por me acompanhar em todas as visitas aos produtores colombianos e me dar a oportunidade de demonstrar meu conhecimento aos alunos e pesquisadores da Universidade Católica do Oriente.

Aos produtores pertencentes ao grupo "Dendranthema": Capiro, Flores de Oriente, Vegaflor, Galeria, Fides e Deliflor por patrocinarem minha visita à Colômbia.

A Timorex por contribuir e disponibilizar o senhor Roberto Escandón para me acompanhar durante as visitas aos produtores colombianos.

As amigas Anamarija Butkovic, Beatriz Gayubas e Fabiana Velasco, companheiras de todos os fins de semana e feriados em que ficávamos juntas no laboratório do IBMCP estudando e realizando nossas pesquisas.

Aos amigos Cristian Mares Barreda e Debora Sayas Gilabert que no maior momento de dificuldade, na Espanha, me acolheram em sua morada com tanto carinho. Em especial ao Mares por toda ajuda e companheirismo no IBMCP.

A amiga Mariana Krüger, anjo enviado por Deus, sua amizade foi essencial durante o período em que estive na Espanha.

A minha amiga Maria Aurea Saboya Chiaradia Picarelli, peça fundamental para me amparar e me manter firme na jornada deste trabalho. Você tornou os períodos em que estive no Instituto Biológico muito mais leves. Obrigada por me ajudar e me apoiar não somente neste estudo, mas em todos os aspectos da minha vida.

Ao meu grande amigo Thiago Pap por todo o companheirismo, apoio, ajuda, amparo e amizade. Meus dias nunca foram tão divertidos. Você fez e faz valer a pena todo o esforço desses quatro anos. O meu muito obrigada.

Agradeço à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros concedidos: bolsa de doutorado (cota do Programa de Pós-Graduação) e bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

Obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para meu sucesso.

“O conhecimento não serve de nada, a não ser que se ponha em prática”

(Anton Tchekhov)

RESUMO

GOBATTO, Danielle. ***Chrysanthemum stunt viroid: diversidade genética, hospedeiras alternativas, interações viroide-hospedeiro e estudo do impacto na produção do crisântemo.*** 2018. 137 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

O Brasil está entre os maiores consumidores de plantas ornamentais, sendo que 97% de seu abastecimento vem de sua produção interna. O estado de São Paulo destaca-se na produção de flores, tendo o crisântemo como a principal espécie de ornamental produzida. Dentre os patógenos que infectam o crisântemo, há duas espécies de viroides: o *Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd (gênero *Pospiviroid*, família *Pospiviroidae*); e o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd (gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*). Na América do Sul, há poucos estudos sobre viroides em crisântemo, havendo somente relatos da presença do CSVd. O presente trabalho teve como objetivos: (i) realizar um levantamento do CSVd em cultivos de crisântemo para conhecer o *status* atual da diversidade genética desse viroide nas principais regiões produtoras no Brasil e na Colômbia; (ii) caracterizar, por meio do sequenciamento completo, os genomas de isolados de CSVd; (iii) avaliar, por meio de coletas de plantas em campo e inoculação mecânica, plantas hospedeiras alternativas do CSVd; (iv) estudar possíveis interações moleculares viroide-hospedeiro; e (v) estimar as perdas econômicas que o CSVd pode causar nas produções comerciais de crisântemo. O levantamento indicou que o CSVd está amplamente disseminado nos cultivos de crisântemo no estado de São Paulo e na região de Rionegro, Colômbia. O estudo fitossociológico revelou 21 plantas daninhas diferentes encontradas no campo, confirmando a diversidade de plantas daninhas encontradas nos cultivos brasileiros de crisântemo. *Cardamine bonariensis*, *Chamaesyce hirta*, *Conyza bonariensis*, *Oxalis latifolia*, *Emilia sagittata* e *Portulaca oleracea* foram infectadas experimentalmente, o que indica que essas espécies de plantas daninhas podem atuar como reservatório(s) do CSVd no campo. Plantas de *Oxalis latifolia* infectadas naturalmente pelo CSVd foram identificadas na Colômbia, sendo o primeiro relato de um viroide nessa hospedeira. No estudo das interações viroide-hospedeiro foram testados 3 patossistemas: CSVd-crisântemo, PSTVd-tomateiro e ASBVd-abacateiro. Houve somente a identificação de uma proteína de abacateiro que interage com o ASBVd *in vivo*: a superóxido dismutase [Cu-Zn]₂ (SOD). O complexo ribonucleoproteico (viroide-proteína) pode ser transportado célula a célula, provavelmente auxiliando o viroide a completar outras etapas de seu ciclo infeccioso. E por fim, um possível fenômeno de proteção cruzada (*cross protection*) foi observado em plantas de crisântemo, na Espanha, infectadas com um isolado fraco de CSVd, que tem potencial para ser utilizado como ferramenta biológica (vacina) para o controle do CSVd. O estudo de caso revelou que os prejuízos com as infecções de CSVd podem ultrapassar 15%, gerando perdas superiores a milhões de dólares ao ano.

PALAVRAS-CHAVE: CSVd. *Pospiviroidae*. *Avsunviroidae*. *Dendranthema*. Ornamental.

ABSTRACT

GOBATTO, Danielle. ***Chrysanthemum stunt viroid: genetic diversity, alternative hosts, viroid-host interactions and impact study on chrysanthemum production.*** 2018. 137 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

Brazil is among the largest consumers of ornamental plants and the supply comes from domestic production (97%). The state of São Paulo stands out with the flowers production bearing the chrysanthemum as the main produced ornamental. Among pathogens that affect chrysanthemum, two viroids are important: *Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd (genus *Pospiviroid*, family *Pospiviroidae*) and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd (genus *Pelamoviroid*, family *Avsunviroidae*). In South America, there are few studies on viroids and only CSVd isolates were identified. This work had the following objectives: (i) to carry out a CSVd survey on chrysanthemum crops to know the current status of genetic diversity in the main producing regions in Brazil and Colombia; (ii) to identify and characterize CSVd isolates by complete sequencing of their genomes; (iii) to evaluate, by means of collection plants in field and mechanical inoculation, alternative hosts of CSVd; (iv) to study some aspects on molecular viroid-host interactions; and (v) to estimate the economic losses CSVd can cause in commercial chrysanthemum productions. Our survey indicated that CSVd is widely disseminated in chrysanthemum crops in São Paulo, Brazil, and in the region of Rionegro, Colombia. The phytosocioecological study in the field revealed 21 different weeds, which demonstrated a substantial diversity of spontaneous vegetation found in Brazilian chrysanthemum crops. *Cardamine bonariensis*, *Chamaesyce hirta*, *Conyza bonariensis*, *Oxalis latifolia*, *Emilia sagittata* and *Portulaca oleracea* were experimentally infected by CSVd, which indicates that these weeds can act as viroid reservoirs in the field. *Oxalis latifolia* naturally infected with CSVd was found in Colombia, being the first report of a viroid infecting this host. In the study of viroid-host interactions, 3 patosystems were tested: CSVd-chrysanthemum, PSTVd-tomato and ASBVd-avocado. There was only the identification of an avocado protein that interacts with ASBVd *in vivo*: superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 (SOD). This viroid-protein complex might be transported between cells, allowing viroid in its infectious cycle. Finally, a cross-protection phenomenon was observed in chrysanthemum plants, in Spain, infected with a CSVd mild isolate, which may be used as biological tool (vaccine) for the CSVd control. The case study has shown that losses from CSVd infections in chrysanthemum can exceed 15%, causing losses in excess of a million dollars per year.

KEYWORDS: CSVd. *Pospiviroidae*. *Avsunviroidae*. *Dendranthema*. Ornamental.

Lista de tabelas

- Tabela 1 – Classificação taxonômica dos viroides em famílias, gêneros e espécies com seus respectivos acrônimos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV - <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).....28
- Tabela 2 – Viroides que infectam plantas ornamentais.....38
- Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do CSVd.....51
- Tabela 4 – Questionário aplicado em propriedade produtora de crisântemo de corte, localizado em Rionegro, Antioquia, Colômbia, destinado para se mensurar as perdas gerais causadas pelo CSVd.....61
- Tabela 5 – Amostras de crisântemo com suspeita de infecção pelo CSVd coletadas durante o período de janeiro de 2014 a agosto de 2016, nos principais polos de produção e distribuição de mudas de crisântemo no Brasil e na Colômbia, além de amostras adquiridas, em 2017, em um comércio local de flores em Valencia, Espanha.....62
- Tabela 6 – Isolados de *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) coletados em duas regiões do estado de São Paulo, Brasil, e na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia, que foram sequenciados neste trabalho, com as sequências de nucleotídeos depositados no *GenBank*.....63
- Tabela 7 – Relação de variantes de sequência de CSVd com sequência(s) de nucleotídeos idêntica(s) às variantes de sequência considerados referência depositados no *GenBank*.....66
- Tabela 8 – Determinação da gama de hospedeiras experimentais por meio de inoculações mecânicas com um isolado brasileiro de CSVd, e os resultados de RT-PCR e da expressão ou não de sintomas 30 dias após as inoculações.....71

Tabela 9 – Média de eficiência na produção de crisântemo de corte na Colômbia em uma área de 1 ha (1.000.000 de plantas).....	76
Tabela 10 – Estimativa de possíveis perdas de crisântemos exportáveis devido à infecção pelo CSVd na Colômbia.....	77
Tabela 11 – Porcentagens de perdas de talos de crisântemos exportáveis devido à “suspeita” de infecção pelo CSVd em três produtores de crisântemo, dois da Colômbia (A) e (B), e um do Brasil (C).....	77
Tabela 12 – Perda econômica estimada de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda por ciclo de produção quando os talos são vendidos a US\$0,10 centavos de dólar.....	78
Tabela 13 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda por ciclo de produção quando os talos são vendidos a US\$0,15 centavos de dólar.....	78
Tabela 14 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda após um ano de produção quando os talos são vendidos a US\$0,10 centavos de dólar.....	79
Tabela 15 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda após um ano de produção quando os talos são vendidos a US\$0,15 centavos de dólar.....	79
Tabela 16 – Levantamento de plantas daninhas coletadas na região de Artur Nogueira, SP, em produtor de crisântemo em vaso e avaliação de suscetibilidade ao CSVd após inoculação.....	80
Tabela 17 - Levantamento de plantas daninhas coletadas na região de Paranapanema, SP, em produtor de crisântemo em vaso e avaliação da suscetibilidade ao CSVd após inoculação.....	81

Lista de figuras

- Figura 1 – Representação esquemática das estruturas secundárias dos RNA dos viroides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*. *Pospiviroid*, gênero tipo da família *Pospiviroidae*, apresentando molécula compacta em forma de bastão, com os cinco domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e Terminal Direito (TR). Os gêneros *Avsunviroid* e *Pelamoviroid* são constituídos, respectivamente, por moléculas de RNA com estrutura secundária de “quase-bastão” e ramificada. Figura adaptada de Eiras (2012) e atualizada de acordo com López-Carrasco; Flores (2017)27
- Figura 2 - (A) Crisântemo [*Chrysanthemum morifolium* (sin. *Dendranthema grandiflora*)] variedade ‘Pelle’ infectada por um isolado brasileiro do *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), apresentando mau desenvolvimento, redução drástica do tamanho da flor, (C) quebra de coloração das pétalas e nanismo; (B) e (D) são crisântemos infectados por um isolado do *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd), apresentando amarelecimento generalizado e mosqueado foliar.....32
- Figura 3 – Estrutura secundária da molécula de RNA circular com 354 nucleotídeos do *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), isolado de crisântemo do estado de São Paulo [código de acesso no Genbank JX909290 (GOBATTO et al., 2012)].....34
- Figura 4 – Principais regiões produtoras de crisântemo no estado de São Paulo, Brasil e Rionegro, Antioquia, Colômbia, onde foram coletadas amostras com suspeita de infecção de CSVd.....45
- Figura 5 – Bandejas utilizadas para semeadura das diferentes espécies de plantas que foram desafiadas via inoculação mecânica com um isolado de *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (A). Plântulas, após serem transplantadas para vasos com capacidade de 350 mL de substrato (B). Plantas de crisântemo infectadas com CSVd mantidas em casa de vegetação e utilizadas como fonte inóculo (C).....48

- Figura 6 – Representação da estrutura secundária da molécula de RNA circular do CSVd com a localização dos oligonucleotídeos RF74_CSVd(c) e RF75_CSVd(s) utilizados na amplificação via RT-PCR. *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’.....51
- Figura 7 – Plasmídeo pBdPSTVd contendo dois monômeros de PSTVd indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho, respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisenso encontram-se sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*HindIII* e *EcoRI*).....53
- Figura 8 – Plasmídeo pBdCSVd-Bra contendo dois monômeros de CSVd (isolado brasileiro) indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisenso estão sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*XhoI* e *XbaI*).....54
- Figura 9 – Plasmídeo pBdCSVd-Esp contendo dois monômeros de CSVd (isolado espanhol) indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisenso estão sublinhados. As enzimas *HincII*, *XbaI* e *EcoRV* estão indicados nas cores verde, laranja e rosa, respectivamente.....55
- Figura 10 – Plasmídeo pBdASBVd [A28] contendo dois monômeros de ASBVd indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisenso estão sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*XbaI* e *EcoRI*).....55

- Figura 11 – Alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos dos isolados brasileiros e colombianos de CSVd, sequenciados neste trabalho, com outros variantes de sequência de CSVd com genomas completos depositados no GenBank Os códigos de acesso do GenBank dos isolados brasileiros utilizados nas análises foram incluídos na Tabela 6.....64
- Figura 12 – Estrutura secundária de mínima energia livre a 24oC, obtida com os programas mFold e RNAviz, para o isolado 2214-BR de CSVd (acesso GenBank JX909290) com 354 nucleotídeos, sequenciado por Gobatto et al. (2012a; 2014). As alterações de resíduos entre os isolados caracterizados neste trabalho (códigos de acesso no GenBank descritos na Tabela 6) e o isolado de CSVd sequenciado por Gross et al. (1982) (acesso GenBank M19506) estão indicadas em vermelho. Os domínios TL (Terminal esquerdo), P (Patogenicidade), C (Central), V (Variável) e TR (Terminal direito) estão indicados.....65
- Figura 13 – Árvore filogenética com base no alinhamento múltiplo de sequências de isolados brasileiros de CSVd, colombianos, além de um isolado espanhol, empregando método Neighbor Joining com análises de bootstrap para 1.500 replicações, utilizando o software MEGA (versão 7.0). Os códigos de acesso do GenBank dos variantes de sequência utilizados nas análises foram incluídos nas Tabelas 6.....67
- Figura 14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida TBE(1x) (200V, 2 horas), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta das 6 alíquotas retiradas nas fases de extração de adutos para verificação da preservação dos complexos RNA/proteína. M= Marcador de RNA RiboRuler (Fermentas), 1= AL1, 2= AL2, 3= AL3, 4= AL4, 5= AL5 e 6= AL6 (A). Hibridização Northern-blot com sonda de polaridade negativa específica para a detecção de moléculas do ASBVd (+), evidenciando as etapas de extração, sendo: cd=moléculas circulares diméricas, ld=moléculas lineares diméricas, sup=moléculas supra genômicas, mc=monômeros circulares e ml=monômeros lineares (B). A posição dos complexos RNA-proteína está indicada à direita.....68

Figura 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida TBE(1x) (200V, 2 horas), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, onde: 1= complexos RNA-proteína de folhas de abacate com ASBVd não irradiadas com luz UV [controle negativo], M= Marcador de RNA RiboRuler (Fermentas), e 2= complexos de RNA/proteína de folhas de abacate com ASBVd irradiadas com 3 horas de luz UV (A). O retângulo tracejado vermelho indica a região onde o gel de poliacrilamida foi dissociado para posterior eluição dos adutos. Em (A) o gel está corado com brometo de etídio e após o corte do gel de acordo com o marcador de RNA o mesmo gel foi transferido e hibridizado para detecção de moléculas de polaridade (+) do ASBVd (B).....69

Figura 16 – Fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de diferentes espécies de plantas para determinação do círculo de hospedeiras experimentais. M'= 100pb ladder, A= *Amaranthus viridis*; B= *Chenopodium amaranticolor*; C= *C. murale*; D= *Chrysanthemum carinatum*; E= *Datura stramonium*; F= *Emilia sagittata*; G= *Gomphrena globosa*; H= *Helianthus annuus*; I= *Lupinus russell*; J= *Mirabilis jalapa*; L= *Portulaca grandiflora*; M= *Senecio cruentus*; N= *Solanum lycopersicum* “Cereja”; O= *S. lycopersicum* “Santa Clara”; P= *S. tuberosum* “Ágata”; Q= *Vinca rosea*; R= *S. lycopersicum* “Italiano”; S= *S. lycopersicum* “Rutgers”; sendo 1= Planta sadia, 2-5= Plantas inoculadas e C(+)= controle positivo. *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’.....72

Figura 17 – *Amaranthus viridis* (A), *Chenopodium murale* (B) e *Gomphrena globosa* (C) apresentando sintomas de nanismo, 30 dias após a inoculação com isolado do CSVd. As testemunhas não inoculadas (sadias) estão representadas à esquerda.....73

- Figura 18 – Folhas de *Chenopodium amaranticolor* apresentando sintomas de pontos cloróticos, necróticos, amarelecimento e diminuição do tamanho das folhas induzidos pelo CSVd (A) (à esquerda, folha sadia seguida de três folhas provenientes de plantas infectadas com um isolado de CSVd). Em (B) a testemunha está representada à esquerda.....73
- Figura 19 – Folhas de *Emilia sagittata* apresentando pontos necróticos e deformação foliar induzidos pelo CSVd, em comparação à folha de planta não inoculada à esquerda (A). Em (B) observa-se nanismo em planta inoculada com CSVd (à direita) em comparação à testemunha não inoculada (à esquerda)74
- Figura 20 – *Lupinus russell* (A) e *Mirabilis jalapa* (B) apresentando sintomas de nanismo e amarelecimento das folhas induzidos por um isolado de CSVd, em comparação às suas testemunhas não inoculadas (sadias) representadas à esquerda de cada figura.....74
- Figura 21 – Sintomas observados em tomateiros (*Solanum lycopersicum*), 30 dias após a inoculação, com um isolado de CSVd. (A) tomateiro variedade “Cereja” com escurecimento das nervuras e má formação foliar; (B) tomateiro variedade “Santa Clara” com nanismo; (C) tomateiro variedade “Italiano” com deformação, amarelecimento e escurecimento das nervuras foliares, além de má formação da planta; (D) tomateiro variedade “Rutgers” com má formação e nanismo. Os vasos à esquerda correspondem às plantas não inoculadas (sadias).....75
- Figura 22 – Representação das perdas econômicas anuais quando a infecção pelo CSVd leva a 15% de erradicação de plantas de crisântemo sobre o ciclo de produção, considerando as vendas dos talos de crisântemo a US\$0,10 centavos de dólar. Às áreas cultivadas estão representadas em azul, 60 ha, em laranja, 30 ha e em cinza, 5 ha.....79

- Figura 23 – Plantas daninhas de diferentes espécies encontradas dentro das linhas (A), entre as estufas (B), nos entornos das estufas (C) e dentro dos canteiros de crisântemo (D).....82
- Figura 24 – Plantas de *Cardamine bonariensis* Pers. encontradas nas entrelinhas dos sistemas de produção de crisântemos em vaso (A) e (B) e dentro dos vasos de crisântemos cultivados no Brasil. Produção de crisântemos de corte na Colômbia apresentando *C. bonariensis* nas entrelinhas (D) e dentro dos canteiros entre os crisântemos (E) e (F).....83
- Figura 25 – Agriãozinho (*Cardamine bonariensis*): caule ramificado, tenro e glabro (A). Inflorescência do tipo cacho com flores pedunculadas, cálice com quatro sépalas e corola com quatro pétalas (B) e folhas com longo pecíolo, dispostas de forma alternada (C).....84
- Figura 26 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de agriãozinho (*Cardamine bonariensis*) M= 100pb DNA ladder; 1= *C. bonariensis* 1; 2= *C. bonariensis* 2; 3= *C. bonariensis* 3; 4= *C. bonariensis* 4; 5= controle negativo; 6=controle positivo.....85
- Figura 27 – Trevos (*Oxalis latifolia*) sadios utilizados nos experimentos de inoculação (A). Trevos, 30 dias após a inoculação com um isolado de CSVd com sintomas de mosaico e deformação foliar (B, C e D). Trevos encontrados em campo de crisântemo da região de Rionegro, Antioquia, Colômbia, apresentando sintomas severos de clorose e epinastia foliar (E), (F) e (G)..86

Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75 mA, 45 V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a amplificação total do CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de trevo (*Oxalis latifolia*) inoculadas com um isolado de CSVd e analisadas após 30 dias. M= 100pb DNA ladder; 1= controle negativo; 2-5= *Oxalis latifolia* inoculada; C(+)= controle positivo.....87

Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a amplificação do CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de trevo (*Oxalis latifolia*) proveniente de campo de crisântemo na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia. M= 100pb DNA ladder; 1= *Oxalis latifolia*; 2= *Oxalis latifolia*.....87

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	V
1.INTRODUÇÃO.....	14
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.Produção de plantas ornamentais no Brasil e sua distribuição.....	19
2.2.Crisântemo: importância econômica, características da produção classificação botânica, origem, cultivo e principais doenças e pragas.....	21
2.3.Viroides: propriedades, classificação e taxonomia.....	26
2.4.Principais doenças induzidas por viroides em plantas ornamentais.....	30
2.4.1Família <i>Avsunviroidae</i>	30
2.4.1.1. <i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (CChMVd).....	31
2.4.2.Família <i>Pospiviroidae</i>	32
2.4.2.1. <i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd).....	33
2.4.2.2. <i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (CSVd).....	33
2.4.2.3. <i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd).....	37
2.5.Manejo e controle.....	39
2.6.Estado da arte dos aspectos relacionados às interações viroide-hospedeiro.....	42
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1.Local de realização dos experimentos e coleta das amostras.....	45
3.1.1. Levantamento do CSVd em campos de crisântemo.....	45
3.1.2. Levantamento fitossociológico em campos de crisântemo.....	46
3.2. Inoculação mecânica e círculo experimental de hospedeiros.....	47
3.3.Extração de RNA.....	48
3.3.1. Extração de RNA com cromatografia com celulose “Whatman” para folhas de crisântemo.....	48
3.3.2.Extração de RNA para folhas de plantas daninhas.....	49
3.4. Eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE).....	50
3.5. RT-PCR.....	51
3.6. Eluição dos fragmentos de DNA.....	52
3.7. Sequenciamento e análise das sequências.....	52

3.8. Clonagem e inoculação mecânica de transcritos diméricos de ASBVd, PSTVd e CSVd em plantas hospedeiras.....	52
3.9. Indução e purificação de adutos.....	56
3.10. Síntese de ribossondas e hibridização <i>Northern-blot</i>	59
3.11. Eluição de complexos de RNA/proteína de géis de poliacrilamida.....	60
3.12 Impactos na produção: estudo de caso.....	60
4.RESULTADOS.....	61
4.1.Identificação e caracterização de isolados do CSVd no Brasil e na Colômbia.....	61
4.1.1. Identificação dos isolados de CSVd via sPAGE e RT-PCR.....	61
4.1.2. Sequenciamento e análise filogenética.....	62
4.2.Análises das interações viroide-hospedeiro.....	68
4.3.Determinação do círculo de hospedeiros experimental do CSVd.....	70
4.4. Avaliação do impacto do CSVd na produção do crisântemo.....	76
4.5.Levantamento de plantas daninhas: identificação de novas hospedeiras do CSVd.....	80
4.6. <i>Cardamine bonariensis</i> Pers.: presença constante nos cultivos de crisântemo, uma nova hospedeira do CSVd.....	81
4.7. <i>Oxalis latifolia</i> : nova hospedeira e potencial reservatório do CSVd nos campos de produção de crisântemo.....	85
5.DISSCUSSÃO.....	89
5.1.Status atual da diversidade genética dos viroides no Brasil e na Colômbia.....	89
5.2.Hospedeiros alternativos do CSVd.....	91
5.3.Impacto na produção causado pelo CSVd em cultivos de crisântemo.....	94
5.4.Interações viroide-hospedeiro: descoberta de mais uma proteína que interage com viroide <i>in vivo</i>	99
6.CONCLUSÕES.....	106
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

1. INTRODUÇÃO

O setor de produção e comercialização de flores e plantas ornamentais consiste em um bem-sucedido ramo do agronegócio brasileiro contemporâneo. De acordo com dados publicados pelo AGRIANUAL (2016), somente no ano de 2014, o setor alavancou vendas globais que ultrapassaram 5 bilhões de reais. Em 2015, houve um crescimento de 6%, movimentando valores próximos a 6 bilhões de reais, o que demonstra que esta cadeia produtiva se encontra em constante expansão (SEBRAE, 2015a; AGRIANUAL, 2016). O Brasil está entre os maiores consumidores de plantas ornamentais e seu abastecimento vem de sua produção interna, 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 (AGRIANUAL, 2016).

A distribuição atacadista de flores e plantas ornamentais concentra-se basicamente no estado de São Paulo e conta com participação importante das cooperativas, as quais respondem por cerca de 40% do total movimentado anualmente. No mercado internacional, o Brasil não responde por volumes de produção ou valores de comercialização relevantes. Neste contexto, o setor é liderado pelas exportações de estacas de crisântemos seguidas de outras mudas de diferentes plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETEZ, 2014; OLIVETTI et al., 1994; SEBRAE, 2015a).

O crisântemo tem boa aceitação no mercado interno brasileiro, porém ainda há desafios a enfrentar, que impedem que o produtor desta ornamental exporte e alavanque o comércio. No Brasil, os produtores de crisântemo planejam a produção de acordo com temas culturais e datas comemorativas, o que diferencia o mercado brasileiro de outros países pioneiros em produção e comercialização desta ornamental (SEBRAE, 2015b; AGRIANUAL, 2016). Além disso, as variedades produzidas no Brasil também influenciam a diversificação e especialização do mercado interno. De acordo com o Programa Brasileiro de Exportação de Flores e Plantas Ornamentais – FloraBrasilis – os polos nacionais de produção de plantas ornamentais foram distribuídos em cinco categorias: (i) segundo os níveis de produção; (ii) o nível tecnológico; (iii) o grau de organização dos produtores; (iv) a inserção no mercado; e (v) o potencial exportador (OLIVETTI et al., 1994; BUAINAIN, 2007). Além do estado de São Paulo, a região Nordeste se destaca,

mais precisamente os estados de Alagoas, Pernambuco e Ceará, onde encontram-se polos de produção de ornamentais e que, atualmente, contam com políticas de promoção de exportações de flores, com destaque para o crisântemo, rosas, folhagens tropicais de corte e de plantas ornamentais para paisagismo (BUAINAIN, 2007).

O crisântemo, pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae e gênero *Dendranthema*, possui mais de 100 espécies e 800 variedades e híbridos que são comercializados ao redor do mundo. Tem grande aceitação no mercado quando comparado a outras ornamentais, sendo que os cultivares comercializados atualmente compreendem linhagens originárias da Ásia e Europa. Com variedades de formas e cores, o crisântemo pode ser cultivado em ambiente protegido ou no campo em diferentes tipos de plantio como flor de vaso, corte ou destinados para paisagismo (LAVILA, 1992; OLIVETTI et al., 1994). Devido às suas características e morfologia, possui diferentes tipos de inflorescência podendo ser destacados os mais cultivados: margarida, girassol, pompom, decorativa, *spider* ou *spaghetti* e globosa (LAVILA, 1992; GRUSZYNSKI, 2001).

Há inúmeras doenças que acometem o crisântemo, dentre elas estão as de origem fúngica, bacteriana, as causadas por nematoides e as induzidas por vírus e viroides. Dentre os viroides, tema desta tese, destacam-se duas espécies: o *Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd (gênero *Pospiviroid*, família *Pospiviroidae*); e o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, CChMVd (gênero *Pelamoviroid*, família *Avsunviroidae*) (DI SERIO et al., 2014).

Os viroides, minúsculos sistemas genéticos que se replicam no interior das células vegetais, são desprovidos de capa proteica e não necessitam de um vírus auxiliar para estabelecer a infecção nas plantas hospedeiras. Constituídos de RNA de fita simples e circular (tamanho que oscila entre 246 e 401 nucleotídeos), não codificam proteínas e são totalmente dependentes de fatores do hospedeiro para replicação, processamento, movimento e patogênese. De acordo com os critérios estabelecidos pelo “Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus” (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), os viroides são classificados como agentes subvirais, e as pouco mais de 30 espécies aceitas estão incluídas em duas famílias: *Pospiviroidae*, com membros que se replicam no núcleo da célula por meio de um mecanismo de círculo rolante assimétrico, sem atividade ribozimática; e *Avsunviroidae*, com espécies que replicam-se nos cloroplastos por meio de um

mecanismo de círculo rolante simétrico, com atividade de ribozimas nas moléculas de ambas as polaridades (DI SERIO et al., 2014; FLORES et al., 2014; FLORES et al., 2016; STEGER; PERREAULT, 2016; EIRAS, 2017a; 2017b).

O CSVd pode induzir quebra de coloração e redução do tamanho das flores, além de redução do desenvolvimento das plantas. Porém, muitas vezes não há expressão de sintomas, fato que ocorre dependendo da base genética do hospedeiro, das condições de cultivo, da variedade cultivada e sua suscetibilidade, o que normalmente dificulta a identificação no campo e facilita a disseminação do viroide entre os cultivos. O CSVd tem uma gama de hospedeiros ampla, que inclui espécies de importância econômica como a batatinha (*Solanum tuberosum*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), o pimentão (*Capsicum annuum*), cultivares de pepino (*Cucumis sativus*), ornamentais do gênero *Dendranthema*, *Dahlia* e *Petunia*, além de espécies de plantas daninhas como *Emilia sagittata* e *Nicandra physalodes* (RUNIA; PETERS, 1980).

A ampla gama de hospedeiros, a facilidade de o CSVd ser transmitido mecanicamente e as infecções latentes (quando as infecções transcorrem sem expressão de sintomas) amplificam a capacidade de disseminação e sua manutenção nos sistemas de cultivo (YOON et al., 2012; CHO et al., 2013; GOBATTO et al., 2014). Acredita-se que muitas espécies de plantas daninhas podem atuar como reservatórios naturais do CSVd, contribuindo significativamente para a manutenção da fonte de inóculo da doença em áreas cultivadas com crisântemo (MATSUSHITA; PENMETCHA, 2009). Em condições naturais, infecções pelo CSVd têm sido relatadas em *Petunia hybrida*, *Ageratum* sp., *Dahlia* sp., *Senecio* sp., *Vinca major* e *Argyranthemum frutescens* (CHO et al., 2013).

Considerado praga quarentenária A2 na Europa (OEPP/EPPO, 2013), o CSVd foi relatado em praticamente todas as regiões em que o crisântemo é cultivado: Ásia, África, América do Norte, América do Sul, Europa e Oceania (CHO et al., 2013; YOON et al., 2013; YOON; PALUKAITS, 2012; GOBATTO et al., 2014). O CSVd, quando atinge concentrações elevadas nos tecidos de cultivares de crisântemo suscetíveis, pode afetar o desenvolvimento das plantas e das flores, prejudicando ou até mesmo impossibilitando sua comercialização (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003).

O CSVd é facilmente transmitido por inoculação mecânica a partir da fricção de extrato de plantas infectadas sobre plantas hospedeiras sadias. Porém, em campo, sua transmissão está associada ao contato foliar, práticas de enxertia e

ferramentas de corte utilizadas para o manejo no campo, durante o desponete (*pinch*) como canivetes, tesouras e principalmente as lâminas utilizadas para a retirada de mudas. O CSVd não tem vetores associados à sua transmissão, sendo o homem considerado o principal agente de dispersão do patógeno, por meio de intercâmbio formal ou informal de material vegetal (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003).

A principal medida de controle do CSVd baseia-se em métodos preventivos, visando principalmente à desinfecção das ferramentas utilizadas no campo, evitando a entrada e circulação do patógeno no sistema de produção de mudas e matrizes. A implantação de programas eficientes de indexação também é fundamental, com o emprego de métodos moleculares que apresentem elevada especificidade e sensibilidade visando o sucesso da produção de mudas e comercialização de plantas de crisântemo livres de viroides (OEPP/EPPO, 2013).

No Brasil, ainda há poucos estudos sobre a ocorrência, distribuição e potencial de danos induzidos pelos viroides em plantas ornamentais. Por ser um país de clima predominantemente tropical e considerando que os viroides normalmente se replicam com maior eficiência em condições de temperaturas elevadas, o Brasil deve conter uma maior diversidade de espécies desses patógenos distribuídas em diferentes espécies de plantas. Além disso, plantas originalmente de clima temperado quando cultivadas em condições tropicais e subtropicais podem se tornar potenciais hospedeiras de novos viroides (SINGH, 1983, VERHOEVEN, 2017).

Devido à propagação vegetativa do crisântemo, os viroides estão entre os patógenos de maior importância para esta ornamental. Vale ressaltar que o conhecimento da diversidade genética dos viroides é um dos fatores mais importantes a serem analisados quando se visa estabelecer estratégias de detecção e controle, principalmente por ter genoma constituído de RNA e sofrer constantes mutações (GAGO et al., 2009).

Há poucos estudos envolvendo informações sobre resistência de plantas a infecções por viroides. Em alguns trabalhos há relatos, em espécies do gênero *Solanum* (*S. tuberosum*, *S. acaule*, *S. guerreroense*, *S. berthaultii* e *S. stoloniferum*) de tolerância ao PSTVd (SOFY et al., 2013; PALUKAITIS, 2014). Porém, até o presente momento nenhuma fonte natural de resistência ao CSVd foi reportada (FLORES et al., 2017). Em trabalhos utilizando como porta-enxerto cultivares híbridos de crisântemo previamente infectados com CSVd e crisântemo selvagem

como enxerto, demonstrou-se que nos crisântemos selvagens não foi possível detectar o viroide. Além disso, a resistência ao CSVd foi expressa (em parte) na primeira progênie híbrida, resultante do cruzamento da cultivar resistente com duas cultivares suscetíveis (MATSUSHITA et al., 2012). Foi possível observar certa resistência após a inoculação com CSVd, sendo que o viroide estava ausente no meristema apical e nas folhas jovens (NABESHIMA et al., 2012).

Bioensaios de proteção cruzada (*cross protection*) com isolados fracos de PSTVd, CChMVd e PLMVd já eram realizados antes mesmo desses patógenos serem identificados como viroides (FERNOW et al., 1969; LEE et al., 2013). Essas práticas, atualmente, são realizadas experimentalmente para alguns vírus e viroides, uma vez que há riscos envolvidos na manutenção de fontes de inóculo no campo (FLORES et al., 2017).

Os viroides são considerados parasitas da maquinaria de transcrição celular, não codificam proteínas próprias, e isso implica em uma total dependência de interações com fatores da célula hospedeira para que esses patógenos possam completar as diferentes etapas do ciclo infeccioso (FLORES et al., 2012; 2015; 2016; STEGER; PERREAULT, 2016). Informações relativas às interações de viroides com fatores do hospedeiro são restritas. No entanto, dados experimentais, apesar de ainda limitados a poucos trabalhos, indicam que proteínas presentes nas células vegetais são recrutadas para interagir com viroides, auxiliando esses patógenos nas etapas de seu ciclo infeccioso (EIRAS et al., 2011; NAVARRO et al., 2012). Para o estudo de interações neste trabalho foram selecionados três viroides: o *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), ambos pertencentes à família *Pospiviroidae* e gênero *Pospiviroid*, devido à facilidade de transmissão e por acumularem-se em elevadas concentrações em suas plantas hospedeiras, além do ASBVd, pertencente à família *Avsunviroidae* e gênero *Avsunviroid* por ser um modelo para estudos desse tipo de interação (DARÒS; FLORES, 2002).

Esta Tese teve como objetivos: (i) realizar um levantamento da ocorrência do CSVd em cultivos de crisântemo para conhecer o *status* atual da diversidade genética de isolados desse viroide nas principais regiões produtoras desta ornamental no Brasil e na Colômbia; (ii) identificar e caracterizar por meio do sequenciamento completo o genoma dos diferentes isolados de CSVd; (iii) avaliar, por meio de coletas de plantas em campo e inoculação mecânica, plantas

hospedeiras alternativas do CSVd, que possam atuar como reservatórios do viroide no campo; (iv) avaliar as perdas na produção do crisântemo causadas pelo CSVd em um estudo de caso; e (v) estudar aspectos relacionados às interações moleculares viroide-hospedeiro utilizando 3 patossistemas diferentes CSVd-crisântemo, PSTVd-tomateiro e ASBVd-abacateiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção de plantas ornamentais no Brasil e sua distribuição

A produção de flores e plantas ornamentais, no Brasil, encontra-se distribuída em vários estados, mas está concentrada principalmente nas regiões Sudeste e Sul do país. O estado de São Paulo destaca-se com grande participação no mercado de mudas de plantas ornamentais, bulbos e de flores de corte, principalmente de rosas e crisântemos (BUAINAIN, 2007). Os polos de produção e comercialização de flores e plantas ornamentais do estado de São Paulo são divididos em sete regiões: Atibaia, Grande São Paulo, Dutra, Vale do Ribeira, Paranapanema, Campinas e Holambra (SEBRAE, 2015a).

Na região de Atibaia encontram-se pequenos e médios produtores que caracterizam a estrutura fundiária mantida na região. Esta região responde por 25% da produção nacional de flores e plantas ornamentais concentrando-se em flores de corte e de vasos, com destaque para as rosas, os crisântemos e as orquídeas (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

A região da Grande São Paulo é caracterizada por concentrar comunidades japonesas compostas por pequenos agricultores, em municípios pertencentes ao “cinturão verde” de São Paulo, com sistemas produtivos que incluem tecnologias rudimentares. Nessa região, a produção de plantas para paisagismo, forrações e flores de corte, com destaque para rosas e crisântemos, é escoada por meio da Ceagesp.

No município de Arujá, além de uma cooperativa de produtores, encontra-se a Associação dos Produtores de Flores da Região da Dutra (Aflord), responsável por realizar anualmente feiras promovendo e comercializando as flores e plantas cultivadas na região.

A região do Vale do Ribeira destaca-se pela produção de plantas destinadas ao uso em projetos de paisagismo. Entretanto, o clima quente e úmido da região tem propiciado o desenvolvimento do cultivo de flores tropicais, com destaque para os antúrios e helicônias. Seus produtos são predominantemente comercializados na Ceagesp e Ceasa (Campinas).

Na região de Paranapanema, localizada no extremo oeste do estado de São Paulo, encontra-se a colônia holandesa conhecida como Holambra II, em referência à principal colônia holandesa existente na cidade de Holambra dedicada à produção de flores. Nesta região encontram-se produtores dedicados ao cultivo de flores de corte e vaso. A Cooperativa de Holambra II comercializa através de leilões grande parte das flores produzidas na região. Contudo, essa modalidade de vendas ainda é pouco desenvolvida. Parte da produção é vendida aos atacadistas que abastecem os mercados da região oeste do estado de São Paulo, norte do Paraná e Mato Grosso do Sul. Pequena parcela dessa produção é escoada por meio do Veiling e Floranet, em Holambra (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014; SEBRAE, 2015a).

A região de Campinas tem grande importância nacional na produção de plantas para paisagismo que são comercializadas no Mercado Permanente de Flores e Plantas Ornamentais, administrado pelo Ceasa (Campinas), em parceria com a Associação dos Produtores e Comerciantes do Mercado Permanente de Flores de Campinas (Aproccamp). Este Mercado é considerado o melhor centro de comercialização de flores e plantas do país, o primeiro Mercado Permanente de Flores em área coberta do Brasil e o maior da América Latina. Recebe mensalmente, compradores das cinco regiões do Brasil e dos mais variados ramos atacadistas, supermercados, floriculturas, viveiristas, paisagistas, decoradores, garden centers, hotéis, restaurantes, entre outros. O mercado tem mais de cinco mil empresas cadastradas e está dividido em cinco setores: flores de corte, plantas em vasos, paisagismo, forrações e acessórios (BUAINAIN, 2007; JUNQUEIRA; PEETZ, 2014; SEBRAE, 2015a).

A região de Holambra é o principal centro de desenvolvimento da floricultura no país e é conhecida como a capital nacional das flores. Dispõe de três centros de comercialização (Veiling Holambra, Floranet e Assflora) e realiza importantes eventos do setor, como a Feira de Tecnologia de Insumo (Hortitec), para os produtores, o Encontro Nacional de Floristas (Enflor), para profissionais do varejo, e a Exposição de Flores e Plantas da América Latina (Expoflora). Na região existem

mais de trezentos produtores, atacadistas e distribuidores de flores do país e os principais fabricantes e fornecedores de insumos, tecnologia e mudas de propagação. Encontram-se, também, as principais empresas de mudas, bulbos e sementes, com forte especialização em crisântemos, begônias, gladiolos, lírios, rosas entre outras plantas ornamentais. Holambra, Santo Antônio da Posse, Mogi Mirim e Arthur Nogueira são os principais municípios produtores da região e apresentam uma grande diversidade de espécies e variedades de flores e plantas ornamentais (BUAINAIN, 2007; JUNQUEIRA; PEETZ, 2014; SEBRAE, 2015a).

2.2. Crisântemo: importância econômica, características da produção, classificação botânica, origem, cultivo e principais doenças e pragas

Desde 2009, após a crise ter atingido os setores da cadeia produtiva de plantas ornamentais, o mercado mundial deste setor encontra-se em plena expansão (AGRIANUAL, 2016). Atualmente, há uma forte concorrência com produtores tradicionais de flores e plantas ornamentais de países equatoriais como o Quênia, Etiópia, Equador, Colômbia e Malásia, que aumentaram a sua quota nos negócios da floricultura mundial. Fatores como a crescente demanda por produtos a preços mais acessíveis e com uma logística adequada incentivaram uma competição com os produtores de ornamentais mais tradicionais (SEBRAE, 2015a; ANDRADE, 2016).

Em 2013, as exportações de flores e plantas ornamentais, folhagens de corte, bulbos e plantas envasadas foram de US\$ 21,8 bilhões valores expressivos frente ao resultado de 2003 quando renderam US\$ 11,6 bilhões (SEBRAE, 2015a).

As flores de corte, com destaque para o crisântemo, são consideradas como principal ramo dentro no comércio mundial da floricultura conferindo um grande valor comercial, seguido pelas plantas envasadas que são negociadas geralmente nos mercados internos. Com a expansão geográfica da produção das flores de corte, bem como um maior desenvolvimento em logística, tornou-se viável o transporte a longa distância do material produzido, favorecendo o crescimento da oferta (JUNQUEIRA; PEETZ, 2014).

Atualmente, observa-se uma mudança estrutural no curso mundial da floricultura. Se antes a Holanda produzia e exportava números significativos de ornamentais, hoje sua participação perde lugar para países como Quênia, Equador,

Etiópia, Colômbia e Malásia que têm aumentado sua participação em produtos exportados. Por exemplo, em 2003, o Japão importou 8% de suas flores de corte da Holanda, sendo que em 2013, essa participação diminuiu para 2%. No mesmo período, o Japão aumentou as importações de flores de corte provenientes da Malásia de 10% para 26%, e as importações da Colômbia cresceram de 14% a 22%. Os Estados Unidos importaram 65% de todas as flores de corte da Colômbia em 2013, contra 55% em 2003 (ANDRADE, 2016).

Um dos maiores avanços em transporte de flores de corte por via marítima, em contêineres, demonstrou grande evolução e impulsionou os fluxos de comércio (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; AGRIANUAL, 2016). Atualmente, cerca de 15% do total das exportações de flores de corte da Colômbia já são enviados pelo mar. Isso permite que o país tenha uma expansão abrangente de seus produtos com um dos principais destinos, o Reino Unido. Outros fluxos intensos de contêineres são do Vietnã para o Japão e de Israel para a Europa (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015).

Mesmo com todo o crescimento do Quênia, da Etiópia e da Malásia, em 2013, os principais países exportadores de flores de corte ainda são liderados pela Holanda com 52% de participação seguida da Colômbia com 35% e Equador com 9% (AGRIANUAL, 2016).

A disponibilidade, circunstâncias econômicas, tradições religiosas e culturais desempenham papel importante como fatores de decisão na aquisição de flores e plantas. Em alguns mercados, os consumidores estão optando por flores e plantas de baixo custo, comercializadas principalmente por supermercados, pequenas lojas econômicas e lojas de bricolagem (BARTSCH et al., 2004; JUNQUEIRA; PEETZ, 2008; SEBRAE, 2015b).

Na última década, não se observaram tendências claras nos fluxos de importação e de exportação nos grandes mercados emergentes como Brasil, China, Índia, México e Turquia. No entanto, percebe-se uma crescente demanda interna e um aumento na produção de flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; ANDRADE, 2016).

No Brasil são cultivadas mais de 350 espécies e 3 mil variedades de diferentes tipos de plantas ornamentais. Estima-se uma área cultivada de aproximadamente 15 mil hectares, onde 8,2 mil produtores atuam em propriedades com áreas médias de 1,8 ha (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; ANDRADE, 2016). Quando analisado o consumo de flores do mercado brasileiro, o faturamento

apresentou evoluções anuais consideráveis, onde no ano de 2012 o setor da floricultura gerou R\$4,8 bilhões, atingindo R\$5,7 bilhões em 2014 e com um crescimento estimado em mais de 8% para o ano de 2015 (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015).

O desenvolvimento do setor produtivo de plantas ornamentais no Brasil enfrenta inúmeras restrições importantes a serem pontuadas que impedem o seu sucesso, são eles o endividamento do consumidor com o alto custo da cadeia, a crise de abastecimento de água no Sudeste, uma maior fiscalização e como consequência a tributação, uma escassez de mão de obra associados, a redução dos financiamentos e infraestrutura deficitária (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; ANDRADE, 2016).

Apesar dos desafios que o mercado de flores e outras ornamentais enfrentam no decorrer de sua cadeia produtiva, esta é uma importante engrenagem na economia brasileira, responsável por 215,8 mil empregos diretos, destes: 78,5 mil relativos à produção (36,4%), 8,4 mil relacionados à distribuição (3,9%), 120,6 no varejo (55,9%), 8,3 mil em outras funções (3,8%), em sua maior parte relacionadas com atividades de apoio à cadeia (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; ANDRADE, 2016).

O estado de São Paulo é o principal produtor nacional de crisântemo (*Dendranthema* spp.) e concentra a distribuição das flores e plantas ornamentais em 131 municípios principalmente nas regiões próximas a Holambra, Campinas e Atibaia. Por ser uma espécie que apresenta flores com grande aceitação de mercado, é considerada a ornamental 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 crisântemo de corte tem maior aceitação no mercado internacional, ganhando espaço nos mercados consumidores da Espanha, França, Holanda, Portugal, Suíça entre outros. Desde o final da década de 1990, o Brasil apresenta um desempenho crescente na participação no mercado externo (JUNQUEIRA; PEETZ, 2015; AGRIANUAL, 2016). O mercado interno brasileiro é bastante atrativo com relação à produção de crisântemos, que se encontra em amplo desenvolvimento. Contudo, os consumidores brasileiros ainda não têm por hábito comprar flores e o consumo de crisântemo só é significativo por ocasião de datas comemorativas como o dia das mães, Natal e Réveillon, finados, dia internacional da mulher e o dia dos namorados.

O crisântemo, principal planta ornamental produzida no Brasil, é pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Asterales, família Asteraceae (Compositae) e gênero *Dendranthema* (ex *Chrysanthemum*). Possui mais de 100 espécies identificadas e 800 variedades e híbridos comercializados mundialmente. Originário de clima subtropical, tem como principal exigência climática períodos de dias curtos antes e durante a floração. As espécies que atualmente são comercializadas são originárias da Ásia. O crisântemo é uma planta ornamental com uma gama de variadas formas e cores. É mantida em diferentes condições de cultivo, ambiente protegido ou campo, sendo utilizada tanto como flor de vaso quanto de corte ou jardim (OLIVETTI et al., 1994). As flores centrais são hermafroditas e geralmente férteis (SOUZA; LOURENZI, 2012). Dentre as variedades comerciais, destacam-se os tipos: “simples” ou “margarida”; “anêmona” ou “girassol”; “pompom”; “decorativas”; “spider”, “Fuji” ou “spaghetti” e inflorescências globosas tipo “bola” (GOBATTO et al., 2013). “Margarida” é sua forma mais conhecida apresentando uma inflorescência simples onde estão presentes as flores externas. O crisântemo em condições naturais, floresce no inverno. Com técnicas e manejos adequados a produção, mantidas em estufa durante o verão e com técnicas de escurecimento é possível induzir o florescimento. Dependendo da variedade e da época do ano, as plantas devem receber iluminação noturna por até quatro semanas para estimular o crescimento vegetativo. Quando atingem cerca de 40 cm (vaso) ou 80 cm (corte), inicia-se a indução do florescimento em ambiente escuro. Esta fase pode durar de três a seis semanas. Seu ciclo produtivo dura entre 12 a 14 semanas. Para se obter mudas, estacas de tamanhos diferentes, dependendo da variedade a ser produzida, são retiradas das ponteiros das plantas matrizes (GRUSZYNSKI, 2001).

Existem duas formas de conduzir as plantas de crisântemo dependendo da variedade a ser cultivada: (i) de acordo com a quantidade de flores em cada haste; e (ii) de acordo com o número de hastes por muda. Quando se quer aumentar o número de flores por haste existem duas formas de conduzir o cultivo: (i) ‘Disbuds’, que consiste na retirada das flores secundárias prevalecendo a flor terminal; e (ii) ‘Spray’ onde é retirada a flor central possibilitando que as outras inflorescências se desenvolvam. Quando o objetivo é o aumento de número de hastes por muda, a condução pode ser realizada de duas formas: (i) haste única e (ii) hastes múltiplas, de 3 a 5 hastes por muda, estimuladas pela brotação lateral devido à retirada do meristema apical (‘Pinch’) (GRUSZYNSKI, 2001).

Suscetível a várias doenças fúngicas, o crisântemo é afetado pelas ferrugens como *Puccinia tanacetii* e *P. horiana*, tombamentos e podridões de raízes e hastes provocados por *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia* sp., murchas causadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* e *Verticillium dahliae*, manchas provocadas por *Septoria* spp. e *Alternaria* spp., oídio causado por *Erysiphe cichoracearum* e o bolor cinza causado por *Botrytis cinerea*. As doenças bacterianas também são largamente encontradas no Brasil, como as manchas provocadas por *Pseudomonas marginalis* e *P. cichorii*, galhas por *Agrobacterium tumefaciens* e podridões e murchas causadas por *Erwinia chrysanthemi* (HORST; NELSON, 1997; SONG et al., 2012). Dos principais nematoides que acometem as produções de crisântemo, podem ser citados *Aphelencooides ritzmabosi* provocando necroses foliares até a sua podridão total, e *Pratylenchus penetrans* e *Meloidogyne incognita* que provocam severas lesões radiculares. Moscas-minadoras como *Liriomyza trifolii* e *L. sativae*, tripes (*Thrips palmi*, *T. tacaci* e *Frankliniella occidentalis*), o ácaro *Tetranychus urticae*, as moscas-brancas *Bemisia tabaci* e *B. argentifolli* e os pulgões *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* são as principais pragas encontradas em cultivos de crisântemo no Brasil (HORST; NELSON, 1997; SONG et al., 2012).

Dos vírus descritos em crisântemo, podem ser citados: o *Chrysanthemum virus B* (CVB, *Carlavirus*), que induz em alguns cultivares um mosqueado e clareamento de nervuras; o *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), que induz 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: (i) um *Rhabdoviridae* não identificado, que induz faixas cloróticas nas folhas; (ii) um *Potyvirus*, que causa nanismo em *Chrysanthemum frutescens*; (iii) *Ilarvirus*, que induz desenhos cloróticos em folhas de *C. morifolium*; (iv) *Tospovirus*, com duas espécies: TSWV e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV). O TSWV induz manchas cloróticas e distorção em folhas de *C. leucathemum* e necrose em folhas e caules de *Dendranthema grandiflora*. O CSNV induz em *C. morifolium* manchas necróticas circundadas por halo clorótico nas folhas, necrose de caule e da haste floral, denominada “canela-preta” (DUARTE et al., 1995; IMENES; ALEXANDRE, 1996; HORST; NELSON, 1997). Recentemente Wang et al., (2018)

identificaram um novo carlavírus em Pequim, China, denominado Chrysanthemum virus R (CVR) detectado em crisântemos apresentando retardo no crescimento.

2.3. Viroides: propriedades, classificação e taxonomia

Considerados os menores sistemas genéticos capazes de se replicar no interior de uma célula vegetal, os viroides são constituídos por um minúsculo RNA de fita simples (ssRNA) e circular, com alta complementariedade entre suas bases nitrogenadas, lhes conferindo uma forte estrutura secundária com um tamanho que oscila entre 246 e 401 nucleotídeos. Diferente dos vírus, os viroides não codificam proteínas o que os faz depender totalmente da maquinaria de transcrição das células hospedeiras para a sua replicação e de outros fatores do hospedeiro para que possam completar as etapas de seu ciclo infeccioso: replicação, processamento, movimentos intracelulares, célula a célula e sistêmico (via floema), e os aspectos relacionados aos mecanismos de silenciamento pós-transcricional e à patogênese (indução de sintomas e alterações intracelulares). Diferentemente dos RNA satélites, os viroides não necessitam de um vírus auxiliar para estabelecer a infecção nas plantas hospedeiras (FLORES; OWENS, 2008; DING, 2009; GÓMEZ; PALLÁS, 2013; NAVARRO et al., 2013).

Considerados agentes subvirais, os viroides, entre as entidades biológicas conhecidas, são aqueles que apresentam as maiores taxas de mutação, o que pode gerar elevada e constante variabilidade genética de suas populações e, conseqüentemente, novas adaptações (GAGO et al., 2009).

Atualmente, existem pouco mais de trinta espécies de viroides descritas. Estas espécies estão divididas em duas famílias de acordo com suas propriedades biológicas e moleculares: *Pospiviroidae*, com membros que se replicam no núcleo da célula por meio de um mecanismo de círculo rolante assimétrico, sem atividade ribozimática; e *Avsunviroidae*, com espécies que 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., 2012; FLORES et al., 2014; FLORES et al., 2016; STEGER; PERREAULT, 2016; EIRAS, 2017a; 2017b). O RNA dos membros pertencentes à família *Pospiviroidae* apresenta cinco domínios: C (Central) – que contém a Região Central Conservada (CCR); P (Patogenicidade) – relacionado com a patogênese em alguns viroides; V (Variável) – onde se encontra a

maior variabilidade entre viroides similares; TL (Terminal esquerdo) e TR (Terminal direito) – localizadas nos extremos esquerdo e direito da molécula, respectivamente, e relacionados com a replicação. Por outro lado, as espécies pertencentes à família *Avsunviroidae* não possuem a região CCR e seus RNA se autoclivam por meio de ribozimas do tipo “cabeça-de-martelo” (FLORES et al., 2005; OWENS et al., 2012; NAVARRO et al., 2013). Na figura 1 estão representadas, esquematicamente, as estruturas secundárias das moléculas de RNA de viroides das duas famílias.

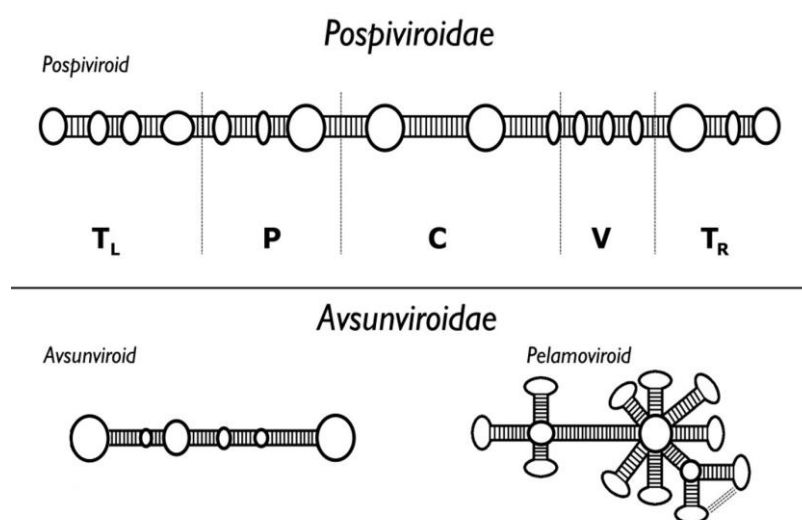


Fig. 1 – Representação esquemática das estruturas secundárias dos RNA dos viroides das famílias *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*. *Pospiviroid*, gênero tipo da família *Pospiviroidae*, apresentando molécula compacta em forma de bastão, com os cinco domínios: Central (C); Patogenicidade (P); Variável (V); Terminal Esquerdo (TL) e Terminal Direito (TR). Os gêneros *Avsunviroid* e *Pelamoviroid* são constituídos, respectivamente, por moléculas de RNA com estrutura secundária de “quase-bastão” e ramificada. Figura adaptada de Eiras (2012) e atualizada de acordo com López-Carrasco; Flores (2017).

O termo viroide (utilizado para designar um novo patógeno de plantas, distinto dos vírus, constituído por um minúsculo RNA circular que não codifica proteínas e não possui capa proteica) foi apresentado à comunidade científica no final da década de 1970 (DIENER, 1971; DIENER & RAYMER, 1967). O *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), patógeno que induz a doença conhecida como “afilamento do tubérculo da batatinha” foi identificado e caracterizado por Diener (1971), e sequenciado vinte anos mais tarde por Gross et al., no início da década de 1970. Além do PSTVd, nos anos seguintes outros viroides associados a doenças importantes foram identificados e caracterizados em diversas espécies de plantas como o *Citrus exocortis viroid* (CEVd) induzindo a “exocorte dos citros”, o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), agente causal do “nanismo do crisântemo”, o *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd), que induz o “cadang-cadang do coqueiro”,

o *Hop stunt viroid* (HpSVd), agente causal do “nanismo do lúpulo” e da “xiloporose dos citros”, e o *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), que induz o “cálico do pessegueiro” (HADIDI et al., 2003; FLORES; OWENS, 2008). Atualmente, há 29 espécies de viroides pertencentes a cinco gêneros da família *Pospiviroidae*, e 4 espécies descritas como pertencentes a 3 gêneros da família *Avsunviroidae* (Tabela 1).¹

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos viroides em famílias, gêneros e espécies com seus respectivos acrônimos, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV - <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>)

Família	Gênero	Espécie	Acrônimo
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Pospiviroid</i>	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd
		<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd
		<i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd
		<i>Columnea latent viroid</i>	CLVd
		<i>Iresine viroid 1</i>	IrVd-1
		<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd
		<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd
		<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd
		<i>Pepper chat fruit viroid</i>	PCFVd
		<i>Cocadviroid</i>	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>
	<i>Coconut tinangaja viroid</i>		CTiVd
	<i>Hop latent viroid</i>		HLVd
	<i>Citrus bark cracking viroid</i>		CBCVd
	<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i>	HpSVd
		<i>Dahlia latent viroid</i>	DLVd
	<i>Apscaviroid</i>	<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd
		<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd
		<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd
		<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd
		<i>Citrus dwarfing viroid</i>	CDVd
		<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i>	GYSVd-1
		<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i>	GYSVd-2
		<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd
		<i>Citrus viroid V</i>	CVd-V
		<i>Citrus viroid VI</i>	CVd-VI
		<i>Citrus viroid VII*</i>	CVd-VII
	<i>Coleviroid</i>	<i>Coleus blumei viroid 1</i>	CbVd-1
		<i>Coleus blumei viroid 2</i>	CbVd-2
		<i>Coleus blumei viroid 3</i>	CbVd-3
<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch viroid</i>	ASBVd
	<i>Pelamoviroid</i>	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd
		<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CChMVd
	<i>Elaviroid</i>	<i>Apple hammerhead viroid</i>	AHVd**
		<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd

*CVd-VII foi recentemente identificado e caracterizado na Austrália e deverá ser considerado uma nova espécie do gênero *Apscaviroid* (CHAMBERS et al., 2017), bem como AHVd** foi recentemente identificado e caracterizado no Canadá e deverá ser considerado uma nova espécie do gênero *Pelamoviroid* (SERRA et al., 2018).

¹ Informações mais aprofundadas sobre os diferentes aspectos da biologia, evolução e interações moleculares viroide-hospedeiro podem ser obtidas nas revisões de Eiras et al. (2006), Eiras (2010), Eiras (2017a; 2017b), Flores et al. (2012), Flores et al. (2014), Navarro et al. (2013), Palukaitis (2014), Wang; Ding (2010), López-Carrasco; Flores (2017).

O círculo de hospedeiros dos viroides é extremamente variável. Enquanto há espécies como o PSTVd, HpSVd, CEVd e o CSVd que infectam desde plantas herbáceas a lenhosas de diversas famílias botânicas, incluindo ornamentais, há viroides com círculo de hospedeiros restrito, como, por exemplo, o CCCVd que só infecta monocotiledôneas, o ASBVd que só infecta espécies de Lauraceae e o CChMVd que só infecta crisântemo (EIRAS et al., 2006). Há, por exemplo, estirpes diferentes de um mesmo viroide que podem induzir sintomas severos, brandos, ou até mesmo não induzir sintomas (latência) em uma mesma planta hospedeira, como por exemplo o CChMVd em crisântemo. Além disso, deve-se levar a temperatura em consideração quando se avalia a expressão dos sintomas induzidos por viroides (SINGH, 1983).

Normalmente, a replicação, o acúmulo de moléculas de RNA dos viroides e a expressão dos sintomas nas plantas hospedeiras são favorecidos por temperaturas elevadas. Isso explica, pelo menos em parte, a importância maior dos viroides nos cultivos protegidos e nas regiões tropicais e subtropicais. Os sintomas induzidos por esses patógenos são, normalmente, semelhantes aos induzidos por vírus, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico. Nas folhas, causam malformações, epinastia, rugosidade, manchas cloróticas e necróticas. No caule de plantas lenhosas, levam a um encurtamento dos entrenós, descoloração, caneluras, exsudação de goma e necrose. Induzem quebra de coloração e diminuição do tamanho das flores, e nos órgãos de reserva causam deformação, descoloração e necrose. Na planta como um todo, os viroides podem induzir nanismo, amarelecimento e, no caso de espécies lenhosas, definhamento da copa e morte (HADIDI et al., 2003).

As infecções, porém, muitas vezes transcorrem de forma latente, ou seja, sem que haja a expressão de sintomas perceptíveis. A latência possibilita a perpetuação dos viroides nos cultivos, além de facilitar a sua disseminação, principalmente em culturas que são propagadas vegetativamente, devido ao trânsito e comércio de mudas infectadas. Portanto, a propagação vegetativa pode ser considerada o meio mais eficiente de disseminação, embora alguns viroides, como o *Coleus blumei viroid 1* (CBVd-1), sejam transmitidos por sementes. Pode-se afirmar também que os viroides não têm vetores associados à sua transmissão, apesar de haver relatos da transmissão do PSTVd por afídeos, em condições ecológicas específicas. Nesse caso, o RNA do viroide é encapsidado pelo *Potato leafroll virus* (PLRV), vírus

transmitido por afídeos de modo circulativo (SYLLER et al., 1997; SYLLER; MARCZEWSKI, 2001).

Vale ressaltar também que os viroides, devido à sua elevada estabilidade, podem ser eficientemente transmitidos por ferramentas de corte (tesouras de poda e canivetes) contaminadas, o que tem reflexo direto em sua eficiente disseminação em muitos sistemas de cultivo, principalmente de ornamentais e frutíferas. Outra prática bastante difundida, principalmente em fruticultura, é a enxertia. Os viroides, assim como os vírus, que infectam as plantas sistemicamente através do movimento pelos vasos do floema, são também eficientemente transmitidos por enxertia (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003).

O diagnóstico precoce, por meio de métodos eficientes e confiáveis de detecção, é fundamental, principalmente para se evitar a disseminação dos viroides, via material propagativo infectado, para novas regiões produtoras. Vale reforçar que os viroides, por serem constituídos exclusivamente de RNA, têm seu diagnóstico baseado em métodos biológicos (inoculação mecânica ou enxertia em plantas indicadoras) e/ou moleculares como eletroforese em géis de poliacrilamida (PAGE), hibridização de ácidos nucleicos, transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) convencional e em tempo real. Os testes sorológicos, frequentemente utilizados no diagnóstico de vírus de plantas, não são utilizados para o diagnóstico de viroides (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003).

2.4. Principais doenças induzidas por viroides em plantas ornamentais

2.4.1. Família *Avsunviroidae*

Na família *Avsunviroidae* encontram-se as espécies de viroides que pertencem a três gêneros: *Avsunviroid*, *Pelamoviroid* e *Elaviroid* (Tabela 1). Os membros desta família não possuem a “Região Central Conservada” - CCR e seus RNA replicam-se nos cloroplastos por meio do mecanismo de círculo rolante simétrico baseado única e exclusivamente em RNA e se autoclivam por meio de ribozimas do tipo “cabeça-de-martelo” (*hammerhead*). Há um único viroide desta família que é capaz de infectar plantas ornamentais, o *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd), pertencente ao gênero *Pelamoviroid*, que foi descrito exclusivamente em crisântemo.

2.4.1.1. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd)

No final da década de 1960, nos Estados Unidos, Dimock e Geissinger descreveram uma possível “virose” no cultivar ‘Yellow Delaware’ de *Dendranthema grandiflora*, denominada “mosqueado clorótico do crisântemo”. Os sintomas dessa doença consistiam de um mosqueado leve (Figura 2), 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, quando havia recuperação das plantas, a doença era mascarada. Em 1975, Romaine e Horst sugeriram tratar-se de um possível viroide, porém somente 22 anos mais tarde Navarro e Flores sequenciaram o genoma completo, caracterizaram e descreveram a estrutura secundária em detalhes da molécula de RNA confirmando tratar-se de uma nova espécie de viroide denominada *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd). Esse viroide foi classificado no gênero *Pelamoviroid* da família *Avsunviroidae* em função de suas propriedades biológicas e moleculares, principalmente devido à presença de estruturas ribozimáticas nas moléculas de RNA de ambas as polaridades e à capacidade de se autoclicar *in vitro* e *in vivo* por meio de ribozimas do tipo “cabeça-de-martelo”. O CChMVd é constituído por um RNA de fita simples, circular, fortemente estruturado com tamanho que oscila entre 398 e 401 nucleotídeos (OWENS et al., 2012).

Sua distribuição geográfica parece limitada pois, após a primeira constatação nos EUA, houve relatos da doença somente na Dinamarca, França e Índia. É provável que isolados do CChMVd que não induzem sintomas passem despercebidos nas barreiras fitossanitárias e estejam presentes em outros países e regiões produtoras do mundo (CHO et al., 2013). O círculo de hospedeiros do CChMVd é restrito, infectando somente alguns cultivares de crisântemo (Tabela 2) como ‘Bonnie Jean’, ‘Deep Ridge’ e ‘Yellow Delaware’, além da espécie *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* cultivar ‘Clara Curtis’, espécies de crisântemo antigas e quase extintas nos dias de hoje (HORST, 1987). A transmissão experimental do CChMVd pode ser realizada por meio de inoculação mecânica com extrato de folhas infectadas sobre folhas de plantas sadias, sendo, porém, mais eficiente por meio da inoculação de preparações de RNA purificados (ROMAINE; HORST, 1975).

O controle do CChMVd depende de medidas preventivas aliadas ao monitoramento de plantas infectadas por meio de métodos de diagnóstico específicos e sensíveis.



Fig. 2 – (A) Crisântemo [*Chrysanthemum morifolium* (sin. *Dendranthema grandiflora*)] variedade 'Pelle' infectada por um isolado brasileiro do *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), apresentando mau desenvolvimento, redução drástica do tamanho da flor, (C) quebra de coloração das pétalas e nanismo; (B) e (D) são crisântemos infectados por um isolado do *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd), apresentando amarelecimento generalizado e mosqueado foliar.

2.4.2. Família *Pospiviroidae*

Os membros da família *Pospiviroidae* replicam-se no núcleo das células hospedeiras por meio de um mecanismo de círculo rolante assimétrico, baseado única e exclusivamente em RNA, possuem uma região central conservada (CCR) entre espécies do mesmo gênero e não apresentam atividade ribozimática. A molécula de RNA dos viroides desta família possui uma conformação compacta em forma de bastão e apresenta cinco domínios: C – região central da molécula, que contém a CCR; P – relacionado com a patogênese em alguns viroides; V – onde se encontra a maior variabilidade entre os viroides similares; TL e TR – localizados nos extremos esquerdo e direito da molécula, respectivamente, (Figura 1). Os seguintes gêneros pertencem à esta família: *Apscaviroid*, *Cocadviroid*, *Coleviroid*, *Hostuviroid* e *Pospiviroid* (gênero tipo).

2.4.2.1. *Citrus exocortis viroid* (CEVd)

Apesar de ser conhecido mundialmente por induzir a “exocorte”, uma importante doença em citros, o CEVd possui uma ampla gama de hospedeiros, distribuídos principalmente nas famílias Rutaceae, Vitaceae, Asteraceae Brassicaceae e Solanaceae que incluem: *Citrus* spp., *Gynura aurantiaca*, *Solanum lycopersicum*, *S. melongena*, *S. tuberosum*, *Brassica* spp., *Vicia faba* e *Vitis* spp., além das seguintes espécies ornamentais: *Chrysanthemum* spp., *Glandularia pulchella*, *Impatiens* spp., *Lycianthus rantonetii*, *Petunia* spp., *Solanum jasminoides*, *Verbena* spp. e *Zinnia elegans* (Tabela 2), esta última descrita somente em infecções experimentais. A infecção do CEVd nessas espécies ornamentais transcorre de forma latente, sem expressão de sintomas. A transmissão é feita principalmente por propagação vegetativa e práticas de enxertia, muito utilizadas em cultivos de espécies lenhosas. O viroide pode ser detectado a partir de amostras foliares submetidas à extração de RNA, seguida de PAGE, RT-PCR com oligonucleotídeos específicos ou hibridização de ácidos nucleicos. Porém, seu diagnóstico pode também ser realizado por inoculação mecânica em plantas indicadoras herbáceas, como o tomateiro e a *Gynura aurantiaca*. O CEVd, bem como a maioria dos viroides, não possui vetor conhecido que esteja associado à sua transmissão. Assim, práticas agrícolas e intercâmbio de materiais de propagação vegetativa, têm sido os principais responsáveis pela difusão do CEVd ao redor do mundo. Portanto, devido à sua eficiente transmissão por ferramentas de corte contaminadas, ao amplo círculo de hospedeiros, e à ocorrência em citros e em videira no Brasil, todo cuidado deve ser tomado para que esse patógeno não passe a ser um problema para os cultivos de ornamentais.

2.4.2.2. *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)

Durante muitos anos, a doença conhecida por “nanismo do crisântemo” 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 fitopatogênico menor e mais simples que os vírus. Essa doença foi reconhecida primeiramente nos EUA, ocasionando uma importante epidemia que durou de 1945 a 1947 (BRIERLEY; SMITH, 1951). Disseminou-se

rapidamente até o Canadá, em 1950, e depois para outros países, principalmente em regiões produtoras de crisântemo, muito provavelmente devido ao trânsito informal de material vegetal e pelo comércio de mudas (LAWSON, 1987). Quase trinta anos mais tarde, Diener e Lawson, em 1973, demonstraram que o agente causal do “nanismo do crisântemo” era um viroide, então denominado *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd).

O CSVd é 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 (Figura 3).

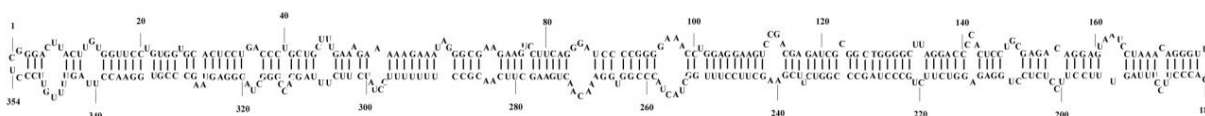


Fig. 3 – Estrutura secundária da molécula de RNA circular com 354 nucleotídeos do *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), isolado de crisântemo do estado de São Paulo [código de acesso no *Genbank* JX909290 (GOBATTO et al., 2012)].

O CSVd, quando em altas concentrações, pode afetar seriamente as plantas e as flores de diversos cultivares de crisântemo, impossibilitando sua comercialização. Como exemplo, podem ser citadas as perdas causadas, em 1987, na Austrália, que chegaram a aproximadamente 3 milhões de dólares (HILL et al., 1996). Entretanto, a severidade dos sintomas em crisântemo é variável e depende da base genética do hospedeiro e das condições de cultivo (MATSUSHITA et al., 2012; YOON et al., 2012; YOON; PALUKAITIS, 2014). Cultivares de crisântemo do tipo “pompom” parecem ser mais sensíveis em comparação aos demais tipos (BRIERLEY; SMITH, 1951; HORST et al., 1977). O sintoma mais comum é a redução do porte (nanismo) das plantas. Esse efeito é mais facilmente reconhecido quando plantas saudáveis crescem ao lado de plantas infectadas (VERHOEVEN, 2017). As folhas também podem apresentar sintomas de afilamento ou arredondamento dependendo da variedade, além de amarelecimento e redução do tamanho das flores, podendo reduzir o peso fresco em até 65%. Sintomas de mau desenvolvimento, quebra de coloração das flores e nanismo podem ser observados na Figura 2.

O círculo de hospedeiros do CSVd é amplo, abrangendo espécies de diferentes famílias botânicas, incluindo olerícolas de importância econômica como a batatinha (*Solanum tuberosum*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), o pimentão (*Capsicum annuum*), cultivares de pepino (*Cucumis sativus*), ornamentais como *Ageratum* sp., *Argyranthemum frutescens*, *Dahlia* spp., *Chrysanthemum* (sin. *Dendranthema*) spp., *Gynura aurantiaca*, *Pericallis x hybrida*, *Petunia* spp., *Senecio cruentus*, *Solanum jasminoides*, *Tithonia* sp., *Verbena* sp., *Vinca major*, *Zinnia elegans* (Tabela 2), além de espécies de plantas daninhas como *Emilia sagittata* e *Nicandra physalodes* (RUNIA; PETERS, 1980).

Matsushita; Penmetcha (2009) demonstraram que RNA lineares transcritos do CSVd são infectivos e que este viroide se replica eficientemente em muitos hospedeiros, o que explica a ocorrência frequente da doença em crisântemo. Diante deste fato, acredita-se que muitas espécies de plantas daninhas podem atuar como reservatórios naturais do CSVd, contribuindo significativamente para a manutenção da fonte de inóculo da doença em áreas cultivadas com crisântemo. Por meio de RT-PCR, o CSVd foi identificado na Eslovênia, Turquia, Egito, Japão, Coreia, China e Índia, com destaque para a detecção em espécies de crisântemo selvagens, encontradas no Japão, que não apresentavam quaisquer sintomas. Em condições naturais, infecções do CSVd têm sido relatadas em *Petunia hybrida*, *Ageratum* sp., *Dahlia* sp., *Senecio* sp., *Vinca major* e *Argyranthemum frutescens* (CHO et al., 2013). Além disso, Cho et al., (2013), testaram por meio de RT-PCR, 39 variedades de crisântemos produzidos na Itália, demonstrando que para se produzir mudas saudáveis, medidas fitossanitárias como a indexação de mudas utilizando-se métodos de detecção molecular são muito eficientes para o controle da entrada desses patógenos no campo (VERHOEVEN, 2017).

O CSVd é considerado praga quarentenária A2 na Europa, pode ser encontrado em praticamente todos os países e regiões em que o crisântemo é cultivado com descrição da ocorrência em todos os continentes (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003). No Brasil, recentemente, a ocorrência do CSVd em cultivos de crisântemo foi confirmada, no estado de São Paulo, por meio de eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (*sequential Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, SPAGE), RT-PCR e sequenciamento completo do genoma de isolados de diferentes municípios como Artur Nogueira, Atibaia e Holambra, tradicionais no cultivo e produção de plantas ornamentais. Em levantamento realizado por Gobatto et al.

(2014), demonstrou-se que o CSVd se encontra disseminado nos cultivos de crisântemo, sendo que, na maioria das vezes, as plantas infectadas não expressam sintomas, o que, de certa forma, ajuda a garantir a permanência do viroide nos sistemas de cultivo.

Apesar de não ter vetores associados à sua transmissão, devido à sua elevada estabilidade e por alcançar elevadas concentrações na planta hospedeira, o CSVd é facilmente transmitido por inoculação mecânica a partir da fricção de extrato de plantas infectadas sobre a superfície de folhas saudáveis. Além disso, é também transmitido por contato foliar, enxertia e ferramentas de corte contaminadas. De acordo com os levantamentos realizados por Gobatto et al. (2012), constatou-se que, mesmo diante do elevado nível tecnológico dos produtores de crisântemo do estado de São Paulo, é corriqueiro o convívio de muitas espécies de plantas daninhas no entorno das estufas, bem como nas entre linhas dos canteiros, tanto dos cultivos destinados à produção de mudas, como, principalmente, nos cultivos comerciais. Além disso, práticas culturais rotineiras de capina para a eliminação das plantas daninhas e a não frequente desinfecção das ferramentas podem estar associadas à manutenção do CSVd nos cultivos de crisântemo, dificultando seu controle (MATSUSHITA et al., 2009). Assim, como a maioria dos viroides, o CSVd não tem vetores conhecidos e sua transmissão via sementes verdadeiras e solo ainda não foi confirmada (CHO et al., 2013). 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 CSVd é difícil devido a fatores como: (i) facilidade de transmissão na natureza; (ii) período latente extremamente longo; (iii) propagação vegetativa; e (iv) limitação de espécies de crisântemo com resistência natural ao CSVd. Assim, 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: (i) redução do trânsito de materiais propagativos a partir das áreas de ocorrência do patógeno; (ii) programas eficientes de indexação e certificação; (iii) serviços quarentenários que sejam rigorosos e que empreguem métodos de detecção com elevada especificidade e sensibilidade; (iv) acompanhamento da cultura e eliminação de plantas infectadas; e (v) 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).

2.4.2.3. *Potato spindle tuber viroid (PSTVd)*

O PSTVd induz a doença conhecida como “afilamento do tubérculo da batatinha”. Constituído por um RNA circular com tamanho que pode variar de 356 a 360 nucleotídeos, apresenta amplo círculo de hospedeiros, com relatos de infecção de mais de 160 espécies em 13 famílias botânicas. Não há relatos da ocorrência do PSTVd no Brasil, e em função da sua importância como patógeno de batata (afilamento dos tubérculos) e de tomate (induz o “*bunchy top*” no tomateiro), é considerado praga quarentenária A1 e, portanto, medidas quarentenárias são necessariamente tomadas para evitar a sua entrada no país. Além da batata e do tomate, o PSTVd já foi descrito, em outras partes do mundo, infectando plantas de importância econômica, incluindo as seguintes espécies ornamentais: *Brugmansia suaveolens*, *Calibrachoa* spp., *Cestrum* spp., *Dahlia* spp., *Datura* sp., *Lycianthus rantonnetii*, *Petunia* spp., *Solanum jasminoides*, e *Streptosolen jamesonii* (Tabela 2). A infecção nessas espécies ornamentais transcorre de modo latente, sem indução de sintomas aparentes. A via principal de difusão do PSTVd tem sido o intercâmbio internacional de materiais de propagação vegetativa infectados, principalmente tubérculos utilizados como batata-semente. O PSTVd é facilmente transmitido mecanicamente, por meio de ferramentas de corte contaminadas, além de poder ser transmitido por enxertia, sementes verdadeiras e pólen. A transmissão por afídeos foi relatada em associação com partículas do *Potato leafroll virus* (PLRV) e parece não ter relevância epidemiológica, principalmente em culturas distintas da batata. Devido ao amplo círculo de hospedeiros, é possível que o PSTVd possa infectar muitas outras espécies, o que significa que sua entrada, em território brasileiro, poderia ser desastrosa para diferentes setores da agricultura. Vale ressaltar a frequente introdução de novas variedades de espécies ornamentais, podendo facilitar, também, a introdução do viroide em território nacional (EIRAS, 2017b).

Tabela 2 – Viroides que infectam plantas ornamentais

Viroide	Espécie de planta ornamental	Referência(s)
PSTVd	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Verhoeven et al. (2008a)
	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Calibrachoa</i> spp.	Verhoeven (2010)
	<i>Cestrum</i> sp.	Luigi et al. (2011)
	<i>Chrysanthemum</i> sp. ¹	Horst; Nelson (1997)
	<i>Dahlia</i> sp.	Tsushima et al. (2011)
	<i>Datura</i> sp.	Verhoeven (2010)
	<i>Lycianthes rantonnetii</i>	Di Serio (2007)
	<i>Petunia</i> sp.	Mertelik et al. (2009)
	<i>Solanum jasminoides</i>	Verhoeven et al. (2008a)
	<i>Streptosolen jamesonii</i>	Verhoeven et al. (2008b)
CSVd	<i>Ageratum</i> sp.	Henkel; Sanger (1995)
	<i>Argyranthemum frutescens</i>	Menzel; Maiss (2000)
	<i>Chrysanthemum</i> spp. ²	Haseloff; Symons (1981); Gobatto et al. (2014) ²
		Nakashima et al. (1997)
	<i>Cardamine bonariensis</i>	Descrito neste trabalho ²
	<i>Dahlia</i> sp.	Di Serio et al. (2014)
	<i>Gynura aurantiaca</i> ¹	Horst; Nelson (1997)
	<i>Oxalis latifolia</i>	Descrito neste trabalho ²
	<i>Pericallis x hybrida</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Petunia</i> sp.	Verhoeven et al. (1998)
	<i>Senecio cruentus</i> ¹	Horst; Nelson (1997)
	<i>Solanum jasminoides</i>	Verhoeven et al. (2006b)
	<i>Tithonia</i> sp. ¹	Horst; Nelson (1997)
	<i>Verbena</i> sp.	Bostan et al. (2004)
<i>Vinca major</i>	Bostan et al. (2004)	
<i>Zinnia elegans</i> ¹	Horst; Nelson (1997)	
CEVd	<i>Chrysanthemum morifolium</i> ¹	Duran-Vila; Semancik (2003)
	<i>Glandularia pulchella</i>	Singh et al. (2006)
	<i>Impatiens</i> sp.	Bostan et al. (2004)
	<i>Lycianthes rantonnetii</i>	Luigi et al. (2011)
	<i>Petunia</i> sp.	Van Brunschot et al. (2014)
	<i>Solanum jasminoides</i>	Verhoeven et al. (2008c)
	<i>Verbena</i> sp.	Verhoeven et al. (2008a)
<i>Zinnia elegans</i> ¹	Duran-Vila; Semancik (2003)	
CLVd	<i>Brunfelsia undulata</i>	Spieker (1996a)
	<i>Columnnea</i> spp.	Hammond et al. (1989)
	<i>Gloxinia</i> spp.	Verhoeven (2010)
	<i>Nematanthus wettsteinii</i>	Singh et al. (1992)
IrVd-1	<i>Alternanthera sessilis</i>	Singh et al. (2006)
	<i>Celosia plumosa</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Iresine herbstii</i>	Spieker (1996b)
	<i>Portulaca</i> sp.	Verhoeven (2010)
	<i>Verbena</i> sp.	Nie et al. (2005)
	<i>Vinca major</i>	Nie et al. (2005)
TASVd	<i>Cestrum</i> sp.	Verhoeven et al. (2008a)
	<i>Lycianthes rantonnetii</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Solanum jasminoides</i>	Luigi et al. (2011)
	<i>Solanum pseudocapsicum</i>	Spieker et al. (1996)
	<i>Streptosolen jamesonii</i>	Verhoeven (2010)
TCDVd	<i>Brugmansia sanguinea</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Cestrum</i> spp.	Verhoeven et al. (2012)
	<i>Lycianthes rantonnetii</i>	Verhoeven et al. (2012)
	<i>Petunia hybrida</i>	Verhoeven et al. (2007)
	<i>Pittosporum tobira</i>	Verhoeven (2010)
	<i>Solanum jasminoides</i>	Verhoeven et al. (2012)
	<i>Streptosolen jamesonii</i>	Verhoeven et al. (2012)
	<i>Verbena</i> sp.	Singh et al. (2006)
	<i>Vinca minor</i>	Singh; Dilworth (2009)
CbVd – 1, 2 e 3	<i>Coleus</i> spp. ²	Fonseca et al. (1994) ² ; Spieker et al. (1990)
HSVd	<i>Codiaeum</i> spp.	Sanger (1988)
	<i>Hibiscus</i> spp.	Sanger (1988)
DLVd	<i>Dahlia</i> spp.	Verhoeven et al. (2013)
CChMVd	<i>Chrysanthemum</i> spp.	Navarro; Flores (1997)

¹Infeccao experimental; ²Descrito no Brasil

*Parte das informaçoes contidas nesta tabela foi publicada por Gobatto; Eiras (2017).

Vale ressaltar que *Cardamine bonariensis* e *Oxalis latifolia*, apesar de não serem consideradas plantas ornamentais, foram incluídas na tabela acima (Tabela 2), pois foram identificadas no presente trabalho como potenciais hospedeiras do CSVd em cultivos de crisântemo.

2.5. Manejo e controle

De forma geral, o controle dos viroides baseia-se em medidas preventivas. Muitas dessas medidas são gerais e preconizadas para outros patógenos intracelulares (obrigatórios), incluindo os vírus de plantas. Porém, é importante que cada situação (sistema de cultivo, condições climáticas, disponibilidade e custo de tecnologia a ser aplicada, condição financeira do produtor) deve ser analisada para que se tenha sucesso no controle desses patógenos. Outro aspecto importante é com relação ao conhecimento sobre o ciclo do patógeno, que também influencia na adoção das medidas mais adequadas de controle. Abaixo, foram incluídas dez (10) medidas de manejo e controle que podem ser adotadas para a maioria dos viroides que infectam plantas ornamentais, cabendo uma avaliação da viabilidade ou não de sua aplicação, caso a caso:

(i) Utilização de sementes, mudas ou materiais de propagação vegetativa saudáveis, preferencialmente oriundos de fornecedores idôneos e, quando possível, que esses materiais vegetais sejam indexados, com certificado fitossanitário;

(ii) As instalações onde se produzem as mudas, ou onde são mantidas as plantas matrizes, devem estar localizadas em áreas preferencialmente livres de viroides, levando-se em consideração, também, o histórico da área utilizada para o plantio;

(iii) Evitar ou reduzir o trânsito e/ou intercâmbio de sementes, mudas ou material propagativo a partir de áreas de ocorrência do(s) patógeno(s);

(iv) Adoção de programas de indexação e/ou certificação que disponham de técnicas de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade;

(v) Acompanhamento periódico (de preferência diário) e rigoroso dos cultivos, visando à eliminação de plantas infectadas ou que apresentem sintomas suspeitos de infecção. Em muitos casos, pode ser interessante capacitar mão de obra especializada. No Brasil há trabalhadores treinados para fazer essas inspeções visuais, os chamados "pragueiros". Em caso de suspeita de plantas infectadas,

pode-se enviar amostra(s) para laboratórios idôneos para a identificação correta do patógeno. Uma vez constatada a presença do(s) patógeno(s), as amostras infectadas deverão ser incineradas. Em função dos viroides infectarem as plantas sistemicamente, é importante que as raízes das plantas eliminadas sejam também arrancadas e incineradas, assim como algumas plantas vizinhas, que em função da proximidade podem também estar infectadas;

(vi) Desinfecção de ferramentas utilizadas nas práticas agrícolas. Recomenda-se que se utilizem, no mínimo, pares de ferramentas durante os tratos culturais, promovendo a desinfecção de uma enquanto se utiliza a outra. A desinfecção pode ser feita em uma solução de hipoclorito de sódio a 10 %, por meio de desinfecção por autoclave (121°C por 30 minutos) ou flambagem;

(vii) Controle de acesso às casas de vegetação, com práticas rigorosas para os trabalhadores que manipulam as plantas: cumprimento de normas fitossanitárias e de biossegurança; obrigatoriedade de lavagem das mãos antes da entrada e da saída das estufas; mergulhar os pés em solução desinfetante (pedilúvio), principalmente antes de entrar nas estufas; proibição da entrada de material vegetal e de terra que não sejam previamente esterilizados; e restringir a entrada de alimentos nas estufas;

(viii) Evitar o reuso de embalagens, sacos ou vasos plásticos, sem que antes sejam devidamente lavados e desinfetados, e realizar limpeza e desinfecção completa das casas de vegetação, após o término do ciclo anual de cultivo;

(ix) Manter as plantas ornamentais e potenciais hospedeiros de viroides distantes de cultivos de solanáceas, como tomate e batata, hospedeiros da maioria dos *Pospiviroid*, e evitar manipular essas espécies antes de entrar em contato com as plantas ornamentais;

(x) Vigilância fitossanitária e serviços de quarentena (regionais, estaduais e nacionais) efetivos e que disponham de métodos de detecção com elevada especificidade e sensibilidade são fundamentais para evitar a entrada de novos patógenos, principalmente aqueles considerados pragas quarentenárias.

A utilização de material de propagação vegetativa sadio é fundamental, porém está diretamente associada ao bom desempenho de outras medidas, tais como: (i) redução do trânsito de material propagativo a partir de áreas de ocorrência do patógeno; (ii) programas de indexação e certificação que disponham de técnicas de diagnóstico com elevada sensibilidade; (iii) serviços de quarentena rigorosos com

métodos de detecção que apresentem elevada especificidade e sensibilidade; (iv) acompanhamento rigoroso dos cultivos visando à eliminação de plantas infectadas; e (v) desinfecção de ferramentas utilizadas nas principais práticas agrícolas.

No caso de culturas em que os viroides podem causar perdas, como, por exemplo, citros, batata e crisântemo, programas de indexação e certificação de materiais de propagação (gemas de plantas matrizes de citros, tubérculos que serão utilizados como “batata-semente” e mudas retiradas de plantas-matrizes de crisântemo) livres de viroides são fundamentais para o controle efetivo desses patógenos. Nos sistemas de quarentena, é importante dispor de métodos eficientes de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade para se evitar a entrada desses patógenos, principalmente aqueles considerados pragas quarentenárias A1, como é o caso do PSTVd no Brasil (VERHOEVEN, 2017).

Há estratégias envolvendo resistência genética (convencional e transgênica) para o possível controle de alguns viroides (FLORES et al., 2017). Considerando que os viroides são RNA de fita simples com estrutura secundária compacta, apresenta “loops” intercalados por toda sua molécula e sua replicação ocorre através de intermediários de dsRNA, foi desenvolvida uma estratégia utilizando uma RNase específica de dsRNA (RNase pac1). Quando linhagens de batatas transgênicas expressando pac1 foram desafiadas com um isolado de PSTVd, algumas linhagens e suas progênes ficaram livres do viroide (AXTELL, 2013). Subsequentemente, o gene que codifica a pac1 foi introduzido em crisântemo com linhas transgênicas que não exibem fenótipo em comum. Após desafiá-las por inoculação mecânica com um isolado de CSVd, todas as plantas controles que não eram transgênicas ou com baixa expressão de pac1 foram infectadas e apresentaram-se atrofiadas, enquanto que nas plantas que possuíam alta expressão da pac1 o viroide foi detectado em apenas 20% das plantas e estas ainda se mantiveram assintomáticas. Esses dados foram confirmados em um estudo posterior em que três linhagens de plantas transgênicas expressando pac1 de forma estável foram inoculadas com um isolado de CSVd. A infecção foi mais branda, com menor concentração do viroide nas plantas e um retardo no crescimento em comparação às plantas controle (LINO et al., 1991; WATANABE et al., 1995; SANO et al., 1997; ISHIDA et al., 2002; OGAWA et al., 2005).

2.6. Estado da arte dos aspectos relacionados às interações viroide-hospedeiro

Os viroides são considerados parasitas da maquinaria de transcrição celular. Apresentam similaridades estruturais e evolutivas com alguns RNA satélites de vírus de plantas, além de terem em comum a replicação via círculo rolante. Porém, são os únicos com capacidade de completar seu ciclo infeccioso de maneira autônoma, sem codificar proteínas e sem a necessidade de um vírus auxiliar, devendo interagir com fatores da célula hospedeira para completar as etapas do seu ciclo infeccioso (EIRAS, 2017a).

Buscando compreender interações moleculares viroide-hospedeiro, trabalhos pioneiros demonstraram que o PSTVd (*Pospiviroidae*) tem sua replicação mediada pela RNA polimerase II dependente de DNA (MÜHLBACH; SANGER, 1979; FLORES; SEMANCIK, 1982), e que pode formar complexos com histonas e outras proteínas (WOLFF et al., 1985; WERNER et al., 1993). Recentemente, Takeda et al. (2018) demonstraram que o loop 19 no RNA de PSTVd é importante para o movimento do viroide entre os tecidos parenquimáticos das folhas infectadas. Análises de mutações sítio-dirigidas no loop 19 indicaram também que há outras regiões da molécula do RNA do viroide que, de alguma forma, substituem a função de movimento sistêmico.

Em trabalhos envolvendo o ASBVd (*Avsunviroidae*), demonstrou-se que a síntese de RNA do viroide é catalisada por uma RNA polimerase cloroplástica codificada no núcleo da célula (NAVARRO et al., 2000). Estudos utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas permitiram deduzir que o processamento dos oligômeros de viroides da família *Pospiviroidae* eram mediados por uma RNase do tipo III, que reconhece uma estrutura palindrômica formada a partir da interação entre domínios de estrutura secundária do tipo grampo (“hairpin I”) (DARÒS; FLORES, 2004).

Gas et al. (2008), ao analisarem 16 mutantes de CEVd expressos transgenicamente em *A. thaliana*, propuseram um modelo para o processamento de viroides nucleares, onde os oligômeros são processados *in vivo* por meio de uma estrutura secundária de dupla hélice que tem sua formação facilitada pelo “hairpin I”. Os autores concluíram que o corte da molécula seria realizado por uma RNase III, enquanto sua ligação seria dependente do motivo de estrutura terciária loop E,

sendo mediada, provavelmente, por uma RNA ligase. Alguns anos depois, porém, foi demonstrado que a ligação dos monômeros lineares é feita por uma DNA ligase celular (NOHALES et al., 2012).

Recentemente, Nabeshima; Doi; Hosokawa (2017), por meio de enxertia e inoculação de CSVd mediada por *Agrobacterium*, testaram duas cultivares de crisântemo: Piato (suscetível) e Mari Kazaguruma (resistente). Nos experimentos de enxertia o viroide foi detectado em ambas as cultivares. Porém, após a remoção dos porta-enxertos infectados, o CSVd não foi detectado nas folhas superiores. Já nos experimentos utilizando *Agrobacterium*, a infecção sistêmica pôde ser detectada somente na cultivar Piato. No entanto, nas folhas agroinfectadas da cultivar Mari Kazaguruma RNA circulares de CSVd foram detectados em níveis equivalentes aos observados na cultivar Piato sete dias após a inoculação. A detecção *in situ* de CSVd nas folhas inoculadas revelou que o viroide estava ausente no floema de Mari Kazaguruma e em altas concentrações na cultivar Piato. Os autores sugerem que a resistência do CSVd na cultivar Mari Kazaguruma não está relacionada com a replicação do CSVd, mas sim com o movimento do viroide nas folhas.

No caso dos membros da família *Avsunviroidae* que, por se replicarem e se acumularem nos cloroplastos, utilizam a NEP, uma RNA polimerase cloroplástica. A atividade de ribozimas que clivam os oligômeros de ambas as polaridades *in cis*, originam os monômeros lineares (de ambas as polaridades), que são ligados por uma tRNA ligase presente nos plastídeos (NOHALES et al., 2012; FLORES et al., 2014; STEGER; PERREAULT, 2016). Experimentos de imunoprecipitação foram realizados para identificar proteínas de floema de cucurbitáceas (PP2 e CmmLec17) que interagem com o *Hop stunt viroid* (*Pospiviroidae*), auxiliando o movimento deste viroide via floema (GÓMEZ; PALLÁS, 2001; OWENS et al., 2001; GÓMEZ; PALLÁS, 2004; GÓMEZ et al., 2005). Foi caracterizada também uma proteína de tomateiro, denominada viroid RNA-binding protein 1 (Virp1), que apresenta um sinal de localização nuclear que se une a um “motivo” denominado RY, com implicação no movimento do viroide para o núcleo (GOZMANOVA et al., 2003; MARTÍNEZ DE ALBA et al., 2003; KALANTIDIS et al., 2007).

Dubé et al. (2009) identificaram proteínas que interagem com o *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd, *Pelamoviroid*, *Avsunviroidae*) por meio de hibridização *northwestern* com extrato de folhas de pessegueiro. Os autores sugeriram que uma das proteínas identificadas, o fator de alongação 1-alfa (eEF1A), deve se unir a uma

porção estruturada da molécula do PLMVd denominada P1. Estruturas presentes no RNA de diferentes viroides também têm sido caracterizadas quanto à sua possível função nos mecanismos de processamento e replicação (DELGADO et al., 2005; KOLONKO et al., 2006; GAS et al., 2007), no movimento intra e intercelular (GOZMANOVA et al., 2003; QI et al., 2004; ZHONG et al., 2008) e patogênese (DE LA PEÑA; FLORES, 2002; MALFITANO et al., 2003).

Nos trabalhos citados anteriormente, foram utilizados diferentes métodos para isolar proteínas presentes em complexo com viroides *in vitro* e/ou *in vivo*. Em uma abordagem distinta, as proteínas ribossomal L5 e o fator de transcrição IIIA (TFIIIA) foram selecionadas como candidatas a interagir com viroides nucleares, principalmente por apresentarem sítios de união ao rRNA 5S de eucariontes, incluindo o loop E, um “motivo” de estrutura terciária presente em procariontes, eucariontes e na CCR de alguns viroides da família *Pospiviroidae*, e que é conservado no PSTVd, além de estar envolvido em replicação, processamento, especificidade do hospedeiro e patogênese (DING, 2009).

Por meio de irradiação UV de folhas de tomateiro infectado pelo PSTVd, confirmou-se que o loop E não só existe *in vitro* (BRANCH et al., 1985) mas também *in vivo* (EIRAS et al., 2007; WANG et al., 2007), demonstrando ter relevância fisiológica. Resultados de ensaios de união *in vitro* demonstraram que estas proteínas de *Arabidopsis* unem-se às moléculas de polaridade positiva (+) do PSTVd com a mesma afinidade que se unem *in vivo* ao seu substrato natural, o rRNA 5S, enquanto a afinidade pelo ASBVd (+), um viroide cloroplástico que não apresenta o loop E, foi significativamente menor (EIRAS et al., 2011). A L5 está envolvida no transporte núcleo-citoplasmático do rRNA 5S, e facilitaria a exportação de moléculas de polaridade (+) do PSTVd para células vizinhas e mediaría sua passagem seletiva para o nucléolo. Por outro lado, TFIIIA é um fator de transcrição da RNA polimerase III, requerido para a transcrição do rDNA 5S e está envolvido na síntese e acúmulo de rRNA 5S. TFIIIA poderia atuar como uma ponte entre o RNA do viroide e a RNA polimerase, sendo um candidato ao envolvimento com replicação dos viroides nucleares (EIRAS et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos e coleta das amostras

3.1.1. Levantamento do CSVd em campos de crisântemo

Durante o período de janeiro de 2014 a agosto de 2016, foram coletadas trinta e seis (36) amostras de diferentes variedades de crisântemo (*Dendranthema* spp.) com suspeita de infecção de CSVd apresentando ou não sintomas de nanismo, amarelecimento e deformação foliar nos municípios de Artur Nogueira e Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil. No mesmo período, vinte e quatro amostras de crisântemo, além de uma amostra de *Oxalis latifolia* (trevo) foram coletadas em áreas de produção de crisântemo na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia. Posteriormente, em 2017, foram adquiridas, em um comércio local de flores, em Valencia, Espanha, duas amostras de variedades de crisântemo (Figura 4).

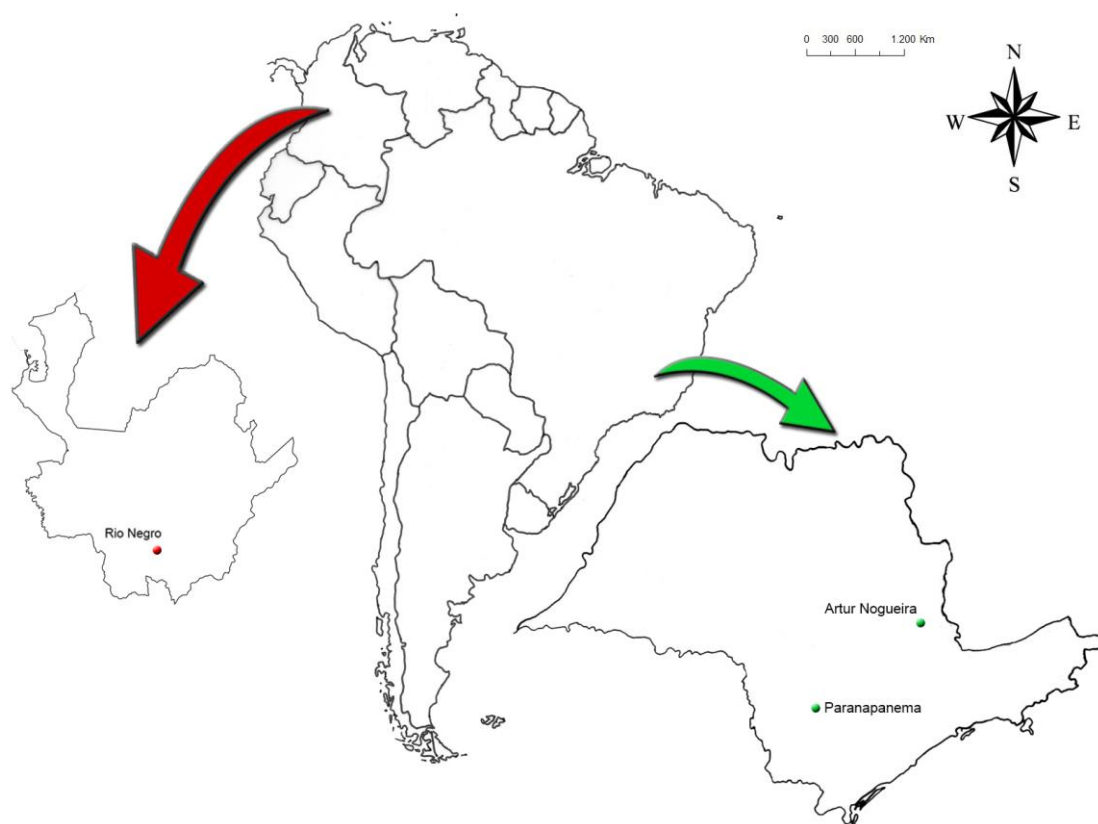


Fig. 4 – Principais regiões produtoras de crisântemo no estado de São Paulo, Brasil e Rionegro, Antioquia, Colômbia, onde foram coletadas amostras com suspeita de infecção de CSVd.

Vale ressaltar que, por questões éticas, os nomes das variedades de crisântemo coletados foram preservados para que não houvesse exposição dos produtores que colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho. Além disso, todo o material coletado foi processado em seu país de origem seguindo a Instrução Normativa Nº 39, de 27 de novembro de 2017 do MAPA, anexo XLIII - Da importação de materiais de origem vegetal para pesquisa científica e experimentação.

3.1.2. Levantamento fitossociológico em campos de crisântemo

Baseando-se no método de Braun-Blanquet (1979), diferentes espécies de plantas daninhas foram coletadas nos campos de crisântemo de dois produtores localizados na região de Artur Nogueira e Paranapanema. Utilizou-se um marcador de 1m² lançado ao acaso nas áreas selecionadas para a realização do estudo. De acordo com este método, a quantidade de lançamentos do quadrante depende do tamanho e do tipo da área analisada. Os produtores selecionados para a realização deste estudo produziam crisântemos tanto de vaso como de corte em estufa, sendo, portanto, mantido um sistema de coleta uniforme para todos. Ao lançar o quadrante, foi observado que a partir do terceiro lançamento as plantas presentes dentro do marcador se repetiam e, de acordo com o método descrito por Braun-Blanquet, o quadrante foi dispensado coletando-se todas as plantas encontradas. As plantas daninhas foram coletadas dentro das estufas, ao seu redor e nas entrelinhas de produção do crisântemo. As sementes e plantas inteiras contendo raízes foram dispostas em vasos com capacidade para 350 mL de substrato e mantidas em casa de vegetação. Após germinação, todas as plantas foram submetidas a testes moleculares para se avaliar a presença ou ausência de CSVd. As plantas daninhas coletadas foram desafiadas por inoculação mecânica, friccionando-se um extrato de folhas jovens de crisântemos infectados com CSVd (previamente testados por métodos moleculares). Trinta dias após as inoculações, as plantas foram testadas por métodos moleculares para se avaliar a presença ou ausência do CSVd.

3.2. Inoculação mecânica e círculo experimental de hospedeiros

Visando à avaliação de um amplo círculo de hospedeiros experimentais para um isolado brasileiro de CSVd, foram selecionadas plantas daninhas comumente encontradas em campos de produção de crisântemo, e espécies de plantas relatadas como hospedeiras indicadoras, de acordo com uma lista de espécies suscetíveis ao CSVd incluídas no “*Compendium of Chrysanthemum Diseases*” (HORST; NELSON, 1997). Avaliaram-se também espécies de plantas indicadoras de vírus, e uma série de espécies de plantas das famílias Asteraceae e Solanaceae, incluindo importantes espécies ornamentais produzidas no Brasil, de acordo com AGRIANUAL (2016) e com o catálogo de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil (SEBRAE, 2015a). As plantas foram obtidas por meio de sementeira em bandejas e transplantadas aproximadamente quinze dias após a germinação para vasos com capacidade de 350 mL de substrato (Figura 5). Foram selecionados cinco vasos, sendo as plantas de quatro desses vasos submetidas a inoculação mecânica. As plantas selecionadas para o teste foram inoculadas com extrato vegetal proveniente de folhas jovens de crisântemo infectado com CSVd previamente confirmada por métodos moleculares. Os extratos foram obtidos por meio da trituração, em almofariz e pistilo previamente esterilizados, destas folhas em presença de solução de sulfito de sódio 0,5%, pH 6,0 na proporção de 1:5 (g:mL), adicionando-se carbureto de silício como agente abrasivo. As inoculações foram realizadas friccionando-se o extrato vegetal infectado com pistilo de porcelana, sobre a superfície adaxial das folhas. Plantas de um dos vasos serviram como controle negativo, sendo inoculadas somente com solução de sulfito de sódio 0,5%, pH 6,0. Após as inoculações, as plantas foram lavadas com água estéril e mantidas em casa de vegetação para observações da evolução do desenvolvimento das plantas e dos sintomas. Trinta dias após as inoculações, todas as plantas apresentando ou não sintomas foram submetidas a extração de RNA com protocolo descrito por Salzman et al. (1999) com modificações e RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificação do genoma completo do CSVd (GOBATTO et al., 2014). Os produtos de DNA amplificados foram visualizados em eletroforese em géis de agarose a 1,5% em presença de brometo de etídio sob luz ultravioleta, e foram resultados negativos a ausência de bandas ou positivos a presença de bandas com tamanho esperado (354-356 pares de bases, pb).



Fig. 5 –Bandejas utilizadas para semeadura das diferentes espécies de plantas que foram desafiadas via inoculação mecânica com um isolado de *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (A). Plântulas, após serem transplantadas para vasos com capacidade de 350 mL de substrato (B). Plantas de crisântemo infectadas com CSVd mantidas em casa de vegetação e utilizadas como fonte inóculo (C).

3.3. Extração de RNA

3.3.1. Extração de RNA com cromatografia com celulose “*Whatman*” para folhas de crisântemo

As extrações dos RNA viroidais das amostras de diferentes variedades de crisântemos coletados nas regiões de Artur Nogueira e Paranapanema foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Flores et al. (1985) com modificações, baseando-se no emprego de agentes orgânicos desproteinizantes partiu-se de 5g de tecido fresco (ou congelado) de folhas jovens com suspeita de infecção viroidal, que foram macerados em almofariz (previamente esterilizado) em presença de nitrogênio líquido, a fim de se obter um pó fino. Em seguida, foram adicionados às amostras: 5mL de Tris HCl 0,2M (pH 8,9), 1,25mL de SDS 5%, 1,25mL de EDTA 0,1M (pH 7,0), 20mL de Fenol e 0,625mL 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. A fase aquosa foi transferida para tubos previamente esterilizados, sendo, em seguida, adicionados 5mL de fenol equilibrado (pH 8,0). As amostras foram novamente submetidas à 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 a um volume final de 20mL. Em seguida, foram adicionados para cada amostra 3,7mL de STE (10X), 13,5mL de Etanol (96%), e 1,25g de celulose não iônica (CF-11, *Whatman*). Os tubos 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 foi lavada por 3 vezes com uma solução contendo 30mL de STE (1X) +

EtOH 35% e submetidas à centrifugação (*Sorval RC2-B*) por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado e eluído com 10mL de STE (1X) por 5 minutos a 3000 rpm, e transferido para um tubo "Corex". Às amostras foram adicionados 5mL 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 ressuspensos com 250µL de água estéril e armazenados em microtubos (livres de *RNAse*) e mantidos a -80°C.

3.3.2. Extração de RNA para folhas de plantas daninhas

Espécies de plantas daninhas muitas vezes apresentam quantidades de polissacarídeos e outros compostos que dificultam a extração de ácidos nucleicos. Diante deste desafio, empregou-se o protocolo descrito por Salzman et al., (1999) com modificações. Este protocolo foi utilizado tanto para extração de RNA de plantas daninhas adquiridas para o estudo fitossociológico quanto para as plantas daninhas utilizadas para os estudos de círculo de hospedeiros do CSVd. Partiu-se de 0,1g de tecido vegetal, que foram macerados em almofariz previamente esterilizado em presença de nitrogênio líquido. Adicionaram-se 20µL de tampão de extração contendo 160µL de 2-mercaptoetanol, 0,08g de polivinilpirrolidona (PVP) e 8mL de solução D (isotiocianato de guanidina [4M], sarcosyl [10%], NaAc [0,75M] e água estéril em volume final para 500mL). Após homogeneizar por 1 minuto, adicionou-se 0,8mL CHCl₃:álcool isoamílico (24:1) sendo homogeneizado por 20 minutos. O conteúdo foi transferido para tubos com capacidade de 2mL e submetidos a centrifugação de 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo com capacidade para 2mL onde foram adicionados mais 0,8mL CHCl₃: álcool isoamílico (24:1), homogeneizados por 10 minutos, centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C e transferidos os sobrenadantes novamente para tubos novos. Ao sobrenadante foram acrescentados 2x o volume de EtOH e 0,1 volume de NaCl (5M), sendo submetidos a precipitação dos ácidos nucleicos a -20°C. Após 6 horas, os tubos foram submetidos a centrifugação de 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante. O precipitado foi mantido em temperatura ambiente para garantir a total evaporação do álcool. Ao precipitado foi adicionado 0,8mL de água estéril para ressuspensão. Adicionou-se ao tubo um

volume igual de Fenol:CHCl₃:álcool isoamílico (25:24:1) e homogeneizado em temperatura ambiente por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 15°C e o sobrenadante transferido para novos tubos para que os ácidos nucleicos pudessem ser precipitados a -20°C por 24 horas em presença de 2x o volume de EtOH e 0,1 volume de NaCl-5M. Os tubos foram submetidos a nova centrifugação de 13000 rpm por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado, e o precipitado ressuspendido em 10µL de água estéril. Os RNAs foram armazenados a -20°C.

3.4. Eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE)

Os RNAs extraídos foram separados mediante dupla eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida (sPAGE). Inicialmente, os ácidos nucleicos foram analisados em um gel nativo (PAGE 5%) em presença tampão TAE (1x), submetidos a uma eletroforese a 200V por 2 horas e 30 minutos, sendo em seguida visualizados sob luz ultravioleta (UV) em presença de brometo de etídio (EtBr). A região de interesse do gel de poliacrilamida, determinada com o auxílio de marcadores moleculares de DNA entre 250 e 400 pares de bases, foi cortada e cuidadosamente transferida para um segundo gel de poliacrilamida 5% TBE (0,25x), contendo Ureia 8M (condição desnaturante). Após a segunda eletroforese (25mA por cerca de 3 horas), o gel foi visualizado sob luz UV, em presença de brometo de etídio. Os ácidos nucleicos também foram precipitados em presença de nitrato de prata, permitindo aumentar a sensibilidade e a visualização de bandas que não são observadas em brometo de etídio. O gel permaneceu em uma solução de 10mL de EtOH, 0,5mL de Ácido Acético glacial e 89,5mL de água estéril, após 3 minutos em agitação o gel foi lavado duas vezes com água estéril e submetido a uma nova agitação em solução de (0,2%) de AgNO₃ por 15 minutos. Por fim, o gel foi lavado em água estéril e revelado com solução de 3g de NaOH, 96,5mL de água estéril e 0,5mL de Formaldehído (37%). Os 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 realizar a RT-PCR foram utilizados 2µL da preparação contendo aproximadamente 100ng de RNA, que foi transferido para um microtubo contendo 1µL (50pmoles/µL) do oligonucleotídeo antisense [RF-74_CSVd(c)], desenhado para anelar especificamente na parte superior da CCR do CSVd (Tabela 3). Após incubação por 1,5 min a 95°C e imediato resfriamento em gelo, foram adicionados 2,5µL de tampão da enzima transcriptase reversa (Roche), 0,5µL de dNTPs (10mM), 200 unidades (1µL) de enzima transcriptase reversa (Roche), sendo a mistura incubada por 60 min a 37°C. A seguir foi realizada a PCR, adicionando 0,2µL da enzima *Taq* DNA polimerase (Roche) na concentração de 5 unidades/µL, 0,5µL dNTPs (10mM), 8µL tampão(10x) recomendado pelo fabricante, 0,5µL de cada oligonucleotídeos específicos [RF-74_CSVd(c) e [RF-75_CSVd(s)], que amplificam o genoma completo do viroide (Tabela 3, Figura 6), 3µL de cDNA e 37,3µL de água estéril. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em géis de agarose 1,5% em presença de brometo de etídio (EtBr) sob luz ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do CSVd

Oligonucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Polaridade	Tamanho dos produtos (pb)
RF75_CSVd(s)	GGGGAAACCTGGAGGAAG	+	354-356
RF74_CSVd(c)	GGGGATCCCTGAAGGACTTCT	-	

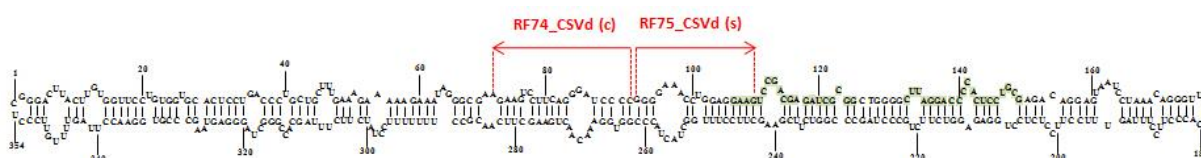


Fig. 6 - Representação da estrutura secundária da molécula de RNA circular do CSVd com a localização dos oligonucleotídeos RF74_CSVd(c) e RF75_CSVd(s) utilizados na amplificação via RT-PCR. *(s) – 'Senso' e (c) – 'Complementar'

3.6. Eluição dos fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA amplificados (~350 pb) via RT-PCR, visualizados em géis de agarose 1,5%, em presença de brometo de etídio (EtBr) sob luz ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), foram dissociadas dos géis utilizando-se um kit de eluição de produtos de PCR da *Concert Gel Extraction Systems* (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

3.7. Sequenciamento e análise das sequências

Os fragmentos de DNA amplificados foram encaminhados para sequenciamento. As sequências foram comparadas com outras depositadas no *GenBank* com o auxílio do programa BLAST do NCBI, disponível na internet. Alinhamentos múltiplos foram realizados com o programa *Clustal X 1.8*. As sequências foram analisadas com o auxílio dos programas mFold para moléculas circulares (ZUKER, 1989) e visualizadas com o programa *RNAviz* (DE RIJK; WACHTER, 1997). As sequências geradas foram posteriormente utilizadas em análises de filogenia utilizando método de *Neighbor Joining*, com análises de Bootstrap para 1.500 replicações, com auxílio do software Mega (versão 7.0).

3.8. Clonagem e inoculação mecânica de transcritos diméricos de ASBVd, PSTVd e CSVd em plantas hospedeiras

Para se compreender as possíveis interações dos viroides com possíveis proteínas dos seus hospedeiros, foram utilizados como base estudos preliminares de interação do *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) com proteínas do abacateiro (DARÒS; FLORES, 2002). Foram selecionados três viroides para o estudo destas interações: o *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), o *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), ambos pertencentes à família *Pospiviroidae* e gênero *Pospiviroid*, devido à facilidade de transmissão e por acumularem-se em elevadas concentrações em suas plantas hospedeiras, além do ASBVd, pertencente à família *Avsunviroidae* e gênero *Avsunviroid* por ser um modelo para estudos desse tipo de interação (DARÒS; FLORES, 2002). Para obter uma grande quantidade de material infectado por PSTVd, plantas de *Nicotiana benthamiana* e tomateiros (*Solanum lycopersicum*)

da variedade Marglobe foram inoculadas com um transcrito dimérico de PSTVd clonado em vetor pBdPSTVd-RG1 [040] (Figura 7).

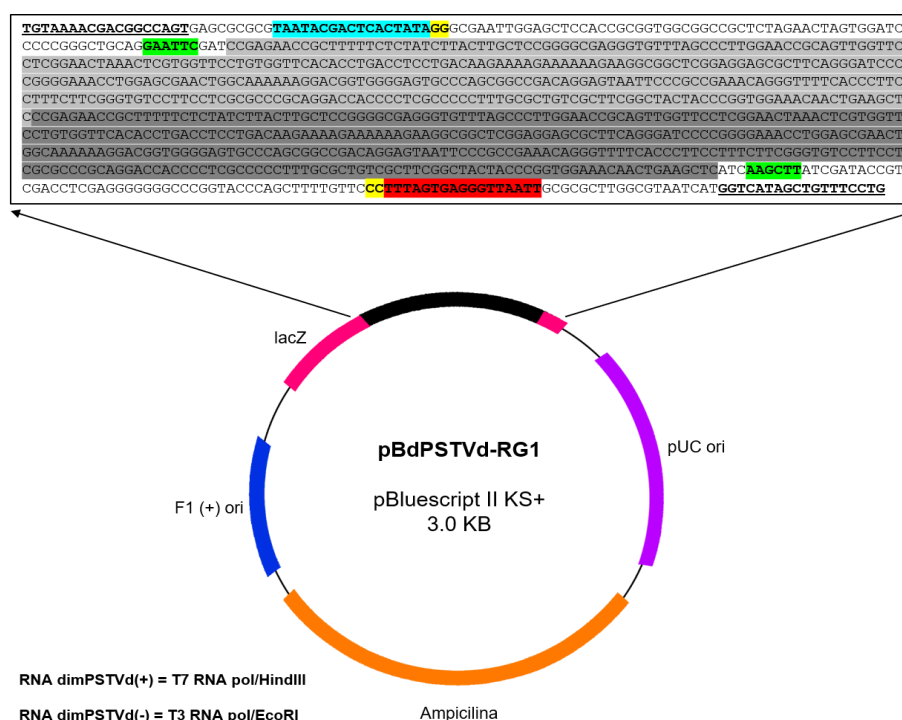


Fig. 7 - Plasmídeo pBdPSTVd contendo dois monômeros de PSTVd indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho, respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisenso encontram-se sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*HindIII* e *EcoRI*).

Células competentes de *Escherichia coli* (DH5- α) foram transformadas com o plasmídeo contendo dímeros de PSTVd por meio de eletroporação (a 1500V). Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 1mL de meio SOC [20g de Triptona, 5g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl, 2,5mL de KCl (1M), 10mL de MgCl₂ (1M) pH 7,0, NaOH e 20mL de glicose (1M)], onde as células eletroporadas permaneceram a 37°C por uma hora em agitação. Após este período, 10 μ L do meio foram dispostos em placa de Petri contendo meio LB (10g Triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl e água estéril para 1L), Ágar e Ampicilina. Após 24 horas, as colônias bacterianas foram selecionadas com palitos de madeira previamente esterilizados e dispostos em tubos de vidro contendo meio LB líquido e 10 μ L de Ampicilina, sendo os tubos mantidos em agitação por 24 horas a 37°C. O meio líquido contendo inúmeras colônias foi purificado com coluna de sílica “Zymo” (*Zymo-Spin I columns, Zymo Research, C1003-250*), de acordo com protocolo do fabricante e as concentrações mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop). Os

plasmídeos foram digeridos e linearizados com enzima específica *Hind*III da seguinte maneira: 5µL de tampão (10x), 2µL de enzima, 10µL de plasmídeo e 33µL de água estéril. Essa reação permaneceu a 37°C por uma hora. Após o período de digestão, o plasmídeo foi purificado com coluna de sílica da “Gen Jet Fermentar” (K0503) com adaptações e as concentrações mensuradas em espectrofotômetro (Nanodrop). As transcrições *in vitro* foram realizadas com a enzima T7 RNA polimerase com as seguintes especificações: 9,2µL de plasmídeo linearizado, 4µL de tampão (10x), 0,8µL de DTT (0,5M), 2µL de NTP (10mM), 1µL de inibidor de RNase, 2µL de pirofosfatase inorgânica (0,1U/µL), 2µL de T7 RNA polimerase e 19µL de água estéril. A reação permaneceu a 37°C por uma hora. Os plasmídeos de CSVd contendo um isolado brasileiro pBdCSVd-Bra [P36] (Figura 8) e o um isolado espanhol pUdCSVd+[K91] (Figura 9) foram transformados, digeridos, linearizados e transcritos de modo similar ao realizado para o plasmídeo de PSTVd, porém cada um utilizando enzimas específicas. O plasmídeo pBdCSVd-Bra [P36] foi digerido e linearizado com a enzima *Xho*I e transcrito com enzima T7 RNA polimerase, enquanto que para o plasmídeo pUdCSVd+[K91] foi digerido e linearizado com a enzima *Xba*I e transcrito com enzima T7 RNA polimerase.

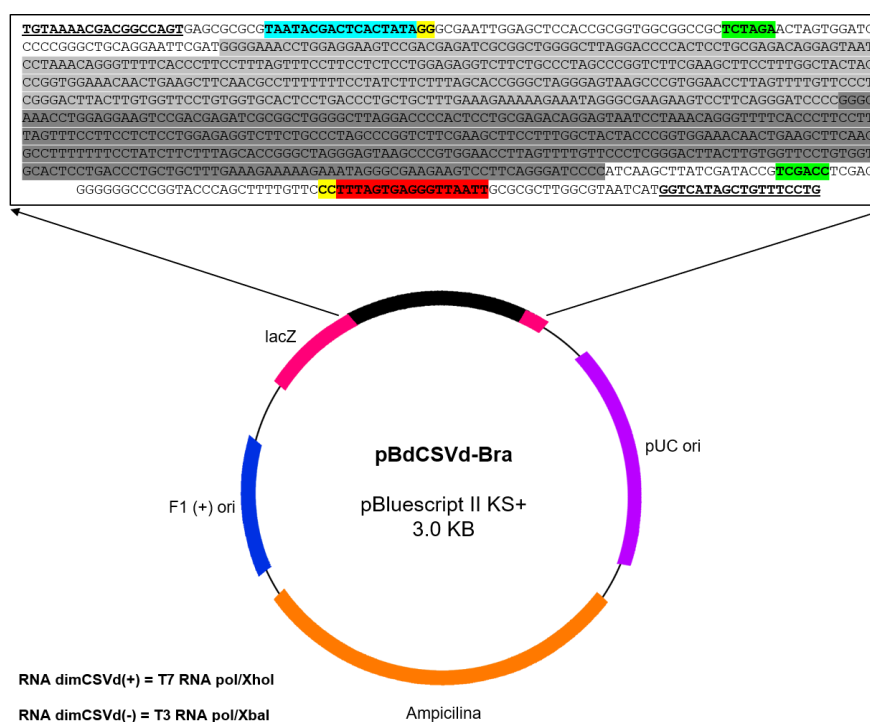


Fig. 8 - Plasmídeo pBdCSVd-Bra contendo dois monômeros de CSVd (isolado brasileiro) indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisense estão sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*Xho*I e *Xba*I).

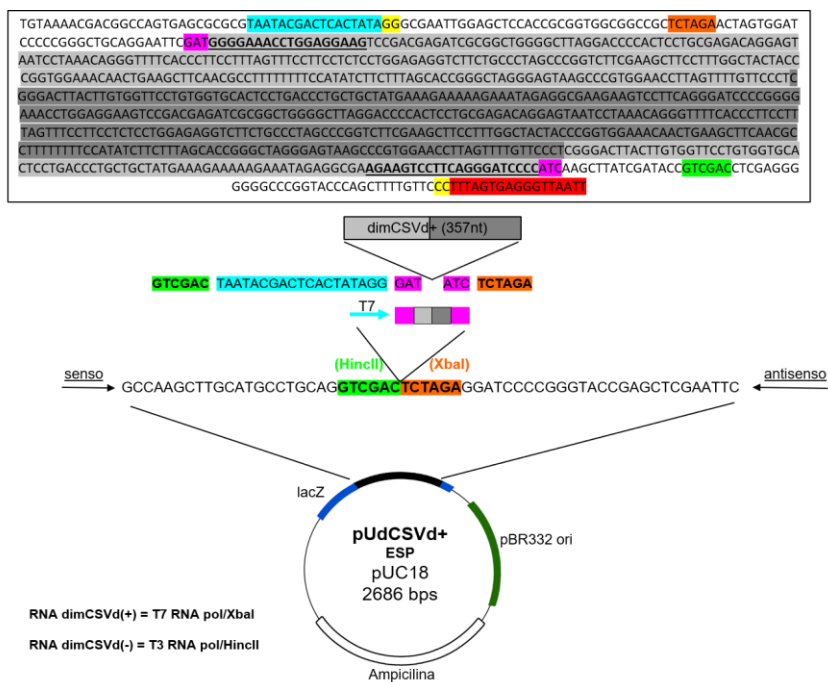


Fig. 9 - Plasmídeo pBdCSVd-Esp contendo dois monômeros de CSVd (isolado espanhol) indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisense estão sublinhados. As enzimas *HincII*, *XbaI* e *EcoRV* estão indicados nas cores verde, laranja e rosa, respectivamente.

Não houve a necessidade de realizar os mesmos procedimentos com ASBVd, uma vez que já havia abacateiros previamente infectados com plasmídeos contendo dímeros de um isolado de ASBVd clonado em vetor pBdASBVd [A28] (Figura 10).

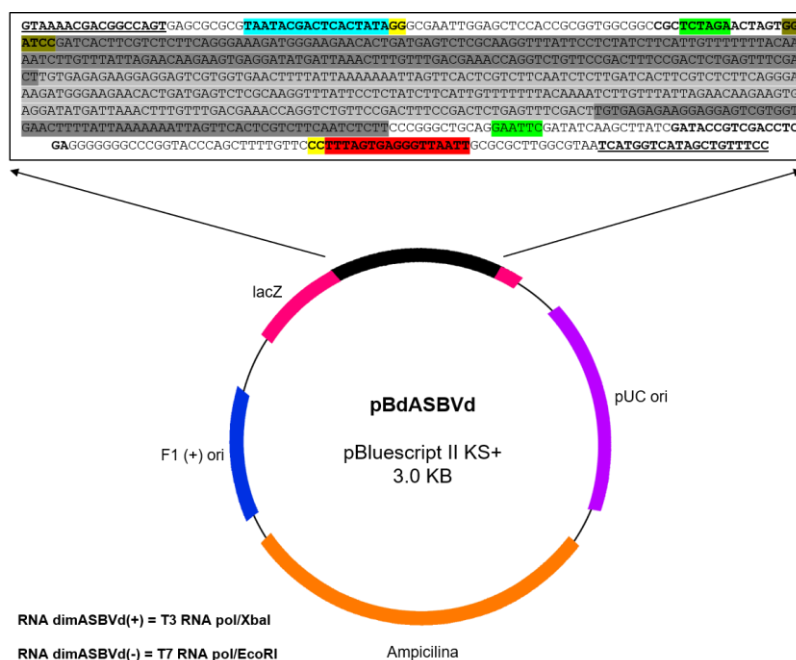


Fig. 10 - Plasmídeo pBdASBVd [A28] contendo dois monômeros de ASBVd indicados em cinza claro e cinza escuro. Os promotores T7 e T3 estão indicados pelas cores azul claro e vermelho respectivamente, acompanhados dos nucleotídeos 1 e 2 sinalizados em amarelo. Os oligonucleotídeos específicos senso e antisense estão sublinhados. Em verde estão indicados os sítios de clonagem (*XbaI* e *EcoRI*).

Para auxiliar na inoculação dos transcritos diméricos de ambos os viroides foi, inicialmente, preparada uma solução de carbureto de silício sendo adicionados a um tubo com capacidade para 2mL, 0,08mg de agente abrasivo carbureto de silício, 720µL de água estéril e 80µL de Tampão Fosfato (0,5M). Em seguida, essa mistura foi submetida a agitação vigorosa em *Vortex Mixer BV1000*.

Plantas de *N. benthamiana* e tomateiros da variedade Marglobe foram obtidas por meio de semeadura em bandejas, transplantadas 15 dias após a germinação para vasos com capacidade de 350mL de substrato e mantidas em casa de vegetação. Após 30 dias, cinco plantas de cada variedade foram selecionadas e inoculadas com os transcritos diméricos de PSTVd, e duas mantidas como controles negativos. Para a inoculação foram selecionadas duas folhas jovens e opostas de cada planta. Em cada folha aplicou-se uma microgota (5µL) de solução de carbureto de silício e 5µL de transcritos, e com o auxílio de uma barra de vidro (em movimentos suaves) promoveu-se a inoculação mecânica.

Para a obtenção de plantas jovens de crisântemo, mudas foram retiradas dos ponteiros de duas variedades de crisântemo adquiridas em comércio local na Espanha. Estas mudas foram plantadas em vasos com capacidade para 350mL de substrato e mantidas em casa de vegetação. Após 30 dias de enraizamento, 10 vasos de cada uma das variedades foram selecionados para inoculação. Cinco plantas foram inoculadas com o transcrito dimérico contendo um isolado espanhol (pUdCSVd+[K91]) e cinco plantas foram inoculadas com o transcrito dimérico contendo um isolado brasileiro (pBdCSVd-Bra[P36]). De cada uma das variedades foram selecionados dois vasos que não foram submetidos a inoculação e foram mantidos como controle negativo. As inoculações para os isolados de CSVd foram realizados igualmente para os transcritos de PSTVd. Após as inoculações, todos os vasos foram mantidos em "Fitotron" com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas escuro, e foram analisados posteriormente por métodos moleculares após 30 dias para confirmar se as plantas estavam infectadas.

3.9. Indução e purificação de adutos

Com o intuito de identificar proteínas presentes nas células vegetais que possam interagir com os RNA dos viroides, coletaram-se folhas de abacateiro infectado pelo ASBVd, *N. benthamiana* e tomateiros infectados com PSTVd e

plantas de crisântemo infectadas com CSVd. Aproximadamente 10g de cada espécie foram dispostas em bandejas contendo gelo, com a parte abaxial das folhas voltadas para cima e submetidas à indução e produção de adutos por meio de irradiação com luz ultravioleta (254nm) por 3 horas para abacateiro e 1 hora para *N. benthamiana*, tomateiro e crisântemo. A luz UV faz com que ocorram ligações covalentes entre moléculas de RNA com proteína(s) que possam estar próximas em associação ou não, nos tecidos da planta (*in vivo*). As folhas foram secas e os complexos de RNA/proteína foram purificados de acordo com o protocolo descrito por Daròs e Flores (2002) com modificações. Primeiramente, as folhas foram dispostas em tubos com capacidade de 300mL em presença de tampão "T" [0,1M de Tris-HCl (pH 9.0), 10mM EDTA, 0,1M 2-mercaptoetanol, 5M Ureia e 0,1M de NaCl] na proporção de 1:5 e trituradas com homogeneizador de amostras "Polytron". Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos e a fase aquosa foi transferida cuidadosamente para Beckers contendo 10cm² de "Miracloth" (alíquota 1). Com uma pequena barra imantada, este Becker contendo a fase aquosa foi submetido à agitação em agitador magnético onde foram adicionados Ureia e NaCl elevando a solução para 8M e 1M, respectivamente. Esta solução foi disposta em novos tubos com capacidade para 300mL e submetidos a nova centrifugação por 15 minutos a 10000 rpm. A fase aquosa foi transferida para Beckers contendo 10cm² de "Miracloth" (alíquota 2), sendo adicionado ½ volume de solução de Fenol:Clorofórmio (1:1) - Fenol previamente saturado com solução de Tris-HCl (pH 9,0) mantendo agitação por 15 minutos com auxílio de barra imantada em agitador magnético. Esta solução foi distribuída em tubos "Falcon" com capacidade de 50 mL e submetidas a centrifugação de 7500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução foi separada em três fases: aquosa, interfase e orgânica. Da fase aquosa alíquotaram-se 200µL (alíquota 3) e o restante foi descartado com o auxílio de uma pipeta de 1000mL. Já a fase orgânica foi descartada cuidadosamente com o auxílio de uma seringa e agulha para que somente a interfase fosse preservada. À interfase, onde estão presentes os complexos de RNA/proteínas, foram adicionados 10mL de Fenol:Clorofórmio (1:1) [saturado com Tris-HCl (pH 9.0)] e 10mL de tampão contendo 8M Ureia, 1M NaCl, 10mM EDTA, 0,1M 2-mercaptoetanol e 0,1M Tris-HCl (pH 9,0) e submetida a agitação vigorosa por meio de *Vortex Mixer BV1000* e centrifugação a 7500 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente separou-se a solução em três fases e da fase aquosa foram alíquotados 200µL

(alíquota 4), sendo o restante descartado com o auxílio de uma pipeta de 1000mL e a fase orgânica descartada cuidadosamente com o auxílio de uma seringa e agulha, preservando a interfase. Foram adicionados ao tubo contendo a interfase 10mL de tampão contendo 0,1M NaCl, 10mM EDTA, 0,1M 2- mercaptoetanol, 0,1M Tris-HCl (pH 9.0) e 1% SDS e submetido a agitação vigorosa por meio de *Vortex Mixer BV1000*. O conteúdo foi transferido para um tubo de vidro com capacidade para 12mL, retirou-se uma alíquota de 200µL (alíquota 5) e foi adicionado 1 volume de Isopropanol, selado com parafilme e mantido em -20°C por duas horas para precipitação. Os complexos de RNA/proteína foram precipitados por meio de centrifugação a uma rotação de 8000 rpm por 30 minutos a -4°C onde do sobrenadante e o restante descartado. O precipitado foi lavado com Etanol 70% e, depois de seco, foi ressuscitado com 200µL de tampão contendo 8M Ureia, 25mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM 2- mercaptoetanol e 25mM de Tris-HCl (pH 9,0), 1% NP40 e 0,1% de SDS. Uma pequena alíquota de 10µL foi separada para ser avaliada em eletroforese em gel de acrilamida “teste” para aferir se a extração foi realizada com êxito mantendo os complexos de RNA/proteína (alíquota 6). Os adutos foram separados por dupla eletroforese em géis de poliacrilamida e eluídos por difusão. Após a eluição, os tubos contendo os precipitados foram secos e encaminhados ao laboratório de proteômica da Universidade de Valencia (SCSIE), ProteoRed, Espanha. Estes precipitados foram ressuscitados em 20µL de 0,5M ABC (bicarbonato de amônio) e os resíduos de cisteína foram reduzidos por DTT 2mM (DL-Ditiotreitol) em ABC 50mM a 60°C por 20 min. Os grupos sulfúricos foram alquilados com 5mM de IAM (iodoacetamida) em ABC 50mM em ambiente escuro e a temperatura ambiente durante 30 min. As amostras foram submetidas a digestão com tripsina modificada da Promega com 300ng (100ng/µL) em ABC 50mM a 37°C durante a noite e a reação foi interrompida com TFA (ácido trifluoroacético) a uma concentração final de 0,1%. As amostras foram submetidas a análise de perfis proteicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês: *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e espectrometria de massas, e os perfis proteicos foram analisados e comparados com outros perfis de busca do tipo MASCOT (*Matrix-Science*) em dois bancos de dados, Expsy e NCBI.

3.10. Síntese de ribossondas e hibridização *Northern-blot*

Para se obter sondas radioativas de polaridade negativa (~50U/ μ L) para a detecção por hibridização *Northern-blot* dos viroides (ASBVd, PSTVd e CSVd), foram adicionados em microtubo: 1 μ L de plasmídeo linearizado, 2 μ L de tampão (10x), 0,4 μ L de DTT (0,5M), 1 μ L de ATP, CTP, GTP (10mM), 1 μ L de UTP [α -³²P] (800 Ci/mmol), 0,5 μ L de inibidor de RNase (~40U/ μ L), 1 μ L de pirofosfatase inorgânica (0,1U/ μ L), 1 μ L de RNA polimerase T3 ou T7 dependendo do plasmídeo, e água estéril para um volume final de 20 μ L. Após período de incubação de 30 minutos a 37°C, foram adicionados 0,4 μ L de DNase (livre de RNase) (50U/ μ L) seguido por 10 minutos a 37°C. A seguir, a preparação foi purificada em uma minicoluna *Sephadex G-50* (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante (essas colunas são utilizadas para purificar sondas radioativas por exclusão molecular, que visa eliminar nucleotídeos radioativos não incorporados). A radioatividade da sonda foi estimada por meio de leitura em contador de cintilações (*Liquid Scintillation Counter*, Wallac 1409, Pharmacia). A sonda para detecção de ASBVd apresentou 2.475.022,4cpm/ μ L, para detecção de PTVd 1.443.552,3cpm/ μ L, e para a detecção de CSVd apresentou 402.366,8cpm/ μ L. Para a hibridização *Northern-blot*, após eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), 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* (Hoefer), as membranas foram fixadas com luz ultravioleta (*UV crosslinker UVC500* [Hoefer] com um pulso de 1200 [x100 μ J/cm²]) por 1 minuto. A pré-hibridização (bloqueio) foi realizada em solução de hibridização (0,25V de SSC 2X+ 0,1V de SDS 0,1%+ 0,5V de formamida + 10mg/mL de DNA de esperma de salmão + 0,1V de Ficoll 0,1% + 0,1V de PVP 0,1%) por 1 hora a 70°C. As hibridizações foram realizadas adicionando-se 1 μ L da sonda de RNA (ribossonda), previamente desnaturada a 95°C por 1 minuto e 30 segundos e imediatamente colocada em gelo, em 5mL de solução de hibridização, permanecendo a 70°C por 12 horas. Após esse período, as membranas foram lavadas três vezes em presença de tampão de lavagem SSC 2X e 0,1% de SDS durante 15 min a temperatura ambiente, e uma vez com tampão de lavagem SSC 0,1X e 0,1% SDS a 55°C por 15 minutos. Em seguida,

as membranas foram mantidas em contato com filmes de raio-X (Kodak) e, finalmente, reveladas de acordo com as recomendações do fabricante.

3.11. Eluição de complexos de RNA/proteína de géis de poliacrilamida

Os fragmentos (bandas de interesse visualizadas no gel de poliacrilamida) foram cortados com o auxílio de um bisturi e transferidos para tubos com capacidade de 15mL. Inicialmente, adicionaram-se 5mL de TEP, um tampão de eluição que contém 1M de Tris-HCl (pH 9,0), 0,5mM de EDTA (pH 8,0), 0,1M de 2-mercaptoetanol, 1% de SDS e 1mL de Fenol:Clorofórmio (1:1 pH 9.0). Este tubo foi selado com parafilme e mantido em agitação vigorosa em *Fine PCR Rotator-AG* por 12 horas. Em seguida, o tubo foi submetido a centrifugação por 5 minutos a 8000 rpm em temperatura ambiente com a finalidade de separar os pedaços de acrilamida da fase aquosa. Esta fase aquosa foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de 1000mL, transferida para tubo com capacidade de 15mL e, ao tubo que já continha acrilamida, foi adicionado mais 1mL do tampão TEP. Este tubo foi submetido a agitação vigorosa em *Vortex Mixer BV1000* e centrifugação por 5 minutos a 8000 rpm em temperatura ambiente. A fase aquosa foi retirada cuidadosamente e transferida junto a fase aquosa da primeira centrifugação. Todo o conteúdo correspondente à(s) fase(s) aquosa(s) foi transferido por uma coluna GEN-1SBM-40 Proteus '1-Stepbatch' (Generon) para se reter o máximo de acrilamida possível. O conteúdo foi precipitado com 0,1 volume de NaAc 3M (pH 5,5) em presença de 1 volume de isopropanol.

3.12. Impactos na produção: estudo de caso

Um questionário foi elaborado para servir de base para se estimar as possíveis perdas econômicas, como consequência da presença do CSVd nos cultivos de crisântemo. As avaliações levaram em consideração o período de um ano de produção em um sistema de cultivo de crisântemo. Este questionário foi aplicado para o principal produtor e exportador de crisântemo de corte localizado em Rionegro, Antioquia, Colômbia, em uma área de 60 hectares de estufas, com controle de temperatura, irrigação e fotoperíodo, produzindo crisântemos de corte com nível elevado de tecnificação e mão de obra especializada. Foram avaliados os

seguintes parâmetros: redução do vigor, produção e qualidade de flores e custos para o controle do CSVd, porcentagem de plantas erradicadas e utilização de mão de obra qualificada para o controle da doença e as perdas econômicas que as infecções pelo CSVd podem causar (Tabela 4). O estudo de caso foi realizado com o auxílio de plataforma Excel.

Tabela 4 – Questionário aplicado em propriedade produtora de crisântemo de corte, localizado em Rionegro, Antioquia, Colômbia, destinado para se mensurar as perdas gerais causadas pelo CSVd

1. Qual o tamanho da propriedade avaliada?
 2. Qual o número de canteiros existentes por hectare?
 3. Qual o tamanho dos canteiros?
 4. Quantas mudas são plantadas por canteiro?
 5. Qual a eficiência esperada no final do plantio, levando-se em consideração o número de talos exportáveis por canteiro?
 6. Quantos ciclos são realizados por ano?
 7. Qual o grau de perdas gerais, levando-se em consideração o número de talos descartados por perdas gerais?
 8. Qual a porcentagem de talos erradicados com suspeita de infecção pelo CSVd?
 9. Há a utilização de mão de obra qualificada para a identificação do CSVd no campo?
 10. Qual o valor de venda dos talos exportados?
-

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e caracterização de isolados do CSVd no Brasil e na Colômbia

4.1.1. Identificação dos isolados de CSVd via sPAGE e RT-PCR

Por meio de análises moleculares (sPAGE e RT-PCR), o CSVd foi identificado em 27 amostras coletadas no Brasil, 6 amostras coletadas na Colômbia e nas duas amostras adquiridas em comércio local de flores em Valencia, Espanha (Tabela 5). Os resultados obtidos via sPAGE e RT-PCR para todas as amostras avaliadas neste trabalho foram incluídos no Apêndice A.

Tabela 5 – Amostras de crisântemo com suspeita de infecção pelo CSVd coletadas durante o período de janeiro de 2014 a agosto de 2016, nos principais polos de produção e distribuição de mudas de crisântemo no Brasil e na Colômbia, além de amostras adquiridas, em 2017, em um comércio local de flores em Valencia, Espanha.

Local de coleta das amostras	sPAGE/RT-PCR		Número total de amostras
	(+) CSVd	(-) CSVd	
Artur Nogueira, SP, Brasil	26	6	32
Paranapanema, SP, Brasil	1	3	4
Rionegro, Antioquia, Colômbia	6	19	25*
Valencia, Espanha	2	0	2

*Das 25 amostras coletadas na Colômbia, identificou-se o CSVd em uma amostra de trevo (*Oxalis latifolia*) com sintomas de mosaico e deformação foliar.

4.1.2. Sequenciamento e análise filogenética

Os fragmentos de DNA amplificados, que apresentaram bandas com tamanho de cerca de 350pb foram dissociados dos géis de agarose (1,5%) e encaminhados para sequenciamento. As sequências obtidas foram submetidas a alinhamentos múltiplos com o auxílio do programa *Clustal X 1.8* e comparadas com outras sequências depositadas no *GenBank* com o auxílio do programa BLASTn do NCBI. Quando comparadas com outras sequências de genomas completos do CSVd depositados no *GenBank* (dados não disponibilizados), foram observadas porcentagens de identidade de nucleotídeos que variaram de 92 a 100%. As sequências obtidas neste trabalho foram depositadas no banco de dados genômicos (*GenBank* NCBI) (Tabela 6).

Tabela 6 – Isolados de *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) coletados em duas regiões do estado de São Paulo, Brasil, e na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia, que foram sequenciados neste trabalho, com as sequências de nucleotídeos depositados no *GenBank*

Nº de sequências	Nome	Origem	COD: <i>GenBank</i>	Nº de bases
1	2215-BR	Artur Nogueira	KU535579	354
2	2216-BR	Artur Nogueira	KU535580	354
3	2217-BR	Artur Nogueira	KU535581	354
4	2218-BR	Artur Nogueira	KU535582	354
5	2219-BR	Artur Nogueira	KU535583	354
6	2220-BR	Artur Nogueira	KU535584	354
7	2221-BR	Artur Nogueira	KU535585	354
8	2222-BR	Paranapanema	MF359692	354
9	2223-BR	Artur Nogueira	MF359693	355
10	2224-BR	Artur Nogueira	MF359694	354
11	2225-BR	Artur Nogueira	MF359695	356
12	2226-BR	Artur Nogueira	MF359696	356
13	2227-BR	Artur Nogueira	MF359697	354
14	2228-BR	Artur Nogueira	MF359698	354
15	2229-BR	Artur Nogueira	MF359699	354
16	2230-BR	Artur Nogueira	MF359700	356
17	2231-BR	Artur Nogueira	MF359701	354
18	2232-BR	Artur Nogueira	MF359702	354
19	2233-BR	Artur Nogueira	MF359703	354
20	2234-BR	Artur Nogueira	MF359704	354
21	2235-BR	Artur Nogueira	MF359705	354
22	2236-BR	Artur Nogueira	MF359706	354
23	2237-BR	Artur Nogueira	MF359707	354
24	2238-BR	Artur Nogueira	MF359708	354
25	2239-BR	Artur Nogueira	MF359709	354
26	2240-BR	Artur Nogueira	MF359710	354
27	2241-BR	Artur Nogueira	MF359711	354
28	2242-CO	Rionegro	MF359712	354
29	2243-CO	Rionegro	MF359713	354
30	2244-CO	Rionegro	MF359714	354
31	2245-CO	Rionegro	MF359715	354
32	2246-CO	Rionegro	MF359716	354
33*	2247-CO	Rionegro	MF359717	354

**Oxalis latifolia* coletada em campos de crisântemo em Rionegro, Antioquia, Colômbia

Os isolados de CSVd de crisântemo, que foram adquiridos em comércio local de Valencia, Espanha, foram sequenciados, mas não foram depositados no *GenBank*, pois estão sendo analisados para um possível emprego em estratégia de controle do CSVd via proteção cruzada (*cross-protection*), com potencial de geração de patente. Portanto, essas informações não foram incluídas nesta tese e ainda não serão publicadas.

A análise do alinhamento múltiplo dos variantes de sequência do CSVd permitiu a observação de mutações, que se distribuíram no genoma dos diferentes isolados, de diferentes origens e regiões geográficas (Figura 11).


```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120     *
2227_BR : .....T.....C..... : 123
FR_Argyran : .....T.....C..... : 123
CN.3 : .....T.....C..... : 123
2214_BR : .....AG..... : 123
2241_BR : .....AG..... : 123
CN.1 : .....AG..... : 123
JP.2_Dahli : .....AG..... : 123
DE.2_Agera : .....AG..... : 123
US.3_Petun : .....AG..... : 123
2234_BR : .....AG..... : 123
2230_BR : .....TG..... : 125
2222_BR : .....G..... : 123
2229_BR : .....G..... : 123
2223_BR : .....C.G..... : 124
2225_BR : .....C.G..... : 123
2226_BR : .....C.G..... : 125
2228_BR : .....A.....C..... : 123
AU : .....A.AC..... : 123
US.1 : .....A.AC..... : 123
JP.1 : .....A.AC..... : 123
KR.1 : .....A.AC..... : 123
JP.5_Solan : .....A.A..... : 123
IN.2 : .....A.A..... : 124
2217_BR : .....A.A..... : 123
DE.3 : .....A.A..... : 123
KR.2 : .....A.A..... : 123
JP.4_Solan : .....A.A..... : 123
IT_Argyran : .....A.A..... : 123
HU : .....A..... : 123
JP.3 : .....A..... : 123
CN.2 : .....A..... : 123
BE.2_Argyr : .....A..... : 123
2221_BR : .....A..... : 123
AT_Solanum : .....A..... : 123
BE.1_Solan : .....A..... : 123
IN.1_Argyr : .....A..... : 123
NL_Solanum : .....A..... : 123
CA_Vinca_m : .....TA..... : 124
US.2 : .....TA..... : 123
CGGGACTTACTTGTGGTTCCTGTGGGGCCTCTCGACCCCTGCTGgACTTtTgAAGAAAGAAAtgAGGGAGAGAGTcGgCTTCAGTgaggaTCCCGGGGAACCTGGAGGAATCCGACGAGAtCGC

140      *      160      *      180      *      200      *      220      *      240      *      260
2227_BR : .....T.....C..... : 254
FR_Argyran : .....T.....C..... : 254
CN.3 : .....T.....C..... : 254
2214_BR : .....A..... : 254
2241_BR : .....A..... : 254
CN.1 : .....A..... : 254
JP.2_Dahli : .....G.....C..... : 254
DE.2_Agera : .....T..... : 254
US.3_Petun : .....T..... : 255
2234_BR : .....T..... : 254
2230_BR : .....T..... : 256
2222_BR : .....T..... : 254
2229_BR : .....T..... : 254
2223_BR : .....T..... : 255
2225_BR : .....T..... : 254
2226_BR : .....T..... : 256
2228_BR : .....T..... : 254
AU : .....T..... : 254
US.1 : .....T..... : 254
JP.1 : .....T..... : 254
KR.1 : .....T..... : 254
JP.5_Solan : .....T..... : 254
IN.2 : .....G..... : 255
2217_BR : .....G..... : 254
DE.3 : .....G..... : 254
KR.2 : .....G..... : 254
JP.4_Solan : .....C..... : 254
IT_Argyran : .....C..... : 254
HU : .....C..... : 254
JP.3 : .....C..... : 254
CN.2 : .....C..... : 254
BE.2_Argyr : .....C..... : 254
2221_BR : .....G..... : 254
AT_Solanum : .....A..... : 254
BE.1_Solan : .....A..... : 254
IN.1_Argyr : .....T..... : 254
NL_Solanum : .....T..... : 254
CA_Vinca_m : .....T..... : 254
US.2 : .....T..... : 254
GGcTGGGGcCTTAGGACCCCACTCCTGGGAGACAGGAGTAATCCTAaCaGGGTTTTcACCCTTCTCTAGTTCCTTCCTCCTCCTGGAGAGTCTTCGCCCTAGCCGGTCTTCGAAGCTTCTTGGcT

*      280      *      300      *      320      *      340      *      360
2227_BR : .....T..... : 354
FR_Argyran : .....A..... : 355
CN.3 : .....A..... : 354
2214_BR : .....T..... : 354
2241_BR : .....T..... : 354
CN.1 : .....T..... : 354
JP.2_Dahli : .....T..... : 354
DE.2_Agera : .....T..... : 354
US.3_Petun : .....T..... : 355
2234_BR : .....T..... : 354
2230_BR : .....T..... : 356
2222_BR : .....T..... : 354
2229_BR : .....T..... : 354
2223_BR : .....T..... : 355
2225_BR : .....T..... : 354
2226_BR : .....T..... : 356
2228_BR : .....T..... : 354
AU : .....T..... : 354
US.1 : .....T..... : 355
JP.1 : .....T..... : 354
KR.1 : .....T..... : 354
JP.5_Solan : .....T..... : 354
IN.2 : .....T..... : 355
2217_BR : .....T..... : 354
DE.3 : .....T..... : 354
KR.2 : .....T..... : 354
JP.4_Solan : .....T..... : 354
IT_Argyran : .....T..... : 354
HU : .....T.....A..... : 354
JP.3 : .....T.....A..... : 354
CN.2 : .....T.....A..... : 354
BE.2_Argyr : .....T.....A..... : 354
2221_BR : .....T.....A..... : 354
AT_Solanum : .....T.G..... : 354
BE.1_Solan : .....T.G..... : 354
IN.1_Argyr : .....A.G.G..... : 354
NL_Solanum : .....T.G..... : 354
CA_Vinca_m : .....T.G..... : 355
US.2 : .....T.G..... : 354
ACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACGCCCTTTTTTtCcaATCTTCTTAGCACCCGGGCTAGGGAGTAAGCCCGTGGACCTTaGtTtTGTTCCTT

```

Fig. 11 – Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos dos isolados brasileiros e colombianos de CSVd, seqüenciados neste trabalho, com outros variantes de seqüência de CSVd com genomas completos depositados no *GenBank*. Os códigos de acesso do *GenBank* dos isolados brasileiros utilizados nas análises foram incluídos na Tabela 6.

Nas análises das sequências, representadas em sua estrutura secundária, dos isolados de CSVd sequenciados neste trabalho (Tabela 5), observaram-se mutações que se concentraram principalmente em regiões de “loops” nos domínios C e P da molécula do viroide (Figura 12). Análises como esta haviam sido realizadas para sete isolados de CSVd, provenientes do estado de São Paulo (GOBATTO et al., 2012a; GOBATTO et al., 2014), sendo observadas modificações em resíduos localizados em sua maioria em “loops” no motivo P, e em menor proporção nos domínios C e TR.

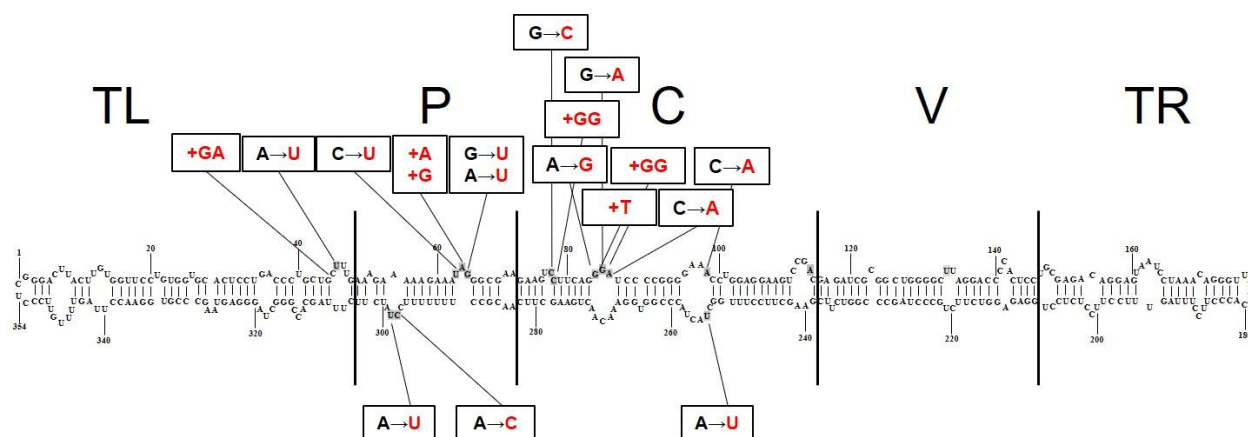


Fig. 12 – Estrutura secundária de mínima energia livre a 24°C, obtida com os programas mFold e RNAviz, para o isolado 2214-BR de CSVd (acesso *GenBank* JX909290) com 354 nucleotídeos, sequenciado por Gobatto et al. (2012a; 2014). As alterações de resíduos entre os isolados caracterizados neste trabalho (códigos de acesso no *GenBank* descritos na Tabela 6) e o isolado de CSVd sequenciado por Gross et al. (1982) (acesso *GenBank* M19506) estão indicadas em vermelho. Os domínios TL (Terminal esquerdo), P (Patogenicidade), C (Central), V (Variável) e TR (Terminal direito) estão indicados.

Observou-se, nas análises filogenéticas, a formação de 3 grupos principais com os isolados brasileiros de CSVd distribuídos nesses grupos, juntamente com outros variantes de sequência do CSVd provenientes do Japão, China, Alemanha, Estados Unidos, França, Coreia do Sul, Áustria, Bélgica, Índia, Holanda, Canadá, Itália e Hungria (Figura 13). Vale ressaltar que os variantes com sequências completas idênticas, tanto dos isolados depositados no *GenBank* quanto dos obtidos neste trabalho, foram suprimidas das análises, sendo mantida somente uma sequência como referência (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação de variantes de sequência de CSVd com sequência(s) de nucleotídeos idêntica(s) aos variantes de sequência considerados referência depositados no *GenBank*.

Variantes de sequência referência e código de acesso no <i>GenBank</i>	Variantes de sequência idênticos
2255-ES (sequência não depositada no <i>Genbank</i>)	Nenhum
JP.2 (AB055974)	Nenhum
2241-BR (MF359711)	2248/2250/2251/2252/2253
2214-BR (JX909290)	Nenhum
CN.1 (JQ809255)	Nenhum
DE.2 (Z68201)	Nenhum
US.3 (U82445)	Nenhum
2234-BR (MF359704)	2235/2236/2237/2238/2239/2240/2242/2243/2244/2245/2246/2247
2230-BR (MF359700)	2231/2232
2228-BR (MF359698)	Nenhum
2222-BR (MF359706)	Nenhum
2229-BR (MF359699)	Nenhum
2226-BR (MF359696)	Nenhum
2223-BR (MF359693)	Nenhum
2225-BR (MF359695)	Nenhum
2227-BR (MF359697)	2218/2219/2220/2233
CN.3 (HQ891018)	CN.4
FR (JF938538)	Nenhum
JP.5 (LC090814)	Nenhum
KR.1 (LC088322)	Nenhum
US.1 (LC192457)	US.3 a US.40
JP.1 (D88895)	JP.6/ JP.7
AT (JF414238)	Nenhum
BE.1 (HG739080)	Nenhum
IN.1 (FN669536)	IN.3/IN.4/IN.5/IN.6
NL (DQ406591)	Nenhum
CA (DQ094298)	Nenhum
US.2 (AJ001849)	US.41 a US.64
DE.3 (X16408)	DE.1/DE.4
2221 BR (KU535585)	Nenhum
IN.2 (FN673553)	IN.7/IN.8/IN.9/IN.10/IN.11/IN.12/IN.13/IN.14
CN.2 (HQ891019)	Nenhum
JP.4 (LC090813)	JP.8/JP.9/JP.10/JP.11/JP.12
BE.2 (HG739079)	BE.3/BE.4
2217 BR (KU535581)	Nenhum
IT.1 (JQ685734)	IT.2/IT.3/IT.4/IT.5/IT.6/IT.7/IT.8/IT.9/IT.10/AU.1/AU.2/AU.3
KR.2 (KC345440)	KR.3/KR.4
HU (AJ000046)	Nenhum
JP.3 (AB279768)	JP.13/JP.14/JP.15/JP.16/JP.17

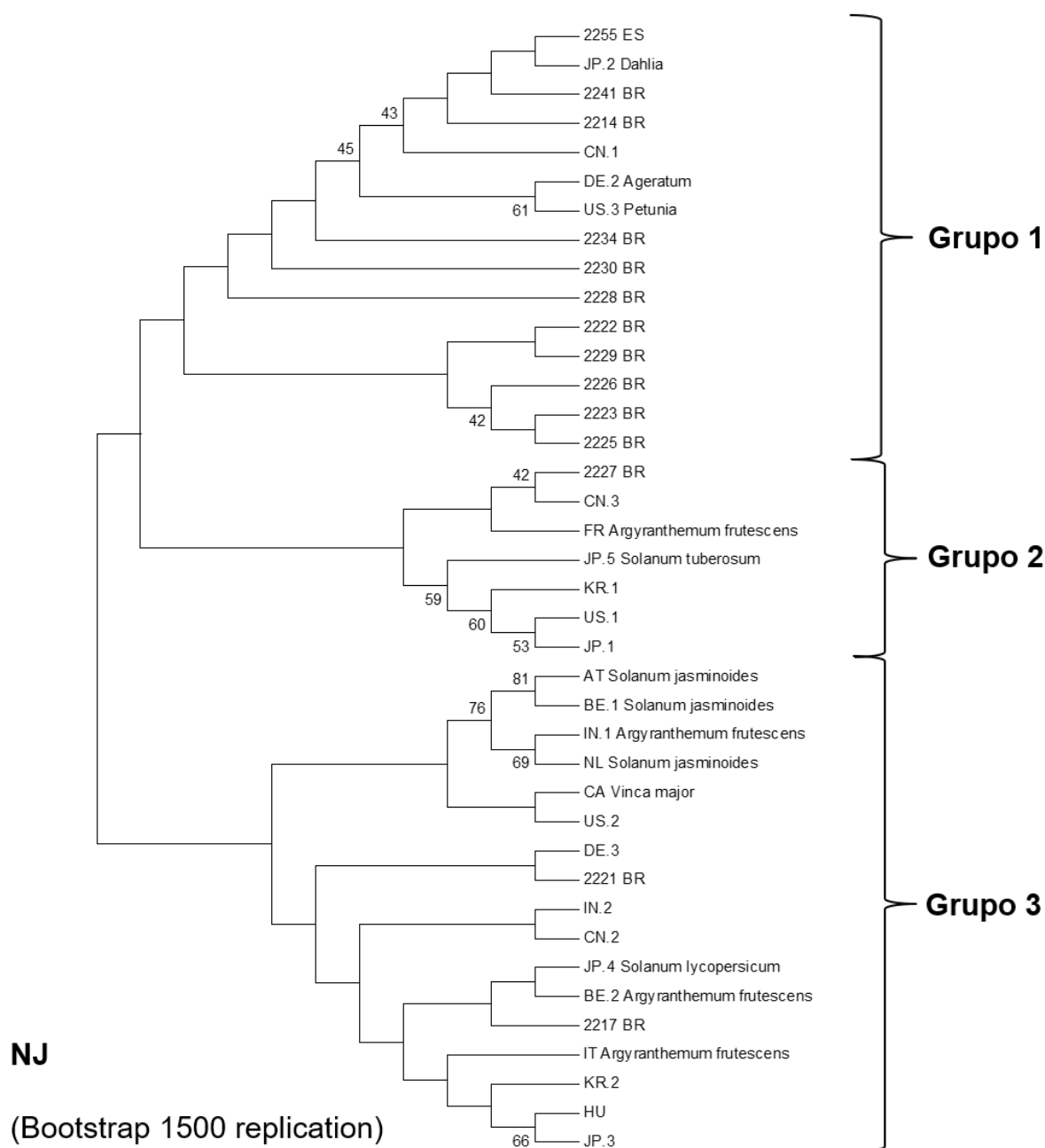


Fig. 13 – Árvore filogenética com base no alinhamento múltiplo de seqüências de nucleotídeos de isolados de CSVd brasileiros, colombianos, além de um isolado espanhol (sequenciados neste trabalho) e variantes de seqüências obtidas do *GenBank*, empregando método *Neighbor Joining* com análises de Bootstrap para 1.500 replicações, utilizando o software MEGA (versão 7.0). Os códigos de acesso do *GenBank* dos variantes de seqüência utilizados nas análises foram incluídos nas Tabelas 6 e 7.

4.2. Análises das interações viroide-hospedeiro

Durante o processo de extração de adutos, seis (6) etapas distintas foram realizadas e a cada etapa executada, uma alíquota de 200µL foi armazenada para a confirmação posterior do sucesso do processo de extração, através de eletroforese em gel de poliacrilamida em TBE (1x) em presença de ureia 5M, e também para confirmar se o isolamento das proteínas com o restante dos ácidos nucleicos foi realizado de maneira correta (Figura 14).

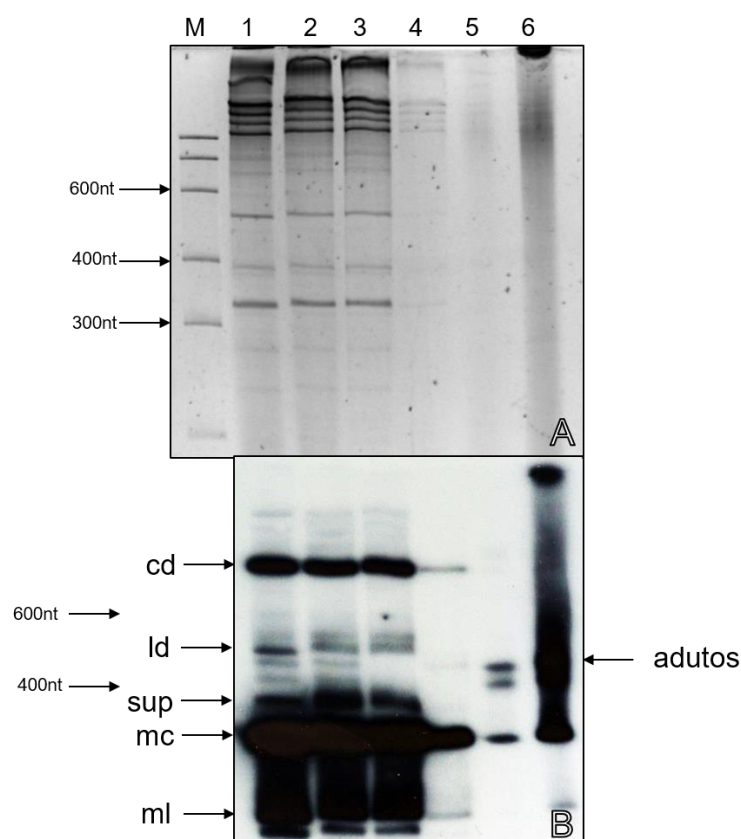


Fig. 14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida TBE(1x) (200V, 2 horas), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta das 6 alíquotas retiradas nas fases de extração de adutos para verificação da preservação dos complexos RNA/proteína. M= Marcador de RNA RiboRuler (Fermentas), 1= AL1, 2= AL2, 3= AL3, 4= AL4, 5= AL5 e 6= AL6 (A). Hibridização *Northern-blot* com sonda de polaridade negativa específica para a detecção de moléculas do ASBVd (+), evidenciando as etapas de extração, sendo: cd=moléculas circulares diméricas, ld=moléculas lineares diméricas, sup=moléculas supra genômicas, mc=monômeros circulares e ml=monômeros lineares (B). A posição dos complexos RNA-proteína está indicada à direita.

O produto da última etapa de extração (Figura 14B AL6), que continha somente os complexos RNA-proteína, foi submetido a uma nova eletroforese em gel de poliacrilamida e transferido para uma membrana de náilon onde foi hibridizado com sonda radioativa para detecção de moléculas de polaridade (+) do ASBVd. Esta última etapa serviu para visualizar que a porção do gel destacada para eluição dos adutos foi retirada na altura correta e correspondia aos complexos RNA-proteína (Figura 15).

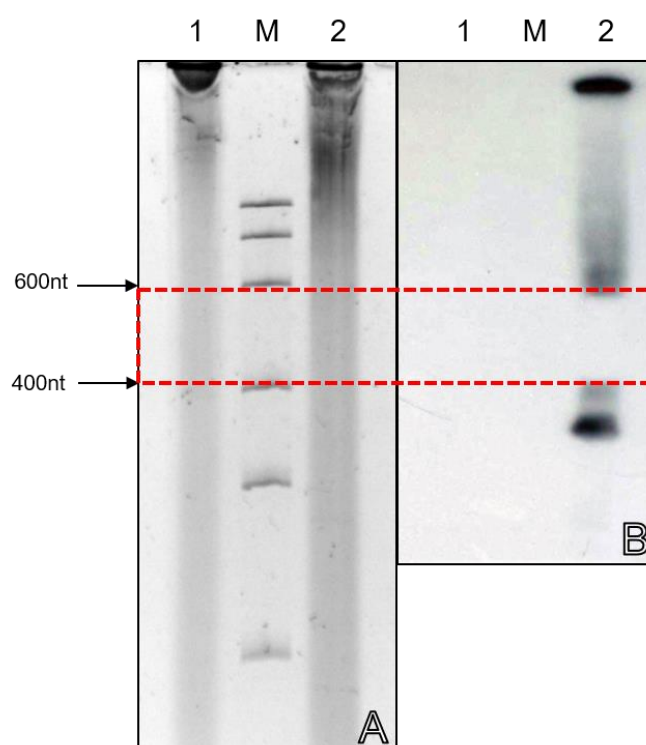


Fig. 15 – Eletroforese em gel de poliacrilamida TBE(1x) (200V, 2 horas), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, onde: 1= complexos RNA-proteína de folhas de abacate com ASBVd não irradiadas com luz UV [controle negativo, C(-)], M= Marcador de RNA RiboRuler (Fermentas), e 2= complexos de RNA/proteína de folhas de abacate com ASBVd irradiadas com 3 horas de luz UV (A). O retângulo tracejado vermelho indica a região onde o gel de poliacrilamida foi dissociado para posterior eluição dos adutos. Em (A) o gel está corado com brometo de etídio e após o corte do gel de acordo com o marcador de RNA o mesmo gel foi transferido e hibridizado para detecção de moléculas de polaridade (+) do ASBVd (B).

Foram identificadas 41 proteínas e enzimas (dados não mostrados), porém em sua grande maioria produtos de contaminação com outras proteínas, como por exemplo queratinas e albuminas, comumente encontradas nestes tipos de busca

uma vez que durante o processo de extração das amostras, proteínas de outros agentes presentes no ambiente acabam sendo indetificadas junto com as proteínas de interesse. Os resultados da proteômica confirmaram duas proteínas, provavelmente correspondente ao aduto 4, a superóxido dismutase [Cu-Zn]₂ (SOD) similar a proteína de *Arabidopsis thaliana* com um número de 0,21emPAI (*Exponentially Modified Protein Abundance Index*) e a superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD) de *Oryza sativa* subsp. Japônica com número de 0,22emPAI. A superóxido dismutase é uma enzima que se encontra no citosol de praticamente todas as células de eucariontes. O ASBVd, para completar as distintas etapas do seu ciclo infeccioso, deve utilizar a maquinaria da célula hospedeira para sua replicação, processamento e movimento intercelular e intracelular, entre o citosol e os cloroplastos da célula. Por afinidade, que pode ser adquirida de acordo com sítios de ligação entre hélices da proteína com a conformação da molécula do viroide e as cargas iônicas exercidas, este complexo pode ser transportado para as células vizinhas, permitindo que o viroide continue seu ciclo infeccioso em uma nova célula.

Nos estudos realizados para obtenção de adutos de proteínas com RNA de PSTVd e CSVd os resultados não foram conclusivos.

4.3. Determinação do círculo de hospedeiros experimental do CSVd

Para a determinação do círculo de hospedeiros de um isolado brasileiro do CSVd, foram selecionadas espécies de plantas daninhas frequentemente encontradas em campos de produção de crisântemo, além de plantas relatadas como hospedeiras indicadoras, de acordo com uma lista de espécies suscetíveis ao CSVd (HORST; NELSON, 1997), e outras espécies de famílias como *Asteraceae*, com o maior número de espécies entre as Angiospermas e *Solanaceae*, incluindo espécies ornamentais cultivadas no Brasil, de acordo com AGRIANUAL (2016) e com o catálogo de Flores e Plantas Ornamentais no Brasil do SEBRAE (2015a) (Tabela 8).

Tabela 8 – Determinação da gama de hospedeiras experimentais por meio de inoculações mecânicas com um isolado brasileiro de CSVd, e os resultados de RT-PCR e da expressão ou não de sintomas 30 dias após as inoculações

Espécie	RT-PCR	Nº Plantas (+)/Nº Planta inoculadas	Sintomas
<i>Amaranthus viridis</i>	+	2/4	P
<i>Antirrhinum majus</i>	-	0/4	A
<i>Arachis pintoi</i>	-	0/4	A
<i>Brassica napus</i>	-	0/4	A
<i>Cassia occidentalis</i>	-	0/4	A
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	+	4/4	P
<i>C. quinoa</i>	-	0/4	A
<i>C. murale</i>	+	4/4	P
<i>Chrysanthemum carinatum</i>	+	2/4	A
<i>Datura stramonium</i>	+	1/4	A
<i>Emilia sagittata</i>	+	4/4	P
<i>Eschscholzia californica</i>	-	0/4	A
<i>Fragaria vesca</i>	-	0/4	A
<i>Gomphrena globosa</i>	+	4/4	P
<i>Godetia</i> sp.	-	0/4	A
<i>Gypsophila elegans</i>	-	0/4	A
<i>Helianthus annuus</i>	+	3/4	A
<i>Lobelia erinus</i>	-	0/4	A
<i>Lupinus russell</i>	+	3/4	P
<i>Mirabilis jalapa</i>	+	3/4	P
<i>Nicandra physalodes</i>	-	0/4	A
<i>Nicotiana tabacum</i> Xanthi	-	0/4	A
<i>N. tabacum</i> Samsun	-	0/4	A
<i>N. rustica</i>	-	0/4	A
<i>N. occidentalis</i>	-	0/4	A
<i>N. benthamiana</i>	-	0/4	A
<i>N. megalosiphon</i>	-	0/4	A
<i>Portulaca grandiflora</i>	+	3/4	A
<i>Ruta graveolens</i>	-	0/4	A
<i>Senecio cruentus</i>	+	2/4	A
<i>Solanum lycopersicum</i> “Cereja”	+	4/4	P
<i>S. lycopersicum</i> “Santa Clara”	+	4/4	P
<i>S. lycopersicum</i> “Italiano”	+	4/4	P
<i>S. lycopersicum</i> “Rutgers”	+	4/4	P
<i>S. tuberosum</i> “Ágata”	+	4/4	A
<i>Vinca rosea</i>	+	3/4	A
<i>Viola tricolor</i>	-	0/4	A
<i>Zinnia elegans</i>	-	0/4	A
<i>Z. lilliput</i>	-	0/4	A

*A=ausente e P=presente

Das 39 espécies inoculadas, 18 foram infectadas pelo CSVd, com resultados confirmados em análises de RT-PCR: *Amaranthus viridis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *Chrysanthemum carinatum*, *Datura stramonium*, *Emilia sagittata*, *Gomphrena globosa*, *Helianthus annuus*, *Lupinus russell*, *Mirabilis jalapa*, *Portulaca grandiflora*, *Senecio cruentus*, *Solanum lycopersicum* “Cereja”, *S. lycopersicum* “Santa Clara”, *S. lycopersicum* “Italiano”, *S. lycopersicum* “Rutgers”, *S. tuberosum* “Ágata” e *Vinca rosea* (Figura 16).

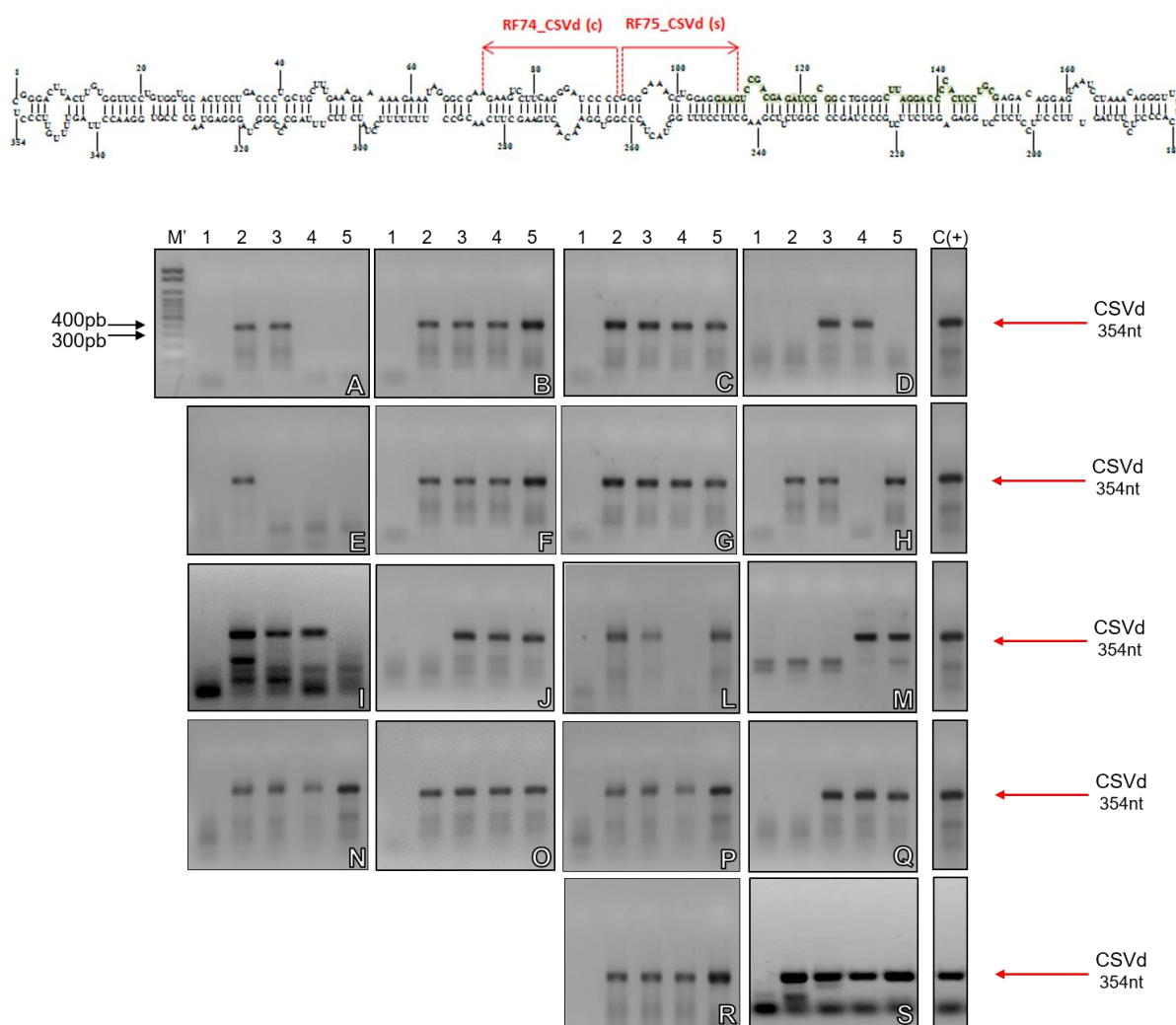


Fig. 16 - Fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de diferentes espécies de plantas para determinação do círculo de hospedeiras experimentais. M'= 100pb ladder, A= *Amaranthus viridis*; B= *Chenopodium amaranticolor*; C= *C. murale*; D= *Chrysanthemum carinatum*; E= *Datura stramonium*; F= *Emilia sagittata*; G= *Gomphrena globosa*; H= *Helianthus annuus*; I= *Lupinus russell*; J= *Mirabilis jalapa*; L= *Portulaca grandiflora*; M= *Senecio cruentus*; N= *Solanum lycopersicum* “Cereja”; O= *S. lycopersicum* “Santa Clara”; P= *S. tuberosum* “Ágata”; Q= *Vinca rosea*; R= *S. lycopersicum* “Italiano”; S= *S. lycopersicum* “Rutgers”; sendo 1= Planta sadia, 2-5= Plantas inoculadas e C(+)= controle positivo. *(s) – ‘Senso’ e (c) – ‘Complementar’.

Amaranthus viridis, *Chenopodium murale* e *Gomphrena globosa* apresentaram sintomas de nanismo (Figura 17), enquanto em *Chenopodium amaranticolor* foram observados retardo no crescimento e pontos cloróticos, necróticos e amarelecimento nas folhas (Figura 18).



Fig. 17 - *Amaranthus viridis* (A), *Chenopodium murale* (B) e *Gomphrena globosa* (C) apresentando sintomas de nanismo, 30 dias após a inoculação com isolado do CSVd. As testemunhas não inoculadas (sadias) estão representadas à esquerda.

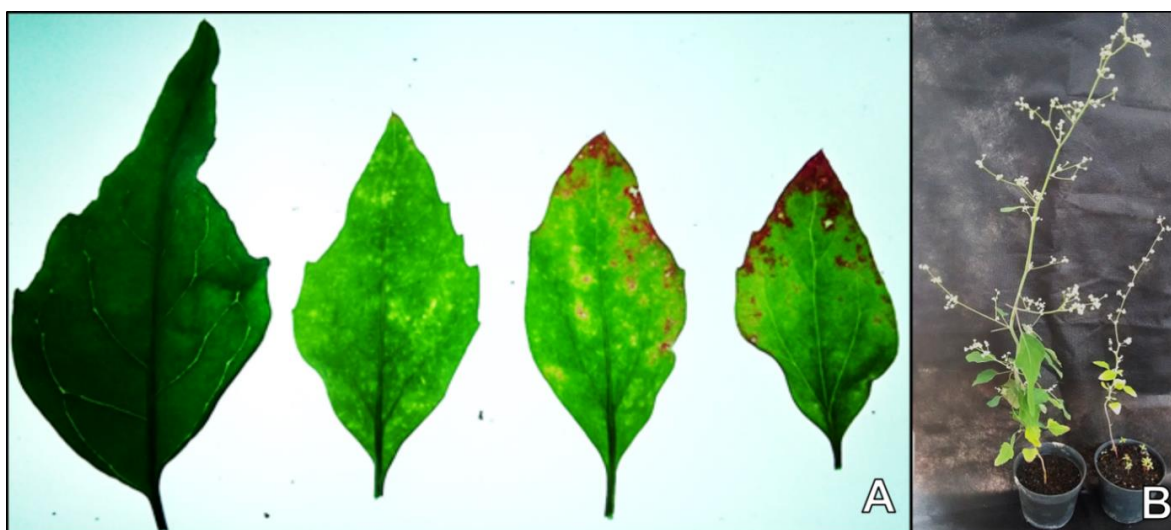


Fig. 18 - Folhas de *Chenopodium amaranticolor* apresentando sintomas de pontos cloróticos, necróticos, amarelecimento e diminuição do tamanho das folhas induzidos pelo CSVd (A) (à esquerda, folha sadia seguida de três folhas provenientes de plantas infectadas com um isolado de CSVd). Em (B) a testemunha está representada à esquerda.

Gobatto et al. (2014) observaram em plantas de *Emilia sonchifolia* inoculadas experimentalmente com CSVd sintomas de epinastia. Neste levantamento, utilizando plantas de *Emilia sagittata*, 30 dias após as inoculações, observaram-se sintomas de nanismo e pontos necróticos nas folhas (Figura 19).



Fig. 19 - Folhas de *Emilia saggittata* apresentando pontos necróticos e deformação foliar induzidos pelo CSVd, em comparação à folha de planta não inoculada à esquerda (A). Em (B) observa-se nanismo em planta inoculada com CSVd (à direita) em comparação à testemunha não inoculada (à esquerda).

Nas espécies ornamentais *Lupinus russell* e *Mirabilis jalapa*, após serem inoculadas com o isolado de CSVd, sintomas de nanismo e amarelecimento foliar foram observados (Figura 20).



Fig. 20 - *Lupinus russell* (A) e *Mirabilis jalapa* (B) apresentando sintomas de nanismo e amarelecimento das folhas induzidos por um isolado de CSVd, em comparação às suas testemunhas não inoculadas (sadias) representadas à esquerda de cada figura.

Das 4 variedades de tomateiros inoculadas, foram observados diferentes sintomas. Em tomateiros variedade “Cereja” as plantas apresentaram nanismo, escurecimento das nervuras e deformações foliares. Nos tomateiros da variedade “Santa Clara” foram observados sintomas drásticos de má formação e nanismo nas

plantas inoculadas, enquanto que em tomateiros da variedade “Italiano”, foram observadas deformações foliares, amarelecimento e escurecimento das nervuras. Em tomateiros da variedade “Rutgers” foram observados sintomas de má formação e retardo no crescimento (Figura 21).

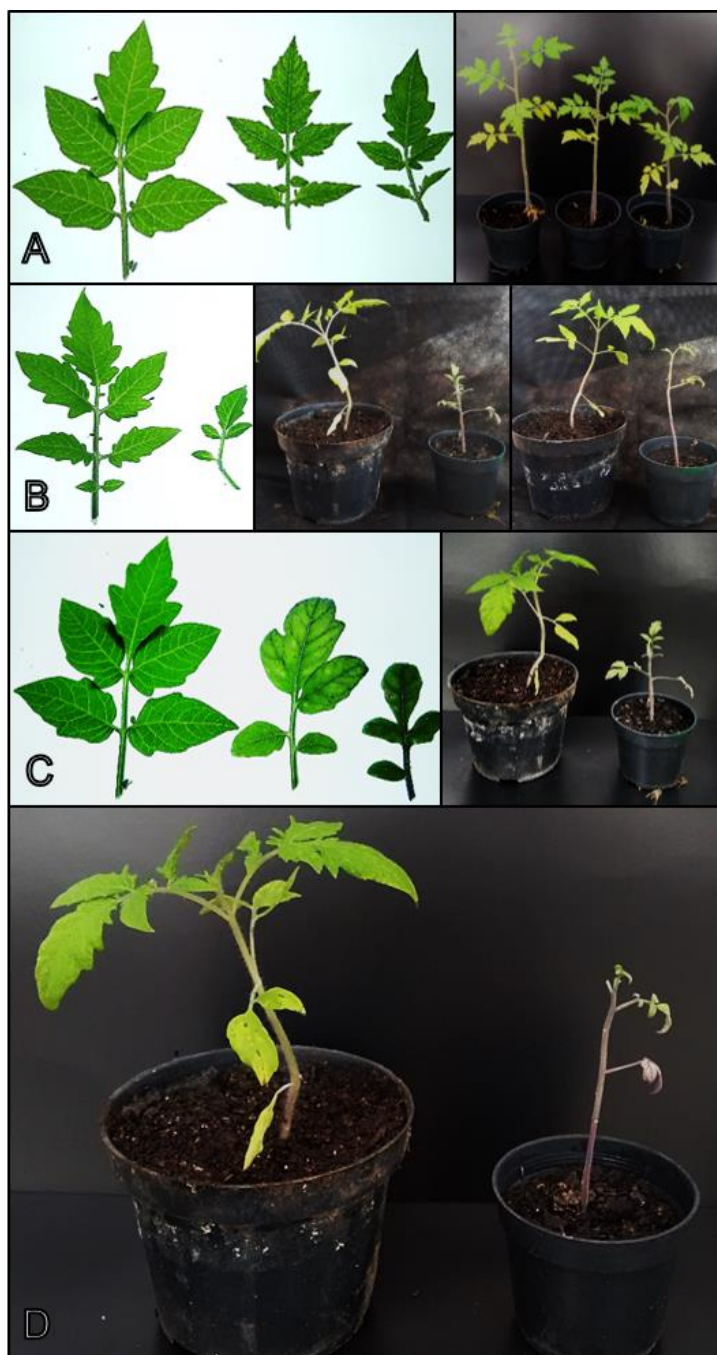


Fig. 21 – Sintomas observados em tomateiros (*Solanum lycopersicum*), 30 dias após a inoculação, com um isolado de CSVd. (A) tomateiro variedade “Cereja” com escurecimento das nervuras e má formação foliar; (B) tomateiro variedade “Santa Clara” com nanismo; (C) tomateiro variedade “Italiano” com deformação, amarelecimento e escurecimento das nervuras foliares, além de má formação da planta; (D) tomateiro variedade “Rutgers” com má formação e nanismo. Os vasos à esquerda correspondem às plantas não inoculadas (sadias).

4.4. Avaliação do impacto do CSVd na produção do crisântemo

O estudo de caso foi realizado em um dos maiores produtores e exportadores de crisântemo da região de Rionegro, Antioquia, Colômbia. O produtor, em um cenário positivo, ou seja, levando-se em consideração que todo o ciclo produtivo do crisântemo tenha um resultado esperado dentro da normalidade, terá uma eficiência média de produção final de cerca de 90% (Tabela 9), ou seja, 10% de perdas no final do ciclo são consideradas aceitáveis pelos produtores (informações colhidas no questionário). Nestas perdas são observados: talos delgados, quebrados ou até mesmo retorcidos, problemas genéticos e anomalias causadas por patógenos. Para que o produtor possa exportar seu material, é necessário que, independente da variedade, a planta possua entre 5 a 7 pontos florais e peso fresco entre 50 e 60g por ramo. Estes números de pontos florais e peso fresco das plantas são exigências pré-estabelecidas pelos mercados consumidores, tais como Inglaterra, Japão, Austrália, Holanda, Estados Unidos e Itália.

Tabela 9 – Média de eficiência na produção de crisântemo de corte na Colômbia em uma área de 1 ha (1.000.000 de plantas)

Nº de canteiros/ha	Densidade plantas/m ²	Tamanho do canteiro	Mudas/canteiro	Eficiência esperada	Talos exportáveis/canteiro	Talos exportáveis/ha
190	90	40 m ²	3600	90%	3240	615600
190	95	40 m ²	3800	90%	3420	649800
190	100	40 m ²	4000	90%	3600	684000

*Fonte: Resultados da pesquisa

Durante o estudo foi observado que os produtores estimam as perdas (10% são aceitáveis) somente no final do ciclo reprodutivo sendo este observado somente antes de enviar o material para exportação. Porém, durante todo o ciclo de produção, que em média é de aproximadamente 70 dias, todas as plantas que são erradicadas diariamente pelos pragueiros, principalmente aquelas com suspeitas de infecção pelo CSVd, não são somadas a estas perdas finais. Com o auxílio do questionário e a observação do intenso trabalho dos pragueiros realizado durante o período do estudo, estimou-se que houve uma média de 15% de possíveis perdas na produção devido às infecções causadas pelo CSVd. Este número foi estimado

pois para se ter um valor exato seria necessário coletar todas as plantas erradicadas durante o ciclo produtivo e submete-las a análises moleculares para a confirmação da presença ou ausência do CSVd. Sendo assim, para apenas um hectare de terra produzindo crisântemo, pode haver perdas de até 97.470 talos descartados devido à presença do viroide (Tabela 10).

Tabela 10 – Estimativa de possíveis perdas de crisântemos exportáveis devido à infecção pelo CSVd na Colômbia

Plantas erradicadas	Total
1%	6498
2%	12996
5%	32490
10%	64980
15%	97470

*Fonte: Resultados da pesquisa

Visando a otimizar o estudo de caso para outras áreas e tendo como base as informações obtidas no produtor escolhido para o estudo, foi possível mensurar as mesmas perdas, de acordo com o tamanho de outras propriedades visitadas na Colômbia e em Artur Nogueira, SP, Brasil (Tabela 11). Calculou-se, neste trabalho, que um dos maiores produtores e exportadores de crisântemos localizados na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia, sofreu perdas de até 5.848.200 talos por ciclo de produção devido à “suspeita” de infecções pelo CSVd.

Tabela 11 – Porcentagens de perdas de talos de crisântemos exportáveis devido à “suspeita” de infecção pelo CSVd em três produtores de crisântemo, dois da Colômbia (A) e (B), e um do Brasil (C)

Propriedade	Área (ha)	1%	2%	5%	10%	15%
A	60	389880	779760	1949400	3898800	5848200
B	30	194940	389880	974700	1949400	2924100
C	5	32490	64980	162450	324900	487350

*Fonte: Resultados da pesquisa

**A e B representam propriedades colombianas e C uma propriedade brasileira

Em média, um talo sadio, contendo de 5 a 7 pontos florais, é vendido entre US\$0,10 e US\$0,15 centavos de dolar, dependendo da variedade. Assim quando estes talos são vendidos a US\$0,10 o produtor colombiano que possui 60 hectares

de estufas, por exemplo, perde por ciclo de produção US\$584.820,00 ou US\$877.230,00 quando vendidos a US\$0,15 (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 – Perda econômica estimada de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda por ciclo de produção quando os talos são vendidos a US\$0,10 centavos de dólar

Perdas Financeiras/Ciclo						
Propriedade	Área (ha)	1%	2%	5%	10%	15%
A	60	US\$38.988,00	US\$77.976,00	US\$194.940,00	US\$389.880,00	US\$584.820,00
B	30	US\$19.494,00	US\$38.988,00	US\$97.470,00	US\$194.940,00	US\$292.410,00
C	5	US\$3.249,00	US\$6.498,00	US\$16.245,00	US\$32.490,00	US\$48.735,00

*Fonte: Resultados da pesquisa

**A e B representam propriedades colombianas e C uma propriedade brasileira

Tabela 13 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda por ciclo de produção quando os talos são vendidos a US\$0,15 centavos de dólar

Perdas Financeiras/Ciclo						
Propriedade	Área (ha)	1%	2%	5%	10%	15%
A	60	US\$58.482,00	US\$116.964,00	US\$292.410,00	US\$584.820,00	US\$877.230,00
B	30	US\$29.241,00	US\$58.482,00	US\$146.205,00	US\$292.410,00	US\$438.615,00
C	5	US\$4.873,50	US\$9.747,00	US\$24.367,50	US\$48.735,00	US\$73.102,50

*Fonte: Resultados da pesquisa

**A e B representam propriedades colombianas e C uma propriedade brasileira

O crisântemo é uma planta de ciclo curto e anualmente são esperados cinco ciclos produtivos (OLIVETTI et al., 1994). Levando-se em consideração a perda média estimada por ciclo, conforme pode-se observar nas tabelas anteriores, após um ano o produtor que possui 60 hectares tem uma perda estimada de US\$2.924.100,00 quando seus talos são vendidos a US\$0,10 e US\$4.386.150,00 quando vendidos a US\$0,15 (Tabelas 14 e 15). Estes números representados na Figura 22, trazem um aspecto pessimista frente às menores taxas de infecção (15%). Essa porcentagem, hoje, é uma realidade com a qual os produtores convivem e, infelizmente, se tornou comum, uma vez que o controle efetivo do CSVd se torna cada dia mais desafiador.

Tabela 14 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda após um ano de produção quando os talos são vendidos a US\$0,10 centavos de dólar

Perdas Financeiras/5 Ciclos (Ano)						
Propriedade	Área (ha)	1%	2%	5%	10%	15%
A	60	US\$194.940,00	US\$389.880,00	US\$974.700,00	US\$1.949.400,00	US\$2.924.100,00
B	30	US\$97.470,00	US\$194.940,00	US\$487.350,00	US\$974.700,00	US\$1.462.050,00
C	5	US\$16.245,00	US\$32.490,00	US\$81.225,00	US\$162.450,00	US\$243.675,00

*Fonte: Resultados da pesquisa

**A e B representam propriedades colombianas e C uma propriedade brasileira

Tabela 15 – Perdas econômicas estimadas de acordo com o tamanho da área cultivada e a porcentagem de perda após um ano de produção quando os talos são vendidos a US\$0,15 centavos de dólar

Perdas Financeiras/5 Ciclos (Ano)						
Propriedade	Área (ha)	1%	2%	5%	10%	15%
A	60	US\$292.410,00	US\$584.820,00	US\$1.462.050,00	US\$2.924.100,00	US\$4.386.150,00
B	30	US\$146.205,00	US\$292.410,00	US\$731.025,00	US\$1.462.050,00	US\$2.193.075,00
C	5	US\$24.367,50	US\$48.735,00	US\$121.837,50	US\$243.675,00	US\$365.512,50

*Fonte: Resultados da pesquisa

**A e B representam propriedades colombianas e C uma propriedade brasileira

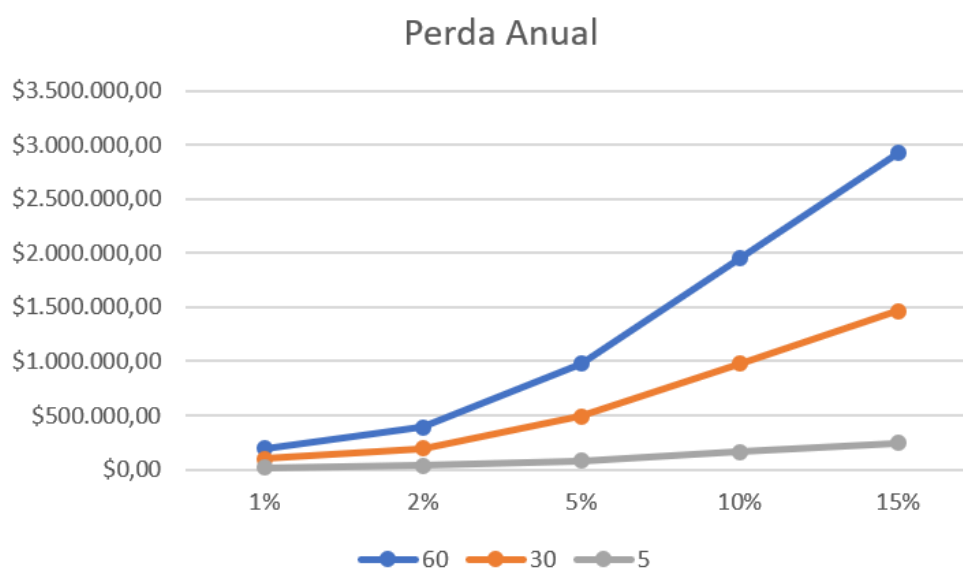


Fig. 22 – Representação das perdas econômicas anuais quando a infecção pelo CSVd leva a 15% de erradicação de plantas de crisântemo sobre o ciclo de produção, considerando as vendas dos talos de crisântemo a US\$0,10 centavos de dólar. As áreas cultivadas estão representadas em azul, 60 ha, em laranja, 30 ha e em cinza, 5 ha.

4.5. Levantamento de plantas daninhas: identificação de novas hospedeiras do CSVd

Utilizando-se o método descrito por Braun-Blanquet (1979) com modificações, plantas daninhas foram coletadas para a realização de análise fitossociológica. As plantas foram avaliadas quanto à diversidade e também quanto à suscetibilidade ao CSVd após serem inoculadas mecanicamente. Na região de Artur Nogueira, SP, foram identificadas 18 espécies de plantas daninhas (Tabela 16), sendo que 5 (*Cardamine bonariensis*, *Chamaesyce hirta*, *Conyza bonariensis*, *Oxalis latifolia* e *Portulaca oleracea*) foram consideradas suscetíveis ao CSVd, uma vez que os resultados de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para este viroide foram positivos.

Tabela 16 – Levantamento de plantas daninhas coletadas na região de Artur Nogueira, SP, em produtor de crisântemo em vaso e avaliação de suscetibilidade ao CSVd após inoculação

Espécie	Família	Nº plantas (+) CSVd / Nº plantas inoculadas	Sintomas
<i>Agerathum conyzoides</i>	Asteraceae	0/4	A
<i>Amaranthus deflexus</i>	Amaranthaceae	0/4	A
<i>Cardamine bonariensis</i>	Brassicaceae	4/4	A
<i>Chamaesyce hirta</i>	Euphorbiaceae	3/4	A
<i>Chamaesyce prostrata</i>	Euphorbiaceae	0/4	A
<i>Commelina benghalensis</i>	Commelinaceae	0/4	A
<i>Conyza bonariensis</i>	Asteraceae	2/4	A
<i>Cyperus roduntus</i>	Cyperaceae	0/4	A
<i>Digitaria insularis</i>	Poaceae	0/4	A
<i>Digitaria sanguinalis</i>	Poaceae	0/4	A
<i>Eclipta prostrata</i>	Asteraceae	0/4	A
<i>Eleusine indica</i>	Poaceae	0/4	A
<i>Hemiscula aculeata</i>	Cleomaceae	0/4	A
<i>Oxalis corniculata</i>	Oxalidaceae	0/4	A
<i>Oxalis latifolia</i>	Oxalidaceae	4/4	P
<i>Sagina chilensis</i>	Caryophyllaceae	0/4	A
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae	0/4	A
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	4/4	A

*A=ausente e P=presente

Das cinco plantas que foram identificadas como positivas para o CSVd (via RT-PCR), somente na espécie *Oxalis latifolia* foram observados sintomas de mosaico, deformação foliar, escurecimento de nervuras e algumas folhas com uma leve epinastia. Vale ressaltar que os sintomas não foram observados no campo e,

sim, após as plantas serem inoculadas experimentalmente com um isolado de CSVd.

Em Paranapanema, 13 espécies de plantas daninhas foram identificadas (Tabela 17). Dessas espécies, 6 (*Cardamine bonariensis*, *Chamaesyce hirta*, *Emilia saggittata*, *Conyza bonariensis*, *Oxalis latifolia* e *Portulaca oleraceae*) foram suscetíveis ao CSVd, sendo confirmadas 30 dias após as inoculações, via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos. Porém, somente *Emilia saggittata* e *Oxalis latifolia* apresentaram sintomas quando desafiadas por inoculação mecânica com um isolado de CSVd.

Tabela 17 – Levantamento de plantas daninhas coletadas na região de Paranapanema, SP, em produtor de crisântemo em vaso e avaliação da suscetibilidade ao CSVd após inoculação

Levantamento de plantas daninhas – Paranapanema, SP			
Espécie	Família	Nº plantas (+) CSVd / Nº	Sintomas
<i>Aeschynomene rudis</i>	Fabaceae	0/4	A
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	0/4	A
<i>Cardamine bonariensis</i>	Brassicaceae	4/4	A
<i>Chamaesyce hirta</i>	Euphorbiaceae	3/4	A
<i>Commelina benghalensis</i>	Commelinaceae	0/4	A
<i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae	0/4	A
<i>Emilia saggittata</i>	Asteraceae	4/4	P
<i>Conyza bonariensis</i>	Asteraceae	4/4	A
<i>Oxalis corniculata</i>	Oxalidaceae	0/4	A
<i>Oxalis latifolia</i>	Oxalidaceae	4/4	P
<i>Portulaca oleracea</i>	Portulacaceae	4/4	A
<i>Sonchus oleraceus</i>	Asteraceae	0/4	A
<i>Tropaeolum majus</i>	Tropaeolaceae	0/4	A

*A=ausente e P=presente

Mais detalhes sobre *Cardamine bonariensis* e *Oxalis latifolia* foram incluídos nos tópicos 5.6 e 5.7, respectivamente, bem como mais informações sobre *Emilia saggittata* podem ser encontradas no tópico 5.3 em círculo de hospedeiros experimental.

4.6. *Cardamine bonariensis* Pers.: presença constante nos cultivos de crisântemo, uma nova hospedeira do CSVd

Durante o período de coletas, entre 2014 e 2016, em busca de material infectado naturalmente pelo CSVd em campos de crisântemo, observou-se que

diferentes espécies de plantas daninhas estavam presentes nos diferentes tipos de cultivo de crisântemo, em vaso ou de corte, e em diferentes situações como dentro dos canteiros entre os crisântemos, entre as entrelinhas e no entorno das estufas (Figura 23).

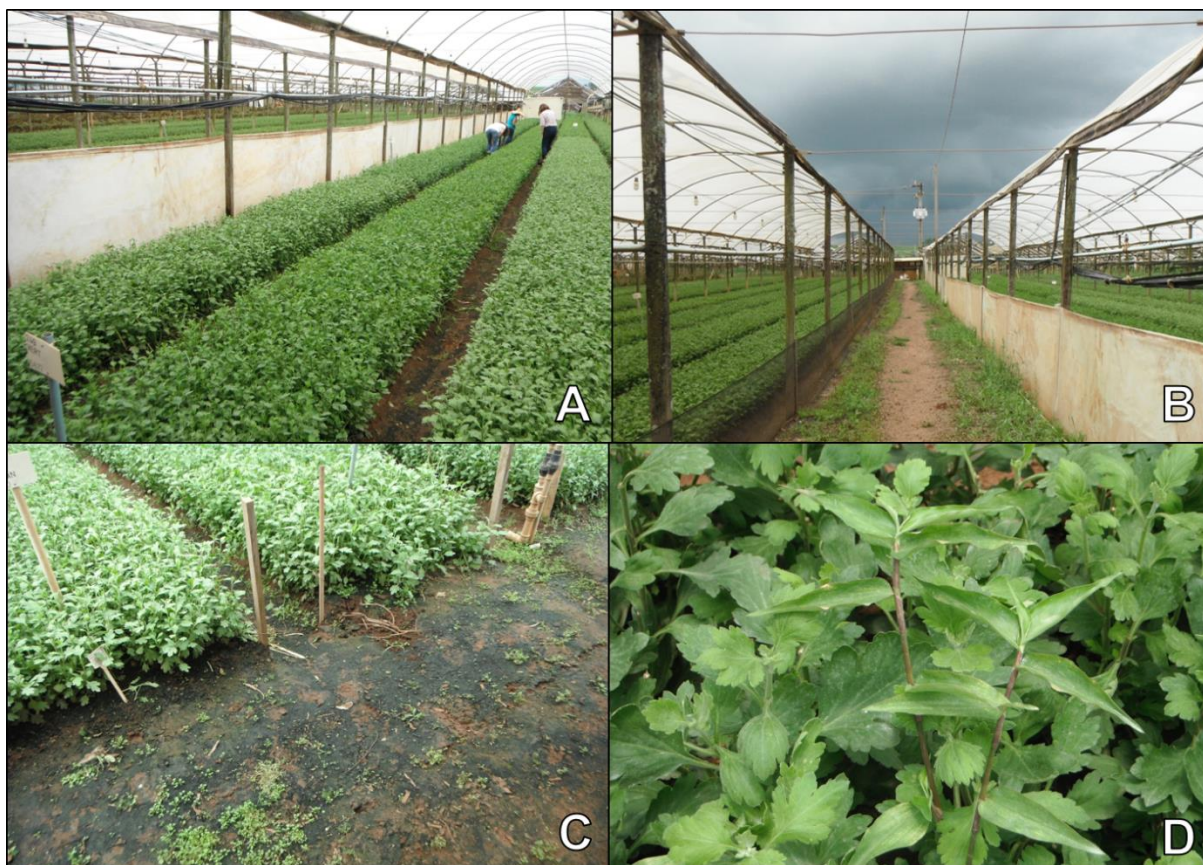


Fig. 23 – Plantas daninhas de diferentes espécies encontradas dentro das linhas (A), entre as estufas (B), nos entornos das estufas (C) e dentro dos canteiros de crisântemo (D).

Durante as visitas às propriedades onde foram realizadas as coletas, os produtores queixavam-se de que, apesar de empregarem diferentes estratégias para o controle das plantas daninhas, como utilização de herbicidas (controle químico), revolvimento do solo (controle mecânico), vaporização e solarização (controle físico), uma das espécies de plantas daninhas permanecia durante todo o ciclo de produção do crisântemo.

Conhecida como agriãozinho, agrião-bravo, ardidinha, mostardinha e principalmente por “erva holandesa”, *Cardamine bonariensis* Pers. é uma planta daninha que pertence à família Brassicaceae. É uma espécie herbácea anual que se desenvolve nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Planta ruderal, é comumente encontrada associada a áreas sombreadas e úmidas,

ocorrendo com muita frequência em viveiros de mudas entre as estruturas que mantêm os vasos, entre as bandejas de produção de mudas e nas entrelinhas de produção de crisântemos de corte (Figura 24).



Fig. 24 – Plantas de *Cardamine bonariensis* Pers. encontradas nas entrelinhas dos sistemas de produção de crisântemos em vaso (A) e (B) e dentro dos vasos de crisântemos cultivados no Brasil. Produção de crisântemos de corte na Colômbia apresentando *C. bonariensis* nas entrelinhas (D) e dentro dos canteiros entre os crisântemos (E) e (F).

O agriãozinho possui caule decumbente, amplamente ramificado, tenro e glabro. Suas folhas, aromáticas, possuem pecíolos longos e são dispostas de forma alternada com limbo subdividido entre 3 a 5 segmentos assimétricos, o que simula uma folha composta, e com margens recortadas. Sua inflorescência terminal é do tipo cacho e suas flores são pedunculadas com cálice contendo quatro sépalas livres e corola com quatro pétalas. Seus frutos são do tipo síliqua alongada e sua propagação é feita por meio de sementes (Figura 25).



Fig. 25 – Agriãozinho (*Cardamine bonariensis*): caule ramificado, tenro e glabro (A). Inflorescência do tipo cacho com flores pedunculadas, cálice com quatro sépalas e corola com quatro pétalas (B) e folhas com longo pecíolo, dispostas de forma alternada (C).

Apesar de estar quase sempre presente nos cultivos de olerícolas como batata, cebola, alface, cenoura, couve-flor entre outras, os estudos de incidência e levantamento fitossociológico do cardamine nos principais cultivos de crisântemo em São Paulo surgiram apenas no ano de 2006, quando, pela primeira vez, os produtores de crisântemo direcionaram sua atenção para a infestação desta planta (FRANCO et al., 2006). Por ser originária da Europa, suspeita-se que tenha chegado aos cultivos brasileiros junto com material vegetal e trânsito informal de plantas e mudas de ornamentais. Seu controle é extremamente difícil, devido à grande quantidade de sementes que são dispersas (por metros de distância) no momento da deiscência explosiva do seu fruto. Isso tem levado muitos produtores a diversificarem cada vez mais suas habilidades e incluírem diferentes alternativas de controle, visto que o sucesso de sua erradicação é praticamente nulo. O agriãozinho tem causado relativo prejuízo econômico aos produtores de crisântemo.

As plantas de agriãozinho coletadas foram analisadas por meio de RT-PCR para a detecção específica do CSVd. O viroide, porém, não foi detectado infectando

as plantas coletadas em campo, sendo obtidos resultados negativos na RT-PCR. As plantas foram, então, desafiadas por inoculação mecânica com um isolado de CSVd, e 30 dias após a inoculação foram novamente analisadas por RT-PCR, sendo observados fragmentos de DNA de tamanho esperado (354pb) (Figura 26). Com o sequenciamento desses fragmentos amplificados, confirmou-se que as plantas estavam infectadas pelo CSVd. Com esses resultados, sugere-se que o agriãozinho pode ser considerado uma nova espécie de planta daninha potencial hospedeira (ou reservatório) do CSVd em campos de produção de crisântemo.

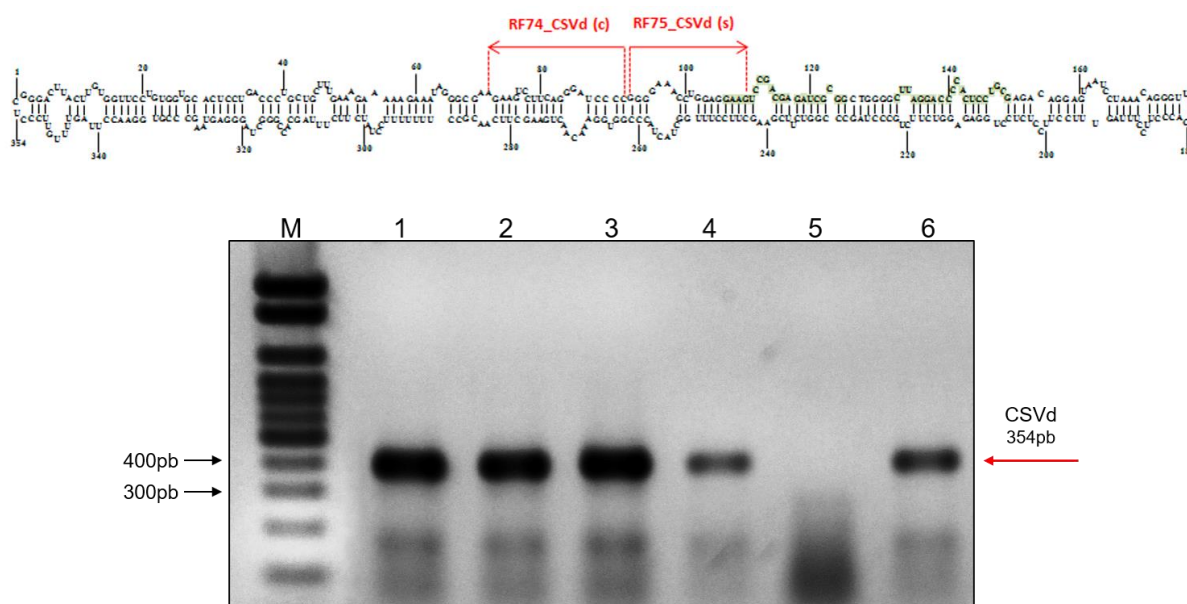


Fig. 26 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para o CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de agriãozinho (*Cardamine bonariensis*) M= 100pb DNA ladder; 1= *C. bonariensis* 1; 2= *C. bonariensis* 2; 3= *C. bonariensis* 3; 4= *C. bonariensis* 4; 5= controle negativo; 6=controle positivo.

4.7. *Oxalis latifolia*: nova hospedeira e potencial reservatório do CSVd nos campos de produção de crisântemo

Durante o período de coletas, de 2014 a 2016, observou-se que plantas de trevo (*Oxalis latifolia*) encontravam-se largamente disseminadas nos cultivos de crisântemos nas regiões de Artur Nogueira e Paranapanema, SP, Brasil, e também na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia.

Nos cultivos do Estado de São Paulo, amostras de trevos presentes dentro e no entorno das estufas de crisântemo foram coletadas e avaliadas por métodos moleculares para se avaliar a presença ou ausência de CSVd (Figura 27A). Uma vez que todas as plantas estavam sadias (livres de viroides), promoveram-se as inoculações mecânicas com um isolado de CSVd e, após 30 dias, observou-se que as plantas inoculadas passaram a expressar sintomas de mosaico e deformação foliar (Figura 27B, C e D), sendo a infecção pelo CSVd confirmada por RT-PCR (Figura 28).

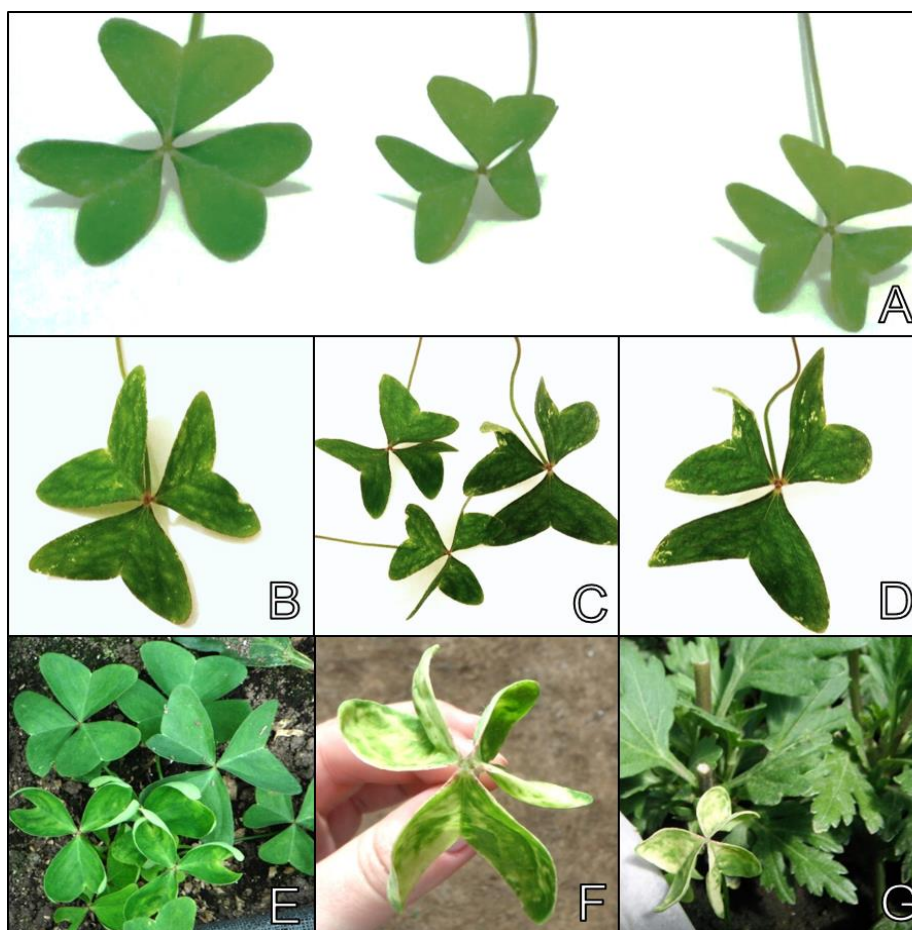


Fig. 27 - Trevos (*Oxalis latifolia*) sadios utilizados nos experimentos de inoculação (A). Trevos, 30 dias após a inoculação com um isolado de CSVd com sintomas de mosaico e deformação foliar (B, C e D). Trevos encontrados em campo de crisântemo da região de Rionegro, Antioquia, Colômbia, apresentando sintomas severos de clorose e epinastia foliar (E), (F) e (G).

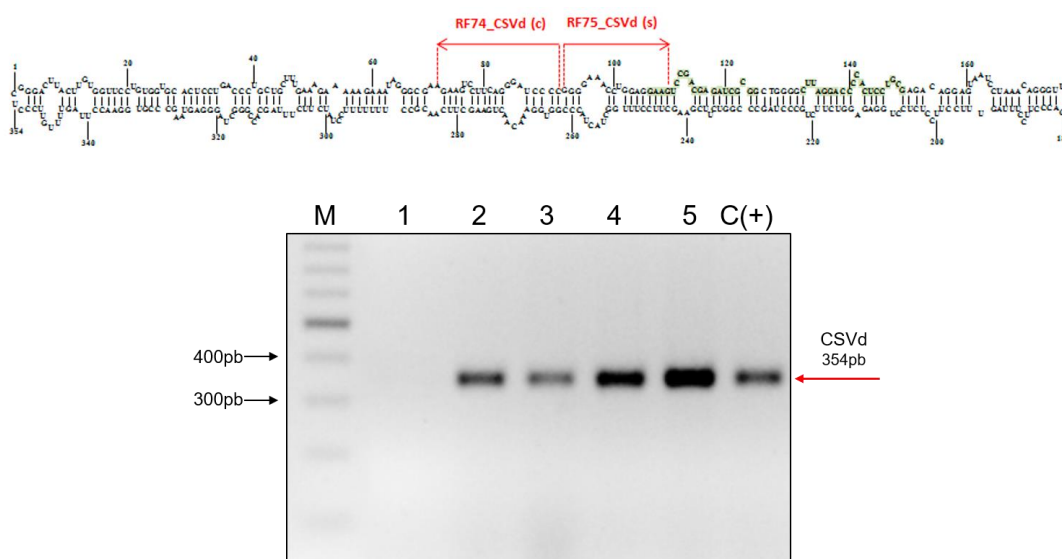


Fig. 28 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75 mA, 45 V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a amplificação total do CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de trevo (*Oxalis latifolia*) inoculadas com um isolado de CSVd e analisadas após 30 dias. M= 100pb *DNA ladder*; 1= controle negativo; 2-5= *Oxalis latifolia* inoculada; C(+)= controle positivo.

Fragmentos de DNA de tamanho esperado (354pb) foram obtidos, o que, após sequenciamento, permitiu a confirmação da presença do CSVd (Figura 29).

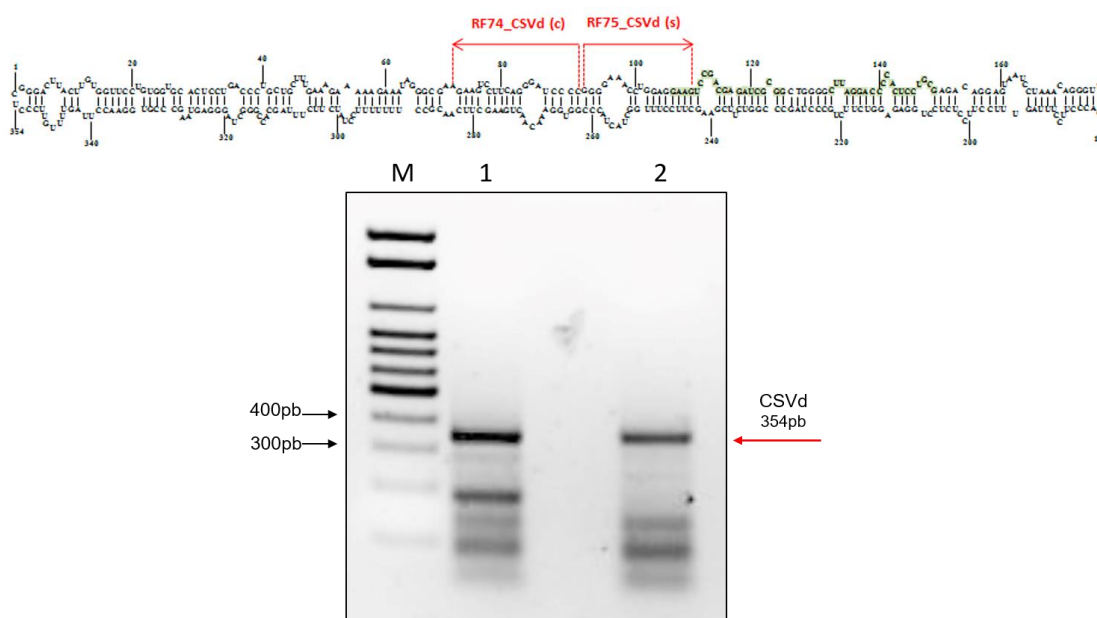


Fig. 29 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% (75mA, 45V), em presença de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta, de fragmentos de DNA amplificados via RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para a amplificação do CSVd a partir de RNA extraídos de folhas de trevo (*Oxalis latifolia*) proveniente de campo de crisântemo na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia. M= 100pb *DNA ladder*; 1= *Oxalis latifolia*; 2= *Oxalis latifolia*

Os crisântemos coletados em torno do trevo que apresentava sintomas também foram submetidos às mesmas análises moleculares, sendo o CSVd detectado por RT-PCR (Tabela 5). Após o sequenciamento dos fragmentos de 354pb, a sequência desse isolado de CSVd foi depositada no *GenBank* com o código de acesso MF359716. Vale ressaltar que nas análises filogenéticas este isolado agrupou-se no mesmo clado do isolado de *Oxalis latifolia*, ambos provenientes do mesmo campo de crisântemo da Colômbia.

Em resumo, os trevos presentes no campo de crisântemo estavam infectados naturalmente pelo CSVd, o que indica que esta planta daninha pode ter papel de reservatório e potencial fonte de inóculo do viroide no campo.

5. DISCUSSÃO

5.1. Status atual da diversidade genética dos viroides no Brasil e na Colômbia

Em levantamento realizado em cultivos de crisântemo no estado de São Paulo, nos anos de 2012 e 2013, verificou-se que o CSVd estava presente em praticamente todas as propriedades visitadas e na maior parte das variedades comerciais avaliadas. Naquela ocasião, somente alguns isolados de CSVd foram sequenciados, sendo observada alguma variabilidade genética entre os isolados (GOBATTO et al., 2014). No presente trabalho, elevou-se o número de isolados de CSVd sequenciados para um total de 35 sendo que 27 isolados foram obtidos em cultivos de crisântemo no Brasil, 6 isolados obtidos em cultivos de crisântemo na Colômbia, e 2 isolados obtidos em comércio local de plantas ornamentais na Espanha.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos de todos os isolados de CSVd analisados neste trabalho, quando comparado com a primeira variante de sequência de CSVd caracterizada por Gross et al. (1982), permitiu a identificação de uma maior variabilidade genética entre os isolados. As mutações observadas na estrutura secundária do RNA dos isolados de CSVd ocorreram predominantemente em regiões da molécula onde não há pareamento entre as bases, denominadas de *loops* e localizadas principalmente nas regiões correspondentes aos motivos de patogenicidade (P) e na região Central (C). Essas mutações (deleções, inserções ou trocas de bases) observadas entre os variantes de sequência não afetaram a estrutura secundária da molécula. 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 se concentraram nas regiões genômicas não pareadas tanto das porções superiores como inferiores da molécula.

As sequências aqui obtidas também foram submetidas a análises filogenéticas incluindo os isolados brasileiros, colombianos e espanhóis do CSVd e comparando-os com outros variantes de sequência obtidos do *GenBank*. Nas análises, observou-se a formação de 3 grupos com isolados brasileiros de CSVd distribuídos em todos eles.

No grupo 1, observou-se que 10 isolados brasileiros de CSVd apresentaram similaridade com isolados provenientes do Japão, Alemanha e Estados Unidos, bem como o isolado 2255 proveniente de crisântemo da Espanha, sequenciados neste estudo. Vale ressaltar que os isolados colombianos de trevo (2242, 2243, 2244, 2245, 2246 e 2247) são idênticos ao isolado brasileiro 2234 contido neste grupo. Uma observação importante é que o variante de sequência proveniente do Japão é de *Dahlia* spp., assim como o isolado alemão de plantas de *Ageratum* sp., e o isolado americano de *Petunia* spp., demonstrando a diversidade de hospedeiros em que o CSVd pode ser encontrado. No grupo 2, observou-se a presença do isolado brasileiro 2227, apresentando elevada porcentagem de identidade de nucleotídeos quando comparado aos isolados provenientes da China, França, Japão, Coreia do Sul e Estados Unidos. O variante de sequência proveniente da França é de plantas de *Argyranthemum frutescens* e o variante do isolado japonês de *Solanum tuberosum*. No grupo 3, com maior número de variantes de sequência, encontram-se os isolados brasileiros 2221 e 2217 com elevada porcentagem de identidade de nucleotídeos com os variantes provenientes da Áustria, Bélgica, Índia, Canadá, Estados Unidos, Alemanha, Japão, Itália, Coreia do Sul e Hungria.

Adkar-Purushothama et al. (2017), em análises filogenéticas empregando 90 isolados indianos de CSVd e CChMVd em comparação com outros variantes de sequência depositados no *GenBank*, observaram que os isolados de CSVd estavam intimamente relacionados com isolados de CSVd europeus, enquanto que os isolados de CChMVd agruparam-se com isolados da Ásia Oriental.

Alguns fatores devem ser considerados para que se possa compreender a variabilidade dos isolados de CSVd brasileiros. Distribuídos nos 3 grupos da árvore filogenética, os isolados sequenciados neste trabalho apresentaram porcentagem de identidade de nucleotídeos elevada quando comparados a variantes de sequência de outros países. O CSVd encontra-se largamente distribuído nos países que cultivam crisântemo, devido principalmente ao seu amplo círculo de hospedeiros e à facilidade deste viroide ser transmitido mecanicamente. Estes fatores amplificam a sua disseminação e manutenção nos sistemas de cultivo (YOON et al., 2012).

O CSVd é considerado praga quarentenária A2 na Europa (OEPP/EPPO, 2013), com ocorrência relatada em praticamente todos os países e regiões onde o crisântemo é cultivado (YOON et al., 2012; YOON; PALUKAITIS, 2014). Com os resultados obtidos no presente trabalho, sugere-se que a variabilidade genética dos

isolados brasileiros de CSVd tem relação direta com as diferentes introduções de germoplasma infectado proveniente de diferentes países, principalmente da Europa e Ásia.

Deve ser levado em consideração também que em plantas de crisântemo adquiridas de comércio local de plantas ornamentais em Valencia, Espanha, observou-se um comportamento aparentemente protetivo *in planta*, similar ao que ocorre em fenômenos de proteção cruzada (*cross protection*), em que uma estirpe fraca (*mild*) de um vírus ou viroide, quando inoculada em uma hospedeira suscetível, não permite que a(s) estirpe(s) severa(s), inoculadas posteriormente, se repliquem eficientemente e induza(m) sintomas (HULL, 2014). Esse mecanismo está relacionado com a indução de silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS), já identificado em plantas de crisântemo infectadas pelo CSVd (JO et al., 2015; NABESHIMA et al., 2017).

As plantas de crisântemo coletadas em Valencia, neste trabalho, apresentavam-se sadias, ou seja, sem a expressão de nenhum tipo de sintoma. Porém, em análises de RT-PCR, um isolado de CSVd foi identificado infectando essas plantas. Quando as mesmas plantas foram analisadas por *Northern-blot* com sonda específica para o CSVd, os resultados foram negativos, confirmando que as plantas, apesar de infectadas, mantinham o viroide em concentrações muito baixas, não sendo possível a sua detecção com o emprego de técnicas menos sensíveis. Os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados e as sequências foram alinhadas e comparadas com outras sequências depositadas no *GenBank*, apresentando elevada porcentagem de identidade de nucleotídeos (dados não apresentados). Esses resultados, se confirmados, poderão ser úteis para o emprego desse isolado fraco (*mild isolate*) em estratégias de controle envolvendo proteção cruzada.

5.2. Hospedeiros alternativos do CSVd

O CSVd, assim como a maioria dos viroides, possui uma elevada estabilidade, sendo facilmente transmitido experimentalmente por inoculação mecânica, contato foliar, enxertia e ferramentas de corte contaminadas (GOBATTO et al., 2014). O círculo hospedeiras do CSVd abrange espécies de diferentes famílias botânicas, incluindo plantas de importância econômica, principalmente

espécies ornamentais dos gêneros *Dendranthema*, *Dahlia* e *Petunia*, além de espécies de plantas daninhas como *Emilia sagittata* e *Nicandra physalodes* (RUNIA; PETERS, 1980).

As inoculações realizadas no presente trabalho em diversas espécies de plantas com um isolado de CSVd permitiram a descoberta de novas hospedeiras deste viroide. Estes dados são importantes na epidemiologia da doença podendo implicar em novas práticas de manejo para o controle do CSVd no campo.

O levantamento fitossociológico foi realizado nas regiões com maior produção de crisântemo no estado de São Paulo, Artur Nogueira e Parapanema. Estas regiões encontram-se a uma distância entre elas de 235km e altitudes de cerca de 600m. O levantamento indicou que as espécies de plantas daninhas presentes nos sistemas de produção de crisântemo são em sua maioria semelhantes. Em ambas as regiões, as plantas daninhas presentes no campo não apresentaram infecções naturais com o CSVd. Entretanto, este fato não descarta a possibilidade deste viroide infectar naturalmente estas plantas no campo, uma vez que muitas delas são hospedeiras experimentais do viroide (HORST; NELSON, 1997). Não se pode descartar também o fato de que, ao realizar coletas de plantas daninhas em cultivos de crisântemo na Colômbia, uma planta da espécie *Oxalis latifolia* estava infectada naturalmente pelo CSVd, bem como as plantas de crisântemo que estavam em seu entorno.

Vulgarmente conhecida como vinagreira, aleluia, caruru, azedinha ou trevo, *Oxalis latifolia* é uma planta daninha com distribuição mundial, encontrada em diferentes tipos de cultivo como em pomares, viveiros, jardins, entre outros, uma vez que se adapta facilmente em climas tropicais e temperados (LORENZI, 2000). Originária do México e pertencente à família Oxalidaceae, que compreende mais de 950 espécies distribuídas em 6 gêneros, o gênero *Oxalis* L. é o maior gênero da família e conta com 800 espécies distribuídas por todo o mundo, destacando-se a África e as Américas como centros de diversidade.

No Brasil, ocorrem cerca de 140 espécies com destaque para *Oxalis latifolia*. De hábito herbáceo, caules aéreos e folhas compostas do tipo trifoliada, possui inflorescência de cor rósea, gineceu heterostílico e fruto do tipo cápsula (FRANCO et al., 2006). Apresenta distribuição, em território brasileiro, nas regiões Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina), em

terrenos cultivados, hortas, canteiros, estradas, além de estar amplamente distribuída em plantios de crisântemo. Embora alguns métodos de controle como mecânicos, culturais e químicos tenham apresentado alguma eficiência, na prática, sua aplicação geralmente é difícil e dispendiosa tornando-se um desafio para os produtores de crisântemo (FRANCO et al., 2006).

Outra planta daninha que merece atenção é o *Cardamine bonariensis* Pers., presença constante nos cultivos de crisântemo em São Paulo nas regiões de Artur Nogueira e Paranapanema e na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia. Esta planta está amplamente distribuída em diferentes tipos de cultivos de olerícolas e ornamentais. Apresenta ciclo reprodutivo curto, entre 40 e 50 dias, e produz uma grande quantidade de pequenas sementes que são dispersas por metros de distância, no momento da deiscência explosiva do fruto tipo síliqua (BACCHIO et al., 1984). Os produtores de crisântemo realizam inúmeras manobras de controle na tentativa de eliminar esta erva daninha, dentre eles os químicos utilizando defensivos agrícolas, mecânicos com o revolvimento do solo, vaporização e solarização na tentativa de inativar as sementes. Porém, com o insucesso, os produtores acabam rendendo-se ao controle feito manualmente (FRANCO et al., 2006). A adoção dessas práticas de manejo e controle causa prejuízos na produção de crisântemos devido ao alto custo. Identificada pela primeira vez no estado de São Paulo por Franco et al., (2006), *Cardamine bonariensis*, pertencente à família Brassicaceae (ex Cruciferae) é uma planta herbácea anual que se desenvolve nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Ruderal, tem afinidade por áreas sombreadas e úmidas e ocorre com frequência em viveiros de mudas, surgindo entre as estruturas que mantêm os vasos, nas bandejas de produção de mudas e nas entrelinhas de produção de crisântemo de corte (FRANCO et al., 2006). Embora não tenham sido identificadas infecções naturais com o CSVd em campo, quando plantas de *C. bonariensis* foram desafiadas com um isolado de CSVd, 30 dias após as inoculações, todas as plantas foram positivas em RT-PCR para o CSVd. Com esses resultados, cardamine passa a ser considerada uma potencial hospedeira do viroide. O CSVd, portanto, provavelmente, pode se manter nos campos de produção de crisântemo utilizando trevo e/ou cardamine como hospedeiras alternativas, sendo sua transmissão realizada por meio de contato foliar.

5.3. Impacto na produção causado pelo CSVd em cultivos de crisântemo

No Brasil, os produtores de crisântemo fazem o planejamento da produção de acordo com temas culturais e datas comemorativas, o que diferencia o mercado nacional de outros países pioneiros em produção e comercialização desta ornamental (AGRIANUAL, 2016). Porém, não apenas a maneira de se comercializar o crisântemo difere o Brasil dos outros mercados. As variedades que são produzidas no território nacional também influenciam a diversificação do mercado interno.

No Brasil, a diversidade de variedades de crisântemo produzidas, em comparação a países da Europa e América Latina, é bem inferior. As “variedades brasileiras” são produzidas há muitos anos e tem boa aceitação no mercado interno, o que dificulta os produtores a diversificar sua produção e adquirir variedades novas. Na intenção de renovar a visão de mercado e com a introdução de novas empresas e parcerias internacionais, o Brasil aos poucos introduz novidades na tentativa de atrair novos consumidores. Contudo, as variedades novas são introduzidas no Brasil de forma indiscriminada, gerando um trânsito informal, que possibilita a entrada de patógenos.

Um dos objetivos deste trabalho foi realizar um estudo de caso, em sistemas de produção de crisântemo, para estimar as perdas econômicas relacionadas à presença do CSVd nos campos de produção. As análises foram realizadas junto a um dos maiores produtores de crisântemo da Colômbia, localizado em Rionegro, Antioquia. É importante destacar que os sistemas de produção de crisântemo na Colômbia apresentam diferenças quando comparados aos sistemas brasileiros, principalmente com os cultivos do estado de São Paulo. Na Colômbia, as produções têm foco nas variedades de corte, sendo exportadas na forma de talos. Já no Brasil, por ter sua produção voltada para o consumo interno com volume de exportação irrelevante, o crisântemo é cultivado em vasos. Os cultivos de crisântemo na Colômbia seguem um sistema de produção muito parecido com o sistema de produção encontrado na China, o que os diferencia do Brasil que tem seu sistema de produção baseado na antiga tradição das colônias Holandesas (GRUSZYNSKI, 2001).

Um ponto em comum entre as produções brasileiras e colombianas é o cultivo dentro de estufas. Porém, os sistemas de produção são distintos. As diferenças têm início na seleção das variedades cultivadas, tratamentos culturais, formas de conduzir a produção e na comercialização. Além disso, a Colômbia é a maior potência na

produção de crisântemos para exportação da América Latina, exportando para os exigentes mercados da América do Norte e Europa (BUAINAIN, 2007). A relevância da Colômbia no mercado internacional de flores atraiu representantes dos principais *Breeders* (criadores de variedades) mundiais com um relacionamento próximo aos maiores produtores colombianos, para facilitar o atendimento e oferta de seus produtos. Vale destacar que os *Breeders* são responsáveis por criar variedades visando à oferta de novos produtos para o mercado, e oferecer aos produtores a garantia de um material livre de doenças e quaisquer outros tipos de anormalidades em suas matrizes (GRUSZYNSKI, 2001).

Mesmo com todo o controle de mudas, pragas, plantas daninhas, solo esterilizado, controles físicos e químicos de todos os setores durante todo o ciclo de produção, os produtores de crisântemo, frequentemente, queixam-se de perdas na produção. Em 2010, um dos principais produtores de crisântemo da Colômbia sofreu uma quebra importante de produção devido à infecção pelo CSVd em uma variedade de crisântemo produzida em larga escala, devido à sua excelente aceitação no mercado externo. Episódios como este tornaram-se cada vez mais comuns, pois o mercado de flores está cada vez mais exigente, fazendo com que os *Breeders* trabalhem intensamente para oferecer, cada vez mais rápido, novas variedades que agradem aos consumidores e atendam às demandas dos produtores por plantas mais resistentes às principais doenças. Frequentemente, há variedades de crisântemo que, por serem muito bem aceitas no mercado, fazem com que os produtores as mantenham por muitos anos nos sistemas de cultivo. Isso pode contribuir para que as plantas, ao longo dos anos, acumulem pragas e doenças. Além disso, podem surgir problemas de caráter genético ou de adaptação da nova variedade. Outro fator importante a ser destacado é que os viroides sofrem constantes mutações genéticas, fato que pode contribuir para a quebra de resistência das variedades (GOBATTO et al., 2014; LÓPEZ-CARRASCO; FLORES, 2017; NABESHIMA et al., 2017).

Podemos levar em consideração que as perdas econômicas causadas pelo CSVd podem ter impacto direto e indireto. O impacto direto está especificamente relacionado ao processo de produção e inclui perdas devido à redução no crescimento das plantas, vitalidade e qualidade, bem como custos adicionais de produção como por exemplo, medidas sanitárias. Já o impacto indireto está

relacionado com as alterações nos preços e no comércio internacional (VERHOEVEN, 2017).

Estudos de perdas econômicas causadas pela infecção de CSVd em plantas ornamentais, principalmente em crisântemos são pouco relatados, pois a observação e gravidade dos sintomas só podem ser observados devido a uma série de fatores como variedades suscetíveis e aumento de temperatura (Verhoeven, 2017). Dentre algumas variedades, sintomas leves ou nenhum sintoma são evidentes e conseqüentemente, as perdas de produção serão substancialmente menores. Quando utilizado material de propagação vegetativa de qualidade as perdas podem ser reduzidas ou nulas (VERHOEVEN, 2017).

Com o estudo de caso, realizado neste trabalho, foi possível mensurar as possíveis perdas causadas pelo CSVd em cultivos de crisântemo em Rionegro, Antioquia, Colômbia. Observou-se que os produtores colombianos aprenderam a conviver com a doença no campo, mantendo-a dentro de um nível de perdas considerado aceitável. Estima-se que 10% de toda a produção são descartados do produto final por fatores como quebra de talos, talos com deformação floral ou tamanhos irregulares, defeitos na coloração, dentre outros. Esses defeitos, muitas vezes, não estão associados a infecções pelo CSVd que, para os produtores, dos 10% descartados, 15% representam perdas devido ao viroide. O desconhecimento dos diferentes sintomas causados pelo CSVd, que diferem de acordo com a variedade cultivada e o caráter genético do viroide, impedem que os produtores tenham dados concretos do prejuízo causado pelo viroide. Os sintomas causados pela infecção do CSVd podem ser confundidos com outras anomalias, problemas genéticos, deficiência nutricional, escassez hídrica, presença de insetos, fungos, bactérias e vírus (BOUWEN; VAN ZAAYEN, 2003).

Outro fator importante é que os produtores colombianos se preocupam em adquirir e manter certificações de qualidade de seus produtos. As certificações representam um diferencial na competição por melhores preços de seus produtos, uma vez que os países compradores adotam um esquema de confiança com aquele produtor que as possui. Dentre as certificações, está o “Sello Verde” concedido pela Florverde® Sustentável Flores. A obtenção deste selo inclui o desenvolvimento, promoção e aplicação de códigos de conduta responsáveis, padrões e práticas agrícolas sustentáveis. A Florverde® Sustentável Flores é uma norma social e ambiental independente para o setor de flores apoiada por uma grande equipe de

agrônomos, assistentes sociais e outros profissionais. Essa equipe é responsável por revisar e atualizar o padrão sob a orientação de um conselho consultivo constituído por floricultores, agrônomos, organizações não governamentais (ONG) e funcionários do governo. Embora esta empresa seja responsável por definir um padrão, a própria certificação é concedida por organismos de certificação de terceiros, tais como a SGS, Icontec e NaturaCert. O processo de certificação inclui a revisão de documentação, inspeção da fazenda, entrevista de trabalhadores e revisão de resultados de testes de laboratório (BUAINAIN, 2007; ARROYAVE, 2009).

Outra certificação é concedida pela *Rainforest Alliance*, que possui em seus cadastros fazendeiros, cientistas, governos, ambientalistas e empresas que se dedicam à conservação da biodiversidade e a assegurar meios de subsistência sustentáveis. Anualmente os principais produtores de crisântemo da Colômbia são submetidos a auditoria para a renovação ou aquisição do selo. Esta certificação permite que eles possam ter acesso a um mercado competitivo frente a consumidores exigentes da América do Norte e Europa (BUAINAIN, 2007).

Há também a OEA - Operador Econômico Autorizado, certificação concedida pelas Aduanas aos importadores, exportadores, agentes consolidadores, portos, aeroportos, terminais, companhias marítimas e demais atores da cadeia, que confere o status de empresa segura e confiável em suas operações. Apesar de ser um programa de adesão voluntária, ela garante aos produtores de crisântemo uma confiabilidade de seus produtos e uma grande aceitação no mercado exterior. A OEA é uma parte envolvida no movimento de cargas internacionais que se insere no contexto dos programas de segurança criados por cada país, com base nas recomendações da OMA - Organização Mundial das Aduanas - para a segurança da cadeia logística. A implementação deste programa objetiva maior segurança e competitividade para o país que a possui. Para as autoridades aduaneiras, empresas que possuem a certificação da OEA atendem a padrões mínimos de segurança estabelecidos dentro dos programas de cada país. Os requisitos para se tornar uma OEA são rigorosos e exigem um alto grau de comprometimento da empresa com normas de segurança em vários setores. Dentre os inúmeros requerimentos exigidos destaca-se a segurança da carga a ser transportada, cabendo aos produtores se preocupar em implementar constantemente medidas que garantam a integridade da carga, assegurando um alto nível de controle sobre ela e principalmente com relação à sanidade (BUAINAIN, 2007; ARROYAVE, 2009).

A certificação de materiais de origem é um dos principais meios para controlar a propagação do CSVd no campo. No entanto, iniciar um programa de certificação é uma das atividades mais caras. Requer inspeção e teste de materiais de propagação e uso de medidas sanitárias. Os custos serão menores quando um programa de certificação já está em vigor para outros patógenos, como por exemplo para vírus (VERHOEVEN, 2017).

Dentre os inúmeros desafios que os produtores enfrentam para produzir flores de alta qualidade e dentro dos padrões exigidos internacionalmente, destaca-se o rigoroso controle de pragas e doenças. Dentre as pragas e doenças mais importantes para se obter todas as certificações, podem ser citadas: larva minadora (*Liriomyza* spp.), tripses (*Frankliniella occidentalis*), mosca-branca (*Bemisia tabaci*), mofo-cinza (*Botrytis* sp.), ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*), fusarium (*Fusarium oxysporum*) e ferrugem-branca (*Puccinia horiana*) (DUARTE et al., 1995; IMENES; ALEXANDRE, 1996; HORST; NELSON, 1997). Apesar do CSVd não estar listado como praga obrigatória para a retirada de certificação para a exportação de material, uma vez que o produto exportado corresponde aos talos floridos de crisântemos prontos para consumo, seu controle é exigido para a importação de novos materiais (OEPP/EPPO, 2013). Mesmo não havendo controle regulatório relacionado à infecção por CSVd para a exportação de talos, a maioria dos produtores mantém o viroide como uma das pragas mais controladas, visando ao bom relacionamento com as certificadoras e os importadores. Porém, para os *Breeders* a documentação de sanidade de mudas limpas de viroides é fundamental para a sua comercialização, implicando em multas e troca de material vegetativo todas as vezes que é identificado e rastreado até sua origem.

Apesar de todo o controle e monitoramento, algumas variedades novas que entram no mercado parecem ter uma maior suscetibilidade quando encontram uma fonte de inóculo de viroide no campo (GOBATTO et al., 2013). De alguma maneira o viroide é incorporado durante o ciclo reprodutivo e as perdas podem ser mensuradas, ao final, quando as plantas são selecionadas e encaminhadas para exportação. Há relatos de produtores com perdas de até 60% da produção no ano de 2010 por causa do CSVd, mesmo realizando todos os controles considerados possíveis.

O levantamento realizado no presente trabalho contribuiu para se comparar os sistemas de produção utilizados no Brasil com os sistemas de produção utilizados

na Colômbia. Essas informações podem ser úteis e proporcionar melhorias nos cultivos de crisântemo no Brasil, visando à melhoria na comercialização, qualidade, e estímulo aos produtores em exportarem seus produtos.

5.4. Interações viroide-hospedeiro: descoberta de mais uma proteína que interage com viroides *in vivo*

Os viroides são constituídos de ssRNAs circulares “desnudos”, ou seja, diferentemente dos vírus, não possuem capsídeo proteico e não apresentam atividade de RNA mensageiro. Portanto, os viroides não codificam proteínas, e isso implica em uma total dependência de interações com fatores da célula hospedeira para que esses patógenos possam completar as diferentes etapas do ciclo infeccioso, que incluem: replicação, processamento, movimento intra e intercelular, além dos aspectos associados à patogênese e silenciamento gênico pós-transcricional (FLORES et al., 2012; 2015; 2016; STEGER; PERREAULT, 2016). Essa necessidade de usurpar os mecanismos celulares de transcrição faz com que os viroides sejam considerados parasitas da maquinaria transcricional das células hospedeiras (FLORES et al., 2014). Para a replicação, por exemplo, que se dá exclusivamente por meio de intermediários de RNA, os membros da família *Pospiviroidae* utilizam a RNA polimerase II (dependente de DNA) para a síntese dos oligômeros em um mecanismo de círculo rolante assimétrico. Os oligômeros são então clivados em monômeros lineares por uma RNase do tipo III, sendo a ligação dos monômeros lineares em monômeros circulares realizada pela DNase I (NOHALES et al., 2012; FLORES et al., 2014; STEGER; PERRAULT, 2016).

Ao contrário, os membros da família *Avsunviroidae*, por se replicarem e se acumularem nos cloroplastos, utilizam a NEP, uma RNA polimerase cloroplástica, que, por sua vez, segue um mecanismo de círculo rolante simétrico, envolvendo atividade de ribozimas que clivam os oligômeros de ambas as polaridades *in cis*, originando os monômeros lineares (de ambas as polaridades), que são ligados por uma tRNA ligase presente nos plastídeos (NOHALES et al., 2012; FLORES et al., 2014; STEGER; PERRAULT, 2016).

Nesta revisão, constatou-se que, embora tenha havido avanços nos últimos anos, as informações relativas às interações de viroides com fatores do hospedeiro ainda são restritas. No entanto, dados experimentais, apesar de ainda limitados a

poucos trabalhos, indicam que proteínas presentes nas células vegetais devem ser recrutadas para interagir com viroides, auxiliando esses patógenos nos processos de infecção das células hospedeiras (EIRAS et al., 2011).

Em trabalhos envolvendo imunoprecipitação, proteínas de floema de cucurbitáceas (PP2 e CmmLec17) foram identificadas em interação com o *Hop stunt viroid* (*Pospiviroidae*), auxiliando no movimento deste viroide via floema (GÓMEZ; PALLÁS, 2001; OWENS et al., 2001; GÓMEZ; PALLÁS, 2004; GÓMEZ et al., 2005).

Em experimentos envolvendo o patossistema tomateiro-PSTVd, identificou-se uma proteína denominada viroid RNA-binding protein 1 (Virp1), que apresenta um sinal de localização nuclear capaz de se unir a um “motivo” denominado RY, presente na molécula do PSTVd, com implicação no movimento intracelular (MARTÍNEZ DE ALBA et al., 2003; GOZMANOVA et al., 2003; KALANTIDIS et al., 2007).

Em experimentos envolvendo hibridização *northwestern* partindo de extrato de folhas de pessegueiro, identificaram-se proteínas, incluindo o fator de alongação 1-alfa (eEF1A), que interagem com o *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd, *Pelamoviroid*, *Avsunviroidae*) por meio da união de uma porção estruturada da molécula do PLMVd denominada P1 (DUBÉ et al., 2009). Em experimentos utilizando folhas de tomates infectados com PSTVd e irradiadas com UV, foi possível confirmar que o loop E existe *in vitro* e *in vivo* (BRANCH et al., 1985; EIRAS et al., 2007; WANG et al., 2007), indicando ter relevância fisiológica. Posteriormente, Eiras et al. (2011) demonstraram, em ensaios de união *in vitro*, que duas proteínas (L5 e TFIIIA) unem-se às moléculas de polaridade positiva (+) do PSTVd com a mesma afinidade que se unem *in vivo* ao rRNA 5S, seu substrato natural, diferentemente do ASBVd, um viroide de cloroplasto, que não possui o Loop E, sugerindo que esse elemento de estrutura terciária deve ter relação direta com a ligação dessas proteínas ao viroide. A L5 está envolvida no transporte entre núcleo e citoplasma do rRNA 5S e poderia facilitar o transporte de moléculas de polaridade (+) do PSTVd para células vizinhas assim como poderia também contribuir com a passagem seletiva para o nucléolo. A proteína TFIIIA é um fator de transcrição da RNA polimerase III utilizado para a transcrição do rDNA 5S e está envolvida na síntese e acúmulo de rRNA 5S. Esta proteína poderia unir o RNA do viroide com a RNA polimerase, sendo um candidato ao envolvimento com replicação dos viroides nucleares (EIRAS et al., 2011).

Mais recentemente, López-Carrasco e Flores (2016) observaram, em análises *in vivo*, que uma grande proporção dos RNA viroidais se acumulam nas células do hospedeiro de forma “desnuda”, ao invés de permanecerem associados constantemente com proteínas do hospedeiro. Isso, de alguma forma, sugere que deve haver uma regulação celular e controle das interações moleculares RNA-proteína. No entanto, certos nucleotídeos da “CCR” mais precisamente localizados no “loop E” de membros da família *Pospiviroidae*, envolvidos com funções de replicação, são mais ativos *in vitro* do que *in vivo*. A interação com as proteínas que mediam algumas dessas funções de replicação ou mudanças estruturais promovidas por outros fatores ocorrem de forma natural e mais abundantemente *in vivo* (LÓPEZ-CARRASCO; FLORES, 2016).

No presente trabalho, com o intuito de identificar novas proteínas e suas interações com diferentes viroides, foram selecionadas três espécies de viroides para a realização das análises: (i) ASBVd, gênero *Avsunviroid*, família *Avsunviroidae*, com replicação e acúmulo nos cloroplastos e atividade de ribozimas nas moléculas de ambas as polaridades; (ii) PSTVd e (iii) CSVd, ambos pertencentes ao gênero *Pospiviroid*, família *Pospiviroidae*, os quais replicam-se no núcleo das células hospedeiras, mas não apresentam atividade de ribozimas.

Nas abordagens que foram empregadas neste trabalho, para estudar e identificar possíveis interações de viroides com proteínas do hospedeiro, houve a necessidade de se obter uma grande quantidade de material vegetal infectado e com elevadas concentrações de cada espécie de viroide nos tecidos. Isto foi necessário, pois considerou-se que, além da degradação natural que pudesse ocorrer durante os processos de extração dos complexos RNA-proteína, deveria haver material suficiente para a realização das análises, e que essa quantidade de material permitisse: (i) a visualização da formação de adutos (complexos RNA-proteína) nos géis de poliacrilamida; e (ii) a realização das análises para a identificação das proteínas por HPLC e espectrometria de massas. Portanto, em função da facilidade de manipulação e do acúmulo em elevadas concentrações nos tecidos das suas respectivas hospedeiras, utilizaram-se patossistemas modelo para esses estudos: PSTVd-tomateiro, ASBVd-abacateiro e CSVd-crisântemo.

As análises de proteômica realizadas para os complexos de RNA de ASBVd com proteínas do abacateiro confirmaram a presença de duas proteínas idênticas, porém de origem distinta: a superóxido dismutase [Cu-Zn]₂ (SOD) similar a esta

proteína de *A. thaliana* com um número de 0,21emPAI (índice de abundância em proteína); e a superóxido dismutase [Cu-Zn] (SOD) similar a *Oryza sativa* subsp. Japônica, com número de 0,22emPAI. Daròs e Flores (2002), em experimentos envolvendo irradiação com luz UV de folhas de abacateiro infectadas pelo ASBVd, identificaram a formação de dois adutos principais, nomeados de adutos 3 e 4. Os autores, naquela ocasião, identificaram por espectrometria de massas a proteína PARBP33 correspondente ao aduto 3. A PARBP33 é uma proteína do tipo chaperona que facilita a auto-clivagem pelas ribozimas dos RNAs diméricos do ASBVd (observações feitas *in vitro*). Sabe-se que as proteínas de cloroplasto, como é o caso da PARBP33, estão envolvidas em inúmeros passos do metabolismo pós-transcriptional de transcritos de RNA de cloroplasto, incluindo a maturação dessa organela. Os autores sugeriram que a autoclivagem por meio de ribozimas do tipo “cabeça-de-martelo”, um passo-chave do mecanismo de replicação por círculo rolante, poderia ser favorecida pela proteína PARBP33.

Como neste trabalho os adutos correspondentes de ambas as regiões 3 e 4 foram encaminhados para análises de espectrometria de massas, a proteína PARBP33 também foi identificada. Porém, há fortes indícios de que a SOD identificada neste trabalho corresponde a uma das proteínas geradas no aduto 4.

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e superóxido de hidrogênio. Ela é considerada uma enzima importante para a defesa antioxidante para as células quando são expostas ao oxigênio. Encontra-se no citosol de praticamente todas as células eucarióticas, onde adquire ligação com cobre e zinco (Cu+Zn+SOD). Esta enzima sofre alterações de seus níveis quando a célula é exposta a algum tipo de estresse, tanto abiótico quanto biótico, como, por exemplo, devido à infecção pelo ASBVd. Visto que este viroide se replica e se acumula nos cloroplastos das células hospedeiras (LÓPEZ-CARRASCO; FLORES, 2017), pode-se intuir que, após a replicação, o RNA viroidal permanece disponível, tanto nos cloroplastos como no citosol da célula, onde, muito provavelmente, por afinidade, associa-se às proteínas Cu+Zn+SOD que estejam livres. Esta afinidade pode ser maior ou menor, de acordo com os sítios de ligação entre hélices da proteína e “motivos” (que dependem da conformação da molécula) presentes no viroide, e também de acordo com as cargas iônicas exercidas. Após a união entre o RNA e a proteína, este complexo (ribonucleoproteico) pode ser transportado para as

células vizinhas, permitindo que o viroide continue seu ciclo infeccioso em uma nova célula.

Futuramente estes resultados deverão ser corroborados com o emprego de outros métodos moleculares e sorológicos para identificar e caracterizar essas ligações.

Nos experimentos de interação PSTVd-tomateiro, empregou-se o mesmo protocolo de extração dos adutos que foi utilizado para o ASBVd. Os produtos das extrações também foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (TBE 1X) em presença de ureia 5M, e visualizados sob luz UV em presença de brometo de etídio, sendo as regiões correspondentes às proteínas identificadas eluídas do gel e encaminhadas para o mesmo laboratório de proteômica. Porém, infelizmente, nenhuma proteína foi identificada. Os experimentos foram repetidos inúmeras vezes, porém, sem sucesso na identificação de qualquer proteína. Presume-se que algum tipo de degradação, em alguma fase do processo, possa ter ocorrido.

As análises de interação CSVd-crisântemo não puderam ser realizadas. Antes da realização dos experimentos, plantas de crisântemo de duas variedades distintas, supostamente livres de viroides, foram adquiridas em um comércio local de plantas ornamentais na cidade de Valência, Espanha. Além disso, plantas de crisântemo da variedade "*Bonnie Jean*" sadias e infectadas com um isolado de CSVd foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. *Bonnie Jean* é uma antiga variedade de crisântemo, não mais comercializada, porém ainda utilizada experimentalmente para estudos com o CSVd, por ser suscetível e permitir que o viroide se acumule sistemicamente nos seus tecidos em altas concentrações (HORST; NELSON, 1997).

As plantas de crisântemo, supostamente livres de viroides, compradas no mercado espanhol, foram então avaliadas quanto à presença do CSVd. Inicialmente, análises de hibridização por *Northern-blot* com a utilização de sondas específicas foram negativas para a presença do CSVd, o que sugeria que as plantas estavam livres do viroide. Porém, quando se avaliou a infecção por RT-PCR, os resultados foram positivos. Isso indicava que as plantas estavam infectadas com um isolado de CSVd que se acumulava em baixíssimas concentrações. Curiosamente, 100% das plantas de crisântemo (de ambas as variedades), provenientes do mercado espanhol, que foram avaliadas, encontravam-se infectadas por esse isolado de CSVd. Mais surpreendente foi notar que, quando as plantas pré-infectadas com o

isolado espanhol foram desafiadas com um isolado brasileiro de CSVd, o isolado brasileiro não pôde ser detectado (e recuperado), e as plantas continuavam assintomáticas, porém ainda infectadas pelo isolado espanhol, resultados confirmados por RT-PCR (dados não mostrados). Esses resultados sugeriram se tratar de um fenômeno de proteção cruzada (*cross-protection*), em que uma planta, quando inoculada com uma estirpe fraca (ou isolado fraco) do viroide, fica protegida de infecções subsequentes por estirpes mais severas do mesmo viroide. Além disso, esse isolado fraco de CSVd tem potencial para ser utilizado como ferramenta biológica para o controle do CSVd via proteção cruzada.

Quando se compararam as sequências de nucleotídeos obtidas desses isolados (fracos) espanhóis de CSVd com os outros isolados de CSVd provenientes do Brasil e da Colômbia, observou-se que os isolados espanhóis apresentavam uma mutação em um único nucleotídeo na região superior da molécula do CSVd, mais precisamente no domínio “V”, onde normalmente se encontra a maior variabilidade entre viroides do mesmo gênero. Todos os outros isolados, tanto brasileiros como colombianos, apresentavam diferentes mutações nas regiões “C”, que contém a Região Central Conservada (CCR), e “P” (Patogenicidade). Vale ressaltar que as mutações foram observadas em regiões da molécula em que não há pareamento entre as bases (“loops”), não causando alterações importantes na estrutura do viroide.

Butković et al. (2017) observaram comportamentos semelhantes em plantas de *Ocimum basilicum* e *Salvia hispanica*, quando inoculadas com isolados de CbVd-1 e CbVd-3, e Tsushima e Sano (2015) com plantas de *Ocimum basilicum* e *Mentha spicata* inoculadas experimentalmente com isolados de CbVd-1 e CbVd-5, ambos obtidos de plantas infectadas com *Coleus blumei viroid* (CbVd, gênero *Coleviroid*, *Pospiviroidae*) da variedade “Aurora black cherry”. As plantas da família Lamiaceae, quando inoculadas com esses viroides, não exibiram sintomas característicos da doença e mutações foram observadas à direita da “CCR”, próxima ao domínio “V”.

Em resumo, há evidências de que os isolados espanhóis de CSVd que contêm a mutação no domínio “V” da molécula, impedem que outros isolados de CSVd, quando inoculados, se repliquem com eficiência. Assim, as plantas, apesar de infectadas sistemicamente, mantêm populações do viroide replicando em seus tecidos em baixíssimas concentrações, sem expressar sintomas. Esses eventos devem ocorrer de forma espontânea, na natureza, e os produtores de crisântemo

comercializam e propagam essas plantas sem o conhecimento de que, embora aparentemente saudáveis, encontram-se infectadas, o que permite a manutenção de populações de viroides nos sistemas de cultivo. Testes futuros serão realizados para confirmar a viabilidade de emprego desse isolado fraco em sistemas de controle do CSVd em crisântemo via proteção cruzada.

6. 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, e na região de Rionegro, Antioquia, Colômbia.

O sequenciamento e análises das sequências do genoma de 35 isolados de CSVd provenientes de cultivos de crisântemo no Brasil, Colômbia e Espanha, revelaram uma elevada identidade de nucleotídeos quando comparada com outros isolados de CSVd depositados no *GenBank*.

Com as análises filogenéticas, observou-se que os isolados brasileiros de CSVd distribuíram-se nos três grupos (clados) principais, sugerindo uma relação dessa variabilidade genética com diferentes introduções de germoplasma infectado proveniente de diferentes países.

O estudo fitossociológico permitiu a identificação de 21 espécies de plantas daninhas coletadas em cultivos de crisântemo no estado de São Paulo. *Cardamine bonariensis* Pers., *Chamaesyce hirta*, *Conyza bonariensis*, *Oxalis latifolia*, *Emilia sagittata* e *Portulaca oleracea* quando desafiadas por inoculação mecânica com um isolado de CSVd, foram infectadas, indicando que estas plantas podem atuar como reservatório do CSVd no campo.

Plantas de *Oxalis latifolia* infectadas naturalmente com CSVd foram identificadas em um cultivo de crisântemo na Colômbia, sendo este o primeiro relato do CSVd nessa hospedeira.

As perdas causadas pela presença do CSVd nos cultivos de crisântemo podem ultrapassar 15% da produção final. Porém, os produtores aprenderam a conviver com o patógeno no campo. Comparações entre os sistemas de produção de crisântemo no Brasil e na Colômbia poderão ser úteis para melhorar a qualidade e a comercialização no mercado interno, além de incentivar os produtores a exportarem sua produção.

Foram observadas várias diferenças entre os cultivos colombianos e brasileiros. A principal delas é que na Colômbia os cultivos são divididos em 4 etapas: área núcleo

para o recebimento e enraizamento das matrizes, área das avós onde são retiradas as primeiras mudas, área das mães onde são mantidas plantas provenientes da área anterior e retiradas novas mudas e área das filhas destinada ao produto final. Também foi observado que nos cultivos colombianos há um fluxo único a ser seguido nas estufas bem como o controle da entrada de funcionários em cada uma das etapas. Os produtores colombianos prezam a qualidade das mudas adquiridas, sendo realizadas indexações de mudas antes da entrada na área núcleo, e o controle, por amostragem, em cada uma das etapas seguintes, além do monitoramento constante de pragas e plantas da vegetação espontânea bem como a erradicação de material suspeito. Outra diferença observada entre os cultivos colombianos e brasileiros é que na Colômbia, as produções têm foco nas variedades de corte, sendo exportadas na forma de talos. Já no Brasil, a produção é voltada para o mercado interno sendo a exportação um fato irrelevante, assim o tipo de crisântemo cultivado é envazado. Um outro fator importante observado é que os produtores colombianos se preocupam em adquirir e manter certificações de qualidade de seus produtos enquanto que no Brasil há poucas exigências de qualidade para a comercialização dos seus produtos.

Nos estudos de interação viroide-hospedeiro, identificou-se uma proteína de abacateiro que interage com o *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) *in vivo*: a superóxido dismutase (SOD).

Um fenômeno de proteção cruzada (*cross protection*) foi observado ocorrendo naturalmente em plantas de crisântemo adquiridas no comércio local de plantas ornamentais em Valencia, Espanha, infectadas com um isolado fraco do CSVd. Identificou-se uma mutação no domínio "V" da molécula desse isolado, sugerindo que essa mutação pode estar diretamente envolvida nesse fenômeno. Trabalhos estão sendo realizados para se comprovar os resultados e também avaliar o possível emprego desse isolado fraco em sistemas de controle do CSVd em crisântemo via proteção cruzada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADKAR-PURUSHOTHAMA, C.R.; CHENNAPPA, G.; POORNACHANDRA RAO, K.; SREENIVASA, M.Y.; MAHESHWAR, P.K.; NAGENDRA PRASAD, M.N.; SANO, T. Molecular diversity among viroids infecting chrysanthemum in India. **Virus Genes**, v.5, n.4, p.636-642, 2017.

AGRIANUAL 2016. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Informa Economics FNP, 2016. 543p.

ANDRADE, P. F. S. **Floricultura - Análise da conjuntura agropecuária - safra 2015/16**. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/flores_2015_16.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

ARROYAVE, S.M.S. *Los instrumentos económicos como incentivos a la internalización de costos ambientales en empresas floricultoras colombianas*. p.112. Universidad de Medellín, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Maestría en Administración– MBA. Medellín, 2009.

AXTELL, M.J. Classification and comparison of small RNAs from plants. **Annual Rev Plant Biology**, v.64, p.137-159, 2013.

BACCHIO, O.; LEITÃO FILHO, H.F.; ARANHA, C. **Plantas invasoras de culturas**. Campinas: Editora da Unicamp, v.3, p.647-662, 1984.

BARTSCH, L. B.; GOMES, M. C. Análise econômica para a produção de crisântemos (*Dendranthema X grandiflorum*, Ramat) de corte nos municípios do sul do RS. Abstracts, XIII Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal de Pelotas, 2004.

BOSTAN H., NIE X., SINGH R.P. An RT-PCR primer pair for the detection of pospiroviroids and its application in surveying ornamental plants for viroids. **Journal of Virological Methods**, v.116, p.189-193, 2004.

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

BRAUN-BLANQUET, J. Fitosociología: bases para el estudio de las comunidades vegetales. **Madrid: H. Blume**, ed.3, p.820, 1979.

BRANCH, A.D.; BENEFELD, B.J.; ROBERTSON, H.D. Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.82, p.6590-6594, 1985.

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

BUAINAIN, A.M. Instituto Interamericano de Cooperación Para a Agricultura - IICA. **Cadeias produtivas de flores e mel**. Distrito Federal: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa, 2007. p.139, v.9 (MAPA. Agronegócios).

BUTKOVIĆ, A. *Biološke i molekularne značajke Coleus blumei viroida* 3. p. 56. Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of the Zagreb. Croácia, 2017.

CHAMBERS, G.A.; DONOVAN, N.J.; BODAGHI, S.; JELINEK, S.M.; VIDALAKIS, G. A novel citrus viroid found in Australia, tentatively named citrus viroid VII. **Archives of Virology**, v.163, p.215-218, 2017.

CHO, W. K.; JO, Y.; JO, K. M.; KIM, K. H. A Current Overview of Two Viroids That Infect Chrysanthemums: *Chrysanthemum stunt viroid* and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. **Viruses**, v. 5, p. 1099-1113, 2013.

DARÒS, J.A.; FLORES, R. A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. **EMBO Journal**, v.21, p. 749-759, 2002.

DARÒS, J.A.; FLORES, R. Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.101, p.6792-6797, 2004.

DE LA PEÑA, M.; FLORES, R. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. **Journal of Molecular Biology**, v.321, p.411-421, 2002.

DELGADO, S.; MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. A short double-stranded RNA motif of Peach latent mosaic viroid contains the initiation and self-cleavage site of both polarity strands. **Journal of Virology**, v.79, p.12934-12943, 2005.

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.

DI SERIO F. Identification and characterization of potato spindle tuber viroid infecting Solanum jasminoides and S. rantonnetii. **Journal of Plant Pathology**, v.89, p.297-300, 2007.

DI SERIO, F.; FLORES, R.; VERHOEVEN, J.T.J.; LI, S.F.; PALLAS, V.; RANGLES, J.W.; SANO, T.; VIDALAKIS, G.; OWENS, R.A. Current Status of viroid taxonomy. **Archives of Virology**, v. 159, p. 3467-3478, 2014.

DIENER, T.O.; RAYMER, W.B. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. **Science**, v.158, p.378-381, 1967.

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 weather virions exit in extracts or in situ. **Virology**, v.43, p.75-89, 1971.

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

DIMOCK, A.W.; GEISSINGER, C. A newly recognized disease of chrysanthemums 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. 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 Tosspovirus. **Journal of Phytopathology**, v. 143, p. 569-571, 1995.

DUBÉ, A.; BISSAILLO, M.; PERREAULT, J.P. Identification of proteins from *Prunus persica* that interact with *Peach latent mosaic viroid*. **Journal of Virology**, v.16, p.12057-12067, 2009.

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

EIRAS, M.; KITAJIMA, E.W.; FLORES, R.; DARÒS, J.A. Existence *in vivo* of the loop E motif in *Potato spindle tuber viroid* RNA. **Archives of Virology**, v.152, p.1389-1393, 2007.

EIRAS, M. Viroides, pequenos RNAs patogênicos capazes de replicação autônoma: modelos moleculares para o estudo de interações patógeno-hospedeiro e evolução. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.4, p.751-758, 2010.

EIRAS, M.; NOHALES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; FLORES, R.; DARÒS, 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.; GALETTI, S. R. **Técnicas de Diagnóstico de Fitopatógenos**. São Paulo: Devir Livraria, 2012. p.192.

EIRAS, M. ncRNAs genômicos e parasitas: viroides, virusoides e RNAs satélites (capítulo II, Seção 9). In: PEREIRA, T.C. (Ed.). **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. p.66-70. 2017a.

EIRAS, M. Tubérculo afilado da batata: uma doença causada por viroide. In: SALAS, F.J.S; TOFOLI, J.G. (Eds.) **Cultura da batata: Pragas e Doenças**. 1ª edição. São Paulo, SP: Instituto Biológico. p.207-2014. 2017b.

FERNOW, K.H.; PETERSON, L.C.; PLAISTED, R.L. The tomato test for eliminating spindle tuber from potato planting stock. **American Potato Journal**, v.46, p.424-429, 1969.

FLORES, R.; SEMANCIK, J.S. Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.79, p.6285-6288, 1982.

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

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

FLORES, R.; SERRA, P.; MINOIA, S.; DI SERIO, F.; NAVARRO, B. Viroids: from genotype to phenotype just relying on RNA sequence and structural motifs. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p.217, 2012.

FLORES, R.; GAGO-ZACHERT, S.; SERRA, P.; SANJU, R.; ELENA, S.F. Viroids: Survivors from the RNA World? **Annual Review of Microbiology**, v.68, p. 395-414, 2014.

FLORES, R.; OWENS, R.A; TAYLOR, J. Pathogenesis by subviral agents: viroids and hepatitis delta virus. **Current Opinion in Virology**, v.17, p.87-94, 2016.

FLORES, R.; NAVARRO, B.; KOVALSKAYA, N.; HAMMOND, R.W.; DI SERIO, F. Engineering resistance against viroids. **Current Opinion in Virology**, v.26, p.1-7, 2017.

FONSECA, M.E.N.; MARCELLINO; L.H.; KITAJIMA, E.W; BOITEUX, L.S. Nucleotide sequence of the original Brazilian isolate of colesus yellow viroid from *Solenostemon scutellarioides* and infectivity of its complementary DNA. **Journal of General Virology**, v.75, p.1447-1449, 1994.

FRANCO, D.A.S.; ROZANSKI, A.; ALMEIDA, S.D.B.; MATALLO, M.B. Levantamento fitossociológico do agrião amargo (*Cardamine bonariensis Pers.*) em sistema de produção de crisântemo. **O Biológico**, v.68, Suplemento, p564-565, 2006.

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

GAS, M.E., HERNÁNDEZ, C., FLORES, R., DARÒS, J.A. Processing of nuclear viroids in vivo: an interplay between RNA conformations. **PLoS Pathogens**, v.3, p.1813-1826, 2007.

GAS, M.E.; MOLINA-SERRANO, D.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R.; DARÒS, J.A. Monomeric linear RNA of *Citrus exocortis viroid* resulting from processing *in vivo* has 5'-Phosphomonoester and 3'-Hydroxyl Termini: implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. **Journal of Virology**, v.82, p.10321-10325, 2008.

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, 2012.

GOBATTO, D. Viroides em Crisântemo: levantamento, identificação, caracterização, avaliação de fontes de resistência e desenvolvimento de métodos de diagnóstico. Dissertação de Mestrado. 67 fls. Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico. 2013.

GOBATTO, D.; CHAVES, A.L.R.; HARAKAVA, R.; MARQUE, J.M.; DARÒS, J.A.; EIRAS, M. *Chrysanthemum stunt viroid* in Brazil: survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. Abstracts, XXIV Congresso Brasileiro de Virologia & VIII Encontro de Virologia do Mercosul. Porto Seguro, 01 a 04 de setembro de 2013. (resumo - Prêmio Helio Gelli Pereira). **Virus Reviews and Research**, v.18 (Supplement 1), p.15, 2013.

GOBATTO, D.; CHAVES, A.L.R.; HARAKAVA, R.; MARQUE, J.M.; DARÒS, J.A.; EIRAS, M. *Chrysanthemum stunt viroid* in Brazil: survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. **Journal of Plant Pathology**, v.96, p.111-119, 2014.

GOBATTO, D.; EIRAS, M. Viroides em ornamentais (capítulo 4). *In*: ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L.; CAMPOS, A.E.C. (Eds.) **Plantas ornamentais: doenças e pragas**. 2ª Edição. São Paulo: Devir Livraria, p.171-199. 2017.

GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.910-913, 2001.

GÓMEZ, G.; PALLÁS, V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. **Journal of Virology**, v.78, p.10104-10110, 2004.

GÓMEZ, G.; TORRES, H.; PALLÁS, V. Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. **Plant Journal**, v.41, p.107-116, 2005.

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

GOZMANOVA, M.; DENTI, M.A.; MINKOV, I.N.; TSAGRIS, M.; TABLER, M. Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.5534-5543, 2003.

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. **Prudução 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.

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 aspermy 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, aspermy and mosaic on flowering and rooting of chrysanthemums. **Phytopathology**, v.67, p.9-14, 1977.

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.

HULL, R. **Plant Virology**. 5th Edition. London: Academic Press. 1104p. 2014.

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

ISHIDA, I.; TUKAHARA, M.; YOSHIOKA, M.; OGAWA, T.; KAKITANI, M.; TOGURI, T. Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. **Pest Management Science**, v. 58, p. 1132-1136, 2002.

JO, K.M.; JO, Y.; CHOI, H.; CHU, H.; LIAN, S.; YOON, J.Y. Development of genetically modified chrysanthemums resistant to *Chrysanthemum stunt viroid* using sense and antisense RNAs. **Sci. Hortic.**, v. 195, p. 17-24, 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M.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.

JUNQUEIRA, H.; PEETZ, M.S. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do Brasil, no período de 2008 a 2013: atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.20, n.2, p. 115-120, 2014.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. **Cadeia produtiva de Flores e plantas ornamentais do Brasil**: Dimensões, características, tendências e perspectivas. 2015. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/13789.PDF>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

KALANTIDIS, K.; DENTI, M.A.; TZORTZAKAKI, S.; MARINO, E.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. Virp1 is a host protein with a major role in *Potato spindle tuber viroid* infection in *Nicotiana* plants. **Journal of Virology**, v.81, p.12872-12880, 2007.

KOLONKO, N.; BANNACH, O.; ASCHEMANN, K.; HU, K.H.; MOORS, M.; SCHMITZ, M.; STEGER, G.; RIESNER, D. Transcription of Potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. **Virology**, v.347, p.392-404, 2006.

LAVILA, A. M. **El crisântemo cultivado, multiplicación y enfermedades**. Madrid: Mundi Prensa, 1992. p.172.

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

LEE, G.; SHIM, H.K.; KWON, M.H.; SON, S.H.; KIM, K.Y.; PARK, E.Y.; YANG, J.K.; LEE, T.K.; AUH, C.K.; KIM, D.; KIM, I.S.; LEE, S. RNA virus accumulation is inhibited by ribonuclease activity of 3D8 scFv in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v.115, p.189-197, 2013.

LINO, Y.; SUGIMOTO, A.; YAMAMOTO, M. *S. pombe* pac1+, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. **EMBO Journal**, v. 10, p. 221-226, 1991.

LÓPEZ-CARRASCO, A.; FLORES, R. Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid in vivo: A “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed in vitro. **RNA Biology**, v.14, p.1046-1054, 2017.

LÓPEZ-CARRASCO, A.; FLORES, R. The predominant circular form of avocado sunblotch viroid accumulates in planta as a free RNA adopting a rod-shaped secondary structure unprotected by tightly bound host proteins. **Journal of General Virology**, v.98, p. 1913-1922, 2017.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3ed. Nova Odessa, AP: Instituto Plantarium, 2000. 640p.

LUIGI, M.; LUISON, D.; TOMASSOLI, L.; FAGGIOLI, F. Natural spread and molecular analysis of pospiviroids infecting ornamentals in Italy. **Journal of Plant Pathology**, v.93, p.491-495, 2011.

MALFITANO, M.; DI SERIO, F.; COVELLI, L.; RAGOZZINO, A.; HERNÁNDEZ, C.; FLORES, R. Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. **Virology**, v.313, p.492-501, 2003.

MARTÍNEZ DE ALBA, A.E.; SAGESSE, R.; TABLER, M.; TSAGRIS, M. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. **Journal of Virology**, v.77, p.9685-9694, 2003.

MATSUSHITA, Y.; PENMETCHA, K.K.R. In vitro-transcribed *Chrysanthemum stunt viroid* RNA is infectious 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.

MENZEL, W.; MAISS, E. Detection of chrysanthemum stunt viroid (CSVd) in cultivars of *Argyranthemum frutescens* by RT-PCR-ELISA. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.107, p.548-552, 2000.

MÜHLBACH, H.P.; SÄNGER, H.L. Viroid replication is inhibited by α -amanitin. **Nature**, v. 278, p.185–188, 1979.

NABESHIMA, T.; HOSOKAWA, M.; YANO, S.; OHISHI, K.; DOI, M. Screening of chrysanthemum cultivars with resistance to chrysanthemum stunt viroid. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.81, p. 285- 294, 2012.

NABESHIMA, T.; DOI, M.; HOSOKAWA, M. Comparative Analysis of Chrysanthemum Stunt Viroid Accumulation and Movement in Two Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) Cultivars with Differential Susceptibility to the Viroid Infection. **Frontiers in Plant Science**, online, v.8, art 1940, 2017.

NAKASHIMA, A., HOSOKAWA, M., MAEDA, S. & YAZAWA, S. Natural infection of chrysanthemum stunt viroid in dahlia plants. **Journal of General Plant Pathology**, v.73, p.225–227, 2007.

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, J.A.; VERA, A.; FLORES, R. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. **Virology**, v.268, p.218-225, 2000.

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.

NIE, X.Z.; SINGH, R.P.; BOSTAN, H. Molecular cloning, secondary structure, and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plants. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.27, p.592-602, 2005.

NOHALES, M. A.; FLORES, R.; DARÒS, J. A. Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, p. 13805-10, 2012.

OEPP/EPPO. Chrysanthemum stunt viroid: inspection. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013, v.43, ed.3, p. 396.

OGAWA, T.; TOGURI, T.; KUDOH, H.; OKAMURA, M.; MOMMA, T.; YOSHIOKA, M.; KATO, K.; HAGIWARA, Y.; SANO, T. Double-stranded RNA-specific ribonuclease confers tolerance against chrysanthemum stunt viroid and tomato spotted wilt virus in transgenic chrysanthemum plants. **Breeding Science**, v. 55, p. 49-55, 2005.

OLIVETTI, M. P. A.; TAKAES, M.; MATSUNAGA, M. Perfil da produção das principais flores de corte no estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 24, n. 7, p. 31-54, jul. 1994.

OWENS, R.A.; BLACKBURN, M.; DING, B. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.905-909, 2001.

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. 2012. p. 1221-1234.

PALUKAITIS, P. What has been happening with viroids? **Virus Genes**, v. 49, p.175-184, 2014.

QI, Y.; PELISSIER, T.; ITAYA, A.; HUNT, E.; WASSENEGER, M.; DING, B. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. **Plant Cell**, v.16, p.1741-1752, 2004.

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.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHUSALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n.1, p.11-17, 1999.

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

SANO, T.; NAGAYAMA, A.; OGAWA, T.; ISHIDA, I.; OKADA, Y. Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. **Nature Biotechnology**, v.15, p.1290-1294, 1997.

SEBRAE, Flores e plantas ornamentais do Brasil. Configuração geoeconomica. **Série estudos mercadológicos**, v.1, p.42, 2015a.

SEBRAE, Flores e plantas ornamentais do Brasil. Comércio e serviços. **Série estudos mercadológicos**, v.2, p.42, 2015b.

SERRA, P.; MESSMER, A.; SANDERSON, D.; JAMES, D.; FLORES, R. Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus Pelamoviroid. **Virus Research**, v. 249, p. 8-15, 2018.

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

SINGH, R.P. Reassessment of the presence of viroid species of the genus Pospiviroid in infected floral parts, using reverse transcription-polymerase chain reaction and infectivity assays. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.28, p.242-249, 2006a.

SINGH, R.P.; BARANWAL, V.K. Symptomless expression of citrus exocortis viroid in ornamental plant species, Impatiens and Verbena, may be a potential threat to potato and tomato crops. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.28, p.364, 2006b.

SOFY, A.R.; MAHFOUZE, S.A.; EL-ENANY, M.A.M. Isozyme markers for response of wild potato species to potato spindle tuber viroid Egyptian isolate. **World Apply Sciences Journal**, v.27, p. 1010-1022, 2013.

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.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. **Instituto Plantarum**, 2012. 768p.

SPIEKER, R.L.; HAAS, B.; CHARNG, Y.C.; FREIMULLER, K.; SANGER, H.L. Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue'. **Nucleic Acids Research**, v18, p39-89, 1990.

SPIEKER, R.L. A viroid from *Brunfelsia undulate* closely related to the columnnea latent viroid. **Archives of Virology**, v.141, p.1823-1832, 1996a.

SPIEKER, R.L. The molecular structure of Iresine viroid, a new viroid species from Iresine herbstii (beefsteak plant). **Journal of General Virology**, v.77, p.2631-2635, 1996b.

STEGER, G.; PERREAULT, J.P. Structure and Associated Biological Functions of Viroids. **Advances in Virus Research**, v.94, p.141-172, 2016.

SYLLER, J.; MARCZEWSKI, W.; PAWŁOWICZ, J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 285–289, 1997.

SYLLER, J.; MARCZEWSKI, W. Potato Leafroll Virus-assisted Aphid Transmission of Potato Spindle Tuber Viroid to Potato Leafroll Virus-resistant Potato. **Journal of Phytopathology**, v. 149, p. 195 – 201, 2001.

TAKEDA, R.; ZIRBEL, C.L.; LEONTIS, N.B.; WANG, Y.; DING, B. Allelic RNA Motifs in Regulating Systemic Trafficking of Potato Spindle Tuber Viroid. **Viruses**, v.10, p160, 2018.

TSUSHIMA, T., MURAKAMI, S., ITO, H., HE, Y.-H., RAJ, A. P. C. & SANO, T. Molecular characterization of potato spindle tuber viroid in dahlia. **Journal of General Plant Pathology**, v.77, p.253–256, 2011.

TSUSHIMA, T.; SANO, T. Analysis of genetic stability and seed transmission of Coleus blumei viroid 1 variants with different internal loop structures. **Viroid 2015: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs Book of Abstracts**, June 25-28, Česke Budějovice, pp. 67-68, 2015.

VERHOEVEN, J.T.J.; ARTS, M.S.J.; OWENS, R.A.; ROENHORST, J.W. Natural infection of petunia by chrysanthemum stunt viroid. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, p.383-386, 1998.

VERHOEVEN, J.T.J.; JANSEN, C.C.C.; ROENHORST, J.W. First report of potato virus M and Chrysanthemum stunt viroid in *Solanum jasminoides*. **Plant Disease**, v.90, p.1359, 2006.

VERHOEVEN, J.T.J.; JANSEN, C.C.C.; WERKMAN, A.W.; ROENHORST, J.W. First report of tomato chlorotic dwarf viroid in *Petunia* hybrid from United States of America. **Plant Disease**, v.91, p.324, 2007.

VERHOEVEN, J.T.J.; JANSEN, C.C.C.; ROENHORST, J.W. First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: citrus exocortis viroid in *Verbena* spp., potato spindle tuber viroid in *Brugmansia suaveolens* and *Solanum jasminoides*. **Plant Pathology**, v.57, p.399, 2008a.

VERHOEVEN, J.T.J.; JANSEN, C.C.C.; ROENHORST, J.W. *Streptosolen jamesonii* 'yellow', a new host plant of potato spindle tuber viroid. **Plant Pathology**, v.57, p.399, 2008b.

VERHOEVEN, J.T.J., JANSEN, C. C. C., ROENHORST, J. W., FLORES, R. & DE LA PEÑA, M. Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. **Virus Research**, v.144, p.209–214, 2009.

VERHOEVEN, J.T.J. Identification and epidemiology of pospiviroids. PhD Thesis, Wageningen University. 2010. p.136.

VERHOEVEN, J.T.J.; BOTERMANS, M.; MEEKES, E.T.M.; ROENHORST, J.W. Tomato apical stunt viroid in the Netherlands: most prevalent pospiviroid in ornamentals and first outbreak in tomatoes. **European Journal of Plant Pathology**, v.133, p.803-810, 2012.

VERHOEVEN, J.T.H.J.; MEEKES, E.T.M; 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.

VERHOEVEN, J.T.J.; HAMMOND, R.W.; STANCANELLI, G. Economic significance of viroids in ornamental crops. In: HADIDI et al. (Eds.). **Viroids and Satellites**. Oxford: Academic Press, 2017. pp.27-38.

WANG, Y.; ZHONG, X.; ITAYA, A.; DING, B. Evidence for the existence of the loop E motif of *Potato spindle tuber viroid in vivo*. **Journal of Virology**, v.81, p.2074-2077, 2007.

WANG, R.; DONG, J.; WANG, Z.; ZHOU, T.; LI, Y.; DING, W. Complete nucleotide sequence of a new carlavirus in chrysanthemums in China. **Archives of Virology**, v.163, p.1973-1976, 2018.

WATANABE, Y.; OGAWA, T.; TAKAHASHI, H.; ISHIDA, I.; TAKEUCHI, Y.; YAMAMOTO, M.; OKADA, Y. Resistance against multiple plant viruses in plants mediated by a double stranded-RNA specific ribonuclease. **FEBS Letters**, v. 372, p. 165-168, 1995.

WERNER, R.; GUITTON, M.C.; MÜHLBACH, H.P. Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. **Plant Physiology**, v.103, p.1473, 1993.

WOLFF, P.; GILZ, R.; SCHUMACHER, J.; RIESNER, D. Complexes of viroids with histones and other proteins. **Nucleic Acids Research**, v.13, p.355-367, 1985.

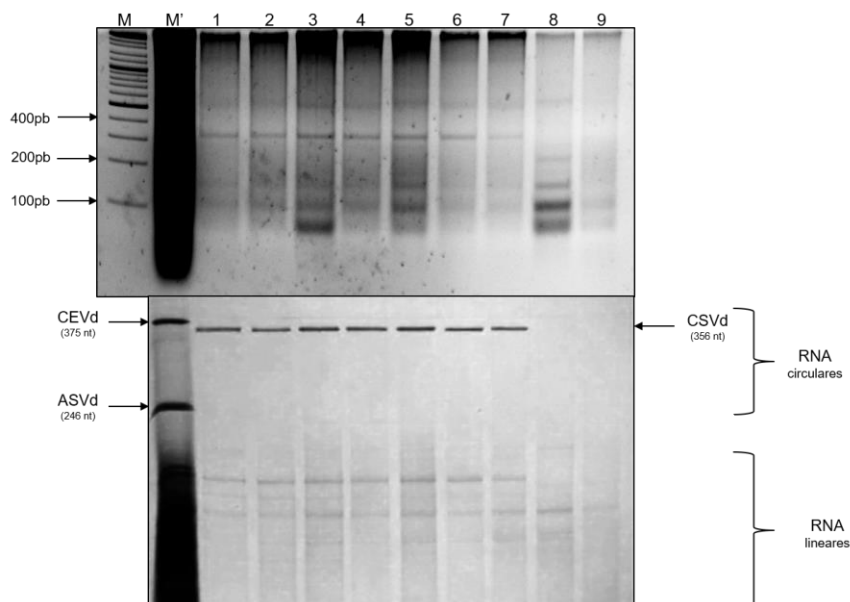
YOON, J.Y.; BAEK, E.; PALUKAITIS, P. Are there strains of *Chrysanthemum stunt viroid*? **Journal of Plant Pathology**, v.94, p.697-701, 2012.

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.

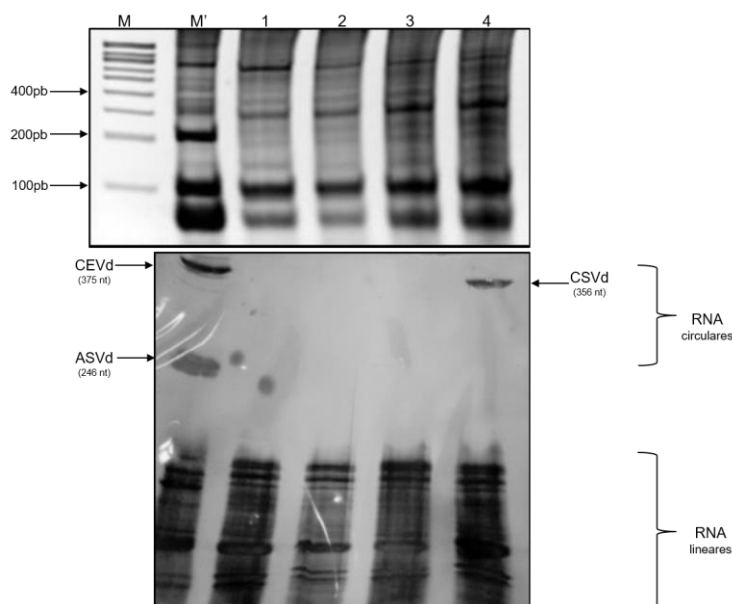
ZHONG, X.; ARCHUAL, A.J.; AMIN, A.A.; DING, B. A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. **Plant Cell**, v.20, p.35-47, 2008.

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

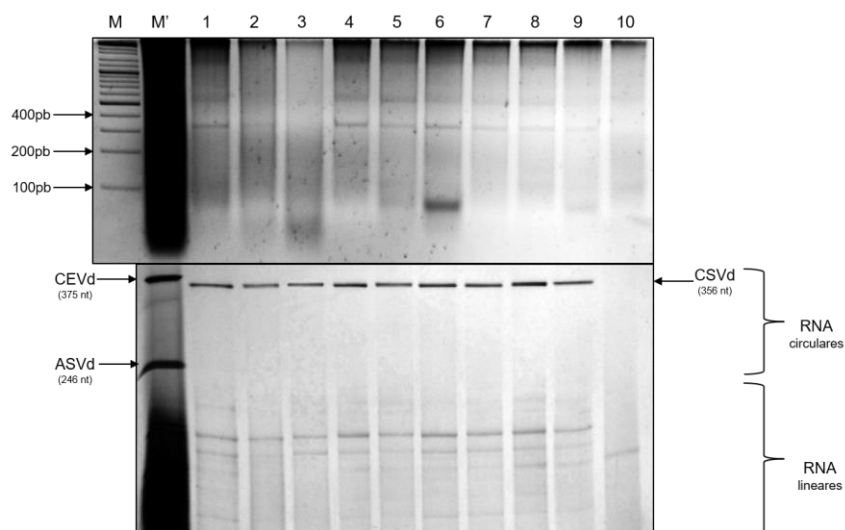
APÊNDICE A



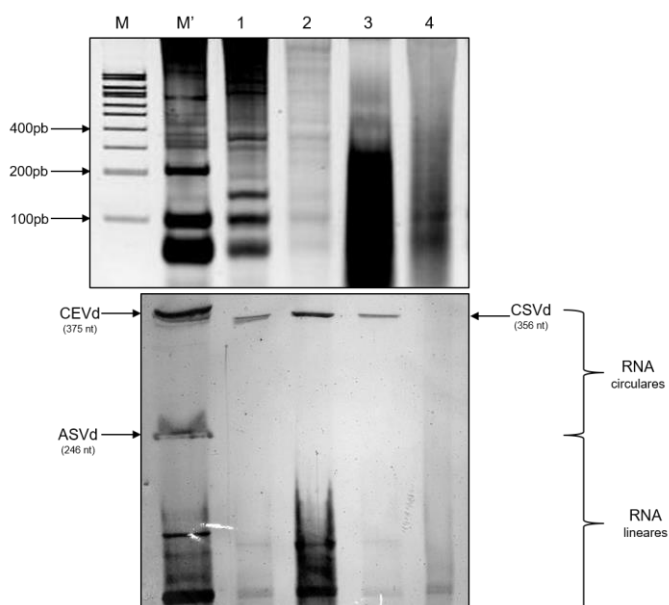
Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante (sPAGE) de amostras de RNA extraídos de plantas de crisântemo coletadas na região de Artur Nogueira, SP, Brasil. M=100pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= KU535579; 2= KU535580; 3= KU535581; 4= KU535582; 5= KU535583; 6= KU535584; 7= KU535585; 8=AN 1; 9=AN 2. Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circulares com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd. As amostras positivas encontram-se identificadas com códigos cadastrados no *GenBank* de acordo com a Tabela 6. *AN=Amostra negativa.



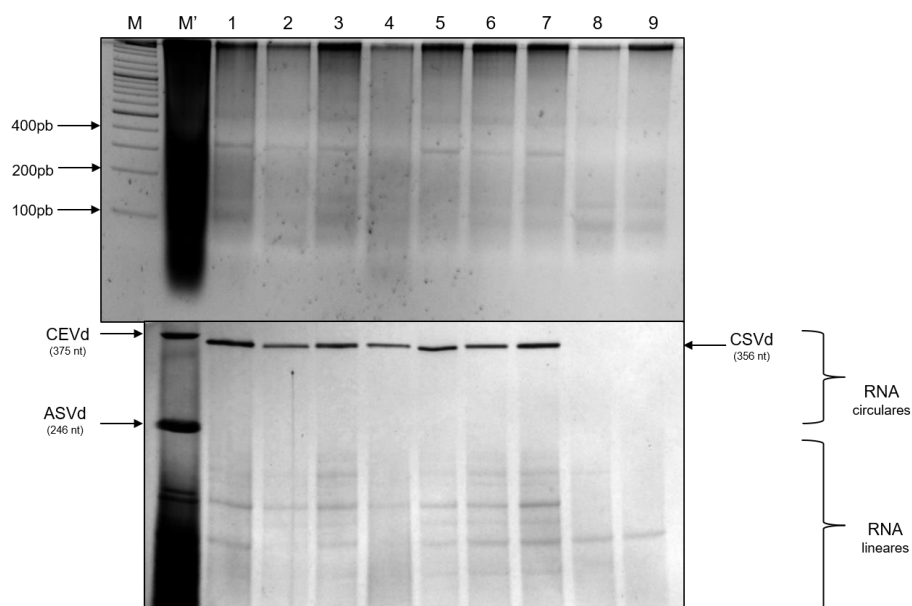
Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante de amostras coletadas na região de Paranapanema. Amostras: M=100pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1=AN 3; 2=AN 4; 3=AN 5; 4= MF359692. Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd. As amostras positivas encontram-se identificadas com códigos cadastrados no *GenBank* de acordo com a Tabela 6. *AN=Amostra negativa.



Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante de amostras coletadas na região de Artur Nogueira. Amostras: M=100pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= MF359693, 2= MF359694, 3= MF359695, 4= MF359696, 5= MF359697, 6= MF359698, 7= MF359699, 8= MF359700, 9= MF359701, 10=AN 6. Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd. As amostras positivas encontram-se identificadas com códigos cadastrados no *GenBank* de acordo com a Tabela 6. *AN=Amostra negativa.



Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante de amostras coletadas na região de Artur Nogueira. Amostras: M=100pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= MF359702; 2= MF359703; 3= MF359704; 4=AN7. Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd. As amostras positivas encontram-se identificadas com códigos cadastrados no *GenBank* de acordo com a Tabela 6. *AN=Amostra negativa.



Resultado da eletroforese sequencial em géis de poliacrilamida nativo e desnaturante de amostras coletadas na região de Artur Nogueira. Amostras: M=100pb DNA ladder; M'=CEVd + ABSVd; 1= MF359705; 2= MF359706; 3= MF359707; 4= MF359708; 5= MF359709; 6= MF359710; 7= MF359711; 8=AN 8; 9=AN 9. Observa-se no segundo gel, a presença de bandas de RNA circular com aproximadamente 356 nucleotídeos correspondentes ao CSVd. As amostras positivas encontram-se identificadas com códigos cadastrados no *GenBank* de acordo com a Tabela 6. *AN=Amostra negativa.