

AMOSTRAGEM E DETECÇÃO DE VÍRUS EM ESPÉCIES DE  
BROMELIACEAE E DE ORCHIDACEAE

**GÉSSICA MYLENA SANTANA RÊGO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

AMOSTRAGEM E DETECÇÃO DE VÍRUS EM ESPÉCIES DE  
BROMELIACEAE E DE ORCHIDACEAE

**GÉSSICA MYLENA SANTANA RÊGO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Briosso.

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO – 2017

AMOSTRAGEM E DETECÇÃO DE VÍRUS EM ESPÉCIES DE  
BROMELIACEAE E DE ORCHIDACEAE

## **GÉSSICA MYLENA SANTANA RÊGO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em            de            de 2017

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Ricardo Moreira de Souza (Ph. D., Plant Pathology) - UENF

---

Prof. Dr. Cláudia de Melo Dolinski – (Ph. D., Plant Pathology) – UENF

---

Prof. Dr. Vicente Martins Gomes (D. Sc. Produção Vegetal) - IFF

---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso (D. Sc., Genética) - UFRRJ  
Orientador

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

045/2017

R343 Rêgo, Géssica Mylena Santana.

Amostragem e detecção de vírus em espécies de *Bromeliaceae* e de *Orchidaceae* / Géssica Mylena Santana Rêgo. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

90 f.

Bibliografia: f. 44 – 57.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Paulo Sérgio Torres Brioso.

1. Bromélia. 2. Orquídea. 3. RT-PCR. 4. Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus. 5. Cucumber Mosaic Virus. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 635.93485

Dedico  
Aos meus pais, Jailton e Fátima  
por todo o apoio e incentivo  
ao longo da minha formação

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela Sua presença e o Seu cuidado.

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pelos ensinamentos através das disciplinas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Torres Brioso, pela oportunidade e pela confiança. Gratidão pela amizade, aprendizado diário e bom convívio, que fizeram toda a diferença na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Moreira de Souza, pelo apoio e colaboração na concretização do trabalho no projeto do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba.

Aos membros da banca, pelas considerações pertinentes para a melhoria do trabalho.

Aos colegas do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.) da UFRRJ, por me acolherem durante as análises das amostras do experimento.

À minha família, especialmente, aos meus pais, por sempre terem me instruído a alcançar voos maiores e investido na minha formação, e ao meu irmão Breno E. S. Rêgo, por sempre se fazer presente na minha vida.

Ao meu querido Edson Mazarotto, pelo carinho, motivação, paciência em todos os momentos e, principalmente, por me fortalecer a sempre continuar.

Aos colegas da UENF: Alexandre M. Almeida, Gustavo Andrade, Fabíola Pimentel, Tamires dos Santos, Emile Caroline Lopes e Katherine Ruas que tornaram a caminhada muito mais leve.

Às amigas do alojamento do F1 da UFRRJ, especialmente, Suenia Campos, Sara Kurokawa, Rafaela Martins e Thaís Lanode pelas boas risadas e conversas nos momentos de maior ansiedade.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1 Família Bromeliaceae .....	4
2.1.1 Bromélias em Restinga.....	7
2.1. 2 Importância econômica das bromélias .....	9
2.1.3 Vírus de Bromélias .....	9
2.2 Família Orchidaceae.....	11
2.2.1 Importância econômica das orquídeas .....	12
2.2.2 Vírus de orquídeas .....	12
2.3 Diagnóstico de vírus de plantas .....	13
2.3.1 Teste Biológico .....	13
2.3.2 Teste Imunocromatográfico .....	13
2.3.3 Teste de PCR e RT-PCR.....	14
3. TRABALHOS .....	15
3.1 Amostragem e detecção de vírus em espécies de Bromeliaceae de restinga no Estado do Rio de Janeiro.....	15



RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
3.1.1 INTRODUÇÃO.....	16
3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
3.1.3 RESULTADOS .....	21
3.1.4 DISCUSSÃO .....	24
3. 2 Levantamento e detecção de vírus em espécies de Orchidaceae nacionais e importadas .....	30
RESUMO .....	30
ABSTRACT .....	30
3. 2.1. INTRODUÇÃO.....	31
3.2. 2. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
3.2.3. RESULTADOS .....	34
3.2.4. DISCUSSÃO .....	39
3.2.5. CONCLUSÃO .....	40
3.2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
4. CONCLUSÃO GERAL .....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
5. ANEXOS .....	58
5.1 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em espécies de Bromeliaceae.....	58
<i>Kit BromeDNAVirus</i> .....	65
5.2 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em espécies de Bromeliaceae.....	66
<i>KIT BromeRNAVirus</i> .....	66
5.3 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus quarentenários para o Brasil em orquídeas importadas .....	75
<i>KIT OrqQuarVirus</i> .....	75
5.4 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em orquídeas para o Brasil.....	83
<i>KIT OrqVirus</i> .....	83

## RESUMO

Rêgo, Gêssica Mylena Santana M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. Amostragem e detecção de vírus em espécies de Bromeliaceae e de Orchidaceae. Orientador: Prof. Paulo Sérgio Torres Brioso.

A família Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais importantes da Mata Atlântica e a família Orchidaceae é representada por plantas de origem nacional e importada que impulsionam o agronegócio. O presente trabalho teve como objetivos o levantamento e a detecção de vírus em representantes das famílias Bromeliaceae e Orchidaceae através de testes biológico, imunocromatográfico e molecular. Além disso, visou a produção de fragmentos genômicos amplificados dos vírus identificados e preparação de quatro protótipos de kit diagnóstico molecular, a fim de facilitar a detecção desses vírus em outros levantamentos. A metodologia consistiu inicialmente na coleta de bromélias na restinga, de abacaxizeiro comercial e de orquídeas importadas e nacionais. Foram detectados nas amostras coletadas de Bromeliaceae, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* em *Aechmea nudicaulis* e em *Bromelia antiacantha*; em *Ananas comosus*, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* e o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3*, indica que as bromélias nativas

podem servir de fonte de inóculo alternativo para o inseto vetor, além das mudas de abacaxizeiro com infecção viral. Já, nos representantes de Orchidaceae nacionais analisadas pôde-se detectar o *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot virus*, o *Orchid fleck dichorhavirus* e nas amostras importadas detectou-se o *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot vírus* e o *Cucumber mosaic vírus*, em infecção simples ou mista. Em nenhuma das amostras, nacionais e importadas, foi detectado vírus quarentenários para o Brasil. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de se fortalecer um programa nacional de indexação de mudas para vírus de forma a reduzir a fonte de inóculo desses vírus no Brasil, a fim de não comprometer o agronegócio.

## ABSTRACT

Rêgo, Géssica Mylena Santana M. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. Survey and detection of viruses in Bromeliaceae and Orchidaceae species. Advisor: Prof. Paulo Sérgio Torres Briosso.

The Bromeliaceae family is one of the Atlantic Forest's most important taxonomic groups and the Orquidaceae family representatives boost agribusiness. The present study aimed the survey and detection of virus in representatives of the families Bromeliaceae and Orchidaceae through biological, immunochromatographic and molecular tests. In addition, this study aimed the production of amplified genomic fragments of the identified viruses and the preparation of four prototypes of molecular diagnostic kits in order to facilitate the detection of these viruses in other surveys. The methodology consisted initially, in the collection of bromeliads in the *Restinga*, commercial pineapple and imported and national orchids. In the Bromeliaceae samples collected were detected, the Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 in *Aechmea nudicaulis* and in *Bromelia antiacantha*; In *Ananas comosus*, the *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* and the *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3*, indicating that native bromeliads may serve as an alternative inoculum source for the insect vector in addition to pineapple seedlings with viral infection. In the national

representatives of Orchidaceae analyzed were detected the *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus* and the *Orchid fleck dichorhavirus* while in the imported samples were detected the *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus* and the *Cucumber mosaic virus*, in simple or mixed infection. In none of the national and imported samples, quarantine viruses were detected for Brazil. The results evidenced the need to strengthen a national program of seedlings indexation for viruses in order to reduce the inoculum source of these viruses in Brazil with the purpose of not compromise agribusiness.

## 1. INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica do Rio de Janeiro é o local de maior ocorrência de bromélias e maior endemismo específico do Brasil. Estudos apontam que quanto maior o número de bromélias em uma mata, maior é a sua diversidade estrutural, pois as bromélias habitualmente aparecem associadas a indivíduos da fauna, seja polinizadores ou se abrigando, como os insetos (Fontoura *et al.*, 1991; Mestre *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2010).

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), situado no Estado do Rio de Janeiro, é o abrigo de diversas espécies ameaçadas de extinção, pertencentes à fauna e flora do bioma Mata Atlântica. O Parque é considerado como uma das principais unidades de conservação do Estado, pois nele concentra-se o maior número de pesquisas científicas em desenvolvimento e várias espécies novas já foram catalogadas (PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA, 2015).

Em levantamento realizado em áreas do PNRJ foram registradas, em cinco zonas de restinga, cerca de 10 espécies de Bromeliaceae. As bromélias encontradas foram: *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker, *Aechmea lingulata* (L.) Baker, *Aechmea nudicaulis* (L.) Grisebach, *Bromelia antiacantha* Bertoloni, *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, *Vriesea neoglutinosa* Mez, *Tillandsia*

*gardneri* Lindley, *Tillandsia recurvata* (L.) L., *Tillandsia stricta* Soland in Sims, *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Cogliatti-Carvalho et al., 2001).

As bromélias formadoras de cisterna possuem a capacidade de atrair centenas de espécies de animais devido à formação de um microclima em sua estrutura e acúmulo de água, o que as tornam indispensáveis para a manutenção da diversidade de fauna e flora local (Fontoura *et al.*, 1991; Lima & Wanderley, 2007; Mestre *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2010).

Não há relatos de trabalhos sobre levantamento de microrganismos fitopatogênicos em bromélias de restinga ou no ecossistema restinga, concomitantemente, de modo que não há parâmetros na área em relação às bromélias e ao bioma estudado, quanto à presença de vírus.

Aliado às bromélias temos as orquídeas que possuem não só a floração exuberante, bem como desempenham um papel semelhante às bromélias quanto à manutenção da biodiversidade de uma floresta. Elas são consideradas como indicadoras ambientais, pois em áreas degradadas ficam suscetíveis a sinais de doença e ataques de pragas (Damasceno, 2005).

No Brasil, os principais gêneros de orquídeas nativas são *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia*, *Stanhopea* e *Oncidium* (Alexandre & Duarte, 2015). As orquídeas importadas de maior expressão são *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. O setor de exportação de orquídeas no Brasil diferencia-se da importação, o qual baseia-se pela quantidade de produção e qualidade caracterizada pela beleza estética ornamental, como cachos longos e grandes flores. A exportação é direcionada, principalmente, a colecionadores de espécies nativas e seus híbridos, que valorizam o produto pela unidade (Junqueira & Peetz, 2010).

A comercialização de plantas ornamentais (incluindo espécies das famílias Bromeliaceae e Orchidaceae) a nível mundial e a disseminação de exemplares entre países tem crescido consideravelmente. O comércio dessas plantas sem a vistoria fitossanitária adequada pode incorrer na disseminação de fitopatógenos (em especial, vírus) entre as espécies locais e prejudicar o agronegócio.

Segundo Lima Júnior *et al.* (2015), as importações de flores e plantas ornamentais no ano de 2014 alcançaram a cifra de US\$ 46,81 milhões e as exportações destas, US\$ 23,81 milhões. Isto representa um crescimento do mercado interno em até seis vezes nos últimos dez anos para alcançar o valor

citado em importações, enquanto que a exportação se manteve estável. Esse comportamento, conforme Lima Júnior *et al.* (2015), denota crescente demanda do mercado interno por material importado.

As orquídeas, bem como as bromélias, podem atuar como fonte de inóculo de fitopatógenos para espécies ornamentais nacionais e, desta forma, prejudicar o agronegócio em nosso país.

Nesse contexto, a pronta e rápida detecção de vírus se faz necessária para coibir a disseminação tanto em nível de produtores, como de consumidores de exemplares infectados com vírus. Portanto, os objetivos deste trabalho foram: Amostragem e identificação das espécies ou possíveis espécies virais presentes em bromélias coletadas em área do PNRJ e em orquídeas nacionais e/ou importadas.

i) Detectar e identificar molecularmente vírus associados a bromélias nativas de restinga, bem como em plantação comercial de abacaxizeiro; ii) Detectar e identificar molecularmente os vírus presentes em amostras da família Orchidaceae importadas e nacionais; iii) Elaborar quatro *kits* de diagnóstico molecular de forma a detectar e identificar molecularmente vírus quarentenários ou não associados às respectivas espécies vegetais.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Bromeliaceae

Dentre os Biomas Brasileiros que representam grande biodiversidade destaca-se a Mata Atlântica ou Floresta Atlântica, termos usados para designar um complexo vegetacional que engloba vários tipos de vegetação, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até a região Nordeste (Tabarelli *et al.* 2005).

A Mata Atlântica espalhava-se por cerca de um milhão de km<sup>2</sup>, restando atualmente apenas 17% da cobertura original, reduzidos a redutos isolados pelo Brasil, resultado de constantes perturbações antrópicas como exploração ilegal de madeira, agricultura, pecuária e urbanismo (Metzger, 2009). Neste sentido, Martinelli *et al.* (2008) aponta as bromélias como um dos grupos taxonômicos mais relevantes, devido ao alto grau de endemismo na Mata Atlântica e valor ecológico decorrente, principalmente, de sua interação com a fauna contribuindo significativamente para a abundante biodiversidade das comunidades em que vive.

A família Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais importantes da Mata Atlântica devido à sua abundância, endemismo e interação com a fauna. No Brasil são conhecidos 44 gêneros e 1349 espécies de bromélias, onde o Estado

da Bahia e a região Sudeste do país contemplam a maior riqueza em biodiversidade (Grant & Zijlstra, 1998; Luther, 2004; Forzza, *et al.*, 2015).

Em relação à reprodução, as bromélias podem ser sexuadas, mediante sementes ou assexuadas mediante afillhos. O processo sexual leva à recombinação genética, fator que é interessante pela ampliação da variabilidade genética, porém tem como desvantagem a disponibilidade de sementes, dificultando a propagação massal de plantas (Guerra, 2006).

Quanto à morfologia botânica das bromélias, estas são hermafroditas, apresentam normalmente inflorescência vistosa e bainha alargada na base. As folhas podem apresentar margens lisas a espinacentes, o que tende a mudar conforme o gênero. As flores podem ser trímeras, com perianto diferenciado em cálice e corola. Podem ser pistiladas ou estaminadas e actinomorfas a zigomorfas (Moreira *et al.*, 2006).

As bromélias podem ser terrestres, epífitas, rupestres e rupícolas. Podem fornecer alimento aos pássaros através das frutas, flores, sementes e água, bem como, contém matéria orgânica e materiais para nidificação, fundamentais na postura de ovos para os anfíbios, forrageamento para reptéis, construção de ninhos das aves e esconderijo para mamíferos (Rocha *et al.*, 2004).

A família *Bromeliaceae* está entre as poucas plantas que tem em sua maioria polinizadores vertebrados, sendo assinaladas como plantas com características de ornitofilia, onde a maioria dos seus polinizadores são pássaros (Sazima, 1989).

Um dos principais polinizadores dos taxa de *Bromeliaceae* são os beija-flores pela atração das brácteas vistosas e coloridas e pela presença de néctar abundante. Evolutivamente, especula-se a relação dos beija-flores de bico longo com as bromélias, de modo que estas aves teriam influenciado na evolução do grupo de plantas das bromélias (Nadkarni & Matelson, 1989; Martinelli, 1994; Sazima *et al.*, 1996; Varassin *et al.*, 2000). O morcego é outro agente polinizador que se aproxima pelo odor forte em muitas flores de antese noturna. Além da ornitofilia e quiropterofilia, há relatos de polinização por borboletas, abelhas, mamangavas e besouros. (Moreira *et al.*, 2006).

As bromélias exercem um papel essencial para manutenção da biodiversidade em sua área de ocorrência, pois algumas espécies de larvas de

borboletas e rãs são encontradas apenas associadas às bromélias (Mestre *et al.*, 2001; Jocque *et al.*, 2010).

A fauna pode estar associada à família Bromeliaceae de modo bromelícola, utilizando as bromélias como abrigo; ou bromelígena, quando são dependentes das bromélias para completar seu ciclo reprodutivo (Peixoto, 1995).

As espécies bromelígenas utilizam as bromélias como um tipo de “aquário”, onde poderão se reproduzir. Por exemplo, a espécie *Dendropsophus haddadi*, que representa a ordem dos anuros, foi registrada em bromélias, utilizando-as como microclimas, pois necessitam de ambientes brejosos ou alagados para sua reprodução. Outra espécie de anuro, *Elachistocleis ovalis*, foi encontrada nas axilas das bromélias *Portea leptantha* (Harms), a qual serve de abrigo durante o dia e a noite, quando a espécie não está em atividade (Peixoto, 1995; Andrade *et al.*, 2009; Mageski *et al.*, 2014).

A água acumulada nos tanques das bromeliáceas é utilizada pela fauna como fonte hídrica ou como parte do ciclo de vida de algumas espécies de anfíbios; as folhas são utilizadas como alimento por alguns herbívoros e também para insetos (Paula & Silva, 2004).

O comportamento da vegetação de espécies, como: *Bromelia antiacantha*, *Polystichum adiantiforme* e *Ouratea cuspidata* representam uma característica importante na contenção de dunas como descrito por Araújo & Oliveira (1988), onde afirma que o vento tende a modelar o relevo, mas a barreira que as plantas realizam conseguem minimizar essa ação.

As bromélias também apresentam como característica o potencial medicinal de modo que os frutos de *Bromelia antiacantha* quando cozinhados e chupados são considerados um remédio valioso contra a tosse, e também anti-helmíntico. A espécie *Tillandsia usneoides* combinada com manteiga de cacau ou banha, é indicada para o tratamento de hemorroidas. O decocto é utilizado no tratamento para hérnias. O decocto de *Tillandsia stricta* em uso interno é tido como diurético (Reitz, 1983).

### 2.1.1 Bromélias em Restinga

A vegetação de restinga é encontrada nas praias e planícies costeiras, e está diretamente ligada ao solo arenoso, superfícies baixas e em declive ao mar. Normalmente são influenciadas por florestas pluviais próximas (Fernandes & Queiroz, 2015). São ecossistemas frágeis (Gomes *et al.*, 2016), o que gera a necessidade de se ampliar os estudos e conservação destas áreas, hoje muito influenciadas por ações antrópicas, em desequilíbrio (Gomes & Silva, 2013).

Segundo a Resolução nº.261/1999 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 1999), “Entende-se como restinga, um conjunto de ecossistemas que compreende comunidades vegetais florística e fisionomicamente distintas, situadas em terrenos predominantemente arenosos, de origens marinha, fluvial, lagunar, eólica ou combinações destas, de idade quaternária, em geral com solos pouco desenvolvidos. Estas comunidades vegetais formam um complexo vegetacional edáfico e pioneiro, que depende mais da natureza do solo que do clima, encontrando-se em praias, cordões arenosos, dunas e depressões associadas, planícies e terraços”.

Um dos principais representantes da flora pertencente à restinga são as bromélias, que exercem um papel fundamental no ambiente, pois a restinga trata-se de um ecossistema com pouca disponibilidade hídrica, de modo que essas plantas atuam como reservatório de água para a fauna.

Na área do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), situado ao norte do Estado do Rio de Janeiro, entre os municípios de Macaé, Carapebus e Quissamã, foram catalogadas cerca de 10 espécies de Bromeliaceae, dentre as quais: *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker, *Aechmea lingulata* (L.) Baker, *Aechmea nudicaulis* (L.) Grisebach, *Bromelia antiacantha* Bertoloni, *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, *Vriesea neoglutinosa* Mez, *Tillandsia gardneri* Lindley, *Tillandsia recurvata* (L.) L., *Tillandsia stricta* Soland in Sims, *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Cogliatti-Carvalho *et al.*, 2001).

Dentre as 10 espécies amostradas na área do PNRJ por Cogliatti – Carvalho *et al.* (2001), as espécies mais abundantes na restinga foram *Neoregelia cruenta* e *Aechmea nudicaulis*. Na área AAE (área aberta de Ericácea), descrita

como a área com maior diversidade, a espécie com maior predominância foi *Bromelia antiacantha*.

Em trabalho realizado por Gomes & Silva (2013) nas restingas do Espírito Santo, com o objetivo de elaborar chaves ilustrativas para identificação de bromélias, verificou-se a presença de 45 espécies na área.

Verificou-se apenas um levantamento sobre determinação de biodiversidade de microrganismos fitopatogênicos associados a bromélias em restinga no Brasil, registrado no estado da Bahia.

*Bromelia antiacantha* (Bertol) é uma espécie de hábito terrestre, que apresenta grande potencial de uso, dispondo de características para fins alimentícios, medicinais, ornamentais e industriais (Filippon *et al.*, 2012). Apresenta estruturas de armazenamento, possibilitando economia de água, a qual é uma característica adaptativa para a espécie, pois é encontrada em ambientes xerofíticos, como em terrenos arenosos. Sua morfologia também dispõe de proteção adicional nas raízes contra organismos patogênicos do solo, devido à presença de compostos fenólicos em suas paredes celulares (Dettke & Milaneze - Gutierre, 2008).

A espécie *Neoregelia cruenta* (Graham) L. P. possui distribuição pelo sudeste do Brasil em formações arbustivas e planícies costeiras. É caracterizada como espécie importante na germinação de outras espécies por atuar na retenção hídrica do solo (Mantuano, 2008).

A espécie *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb ocorre predominantemente em faixas de vegetação de restinga (Pinheiro & Borghetti, 2001). Esteve listada entre as dez espécies mais extraídas comercialmente no litoral do Estado do Paraná (Anacleto, 2005). Quando analisada no bioma da Mata Atlântica, em área localizada na cidade de Ribeirão Grande – SP, apresentou comportamento heliófilo, ou seja, ocorrem em estratos mais altos, ou com clareiras. Sua floração aparece no período de estação chuvosa, entre os meses de outubro a janeiro, atraindo a fauna de beija-flores da espécie *Thalurania glaucopis* Gmelin (Machado & Semir, 2006).

## 2.1.2 Importância econômica das bromélias

As bromélias com maior potencial paisagístico são *Alcantarea regina*, *Aechmea blanchetiana*, *Neoregelia compacta* e *Alcantarea imperialis*. Destacam-se em sua maioria, por causa da sua arquitetura foliar em roseta e brácteas coloridas. O cultivo destas bromélias surge como proposta para atenuar a exploração de espécies nativas de modo que a sua produção seja através de sementes, brotos laterais ou micropropagação, e consiga alcançar a demanda do mercado sem comprometer a preservação dos exemplares (Tamaki *et al.*, 2011).

As plantas ornamentais, onde as bromélias estão inclusas em sua maioria, não recebem o incentivo em pesquisas para ampliar o setor produtivo de flores. Esta é uma falha de organização da cadeia produtiva, pois o Brasil possui riqueza em biodiversidade (Lirio *et al.*, 2003).

Outra bromélia com representatividade econômica no país é o abacaxizeiro, originário do Brasil, sendo uma das espécies de Bromeliaceae mais conhecidas no mundo devido à popularidade de seu fruto (Manetti *et al.*, 2009). Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil é o maior produtor mundial de abacaxi. E conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2013, o Brasil produziu 1,5 milhões de toneladas da fruta.

A espécie *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, conhecida por “caroá-verdadeiro” também se destaca pelo seu grande valor econômico, sendo utilizada como produtora de fibras. Na medicina natural, como digestiva, depurativa e com outras funções, tem-se o uso da enzima “bromelina”, presente em algumas espécies do gênero *Bromelia* (Lemos & Quirino, 2008).

## 2.1.3 Vírus de Bromélias

No mundo, foram registrados em bromélias, os seguintes gêneros de vírus: *Badnavirus*, *Ampelovirus*, *Tospovirus* e *Nucleorhabdovirus*. O gênero *Badnavirus* compreende os seguintes vírus: *Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV); *Ampelovirus* [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2*

(PMWaV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* (PMWaV-3), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 4* (PMWaV-4), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5* (PMWaV-5)], *Tospovirus* [*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)] e um possível *Nucleorhabdovirus* [(*Pineapple chlorotic leaf streak virus* (PCLSV)] (Brioso & Pozzer, 2012; Bhat *et al.*, 2016; Brioso, 2017a).

O levantamento de microrganismos fitopatogênicos em bromélias de restinga ou no ecossistema restinga é algo inédito de modo que não há parâmetros de comparação em estudos quanto à presença de vírus.

Um dos principais problemas fitossanitários para as espécies de abacaxi, que geram grandes prejuízos aos produtores, são os vírus que infectam o abacaxizeiro: *Tomato spotted wilt vírus* (TSWV) e *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV).

*Tomato spotted wilt vírus* (TSWV) tem como vetor diferentes espécies de tripses. Os sintomas ocorrem inicialmente na parte clorofilada, com a manifestação de manchas pequenas. O progresso da infestação pode chegar ao meristema apical e provocar a morte da planta. O controle desse agente leva em consideração os locais de implantação da cultura e sua condução de modo que, deve-se proceder a rotação de culturas e a sua instalação próximo a cultivos de berinjela, tomate, batata e fumo, pois estas são hospedeiras do patógeno, bem como o controle das ervas daninhas, que também atuam como hospedeiras. (Matos, 2000).

O PMWaV (*Pineapple mealybug wilt-associated vírus*) é um vírus causador da doença conhecida popularmente por “Murça do abacaxi”. A transmissão ocorre por meio da cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*), a qual secreta uma toxina durante a alimentação na planta (Santos *et al.*, 2010). Tal doença pode levar a planta à morte antes da frutificação, ou impedir sua frutificação normal. Os sintomas perceptíveis são a coloração vermelho bronzeada e amarelada nas folhas centrais e as margens curvam-se para baixo (Meissner Filho & Sanhes, 2010).

O vírus PMWaV era definido como da família *Closteroviridae*, mas com o advindo de novas informações moleculares, as espécies de vírus transmitidas por cochonilhas foram inseridas no gênero *Ampelovirus*.

## 2.2 Família Orchidaceae

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae. É constituída por mais de 25.000 espécies, encontradas em todas as formações vegetais brasileiras. No Brasil, temos registros de 2.498 espécies distribuídas em 221 gêneros, sendo 1620 espécies endêmicas do Brasil. (Zettler *et al.*, 1990; Forzza *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2015).

As orquídeas podem-se apresentar como aquáticas, epífitas, hemiepífitas, rupícolas, saprófitas e terrícolas. As várias formas das orquídeas podem ser resultantes de sua capacidade adaptativa, assim obtém maior reserva de água e nutrientes (Pansarin, 2008; Barros *et al.*, 2015).

A utilização de maior destaque das orquídeas é para fins ornamentais, sendo uma das flores de maior valor comercial. Podem ser utilizadas na medicina, como na China, onde as espécies de *Dendrobium nobile* são base para tratamentos para gastrite atrófica crônica, diabetes, envelhecimento de pele e doenças cardiovasculares (Zhang *et al.* 2007).

As orquídeas do gênero *Vanilla* possui finalidade alimentícia. São produtoras da baunilha, sendo, portanto, alvo de estudos da sua biologia para render maior produtividade e lucratividade (Reis *et al.*, 2011; Pedroso-de-Moraes *et al.*, 2012).

Apesar de a família Orchidaceae estar entre as maiores famílias de Angiospermas no mundo, algumas espécies estão ameaçadas de extinção e isso deve-se à dificuldade na propagação da espécie, que possui sementes com pouca reserva e a dependência da associação simbiótica com fungos micorrízicos para germinação (Zettler *et al.*, 2001).

A produção de orquídeas para cultivos comerciais tornou-se viável devido às técnicas de semeadura *in vitro*, onde pode-se obter máximo aproveitamento, o que não ocorre, por exemplo, na multiplicação convencional de orquídeas por sementes. Os maiores cuidados decorrentes da utilização da cultura *in vitro* é a aclimatização da plântula, a qual deve ser bem condicionada a fim de evitar estresses e comprometer a sanidade da plântula (Moraes *et al.*, 2002). Exigem um substrato com textura relativamente grossa e drenagem livre, assemelhando-



se às condições naturais onde dispõe de ar e luz, podendo ser utilizado o xaxim ou uma alternativa sustentável como a fibra de coco (Assis *et al.*, 2005).

### **2.2.1 Importância econômica das orquídeas**

No Brasil, as cidades com maior participação produtiva no mercado de plantas ornamentais são Atibaia e Holambra, mas a tendência é que o mercado descentralize para outras áreas produtivas em regiões de todo o país (Abreu, 2013).

As importações no ano de 2014 alcançaram US\$ 46,81 milhões em flores e plantas ornamentais e US\$ 23,81 milhões em exportações. As espécies de mudas importadas no Brasil são principalmente da Holanda e Tailândia, as quais correspondem juntas a mais de 95% das importações, sendo os produtos importados de maior expressão, respectivamente, as espécies dos gêneros *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. Os exemplares destas espécies são normalmente melhorados geneticamente e de grande exuberância devido a sua floração vistosa atendendo à demanda do mercado consumidor (SECEX/MDIC, 2014; Suzuki, 2014; Lima Júnior *et al.*, 2015)

O mercado de orquídeas no Brasil não tem como principal enfoque, a exportação de espécies de híbridos comerciais com grandes cachos e flores exuberantes. A exportação atende aos interesses do mercado de colecionadores, sendo os principais países de destino em 2008, Japão (53,08%), Alemanha (21,74%), EUA (12,27%) e Holanda (8,08%) e outros, como Ucrânia, Taiwan, Hong Kong, África do Sul e Chile (Junqueira & Peetz, 2010).

Entre os gêneros nativos de orquídeas do Brasil e de valor econômico, podemos citar: *Cattleya*, *Laelia*, *Miltonia*, *Stanhopea* e *Oncidium* (Alexandre & Duarte, 2012).

### **2.2.2 Vírus de orquídeas**

As viroses são as doenças de maior gravidade para as orquídeas, pois o seu controle é a erradicação das plantas infectadas. Os vírus que possuem registro de ocorrência em orquídeas na literatura são listados dentro dos gêneros: *Alphacarmovirus*, *Carlavirus*, *Closterovirus*, *Cucumovirus*, *Dichorhavirus*,

*Nepovirus, Orthotospovirus, Platypuvirus, Poacevirus, Potexvirus, Potyvirus, Tobamovirus, Tobravirus, Tombusvirus.*

As principais viroses encontradas em orquídeas no Brasil, quanto à incidência e relevância são: *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Orchid fleck dichorhavirus* assinaladas dentro dos gêneros, respectivamente, *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Dichorhavirus* (Klein, 2008).

Em estudo realizado por Alexandre *et al.* (2010), analisando 636 amostras de orquídeas, foi verificado que 85,5% das amostras não apresentaram infecção. No entanto, entre as orquídeas infectadas, 42% apresentaram infecção pelo *Odontoglossum mosaic vírus* (ORSV), 37% por *Cymbidium mosaic vírus* (CymMV) e 20% de infecção mista (ORSV + CymMV).

O mercado de plantas ornamentais no Brasil ainda está em crescente expansão e, portanto, faz-se necessário um aprofundamento da realidade do país quanto à entrada de mudas e sementes exóticas de modo a corroborar com a sanidade vegetal. O maior controle fitossanitário interno e da entrada de material proveniente de exportação, irá permitir maior qualidade da produção e, conseqüentemente, aumento de competitividade no mercado de plantas ornamentais (Alexandre *et al.*, 2010).

## **2.3 Diagnóstico de vírus de plantas**

### **2.3.1 Teste Biológico**

Os testes biológicos consistem no uso de plantas indicadoras, sensíveis ao vírus por inoculação mecânica e/ou de insetos vetores sob ambiente controlado. O resultado deste teste é avaliado quanto à presença ou ausência de sintomas nas plantas indicadoras. Observa-se os sintomas relatados na literatura para cada grupo ou gênero de vírus. No entanto, não obtemos precisão em nível de espécie neste teste. Contudo, representa mais uma alternativa de suporte ao diagnóstico.

### **2.3.2 Teste Imunocromatográfico**

O teste é vantajoso devido à sua rapidez, baixo preço e praticidade, podendo ser utilizado a campo, por exemplo. O teste sorológico consiste na

reação enzimática do antissoro e antígeno. O material infectado com vírus ao entrar em contato com a enzima, desencadeia a reação e pode ocorrer aparecimento de cor, o que significa resultado positivo para presença de vírus.

### **2.3.3 Teste de PCR e RT-PCR**

O significado de PCR é *Polymerase Chain Reaction*. Essa reação consiste na amplificação do DNA ou cDNA (a qual é sintetizada a partir de uma fita simples de RNA). As reações do PCR são feitas em máquinas chamadas termocicladores, que dão condições de controle de tempo para cada ciclo e temperaturas. O RT-PCR difere da técnica de PCR apenas na transformação de RNA em DNA, através da enzima *transcriptase reversa*, por isso o prefixo RT da reação. Para realizar a reação é necessário amostras de DNA ou cDNA (DNA complementar); oligonucleotídeos, denominados também de *primers*, que são os iniciadores da reação; *DNA polimerase* termo-estável, solução tampão e nucleotídeos livres para polimerização.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 Amostragem e detecção de vírus em espécies de Bromeliaceae de restinga no Estado do Rio de Janeiro

##### RESUMO

A família Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais importantes da Mata Atlântica. Objetivando verificar a presença ou não de vírus associados a bromélias nativas de restinga da Mata Atlântica, procedeu-se a coleta de bromélias nativas e abacaxizeiro comercial associado a teste biológico, sorológico e molecular. Foi detectado, molecularmente, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* em *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha* e em abacaxizeiro, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* e o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* nas amostras coletadas. Tal resultado indica que as bromélias nativas podem servir de fonte de inóculo alternativo para o inseto vetor, além das mudas de abacaxizeiro com infecção viral.

## ABSTRACT

The Bromeliaceae family is one of the most important Atlantic Forest's taxonomic groups. Aiming to verify the presence or absence of viruses associated with native bromeliads of *Restinga* associated with the Atlantic Forest we collected native bromeliads and commercial pineapple associated with biological, serological and molecular tests. *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* was molecularly detected in *Aechmea nudicaulis*, *Bromelia antiacantha* and pineapple, the *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* and *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* were detected in the collected samples. This result indicates that the native bromeliads can serve as an alternative inoculum source for the insect vector in addition to pineapple seedlings with viral infection.

### 3.1.1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é um dos grupos taxonômicos mais importantes da Mata Atlântica devido à sua abundância, ao seu endemismo e interação com a fauna. No Brasil são conhecidos 44 gêneros e 1349 espécies de bromélias, sendo o Estado da Bahia e a região sudeste do país os que contemplam a maior riqueza em biodiversidade.

A Mata Atlântica no Estado do Rio de Janeiro é o local de maior ocorrência de bromélias e maior endemismo específico do Brasil. Estudos apontam que quanto maior o número de bromélias, maior é a diversidade estrutural de uma mata, aumentando associações com a fauna (Fontoura *et al.*, 1991; Grant & Zijlstra, 1998; Mestre *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2010; Forzza *et al.*, 2015).

De acordo com Bonnet (2006), as bromélias desempenham função de extrema importância em um ecossistema, servindo como proteção, berçário e fonte de nutrientes para espécies epifíticas e arbóreas.

As bromélias se destacam economicamente por serem plantas alimentícias e medicinais, como todas as espécies do gênero *Ananas*, uma fruta de ótimo paladar apesar de algumas serem ácidas. Pode ser utilizada para o preparo de sobremesas, sucos e bebidas alcoólicas. No campo medicinal, não existem

pesquisas com resultados concretos, entretanto, existem usos populares do *Ananas* como digestivo, antidiférico, combate aos cálculos renais etc.

As bromélias também são apreciadas há décadas como plantas ornamentais, principalmente nos EUA, Europa e Japão, onde seu cultivo movimentou uma economia considerável. No Brasil, Burle Marx, foi um dos paisagistas pioneiros no uso de bromélias em jardins, conferindo um toque mais natural e tropical aos ambientes (Grando, 2001). Em função da grande procura pelas bromélias de valor ornamental, o extrativismo tem se intensificado em seus ambientes naturais, colocando algumas espécies em ameaça de extinção (Moreira et al., 2006).

No mundo foram registrados em espécies de Bromeliaceae (incluindo o abacaxizeiro) vírus dos gêneros *Badnavirus* [*Pineapple bacilliform CO virus* (PBCOV), *Pineapple bacilliform ER virus* (PBERV)], *Ampelovirus* [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* (PMWaV-3), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 4* (PMWaV-4), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5* (PMWaV-5)], *Tospovirus* [*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)] e um possível *Nucleorhabdovirus* [(*Pineapple chlorotic leaf streak virus* (PCLSV)] (Brioso & Pozzer, 2012;; Bhat et al., 2016; Brioso, 2017a).

No Brasil, o PMWaV-1 foi registrado em *A. comosus* var. *ananassoides* (Baker) Coppens & Leal, *A. comosus* var. *bracteatus* (Lindl.) Coppens & Leal, *A. comosus* var. *comosus* (L.) Merrill, *A. comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppens & Leal, *A. comosus* var. *paraguayensis* (Camargo & L. B. Smith) Coppens & Leal, *Billbergia* spp., *Bromelia balansae* Mez, *Bromelia karatas* L., *Bromelia goeldiana* L. B. Smith, *B. laciniosa* Mart. ex Schult. & Schult.f., *Dyckia* spp., *Pseudananas sagenarius* (Arruda da Camara) Camargo, *Tillandsia* sp.. O PMWaV-2 e PMWaV-3 foram assinalados em todas as variedades da espécie *Ananas comosus* acima referenciadas e em *A. macrodontes* Morren. O PCLSV foi assinalado somente em *Ananas comosus* var. *comosus* (Zaksevskas & Alba, 1971; Zaksevskas & Alba, 1972; Kitajima et al., 1975; Nickel et al., 1995; Nickel et al., 2000; Portugal et al., 2001; Velame et al., 2001; Santos et al., 2002; Peron et al., 2009; Peron et al., 2010; Peron, 2011; Amorim, 2011; Santos, 2013; Ferreira et al., 2014).

Em termos de distribuição de vírus (seja em infecção simples ou mista) nos Estados brasileiros para o gênero *Ananas comosus* var. *comosus*, o PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3 foram relatados nos Estados da Bahia, do Espírito Santo, de Minas Gerais, de Mato Grosso e do Pará; o PMWaV-1 e PMWaV-2 nos Estados da Paraíba e Paraná; o PMWaV-2 e PMWaV-3 no Rio Grande do Sul.

Já no caso dos outros gêneros de Bromeliaceae citados acima foram assinalados o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3, somente no Estado da Bahia.

O PCLSV só foi registrado no Estado do Acre (Kitajima *et al.*, 1975). No Estado do Rio de Janeiro, somente foi detectado o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 associado ao inseto vetor *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi detectar e identificar molecularmente vírus associados a bromélias nativas de restinga no Parque Nacional da Resinga de Jurubatiba.

### 3.1.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.2.1 Coleta das Amostras

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ), localizado a 22° 22' 15" S 41° 47' 13" W, corresponde a áreas de três municípios: Macaé, Carapebus e Quissamã, no Estado do Rio de Janeiro, sendo este o percurso realizado para a coleta de materiais das espécies de Bromélias (Tabela 1).

Segundo a classificação de Alvarez (2013), o clima predominante na região é do tipo tropical com inverno seco (Aw) com uma temperatura média anual entre 22 °C e 24 °C. A média anual de pluviosidade é de 1000 a 1300 mm.

Para se realizar a amostragem da diversidade de vírus presentes em bromélias no PNRJ, foram observadas três espécies: *Bromelia antiacantha*, *Neoregelia cruenta* (Graham) L. P. e *Aechmea nudicaulis* (L.) Grise.

Em trabalho realizado por Cogliatti – Carvalho *et al.* (2001) na restinga do PNRJ, levantando a composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no PNRJ, observou-se que dentre 10 espécies encontradas, as mais abundantes

foram *Neoregelia cruenta* e *Aechmea nudicaulis* e na área AAE (área aberta de Ericácea), descrita como a área com maior diversidade, e, a espécie com maior predominância foi *Bromelia antiacantha*.

As coletas das amostras de folhas de cada espécie das bromélias foram realizadas em três datas diferentes. A primeira coleta foi da espécie *Neoregelia cruenta*. A segunda coleta, *Aechmea nudicaulis* e a terceira coleta foi das amostras de folhas da espécie de *Bromelia antiacantha*. Cada amostra de folha é referente a um ponto diferente do perímetro da área.

O material coletado não foi coletado mediante sintomas, sendo realizado de modo indiscriminado. Algumas espécies apresentaram maior quantidade de amostras de folhas com sintomas de clorose, como a *Aechmea nudicaulis* e vermelhidão em *Neoregelia cruenta*.

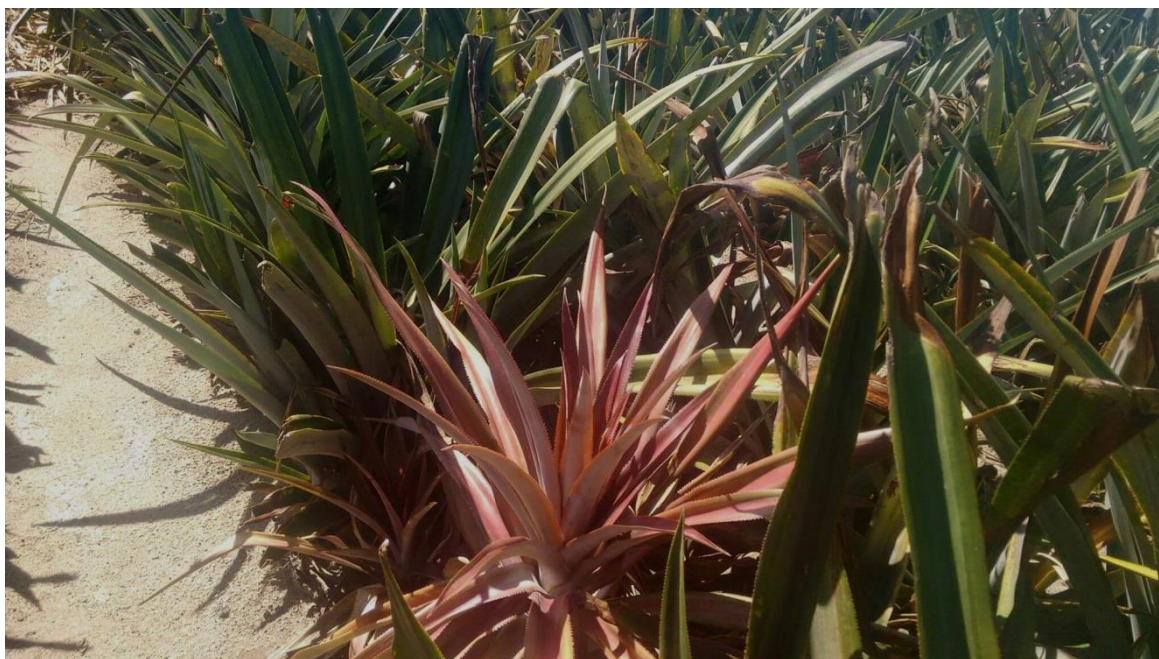
**Tabela 1.** Espécies da família Bromeliaceae coletadas, em 2016, na Restinga de Jurubatiba, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro:

Coleta	Data	Número de amostras de folhas	Espécies de <i>Bromeliaceae</i>
1 <sup>a</sup>	maio/15	20	<i>Neoregelia cruenta</i> (Graham) L.
2 <sup>a</sup>	julho/15	30	<i>Aechmea nudicaulis</i> (L.) Griseb
3 <sup>a</sup>	setembro/15	10	<i>Bromelia anticantha</i> Bertol.
Total		60	

Foram, também, coletadas amostras de abacaxizeiro ‘Pérola’ sintomáticas com sintomas de vermelhidão (Figura 1) no município de Bom Jesus de Itabapoana (RJ), 202 km de distância da Restinga de Jurubatiba (RJ).

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo durante o transporte e mantidas em freezer a -20°C para posterior avaliação no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ.





**Figura 1.** Plantas de abacaxizeiro 'Pérola' coletadas no município de Bom Jesus de Itabapoana (RJ), apresentando sintomas de vermelhidão.

### **Teste Biológico**

Todas as amostras de folhas de plantas de Bromeliaceae coletadas na Restinga de Jurubatiba (RJ) foram inoculadas mecanicamente em folhas expandidas de *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn, a qual foi utilizada por apresentar sensibilidade a uma maior gama de vírus. Na inoculação mecânica, usou-se o extrato foliar de plantas coletadas, diluído dez vezes, com tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,6 contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v) e, como abrasivo, "celite" (Sigma Aldrich Com.), na proporção de 0,1 g por grama de folha.

### **Teste Imunocromatográfico**

As amostras de folhas de plantas de Bromeliaceae coletadas na Restinga de Jurubatiba (RJ) foram testadas quanto a presença de vírus com tiras imunocromatográficas oriundas da empresa Agdia para os vírus dos gêneros *Carlavirus* (PVS – *Potato virus S*), *Closterovirus* (CTV – *Citrus tristeza virus*), *Cucumovirus* (CMV – *Cucumber mosaic virus*), *Nepovirus* (ArMV – *Arabis mosaic*

*virus*), *Potexvirus* (CymMV – *Cymbidium mosaic virus*, PVX – *Potato virus X*), *Potyvirus* (MDMV – *Maize dwarf mosaic virus*, PVY – *Potato virus Y*, ZYMV - *Zucchini yellow mosaic virus*), *Tobamovirus* (ORSV - *Odontoglossum ringspot virus*, PMMoV - *Pepper mild mottle virus*, TMV – *Tobacco mosaic virus*), *Tospovirus* (INSV - *Impatiens necrotic spot orthotospovirus*, TSWV – *Tomato spotted wilt orthotospovirus*), seguindo instruções do fabricante. O teste foi realizado a temperatura ambiente a partir do macerado de 0,1 g em contato com a solução tampão e posterior inserção da tira imunocromatográfica com o antissoro para detecção dos vírus de interesse. A leitura da tira imunocromatográfica era realizada sabendo que a fita, obrigatoriamente, deveria apresentar uma linha vermelha como controle, indicando viabilidade da tira. Caso houvesse um ou mais vírus, a tira apresentaria duas ou mais linhas vermelhas correspondente a posição destinada a cada vírus.

### **Teste Molecular**

A extração de RNA total foi feita com *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen Brasil) e Teste de RT-PCR com SuperScript® III One-Step RT-PCR System com Platinum® Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher). As condições, ciclo e *primers* para a reação de RT-PCR e visualização do *amplicon* viral foi utilizado o *kit BromeRNAvirus* (Anexo 5.2), desenvolvido pelo Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ, seguindo as instruções do mesmo.

A extração de DNA total foi realizada com DNeasy Plant Mini Kit e teste de PCR com Redextract – N- AMP™ Plant PCR Kit (Sigma). As condições, ciclo e *primers* para a reação de PCR e visualização do *amplicon* foi utilizado o *kit BromeDNAvirus* (Anexo 5.1), desenvolvido pelo Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ, seguindo as instruções do mesmo.

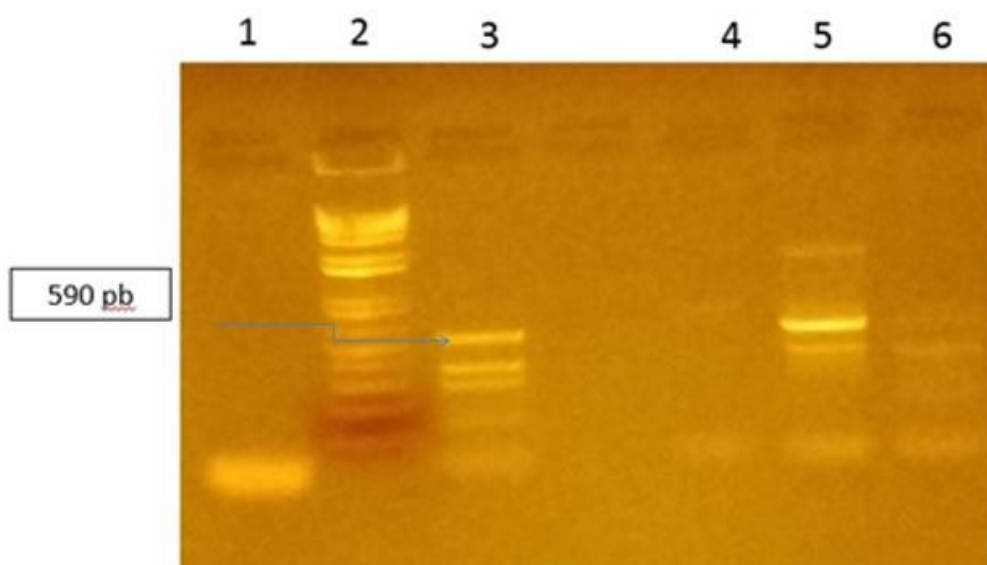
### **3.1.3 RESULTADOS**

Nas amostras coletadas não foram detectados qualquer possível vetor de vírus associado a bromélias, como ácaros, besouros, cochonilhas, pulgões e tripses.

No Teste Biológico adotado nenhuma das amostras de bromélia coletadas, após a inoculação mecânica, originou sintoma nas folhas de *C. amaranticolor*.

Nos Testes com tiras Imunocromatográficas nenhuma das amostras testadas deram reação positiva para os vírus assinalados nas respectivas tiras, ou seja, vírus dos gêneros *Carlavirus*, *Closterovirus*, *Cucumovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus*.

Nos Testes Moleculares, para RNA, houve reação positiva no caso do abacaxizeiro da espécie *Ananas comosus* var. *comosus* para os vírus PMWaV-1 e PMWaV-3 e nas bromélias *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha* testadas para o PMWaV-1 (Figura 2).

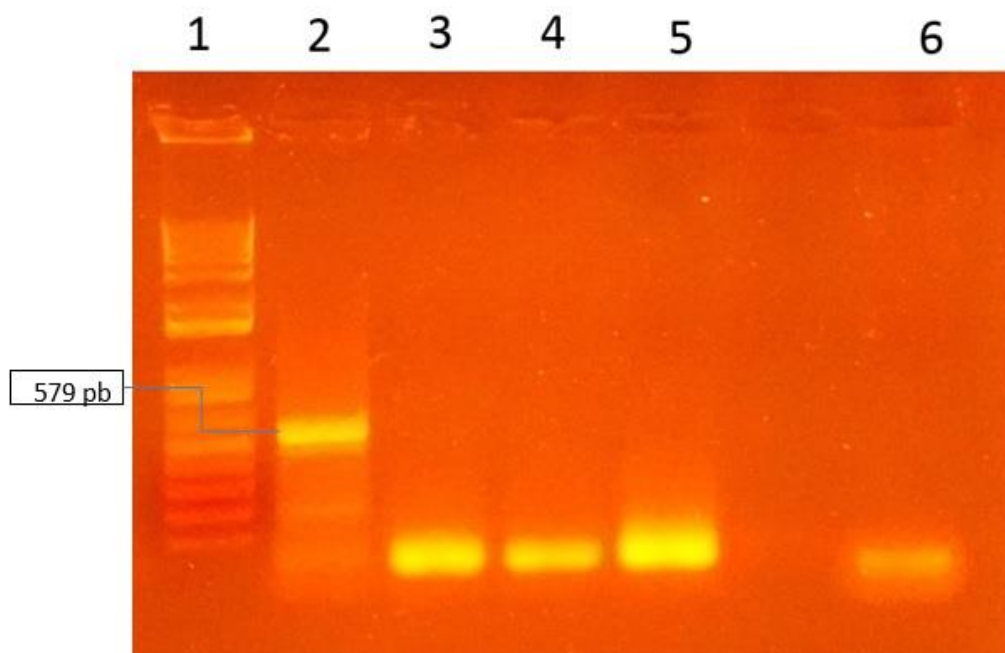


**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar: Controle Negativo (1); 1 kb *plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) (2); Controle Positivo – PMWaV-1 oriundo de folhas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) (3); *Neoregelia cruenta* (4), *Aechmea nudicaulis* (5), *Bromelia antiacantha* (6).

Os oligonucleotídeos específicos para PMWaV-1 foram testados em amostras, produtos de RT-PCR de *Neoregelia cruenta*, *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia Antiacantha* indicadas nas linhas 4, 5 e 6, respectivamente. As amostras das linhas 5 e 6, *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha* acusaram presença

do vírus PMWaV- 1, pois amplificaram um fragmento de 590 pb, correspondente ao peso molecular apresentado pelo controle positivo, proveniente de folhas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) (Figura 2).

Nos Testes Moleculares, para DNA, não houve reação positiva no caso do abacaxizeiro e das bromélias testadas (Figura 3).



**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de PCR a partir de DNA total foliar: 1 kb *plus* DNA *Ladder* (Thermo Fisher Scientific) (1); Controle Positivo – *Amplicon* de *Badnavirus* oriundo de folhas de bananeira (*Musa* spp.) amplificado com os *primers* BadnaFP/ BadnaRp (2); amostra foliar de *Neoregelia cruenta* (3), *Aechmea nudicaulis* (4), *Bromelia antiacantha* (5), Abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) (6)

Os oligonucleotídeos específicos para o gênero *Badnavirus* foram utilizados nas amostras, produtos de RT-PCR de *Neoregelia cruenta*, *Aechmea nudicaulis*, *Bromelia antiacantha*, Abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*), linhas 3, 4, 5 e 6, respectivamente. O controle positivo (linha 2) de *Badnavirus* de folhas de bananeira (*Musa* spp.) contava com um fragmento de 579 pb. Não

houve amplificação deste fragmento para as amostras na eletroforese, acusando ausência de vírus do gênero *Badnavirus* bromélias de restinga (Figura 3).

### 3.1.4 DISCUSSÃO

A partir de espécies encontradas na literatura em trabalhos direcionados ao levantamento de fauna, é relatado como potenciais vetoras de vírus em Bromeliaceae no Brasil, tanto em espécies de restinga, como em ornamentais e frutíferas, os besouros, as cochonilhas e os tripses (Monteiro *et al.*, 2001; Monteiro *et al.*, 2011). E, embora no Estado do Rio de Janeiro tenha sido citado 73 vírus até 2017 (Brioso, 2017b), os resultados obtidos através dos Testes Biológico e Imunocromatográfico neste trabalho indicam a ausência de vírus no Estado do Rio de Janeiro em relação às espécies de bromélias coletadas na Restinga de Jurubatiba (RJ), indicando que os testes não foram eficazes.

Os *amplicons* virais obtidos tanto de bromélias nativas como de abacaxizeiro estão de acordo com o mencionado por Sether *et al.* (2005), onde o PMWaV-1 apresentou o mesmo peso molecular de 590 pb.

Embora Santos (2013) mencione a predominância do PMWaV-2 (seja em infecção simples ou mista) para espécies de bromélias, o mesmo não ocorreu no caso das bromélias da Restinga, no caso do Estado do Rio de Janeiro, já que houve a predominância do PMWaV-1. Convém mencionar que os dados obtidos por Santos (2013) foram restritos a bromélias coletadas junto ao Banco de Germoplasma (BAG) de Abacaxizeiro da Embrapa-Bahia e, portanto, sujeito à ação humana.

Pelos resultados obtidos, neste trabalho, pode-se afirmar que, as bromélias da Restinga de Jurubatiba (RJ), tratam-se do primeiro registro no mundo de *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha* infectadas pelo PMWaV-1 em condições naturais, bem como, o primeiro registro no Estado do Rio de Janeiro, de PMWaV-1 e PMWaV-3 em abacaxizeiro comercial. No entanto, na mesma área de coleta, a bromélia da espécie *Neoregelia cruenta* apresentou resultado negativo para o PMWaV-1.

As espécies de bromélias *Aechmea nudicaulis* apresentaram clorose e em algumas amostras o vermelhão, no entanto esses fatores podem ser indícios, mas não é suficiente para o diagnóstico, pois *Neoregelia cruenta* tem como característica da espécie a vermelhidão nas folhas, pronunciada nas pontas e sua reação para PMWaV-1 foi negativa.

Trata-se, portanto, do primeiro levantamento e detecção de vírus em espécies de Bromeliaceae realizado no Estado do Rio de Janeiro.

### 3.1.5 CONCLUSÃO

Dentre as três espécies de Bromeliaceae amostradas no PNRJ apenas duas espécies, *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha* acusaram presença de vírus nas amostras e apresentaram amplificação do fragmento de peso molecular de 579 pb compatível ao PMWaV-1.

### 3.1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, W.A. (2011) Detecção molecular do complexo viral da murcha do abacaxizeiro em plantas e no inseto vetor. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES., 86p.

Bhat, A. I., Hohn, T., Selvarajan, R. Badnaviruses: The Current Global Scenario. (2016) *Viruses* 8(6): 177. <http://doi.org/10.3390/v8060177>

Brioso, P. S. T. (2014) Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.). Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides (L.VV.VI.). Lista de espécies vegetais infectadas naturalmente com Vírus ou Viróides no Brasil. Criado em 2014. Disponível em: <<http://www.fito2009.com/fitop/fitoplalistavirolbrasil.htm/>> Acesso em 10 de março de 2017.



Bonnet, A., Queiroz, M. H. (2006) Estratificação vertical de bromélias epifíticas em diferentes estádios sucessionais da Floresta Ombrófila Densa, Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 29 (2): 217-228.

Brioso, P. S. T. (2017) Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.). Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides (L.VV.VI.). Lista de Vírus e Viróides assinalados em espécies vegetais no Estado do Rio de Janeiro. Criado em 2015. Disponível em: <<http://www.fito2009.com/fitop/fitoplaliblistavirolrj.htm>> Acessado em 10/03/2017.

Brioso, P. S. T., Pozzer, L. (2012) Badnavirus - Histórico, Importância, Detecção e Estratégia de Controle. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 20: 64-124.

Ferreira, T. F., Souza, R. M., Idalino, W. S. S., Ferreira, K. D., Brioso, P. S. T., (2014) Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Helicotylenchus* sp. with mealybug wilt of pineapple in microplots. *Nematropica* 44: 181-189.

Fontoura, T., Costa, A., Wendt, T. (1991) Preliminary checklist of the Bromeliaceae of Rio de Janeiro State, Brazil. *Selbyana*, 12: 5-45.

Forzza, R. C., Costa, A., Siqueira Filho, J. A., Martinelli, G., Monteiro, R. F., Santos-Silva, F., Saraiva, D. P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B., Versieux, L. (2015). Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>> acessado em 16/11/2016.

Grant, J.R. & Zijlstra, G. (1998) An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae. *Selbyana* 19 (1): 91-121.

Kitajima, E. W., Giacomelli, E. J., Costa, A. S., Costa, C. L., Cupertino, F. P. (1975) Bacilliform particles associated with chlorotic leaf streak of giant pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill. *Phytopathol. Zeit.* 82: 83-86.

Lima, T. T., Wanderley, M. G. L. (2007) Diversidade da Serra do Lopo Extrema - Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5: 1146-1148.

Manetti, L. M. (2009) Metabólitos secundários da família bromeliaceae. *Química nova*, São Paulo, 15: 1-13

Moreira, B. A., Wanderley, M. G. L., Barros, M. A. V. C. (2006) Bromélias: Importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Pós-graduação do Instituto de Botânica de São Paulo. Curso de Capacitação de Monitores - Estágio de Docência.

Mestre, L.A.M., Aranha, J.M.R. & Esper, M.L.P. (2001) Macroinvertebrate fauna associated to the bromeliad *Vriesea inflata* of the atlantic forest (Paraná State, Southern Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44: 89-94.

Monteiro, R. C., Mound, L. A., Zucchi, R. A. (2001) Sistemática, morfologia e fisiologia. Espécies de *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) de Importância Agrícola no Brasil. *Neotropical Entomology* (1): 65-72.

Monteiro, R. F., Forzza, R. C., Mantovani, A. (2011) Leaf structure of *Bromelia* and its significance for the evolution of *Bromelioideae* (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 293: 53-64.

Nickel, O., Chagas, C. M., Sanches, N. F. (1995) A murcha do abacaxizeiro: estudos sobre o envolvimento de um closterovirus. *Fitopatologia Brasileira* 20: 305.

Nickel, O., Chagas, C. M., Vasconcelos, A. P. A. (2000) Association of pineapple mealybug wilt with Closterovirus-like particles and dsRNA in Bahia, Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 25(2): 200-202.

Peron, F. N. (2011) Diagnóstico molecular e imunoenzimático de Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) em diferentes genótipos de



abacaxizeiro. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES. 82p.

Peron, F. N., Fernandes, P. M. B., Ventura, J. A. (2010) Detecção do pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV-1 e PMWAV-2) em abacaxizeiros no Estado de Espírito Santo. *Tropical Plant Pathol.* 35 (supl.): S185.

Peron, F. N., Fernandes, P. M. B., Ventura, J. A. (2009) Detecção do PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. *Tropical Plant Pathology* 34 (supl.): S267.

Portugal, A. M., Meissner Filho, P. E., Santos, L. S., Sanches, F. (2001) Indexação de germoplasma para o vírus associado com a murcha do abacaxí. *Fitopatologia Brasileira* 26: 531.

Romero, G.Q., Nomura, F., Gonçalves, A.Z., Dias, N.Y.N., Mercier, H., Conforto, E.C. & Rossa-Feres, D.C. (2010) Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. *Oecologia*, 162: 941-949.

Santos, A. I., Portugal, A. M., Meissner Filho, P. E., Sanches, N. F., Santos, L. S., Cabral, J. R. S. (2002) Indexação de germoplasma para a murcha do abacaxi. *Fitopatologia Brasileira* 27 (supl.): 212.

Santos, K. C. (2013) Incidência e prevalência das espécies do Pineapple mealybugwilt-associated virus no banco ativo de germoplasma de abacaxi da embrapa mandioca e fruticultura e em nove estados brasileiros' Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, BA. 77p.

Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J., Zee, F., Hu, J. S. (2005) Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Dis.* 89: 450-456.

Velame, K. V. C., Meissner Filho, P. E., Portugal, A. M., Santos, L. S. (2001) Produção de um anti-soro para o vírus associado com a murcha do abacaxí. *Fitopatologia Brasileira* 26: 537.

Zaksevskas, M. L. R. (1972) Reprodução da mancha amarela do abacaxi (yellow spot) sob condições experimentais. *Rev. Soc. Bras. Fitopatol.*, 5:109-110.

Zaksevskas, M. L. R., Alba, A. P. C. (1972) Reprodução da mancha amarela do abacaxi (yellow spot) sob condições experimentais. *Rev. Soc. Bras. Fitopatologia* 5: 109-110.

Zaksevskas, M. L. R., Alba, A. P. C. (1971) Eliminação por ultracentrifugação dos inibidores da infecção de vírus de plantas presentes no suco da folha de abacaxi. *Rev. Soc. Bras. Fitopatologia* 4: 62-63.

### 3. 2 Levantamento e detecção de vírus em espécies de Orchidaceae nacionais e importadas

#### RESUMO

Mudas de orquídeas importadas de países, como Holanda, Taiwan, Tailândia chegam ao Brasil. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fitossanitária, com relação a vírus, de mudas de orquídeas importadas e nacionais através dos testes imunocromatográfico e de RT-PCR. Nas amostras nacionais analisadas, detectou-se o *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot virus*, o *Orchid fleck dichorhavirus*, já nas amostras importadas, detectou-se o *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot virus*, *Cucumber mosaic virus*, em infecção simples ou mista. Em nenhuma das amostras, nacionais e importadas, foi detectado vírus quarentenários para o Brasil. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de se fortalecer um programa nacional de indexação de mudas de orquídeas para vírus de forma a reduzir a fonte de inóculo desses vírus no Brasil a fim de não comprometer o agronegócio.

#### ABSTRACT

Orchid seedlings imported from various countries arrive in Brazil from several countries, such as: Holland, Taiwan, Thailand. This study aimed to evaluate the phytosanitary quality, related to viruses, of imported and domestic orchid seedlings through immunochromatographic and RT-PCR tests. *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, and *Orchid fleck dichorhavirus* were detected in the national samples analyzed while *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, and *Cucumber mosaic virus* were detected in the imported samples, in single or mixed infection. In none of the national and imported samples, quarantine viruses were detected for Brazil. The results evidenced the need to strengthen a national program of orchid seedlings indexing for viruses in order to reduce the inoculum source of these viruses in Brazil with the purpose of not compromise agribusiness.

### 3. 2.1. INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, a qual é constituída por mais de 25.000 espécies. No Brasil, temos registros de 221 gêneros, sendo 1620 espécies endêmicas do Brasil. Possuem diversos fins desde o papel de indicador ambiental, uso medicinal e ornamental, na qual é mais conhecida, fornecendo flores de alto valor comercial (Zettler *et al.*, 1990; Kersten, 2006; Zhang *et al.* 2007; Forzza *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2015).

O mercado de ornamentais no Brasil cresce, apesar de ainda se apresentar pouco descentralizado. As importações no ano de 2014 alcançaram US\$ 46,81 milhões em flores e plantas ornamentais e US\$ 23,81 milhões em exportações. Pode-se dizer que o mercado interno cresceu em até seis vezes nos últimos dez anos para alcançar o valor citado em importações, enquanto que a exportação se manteve estável. Esse comportamento denota crescente demanda do mercado interno (Lima Júnior *et al.*, 2015).

O cenário de entrada e saída das orquídeas requisitadas é representado pelas importações, principalmente da Holanda e Tailândia, as quais correspondem juntas a mais de 95% das importações, sendo os produtos importados de maior expressão, respectivamente, as orquídeas do gênero *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. Os exemplares destes gêneros são normalmente melhorados geneticamente e de grande exuberância devido à sua floração vistosa, atendendo à demanda do mercado consumidor. Os países alvos para exportação são Japão, Alemanha, EUA e Holanda, no entanto a mercadoria de interesse não é semelhante à importada, onde a exigência de mercado são os grandes cachos e flores exuberantes. A exportação atende aos interesses do mercado de colecionadores (SECEX/MDIC, 2014; Suzuki, 2014; Junqueira & Peetz, 2016).

O comércio dessas plantas sem a vistoria fitossanitária adequada pode incorrer na disseminação de viroses entre as espécies locais. As orquídeas ornamentais importadas podem se tornar fonte de inóculo para espécies ornamentais nacionais. Neste contexto, a adoção de medidas para vírus quarentenários faz-se necessário para coibir a entrada de exemplares infectados

com vírus que não foram registrados no país anteriormente, sendo necessária a diagnose nas plantas, antes de sua chegada aos consumidores.

Dentre os vírus citados em representantes da família Orquidaceae temos os vírus dos gêneros: *Alphacarmovirus* (*Carnation mottle virus*), *Carlavirus* (*Calanthe mosaic virus*), *Cucumovirus* (*Cucumber mosaic virus*), *Closterovirus* (*Dendrobium vein necrosis virus*), *Dichorhavirus* [*Orchid fleck dichorhavirus* (= *Dendrobium leaf streak virus*, *Laelia red leaf spot virus*, *Phalaenopsis necrosis virus*)], *Nepovirus* (*Tomato ringspot virus*), *Orthospovirus* (*Capsicum chlorosis virus*, *Impatiens necrotic spot orthospovirus*, *Tomato spotted wilt orthospovirus*), *Poacevirus* (*Caladenia virus A*), *Potexvirus* (*Cymbidium mosaic virus*), *Platypovirus* (*Donkey orchid symptomless virus*), *Potyvirus* [*Bean yellow mosaic virus*, *Calanthe mild mosaic virus*, *Ceratobium mosaic virus*, *Clover yellow vein virus*, *Colombian datura virus*, *Cypripedium calceolus virus*, *Cypripedium chlorotic streak virus* (= *Cypripedium necrotic leaf stripe virus*), *Dasheen mosaic virus*, *Diurus virus Y*, *Dendrobium mosaic virus*, *Habenaria mosaic virus*, *Pecteilis mosaic virus*, *Phalaenopsis chlorotic spot virus*, *Sarcochilus virus Y*, *Spiranthes mosaic virus 2*, *Spiranthes mosaic virus 3*, *Turnip mosaic virus*, *Vanilla mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* (= *Vanilla necrosis virus*)], *Tobamovirus* (*Odontoglossum ring spot virus*, *Tobacco mosaic virus*), *Tobravirus* (*Tobacco rattle virus*), *Tombusvirus* (*Cymbidium ringspot virus*) e, vírus não bem caracterizados e de gênero indeterminado: *Dendrobium virus*, *Dendrobium rhabdovirus*, *Grammatophyllum bacilliform virus*, *Long orchid rhabdovirus*, *Masdevallia isometric virus*, *Phalaenopsis bacilliform virus*, *Short orchid rhabdovirus*, *Trichopilia isometric virus*.

Os vírus quarentenários para o Brasil são os citados nas Instruções Normativas (IN 6/ 2005, IN 52/ 2007, IN 41/ 2008, IN 59/ 2013, IN 01/ 2015) do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que podem incidir em espécies e/ou híbridos de orquídeas importadas. Tais vírus se distribuem em quatro espécies e/ou possíveis espécies virais [*Tomato ringspot virus* (gênero *Nepovirus*), *Phalaenopsis chlorotic spot vírus* (gênero *Potyvirus*), *Capsicum chlorosis virus* (gênero *Orthospovirus*), *Impatiens necrotic spot orthospovirus* (Gênero *Orthospovirus*)].

Dentre os vírus com maior incidência e relevância em representantes de *Orchidaceae* no Brasil, destacam-se o *Cymbidium mosaic virus* (gênero *Potexvirus*), *Odontoglossum ringspot virus* (gênero *Tobamovirus*) e o *Orchid fleck dichorhavirus* (gênero *Dichorhavirus*). O controle dos vírus consiste em medidas preventivas, pois ainda não foi possível desenvolver um método curativo, uma vez que, tratam-se de parasitas obrigatórios que utilizam células vivas para se replicarem (Klein, 2008; Alexandre *et al.*, 2010; Alexandre & Duarte, 2012).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi detectar e identificar molecularmente os vírus presentes em amostras da família *Orchidaceae* importadas e nacionais.

## 3.2. 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3. 2. 2. 1 Origem do material de estudo

As amostras de plantas da família *Orchidaceae* (*Dendrobium nobile*, *Dendrobium hybrid*, *Oncidium hybrid*, *Phalaenopsis amabilis*, *Phalaenopsis hybrid*) recebidas rotineiramente pelo Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ foram oriundas da Holanda, Tailândia, Taiwan e Brasil, seja na forma *in vitro* ou não, no período de 2016 a 2017.

As amostras de plantas importadas eram assintomáticas, com exceção de uma planta de *Phalaenopsis amabilis* que apresentava distorção foliar (Figura 4). As amostras de plantas nacionais eram sintomáticas (Figura 2, Figura 3).

Foram analisadas 502 plantas importadas, sendo 21 plantas de *Dendrobium nobile*, Quatro plantas de *Dendrobium hybrid*, Oito plantas de *Oncidium hybrid*, 386 plantas de *Phalaenopsis amabilis* e 83 plantas de *Phalaenopsis hybrid*. Também foram analisadas 20 plantas do comércio nacional: Uma planta de *Arundina bambusifolia* (oriunda de Ourinhos – São Paulo), 15 plantas de *Phalaenopsis amabilis* (oriunda de Holambra –SP), Quatro plantas de *Oncidium hybrid* (município de Atibaia – São Paulo), provenientes de orquidários.

## Teste Imunocromatográfico

As amostras de orquídeas importadas e nacionais foram testadas quanto a presença de vírus com tiras imunocromatográficas oriundas da empresa Agdia para os vírus dos gêneros *Carlavirus* (PVS – *Potato virus S*), *Closterovirus* (CTV – *Citrus tristeza virus*), *Cucumovirus* (CMV – *Cucumber mosaic virus*), *Nepovirus* (ArMV – *Arabis mosaic virus*), *Potexvirus* (CymMV – *Cymbidium mosaic virus*, PVX – *Potato virus X*), *Potyvirus* (MDMV – *Maize dwarf mosaic virus*, PVY – *Potato virus Y*, ZYMV - *Zucchini yellow mosaic virus*), *Tobamovirus* (ORSV - *Odontoglossum ringspot virus*, PMMoV - *Pepper mild mottle virus*, TMV – *Tobacco mosaic virus*), *Orthospovirus* (INSV - *Impatiens necrotic spot orthospovirus*, TSWV – *Tomato spotted wilt orthospovirus*) seguindo instruções do fabricante.

## Teste Molecular

A extração de RNA total foi realizada com *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen Brasil) e Teste de RT-PCR com SuperScript® III One-Step RT-PCR System com Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher). As condições, ciclo e *primers* para a reação de RT-PCR e visualização do *amplicon* viral foram utilizados o *kit Orqvirus* (Anexo 5.4) e o *kit Orqqvarvirus* (Anexo 5.3) (no caso de vírus quarentenários para o Brasil), desenvolvidos pelo Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ, seguindo as instruções do mesmo.

A extração de DNA não foi efetuada em orquídeas porque os registros de incidência de vírus no mundo nesta família são apenas de vírus com RNA.

### 3.2.3. RESULTADOS

De 522 amostras de plantas avaliadas, 10 apresentaram algum tipo de vírus, sendo 2 amostras apresentando CymMV, isoladamente; 3 amostras com infecção mista de CymMV e ORSV; 4 amostras com infecção mista de CMV, CymMV e ORSV e uma amostra com infecção mista de CMV e ORSV.

As orquídeas nacionais de *Oncidium* spp. provenientes do município de Atibaia apresentaram infecção mista de CymMV/ORSV em 2 amostras (Figura 3).

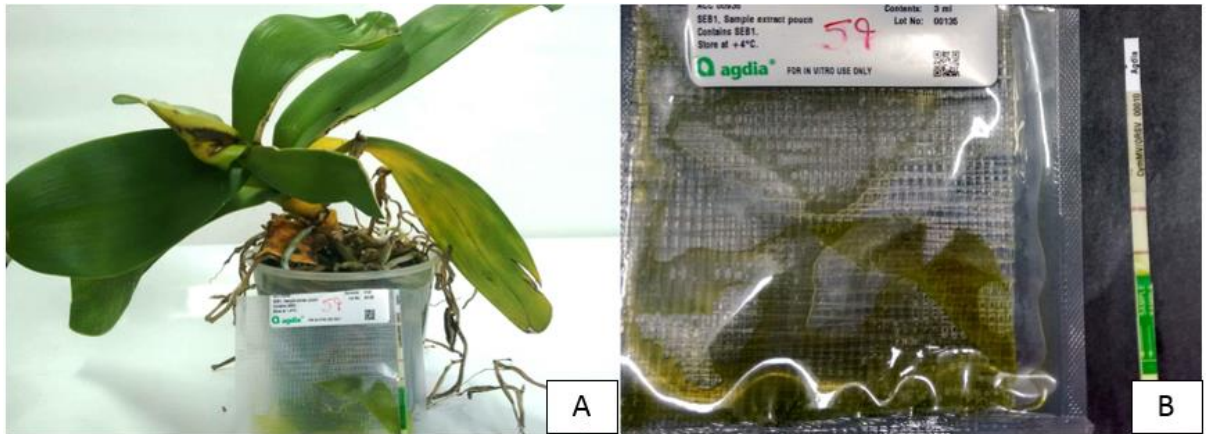
As mudas de origem de Holambra – SP apresentaram infecção simples de CymMV em *Phalaenopsis* spp. em apenas uma amostra (Figura 2) e uma planta de *Arundina bambusifolia* (oriunda de Ourinhos – São Paulo) com infecção mista de CymMV/ORSV. A partir destes dados, calculamos que 20% das amostras nacionais tem incidência de um vírus ou infecção mista.

As orquídeas importadas da Tailândia e Holanda apresentaram infecção mista de CMV, CymMV/ORSV em 4 amostras de *Phalaenopsis* spp., infecção mista de CMV e ORSV em uma amostra de *Phalaenopsis* spp e uma amostra com infecção simples de CymMV em *Phalaenopsis* . Desse modo, calculamos que 1,2% das amostras de orquídeas importadas apresentam algum vírus. Observou-se, portanto, que a incidência de vírus em amostras importadas é menor quando comparado às nacionais.

A fita imunocromatográfica utilizada para detecção rápida de vírus de CymMV, ORSV e infecção mista de CymMV e ORSV pode apresentar de uma a três linhas. Uma linha na fita imunocromatográfica significa que a linha controle está funcionando e que não há incidência de vírus. Duas linhas indicam que além da linha controle, também há outra linha que representa a incidência de um dos vírus, seja CymMV ou ORSV, conforme posição da linha na fita. Três linhas apontam infecção mista na amostra apresentando CymMV e ORSV.

A amostra de *Phalaenopsis hybrid*, inserida nos materiais nacionais apresentava sintomas de lesões cloróticas nas folhas, os quais são descritos como sintomas de CymMV (He et al., 2011). Detectou-se a partir do teste imunocromatográfico, a presença do vírus CymMV, isoladamente representado por duas linhas da tira imunocromatográfica, sendo uma a linha controle e a outra a linha de presença de CymMV (Figura 1) .





**Figura 1.** A) Lesões cloróticas em *Phaleonopsis hybrid* originária do município de Holambra, SP; B) Teste sorológico acusando a presença de CymMV.

O teste imunocromatográfico quando realizado com o macerado de *Oncidium* sp., que apresentava lesões cloróticas, detectou infecção mista de CymMV e ORSV na amostra. O resultado é expresso na fita com a presença de três linhas vermelhas (Figura 2).



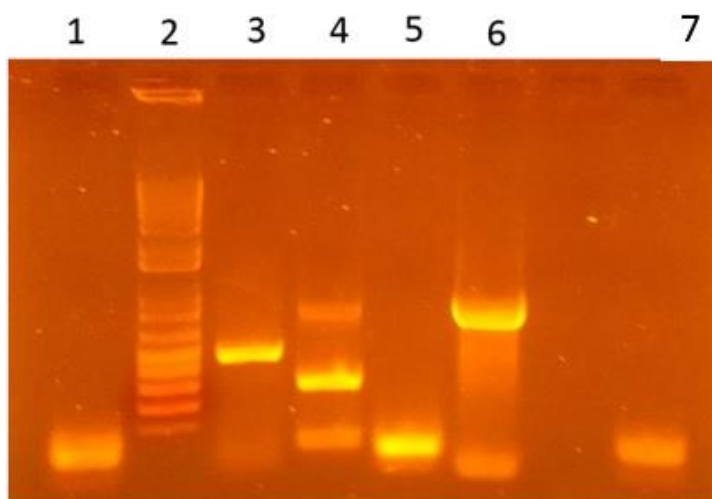
**Figura 2.** A) Visão geral da amostra de *Oncidium* sp. de orquídea proveniente de Atibaia, SP, apresentando lesões cloróticas; B) Teste sorológico indicando infecção mista (CymMV + ORSV).

As amostras de orquídeas importadas foram analisadas e detectou-se em material sintomático presença do vírus CMV. Os sintomas de CMV são mosaicos, cloroses e folhas distorcidas (Kull & Arditti, 2002). Este foi o primeiro relato do vírus CMV em material importado de orquídeas no país (Figura 3).



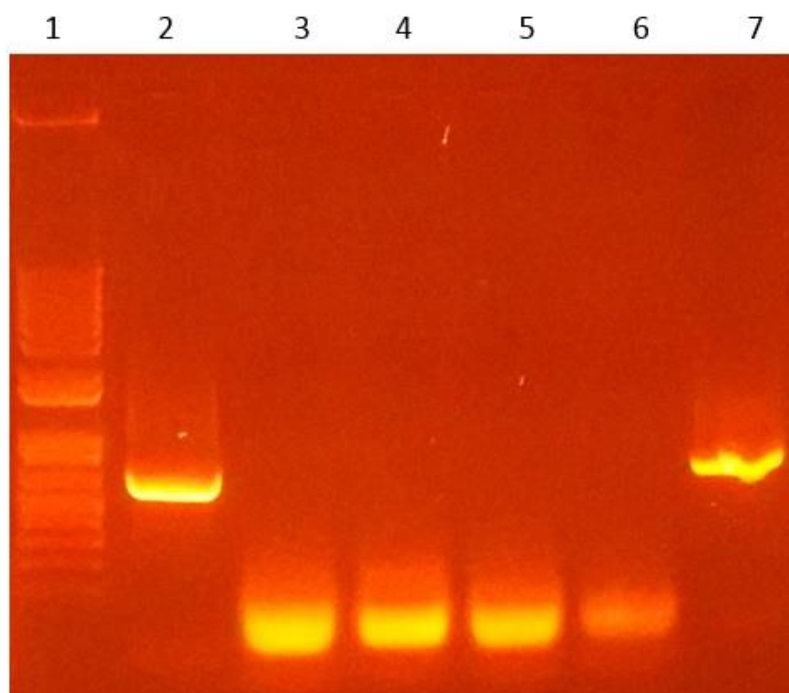
**Figura 3.** Sintomas de distorção foliar em *Phaleonopsis amabilis* de Taiwan e teste imunocromatográfico acusando a presença de CMV.

Os oligonucleotídeos específicos para CMV, CymMV e ORSV foram testados com amostras de *Phaleonopsis amabilis* infectada e sadia. As amostras infectadas são representadas pelas linhas 3, 4 e 6, onde os respectivos vírus e a quantidade de pares de base por fragmento esperado, são: CMV (491-507 pb); CymMV (844-849 pb); ORSV (845-847 pb). As demais linhas 1 e 5 são o controle negativo para estes vírus; linha 2, o marcador molecular 1 kb plus DNA Ladder; e linha 7 representa uma *Phaleonopsis sadia* (Figura 4).



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar. Controle Negativo (1, 5); 1 kb *plus DNA Ladder* (2); *Phalaenopsis amabilis* infectada com: CMV (3), CymMV (4), ORSV (6); *Phalaenopsis amabilis* sadia (7).

Os oligonucleotídeos específicos para o gênero *Potyvirus* foram utilizados nas amostras, produtos de RT-PCR de *Phalaenopsis amabilis*, *Dendrobium nobile* e *Oncidium nobile*, indicadas pelas linhas 3, 4 e 5, respectivamente. O controle positivo de *Potyvirus* contava com um tamanho de fragmento de 700 pb, linha 2. Não houve amplificação do fragmento para as amostras de plantas importadas, acusando ausência de vírus quarentenários em amostras importadas (Figura 5).



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar. 1 kb *plus DNA Ladder* (1); Controle Positivo - *Potyvirus* (2, 7); Amostra foliar plantas importadas de: *Phalaenopsis amabilis* (3), *Dendrobium nobile* (4), *Oncidium nobile* (5); Controle negativo (6).

#### 3.2.4. DISCUSSÃO

A presença de CymMV, ORSV e OFV nas amostras representantes de orquídeas nacionais está de acordo com o mencionado por Alexandre et al. (2010) para o Estado de São Paulo, seja em *Phalaenopsis* ou *Dendrobium*. Além disso, foi possível detectar pela primeira vez na orquídea do gênero *Arundina*, a infecção mista de CymMV e ORSV.

Os resultados obtidos no caso de orquídeas importadas evidenciaram ausência de vírus quarentenários e uma baixa incidência de outros vírus (em especial, o CymMV e o ORSV) sendo pela primeira vez, detectado a presença de CMV em amostras importadas.

Embora, o CMV seja comum no território nacional, a presença do mesmo em material importado deve ser levada em consideração de forma a não vir a prejudicar o agronegócio com possíveis estirpes virais exóticas.

Trata-se, portanto, do primeiro trabalho de levantamento de vírus, no Brasil, a partir de mudas importadas.

### 3.2.5. CONCLUSÃO

Pôde-se detectar nas amostras nacionais os vírus *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Orchid fleck dichorhavirus* e nas amostras importadas, *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus* e *Cucumber mosaic virus*, em infecção simples ou mista. Não houve incidência de vírus quarentenários em nenhuma das amostras, nacionais e importadas.

Verificou-se que 20% das amostras nacionais tem incidência de algum vírus ou infecção mista e em relação às amostras importadas, o valor representa 1,2% das amostras que apresentam algum vírus, evidenciando, portanto, que a incidência de vírus em amostras importadas é menor quando comparado às nacionais.

Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de se fortalecer um programa nacional de indexação de mudas para vírus de forma a reduzir a fonte de inóculo desses vírus no Brasil a fim de não comprometer o agronegócio.

### 3.2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Galleti, S. R. (2010) Vírus detectados em plantas ornamentais no período 2004 a 2008. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 16 (1): 95-100.

Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L. (2012) CymMV e ORSV: Os vírus mais frequentes em orquídeas. Disponível em [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=180](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=180) acessado 08/12/2015.

Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O., Guimarães, L.R.S. (2015) Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

Forzza, RC. et al. (2010). INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Introdução: as angiospermas do Brasil, p. 78-89.

Junqueira, A. H., Peetz, M. S. (2016) Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira. IBRAFLOR – Instituto Brasileiro de Floricultura. Disponível em <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=8> acessado em 15/11/2016.

Kersten, R.A. (2006) Epifitismo vascular na bacia do alto Iguaçu, Paraná. Curitiba. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 218p.

Klein, E. H. S. (2008) Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia. 94 p.

Lima Júnior, J. C., Nakatani, J. K., Monaco Neto, L. C., Lima, L. A. C. V., Kalaki, R. B., Camargo, R. B. (2015) Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil. São Paulo: OCESP.

SECEX/MDIC (Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior) 2014. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>> Acesso em 15/11/2016.

Zettler, F.W., Ko, N.J., Wisler, C.G., Wong, S.M. (1990) Viruses of orchids and their control. *Plant Disease*, 74: 621-626

Zhang, X., XU, J., Wang, J., Wang, N., Kurihara, H., Kitanaka, S., Yao, X. (2007) Bioactive Bibenzyl Derivatives and Fluorenones from *Dendrobium nobile* *Journal of Natural Products* 70 (1):24-28.

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

Foram detectados nas amostras coletadas de Bromeliaceae, o *Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* em *Aechmea nudicaulis* e em *Bromelia antiacantha*.

Pôde-se detectar nas amostras nacionais os vírus *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot virus*, o *Orchid fleck dichorhavirus* e nas amostras importadas, o *Cymbidium mosaic virus*, o *Odontoglossum ringspot virus* e o *Cucumber mosaic virus*, em infecção simples ou mista. Não houve incidência de vírus quarentenários em nenhuma das amostras, nacionais e importadas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, K. (2013) Plano Safra para a Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasil. Disponível em <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=199> acessado em 15/11/2016.

Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L., Rivas, E. B., Galleti, S. R. (2010) Vírus detectados em plantas ornamentais no período 2004 a 2008. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 16 (1): 95-100.

Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L., Ramos, A. F., Harakavar. (2015) Identification and molecular characterization of *Carnation mottle vírus* Brazilian isolates from carnation. *Horticultura Brasileira*, 33:257-260.

Alexandre, M. A. V., Duarte, L. M. L. (2012) CymMV e ORSV: Os vírus mais frequentes em orquídeas. Disponível em [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=180](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=180) acessado 08/12/2015.

Alexandre, M. A. V., Rivas, E. B., Tozetto, A. R. P. Duarte, L. M. L. (2005) An annotated list on the natural occurrence of viroses in ornamental plants in Brazil. Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brazil. 54 p.

Alvarez, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. L. M., Sparovek, G. (2014) Köppen's climate classification map for Brazil Meteorologische Zeitschrift. 22( 6): 711–728.

Anacleto, A., Rejane, R., Negrelle, B. (2013) Produção de bromélias no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, 19 (2):121-136.

Anacleto, A. (2005) Germinação de sementes e desenvolvimento de brotos de *Aechmea nudicaulis* (L) GRISEB (Bromeliaceae): subsídios à produção e extrativismo. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

Andrade, E. V. E., Albertim, K. M., Moura, J. B. (2009) Primeiro registro do uso de Bromeliaceae por *Elachistocleis ovalis* (Schneider, 1799) (Anura: Microhylidae). *Biota Neotropica*, 9 (4):257-259.

Araújo, D. S. D., Oliveira, R. R. (1988) Reserva biológica estadual da praia do sul (Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro): Lista preliminar da flora. *Acta bot. Bras.* 1 (2): 83-94.

Assis, A. M., Faria, R. T., Colombo, L. A., Carvalho, J. F. R. P. (2005) Utilização de substratos à base de coco no cultivo de *Dendrobium nobile* Linl. (Orchidaceae). *Acta Sci. Agronomica*, Maringá, 27 (2):255-260.

Ávila, A. C., Inoue-Nagata, A. K., Costa, H., Boiteux, L. S., Neves, L. O. Q., Prates, R. S., Bertini, L. A. (2004) Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*, Brasileira, 22: 3, 655-658.

Batista, M. F., Marinho, V. L. A. (2001) Vírus e Viróides Transmitidos por Sementes. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 80 p.

Barros, F. de, Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O., Guimarães, L.R.S. (2015) Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

Brasil, 1999. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=260> acessado 04/07/2016.

Brioso, P. S. T. (2016) Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.). Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides (L.VV.VI.). Criada em 2005. Disponível em: <<http://www.fito2009.com/fitop/fitoplavirtaxon.html/>>.

Campoverde, E. V., Palmateer, A. J. (2015) Virus in orchids. Ornamental Plant Pathogens. IFAS Extension - University of Florida. Fact Sheet, n.1

Cogliatti, L., Freitas, A. F. N., Rocha, C. F. D., Sluys, M. V. (2001) Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. Revista Brasileira de Botânica, 24 (1) : 1-9.

Cogni, R., Oliveira, P. S. (2004) Patterns in foraging and nesting ecology in the neotropical ant, *Gnamptogenys moelleri* (Formicidae, Ponerinae). *Insect Soc.*, 51: 123-128.

Colariccio, A., Eiras, M., Chaves, A. L. R., Roggero, P., Chagas, C. M. (2001) Diversidade de tospovirus em olerícolas no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica* 27: 177-182.

Damasceno, A. C. F. (2005) Macro fauna edáfica, regeneração natural de espécies arbóreas, lianas e epífitas em floresta em processo de restauração com diferentes idades no Pontal do Paranapanema. Dissertação de Recursos Florestais. Universidade de São Paulo, 108 p.

Dettke, G. A., Milaneze-Gutierrez, M. A. (2008) Anatomia vegetative de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Balduinia*, 13: 1-14.

Dikova, B., Petrov, N. (2013) First report of *Tomato spotted wilt virus* on a New Host *Leusea carthamoides* in Bulgaria and the World. *The American Phytopathological Society*, 97 (9).

Eiras, M., Chaves, A. L. R., Colariccio, A., Harakava, R., Araujo, J. & Chagas, C. M. (2002) Caracterização do Tomato chlorotic spot vírus isolado de jiló no vale do Paraíba, Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 285-291.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em <http://www.fao.org/brasil/pt/> acessado em 02/12/2016.

Fernandes, M. F., Queiroz, L. P. (2015) Floristic surveys of Restinga Forests in Southern Bahia, Brazil, reveal the effects of geography on community composition. *Rodriguésia*, 66 (1).

Filippon, S., Fernandes, C. D., Ferreira, D. K., Silva, D. L., Altrak, G., Duarte, A. S., Reis, M. S. (2012) *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae): Caracterização demográfica e potencial de manejo em uma população no planalto norte catarinense. *Biodiversidade Brasileira*, 2 (2): 83-91.

Fontoura, T., Costa, A., Wendt, T. (1991) Preliminary checklist of the Bromeliaceae of Rio de Janeiro State, Brazil. *Selbyana*, 12: 5-45.

Forzza, RC., org., et al. (2010). INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de

Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Introdução: as angiospermas do Brasil, p. 78-89.

Forzza, R. C., Costa, A., Siqueira Filho, J. A., Martinelli, G., Monteiro, R. F., Santos-Silva, F., Saraiva, D. P., Paixão-Souza, B., Louzada, R.B., Versieux, L. (2015). Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>> acessado em 16/11/2016.

Francki, R. I. B. (1966) Isolation, purification, and some properties of two viroses from cultivated *cymbidium* orchids, *Aus. J. Biol. Sci.*, 19: 555-564.

Gomes, J. M.L., Silva, N. N. (2013) Bromeliaceae das restingas do Estado do Espírito Santo, Brasil. *Natureza on line* 11 (2): 79-89.

Gomes, L. A. C., Maas, A. C. S., Pedrozo, A. R., Araújo, R. M., Peracchi, A. L. (2016) Morcegos em área de restinga de unidade de conservação no Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Neotropical Biology and Conservation* 11(1): 31-37.

Grant, J.R. & Zijlstra, G. (1998) An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae. *Selbyana* 19 (1): 91-121.

He, Z., Jiang, D., Liu, A., Sang, L., Li, W., Li, S. (2011) The complete sequence of *Cymbidium mosaic virus* from *Vanilla fragans* in Hainan, China. *Virus Genes*, 42:440-443.

Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23 (3): 504-11.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1612&z=t&o=11&i=P>. Acesso em 02/12/2016.

IBRAFLOR Instituto Brasileiro de Floricultura. (2016) Release Imprensa. Disponível em <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=184> acessado em 15/11/2016.

Inouye, N. (1969) Cucumber mosaic vírus isolated from *Dendrobium*. *Agric Res* 53:49-60.

Jensen, A. S. C., Nascimento, F. C., Jensen, R. C., Rotondaro, E. E., Saito, R. T. (2011) Bromélia: promoção da biodiversidade x riscos à saúde ambiental. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, 19: 38-45.

Jocque, M., Kernahan, A., Nobes, A., Willians, C & Field, R. (2010). How effective are non-destructive sampling methods to assess aquatic invertebrate diversity in bromeliads? *Hydrobiologia*, 649: 293-300.

Junqueira, A. H., Peetz, M. S. (2016) Análise conjuntural do comércio exterior da floricultura brasileira. IBRAFLOR – Instituto Brasileiro de Floricultura. Disponível em <http://www.ibraflor.com/publicacoes/vw.php?cod=8> acessado em 15/11/2016.

Kersten, R.A. (2006) Epifitismo vascular na bacia do alto Iguaçu, Paraná. Curitiba. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 218p.

Kitajima, E. W. (2013) Lista comentada dos vírus de plantas descritos no Brasil (1911-2013). Departamento Fitopatologia e Nematologia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Disponível em [http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista\\_comentada\\_2011\\_2013.pdf](http://www.sbv.org.br/site/downs/virus/Lista_comentada_2011_2013.pdf) acessado em 24/05/2016.

Klein, E. H. S., Brioso, P. S. T. (2009) Ocorrência de CyMV em orquídeas do gênero *Arundina* do Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ornamental*, 14 (2): 221-223.

Klein, E. H. S. (2008) Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação *in vitro* de orquídeas no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia. 94 p.

Kull, T., Arditti, J. (2002) *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VIII, 505-546. *Kluwer Academic Publishers*.

Labrín, N., Rangel, E., Schmidt, A., Centeno, F. (2005) Virus del *Cymbidium* y de la Mancha Anillada del *Odontoglossum* Identificado en um Híbrido de *Cattleya* proveniente del Municipio Revenga, Estado Aragua, Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23:1.

Lemos, F. R., Quirino, Z. G. M. (2008) Fenologia e biologia floral de *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) na caatinga paraibana, *Rodriguésia*, 59 (4) : 835-844.

Lima, T. T., Wanderley, M. G. L. (2007) Diversidade da Serra do Lopo Extrema - Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5: 1146-1148.

Lima, M. F. (2009) Detecção e controle de viroses em videira. Circular Técnica. Embrapa. Petrolina, Pernambuco.

Lima Júnior, J. C., Nakatani, J. K., Monaco Neto, L. C., Lima, L. A. C. V., Kalaki, R. B., Camargo, R. B. (2015) Mapeamento e quantificação da cadeia de flores e plantas ornamentais do Brasil. São Paulo: OCESP.

Lirio, V. S., Silva, C. A. B., Reis, B. S., Aguiar, D. R. D., Stringheta, A. C. (2003) Uma análise do setor de distribuição de flores e plantas ornamentais no estado do Rio de Janeiro. *Revista de Economia e agronegócio*, 1(2): 257-282.

Machado, C. G., Semir, J. (2006) Fenologia da floração e biologia floral de bromeliáceas ornitófilas de uma área da Mata Atlântica do sudeste brasileiro. *Revista Brasileira Botânica*, 29 (1): 163-174.

Mageski, M., Silva-Soares, T., Ferreira, R. B. (2014) Hábito bromelígena de *Dendropsophus haddadi* (Anura: Hylidae) em ambiente de Mata Atlântica no sudeste do Brasil. *Boletim Mus. Biol. Mello Leitão*, 34: 97-100.

Mantovani, A., Venda, A. K. L., Forzza, R. C. (2012) EvoluLeaf anatomy of *Quesnelia* (Bromeliaceae): implications for the systematics of core bromelioids. *Plant Systematics and Evolution*, 298:787-800.

Mantuano, D. G. (2008) Crescimento clonal em *Neoregelia cruenta* na Restinga de Jurubatiba: estrutura populacional, plasticidade morfo-anatômica integração fisiológica. Tese de doutorado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Escola Nacional de Botânica Tropical.

Maritan, A. C., Gaspar, J. O., Camargo, L. E. A. (2004) Identification and characterization of a potyvirus isolated from *Zinnia elegans*. *Fitopatologia brasileira*, 29:1.

Martinelli, G., Vieira, C.M., Gonzalez, M., Leitman, P., Piratininga, A., Costa, A.F. & Forzza, R.C. (2008) Bromeliaceae da mata atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia*, 59: 209-258.

Martinelli, G. (1994) Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. PhD thesis. University of St. Andrews. St. Andrews, Scotland, 310 p.

Matos, A. P., Reinhardt, D. H., Sanches, N. F., Souza, L. F. S., Teixeira, F. A., Elias Júnior, J. (2009) Produção de mudas sadias de abacaxi. Circular Técnica. Embrapa. Cruz das Almas - BA.



Matos, A. P. de (Org.). (2000) Abacaxi: fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura: Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 77p.

Metzger, J. P., Martensen, A. C., Dixo, M., Bernaci, L. C., Ribeiro, M. C., Teixeira, A. M. G., Pardini, R. (2009) Time-lag in biological responses to landscape changes in a highly dynamic Atlantic forest region. *Biological Conservation*, 142: 1166-1177

Meissner Filho, P. E., Sanches, N. F. (2010) Vírus da Murcha do Abacaxi. TodaFruta.

Mestre, L.A.M., Aranha, J.M.R. & Esper, M.L.P. (2001) Macroinvertebrate fauna associated to the bromeliad *Vriesea inflata* of the atlantic forest (Paraná State, Southern Brazil). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44: 89-94.

Monteiro, R. F., Forzza, R. C. (2008) A família Bromeliaceae no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Bol. Bot. Univ. São Paulo*, 26 (1): 7-33.

Monteiro, R. C., Mound, L. A., Zucchi, R. A. (2001) Sistemática, morfologia e fisiologia. Espécies de *Frankliniella* (Thysanoptera: Thripidae) de Importância Agrícola no Brasil. *Neotropical Entomology* (1): 65-72.

Moraes, L. A., Pavan, M. A., Sakate, R. K. (2015) Preliminary survey and study of the CymMV variability in orchids of São Paulo state, Brazil. *Acta Horticulture*. p. 55-62.

Moraes, L. A. (2013) Incidência e caracterização dos vírus infectando orquídeas no estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.

Moraes, L. M., Cavalcante, L. C. D., Faria, R. T. (2002) Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. *Acta Scientiarum*, Maringá, 24 (5): 1397-1400.

Moreira, B. A., Wanderley, M. G. L., Barros, M. A. V. C. (2006) Bromélias: Importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. Pós-graduação do Instituto de Botânica de São Paulo. Curso de Capacitação de Monitores - Estágio de Docência.

Moreira, S. R., Eiras, M., Chaves, A. L. R., Galleti, S. R. & Colariccio, A. (2003) Caracterização de uma nova estirpe do Tomato mosaic virus isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira*, 28:602-607.

Nadkarni, N. M., Matelson, T. J. (1989) Bird use of epiphyte resources in neotropical trees. *The condor*, 91: 891-907.

Natal, D., Urbinatti, P. R., Taípe-Lagos, C. B., Cereti-Junior, W., Diederichsen, A. T. B., Souza, R. G., Souza, R. P. (1997) Encontro de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) em Bromeliaceae na periferia de São Paulo, SP, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 31 (5): 517-518.

Oliveira, P. S., Camargo, R. X., Fourcassié, V. (2011) Nesting patterns, ecological correlates of polygyny and social organization in the neotropical arboreal ant *Odontomachus hastatus* (Formicidae, Ponerinae). *Insect Soc.* 58:207-217.

Pansarin, E. R., Pansarin, L. M. (2008) A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*, 59 (1): 99-111.

Paula, C. C., Silva, H. M. P. (2004) Cultivo prático de bromélias. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.

Pedroso-de-Moraes, C., Souza-Leal, T., Panosso, A. R., Souza, M. C. (2012) Efeitos da escarificação e da concentração de nitrogênio sobre a germinação e o

desenvolvimento in vitro de *Vanilla planifolia* Jack ex Andr. (Orchidaceae: Vanilloideae), *Acta Botanica Brasilica*, 26 (3): 714-719

Peixoto, O. L. (1995) Associação de anuros a bromeliáceas na mata Atlântica. *Revista Univ. Rural, Sér. Ciênc.da Vida, Seropédica*, 17(2):75-83.

Pereira, M. A. B., Siebeneichler, S. C., Lorençoni, R., Adorian, G. C., Silva, J. C., Garcia, R. B. M., Pequeno, D. N. L., Souza, C. M., Brito, R. F. F. (2009) Qualidade do fruto de abacaxi comercializado pela COOPERFRUTO- Miranorte - TO. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal -SP, 31 (4): 1048-1053.

Pinheiro, F., Borghetti, F. (2003) Light and temperature requirements for germination of seeds of *Aechmea nudicaulis* (L.) griesebach and *streptocalyx floribundus* (Martius ex schultes F.) Mez (Bromeliaceae). *Acta Bot. bras.*, 17 (1): 27-35.

Reis, C. A. M., Brondani, G. E., Almeida, M. De. (2011) Biologia floral, reprodutiva e propagação vegetativa de baunilha, *Scientia Agraria Paranaensis*, 10 (1): 69-82

Reitz, R. (1983) Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. Flora ilustrada Catarinense. 559 p.

Romero, G.Q., Nomura, F., Gonçalves, A.Z., Dias, N.Y.N., Mercier, H., Conforto, E.C. & Rossa-Feres, D.C. (2010) Nitrogen fluxes from treefrogs to tank epiphytic bromeliads: an isotopic and physiological approach. *Oecologia*, 162: 941-949.

Santos, K. C., Santos, A. F., Andrade, E. C. (2010) Incidência do Pineapple Mealybug wilt Associated Vírus, PMWAV no Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi in vitro da Embrapa Mandioca e Fruticultura. *Jornal Científica - Embrapa Mandioca e Fruticultura*.

Sazima, I., Buzato, S., Sazima, M. (1996) Na assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Bot. Acta*, 109: 149-160.

SECEX/MDIC (Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior) 2014. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>> Acesso em 15/11/2016.

Skelton, A., Daly, M., Nixon, T., Harju, V., Mumford, R. A. (2006) First record of Bean yellow mosaic virus infecting a member of the orchid genus *Dactylorhiza*, *New Disease Reports*, 13, 47.

Thomson, A. D., Smirk, B. A. (1967) An usual strain of tobacco mosaic virus from orchids, *New Zealand Journal of Botany*, 5 (2): 197-202.

Varassin, I. G., Sazima, M. (2000) Recursos de Bromeliaceae utilizados por beija-flores e borboletas em Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão*, 11 (12): 57-70.

PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA. Disponível em <http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que-fazemos/visitacao/unidades-abertas-a-visitacao/2593-parque-nacional-da-restinga-de-jurubatiba.html> acessado em [21/10/2015](http://www.icmbio.gov.br/portal/o-que-fazemos/visitacao/unidades-abertas-a-visitacao/2593-parque-nacional-da-restinga-de-jurubatiba.html).

Rivas, E. B. (2006) Viroses de plantas ornamentais e medidas de controle. Instituto Biológico, disponível em <http://www.biologico.sp.gov.br/rifib/XIVRifib/rivas.PDF> acessado em 07/01/2016

Rocha, C. F. D., COGLIATTI- CARVALHO, L., NUNES-FREITAS, A. F., ROCHA-PÊSSOA, T. C., DIAS, A. S., ARIANI, C. V., MORGADO, L. V. Conservando uma larga porção da diversidade biológica através da conservação de Bromeliaceae, *Vidalia* 2 (1):52-72.

Sazima, I., Vogel, S., Sazima, M. (1989) Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Pl. Syst. Evol.*, 168: 167-179.

Tabarelli, M., Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. M., Bedê, L. C. (2005) Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*. Belo Horizonte, 1 (1). Disponível em <http://www.bioatlantica.org/> acessado em 12/02/2017.

Tamaki, V., Paula, S. M., Nievola, C. C., Kanashiro, S. (2011) Soluções nutritivas alternativas para o cultivo de bromélias ornamentais. *O mundo da Saúde*, São Paulo, 35(1): 91-97.

Zhang, X., XU, J., Wang, J., Wang, N., Kurihara, H., Kitanaka, S., Yao, X. (2007) Bioactive Bibenzyl Derivaties and Fluorenones from *Dendrobium nobile* *Journal of Natural Products*, 70 (1):24-28.

Zheng, Y. X., Chen, C. C., Jan, F. J. (2011) First Report of *Carnation mottle virus* in *Phalaenopsis* Orchids. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, *Plant Disease*, 95: 3.

Zettler, L.W., Stewart, S.L., Bowles, M.L., Jacobs, K.A. (2001) Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *Am. Midl. Nat.*, 145:168-175.

Zeng, Y., Chen, C., Yang, C., Yeh, S., Jan, F. (2008) Identification and characterization of tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. *Eur. J. Plant Pathol.*, 120: 199-209.

Wang, Y. Y., Beck, D. L., Gardner, R. C., Pearson, M. N. (1993) Nucleotide sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is strain of watermelon mosaic virus II. *Archives of Virology*, 129:93-103.

Wong, S. M., Chng, C. G., Lee, Y. H., Zettler, F. W. (1994) Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Protection*, 13(3): 235-239.

## ANEXOS

### 5.1 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em espécies de Bromeliaceae

#### KIT BromeDNAVirus

##### Uso pretendido

O *Kit BromeDNAVirus*, produzido para fins de diagnóstico de vírus (contendo DNA) citados em espécies de Bromeliaceae, foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular destes vírus a fim de impedir sua disseminação no país.

Os vírus (contendo DNA) de incidência em espécies de Bromeliaceae se distribuem no gênero *Badnavirus* [*Pineapple bacilliform CO vírus* (PBCOV), *Pineapple bacilliform ER vírus* (PBERV)].

O *Kit BromeDNAVirus* oferece através do Teste de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), um método diagnóstico sensível de detecção das espécies e/ou gêneros virais acima referenciados sendo que os iniciadores (*primers*) utilizados no Teste de PCR baseiam-se em regiões do genoma viral conservadas e podem detectar estirpes virais ainda não identificadas no país.

## Armazenamento

O *Kit BromeDNAVirus* deve ser armazenado a -10 °C

A mistura de iniciadores (*primers*) liofilizados após reconstituído em 200 µl de água (destilada, deionizada e autoclavada) livre de *DNase* é estável durante um ano quando armazenado a -10 °C.

O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores (*primers*) reconstituídos não está documentado.

## Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso;
- Usar sempre luvas de látex descartáveis;
- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra;
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *DNase* durante o procedimento;
- O *Kit BromeDNAVirus* foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para se obter êxito nos resultados.

## Reagentes

- Agarose Ultra Pura;
- Água Destilada, Deionizada e Esterilizada;
- Álcool Etílico 95%;
- Brometo de Etídio (10 mg/ml);
- Controle Positivo (DNA amplificado de *Badnavirus*);
- Gelo;
- *Kit Redextract-N-AMP™ Plant PCR Kit* (Sigma Aldrich Com.);
- Marcador de Massa Molecular (1kb DNA *Ladder*);
- Nitrogênio Líquido;
- *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil);



- Solução tampão TAE 10X.

### **Materiais e Equipamentos**

- Agitador Magnético (*Vortex*);
- Almofariz e Pistilo;
- Autoclave;
- Balança Analítica;
- Bloco Térmico;
- Caixa de Isopor;
- Caneta *Pilot*;
- Cuba de Eletroforese;
- Deionizador de Água;
- Destilador de Água;
- Freezer;
- Geladeira;
- Jaleco;
- Luvas de Látex;
- Máquina de Gelo;
- Máquina Fotográfica;
- Microcentrifuga;
- Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Papel Alumínio;
- Papel Toalha;
- Ponteiros para Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Tesoura;
- Termociclador;
- Transiluminador de Luz Ultravioleta;
- Tubos de Polipropileno de 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml.

### **Procedimento Detalhado**

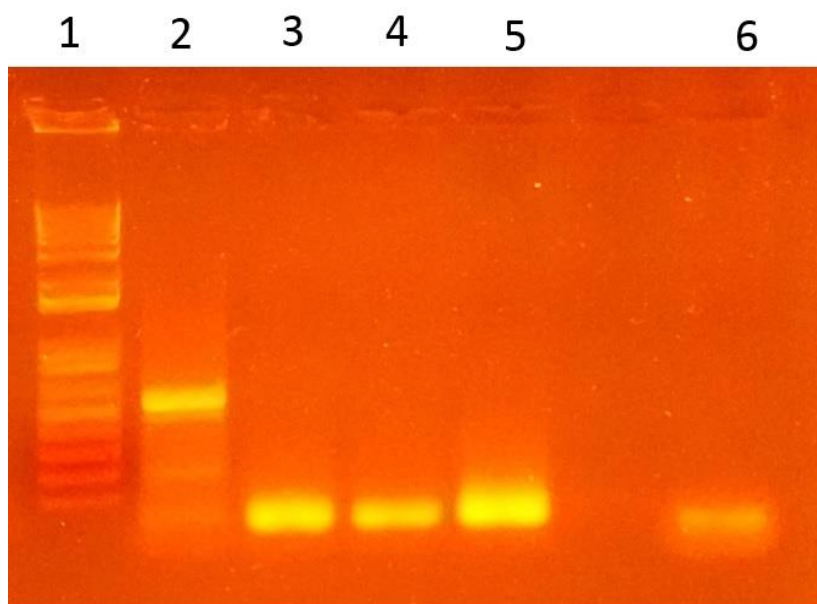
Para executar este procedimento é indispensável o uso de luvas de látex descartáveis e Jaleco.

- 1 – Amostras de Bromeliaceae são obtidas e pesadas, em Balança Analítica, nas seguintes proporções: 0,1 g para amostras tenras (MUDAS, PLANTAS, PLÂNTULAS, FOLHAS) ou 0,03 g de amostras espessas (RAIZ) sendo depositadas em almofarizes;
- 2 - Adicionar nitrogênio líquido e pulverizar a amostra com o auxílio do pistilo;
- 3 - O macerado (na forma de pó) transferido para tubo de polipropileno (EPPENDORFF) de 1,5 ml;
- 4 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 400 µl de tampão AP1 ao macerado;
- 5 – Vortex por um minuto;
- 6 – Colocar o tubo a 65 °C por 10 minutos em Bloco Térmico, fazendo a inversão do tubo por duas a três vezes;
- 7 – Adicionar, com a Micropipeta (P200), 130 µl de tampão AP2;
- 8 – Misturar;
- 9 - Incubar por cinco minutos no gelo;
- 10 – Centrifugar, em Microcentrifuga, a 13500 x g (15000 rpm) por cinco minutos e meio;
- 11 – Coletar, com a Micropipeta (P1000), sobrenadante e aplicar na mini-coluna Lilás (QIASHREDDER) colocada em tubo de 2 ml;
- 12- Centrifugar, em Microcentrifuga, a 13500 x g por dois minutos e meio;
- 14 - Transferir, com a Micropipeta (P1000), 450 µl do filtrado para tubo de polipropileno (EPPENDORFF) de 1,5 ml. Descartar a minicoluna Lilás;
- 15 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 1,5 volumes (675 µl) de tampão AP3/E (contendo Etanol) ao filtrado. Misturar pela pipetagem;
- 16 – Pipetar, com a Micropipeta (P1000), 650 µl da mistura na minicoluna branca colocada em tubo de dois ml (Tubo de Coleta);
- 17 – Centrifugar, em Microcentrifuga, a 5900 x g por um minuto;
- 18 – Descartar o filtrado e reusar o tubo de coleta;
- 19 – Pipetar, com a Micropipeta (P200), o resto da amostra do passo 16 e repetir o passo 17 utilizando a mesma minicoluna branca colocada em tubo de dois ml (Tubo de Coleta);
- 20 - Centrifugar, em Microcentrifuga, a 5900 x g por um minuto;

- 21 - Descartar o filtrado e o Tubo de Coleta;
- 22 – Depositar a minicoluna branca em tubo de dois ml
- 23 - Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão AW (contendo Etanol);
- 25 - Centrifugar, em Microcentrifuga, a 5900 x g por um minuto;
- 26 - Descartar o filtrado e reusar o Tubo de Coleta;
- 27 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão AW (contendo Etanol) a minicoluna branca colocada em tubo de dois ml (Tubo de Coleta);
- 28 - Centrifugar, em Microcentrifuga, a 13500 x g por dois minutos e meio;
- 29 - Descartar o filtrado e o Tubo de Coleta;
- 30 – Transferir a minicoluna branca para tubo de polipropileno de 1,5 ml e pipetar, com a Micropipeta (P200), 50 µl de tampão AE;
- 31 – Incubar por cinco minutos a temperatura ambiente (15 – 25 °C);
- 32 – Centrifugar, em Microcentrifuga, a 5900 x g por um minuto para eluir;
- 33 – Descartar a coluna, fechar tubo de polipropileno contendo o filtrado. **DNA extraído**;
- 34 – Identificar o tubo de polipropileno com Canela *Pillot* e manter no Freezer (-10 °C) até posterior uso, no Teste de PCR;
- 35 - Retirar do tubo de polipropileno, com o auxílio de Micropipeta (P20), 4 µl do DNA extraído que será utilizado no Teste de PCR, a partir do uso dos produtos constantes no *Redextract-N-AMP™ Plant PCR Kit* segundo instruções do fabricante e, tendo os *primers* específicos e condições de amplificação no Termociclador para o agente alvo registrado no formulário **FOR-PCR.VV**;
- 36 - Após a amplificação no Termociclador das amostras de DNA procede-se a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X, contendo brometo de etídio, a 88 volts por 25 - 30 minutos, e posterior visualização dos *amplicons* (fragmentos genômicos amplificados) em Transiluminador de Luz Ultravioleta;
- 37 - *Registrar o resultado no formulário FOR-PCR.VV associado ao **KIT BromeDNAVirus***;
- 38 - Guardar todo o material utilizado e limpar o local de trabalho.

## RESULTADOS

- O teste pode detectar isolados das espécies virais citadas que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as sequências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*, **EMBL** - *European Molecular Biology Laboratory*).
- Controles Positivos devem ter a massa molecular de seus respectivos *amplicons* indicada no **FOR-PCR.VV** e facilmente detectável após a eletroforese. A faixa de massa molecular dos *amplicons* indicada no formulário tem relação com a origem do isolado viral amplificado.
- Controle Negativo (amostra sem a presença do DNA extraído) não deve apresentar qualquer amplificação.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de PCR a partir de DNA total de Bromélia. 1 kb DNA Ladder (1); Controle Positivo – *Badnavirus* oriundo de bananeira (*Musa* spp.) (2); amostra foliar de *Neoregelia cruenta* (3), *Aechmea nudicaulis* (4), *Bromelia antiacantha* (5), Abacaxizeiro (*Ananas comusus*) (6).

## Limitações

O que se segue é uma descrição de fatores que podem limitar o desempenho do teste ou interferir com os resultados de teste adequados.

- Os iniciadores (*primers*) liofilizados são estáveis durante um ano a partir da data de sua confecção, quando armazenados a -10 °C.

- Recomenda-se a utilização da mistura de iniciadores (*primers*) reconstituída em um ensaio. Se forem realizados ensaios subsequentes, a mistura de iniciadores deve ser aliquoteada e armazenada a -10 °C. O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores reconstituídos não está documentado.

- O sucesso do Teste de PCR depende da qualidade do DNA.

## FOR-PCR.VV – 01/00

1 - IDENTIFICAÇÃO		
<b>Nome do Ensaio</b> Amplificação de fragmento genômico de espécies de <i>Badnavirus</i> a partir de espécies de Bromeliaceae		
<b>AMOSTRA</b>		
<b>Número do Registro:</b> Material - 1. Folhas, 2. Mudas, 3. Mudas (plantas) <i>in vitro</i> , 4. Plantas, 5. Plântulas, 6. Raiz		
Tipo - DNA (x) – Material a ser analisado ( ) - Vírus		
<b>Data</b>	<b>Solicitação</b>	
<b>Responsável pela Reação de RT-PCR</b>	Número do Teste 01	<b>Número</b>
		<b>Descrição das Amostras</b>
		1
		2
		3
		4
		5
		6
		7
8		

2 - COMPONENTES DA REAÇÃO		
Componentes	Volume	Quantidade de Amostra para o Gel
1. Água destilada, deionizada e autoclavada	04 µl	16 µl
2. REDEExtract-N-Amp PCR reaction mix	10 µl	
3. Primer BadnaFP	01 µl	
4. Primer BadnaRP	01 µl	
5. DNA extraído com DNeasy Plant Mini kit	04 µl	
<b>Volume Total</b>	20 µl	

3 - CICLO UTILIZADO		
<b>Termociclador: PTC 200 (MJ Research)</b>		
94 °C/ 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C/ 30 segundos, 50 °C/ 30 segundos, 72 °C/ 1 minuto, 72 °C por três minutos; 4 °C por cinco minutos.		
<b>Tempo Total: 2h10'</b>		
<b>Distribuição no Gel (esquerda para a direita):</b>	<b>Eletroforese:</b>	<b>Título da Fotografia do Gel:</b>
<b>Amostra - 4, 5, 6, 7, 8</b>	<b>Tampão: TAE 1X</b>	Agarose - 1,2% com brometo
<b>Resultado</b>	<b>Voltagem (volts): 88</b>	<b>Fragmento -</b>
Negativo ( ) -	<b>Tempo (minutos): 25-30</b>	<b>Fotografia:</b>
Positivo ( ) -		<ul style="list-style-type: none"> <li>• não tirada ( )</li> <li>• tirada ( )</li> </ul>

4 – OBSERVAÇÃO
- Extração do DNA total com <i>DNeasy Plant Mini Kit</i> (QIAGEN BRASIL) e Teste de PCR com <i>Redextract-N-AMP™ Plant PCR Kit</i> (Sigma)
<b>Primers: BadnaFP</b> (5' – ATGCCITTYGGIITIAARAAYGCICC- 3') e <b>Badna RP</b> (5' – CCAYTTRCAIACISICCCCAICC - 3') - fragmento esperado – 579 pb

Local	Data	Assinatura do Responsável pelo Ensaio

## 5.2 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em espécies de Bromeliaceae

### KIT BromeRNAVirus

#### Uso pretendido

O *Kit BromeRNAVirus* produzido para fins de diagnóstico de vírus (contendo RNA) citados em espécies de Bromeliaceae foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular destes vírus a fim de impedir sua disseminação no país.

Os vírus (contendo RNA) de incidência em espécies de Bromeliaceae se distribuem nos gêneros *Ampelovirus* [*Pineapple mealybug wilt-associated virus 1* (PMWaV-1), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 2* (PMWaV-2), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 3* (PMWaV-3), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 4* (PMWaV-4), *Pineapple mealybug wilt-associated virus 5* (PMWaV-5)], *Tospovirus* [*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)] e um possível *Nucleorhabdovirus* [(*Pineapple chlorotic leaf streak virus* (PCLSV)],

O *Kit BromeRNAVirus* oferece através do Teste de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), um método diagnóstico sensível de detecção das espécies e/ou gêneros virais acima referenciados sendo que os iniciadores (*primers*) utilizados no Teste de RT-PCR baseiam-se em regiões do genoma viral conservadas e podem detectar estirpes virais ainda não identificadas no país.

#### Armazenamento

O *Kit BromeRNAVirus* deve ser armazenado a -10 °C.

A mistura de iniciadores (*primers*) liofilizados reconstituído em 200 µl de água (destilada, deionizada e autoclavada), livre de *RNAse*, é estável durante um ano quando armazenado a -10 °C.

O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores (*primers*) reconstituídos não está documentado.

## Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso;
- Usar sempre luvas de látex descartáveis;
- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra;
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *RNase* durante o procedimento;
- O *Kit BromeRNAVirus* foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para se obter êxito nos resultados.

## Reagentes

- Agarose Ultra Pura;
- Água Destilada, Deionizada e Esterilizada;
- Álcool Etílico 95%;
- Brometo de Etídio (10 mg/ml);
- Controle Positivo (DNA amplificado de PMWaV-1);
- Dietil Pirocarbonato de Sódio (DEPC);
- Gelo;
- *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Thermo Fischer);
- Marcador de Massa Molecular (1kb DNA Ladder);
- Nitrogênio Líquido;
- *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil);
- Solução tampão TAE 10X.

## Materiais e Equipamentos

- Agitador Magnético (*Vortex*);
- Almofariz e Pistilo;



- Autoclave;
- Balança Analítica;
- Caixa de Isopor;
- Caneta *Pillot*;
- Capela de Exaustão;
- Cuba de Eletroforese;
- Deionizador de Água;
- Destilador de Água;
- Freezer;
- Geladeira;
- Jaleco;
- Luvas de Látex;
- Máquina de Gelo;
- Máquina Fotográfica;
- Microcentrifuga;
- Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Papel Alumínio;
- Papel Toalha;
- Ponteiros para Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Tesoura;
- Termociclador;
- Transiluminador de Luz Ultravioleta;
- Tubos de Polipropileno de 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml.

### **Procedimento Detalhado**

Para executar este procedimento é indispensável o uso de luvas de látex descartáveis e Jaleco.

1 – Amostras de Bromeliaceae são obtidas e pesadas, em Balança Analítica, nas seguintes proporções: 0,1 g para amostras tenras (MUDAS, PLANTAS,

PLÂNTULAS, FOLHAS) ou 0,03 g de amostras espessas (RAIZ) sendo depositadas em almofarizes;

2 - Adicionar nitrogênio líquido e pulverizar a amostra com o auxílio do pistilo. Adicionar, com o auxílio de micropipeta (P1000), 450 µl de tampão RLT (acrescido de 4,5 µl de *Beta*-mercaptoetanol com a micropipeta P20) à amostra pulverizada. Misturar com o pistilo;

3 - Transferir, com o auxílio do pistilo, a suspensão para tubo de polipropileno de 1,5 ml. Fechar o tubo, misturar o conteúdo pela agitação vigorosa em *Vortex* por 30 segundos;

4 - Abrir o tubo, transferir o lisado para coluna lilás (*QIAshredder*) do *kit*, colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Fechar o tubo de polipropileno;

5 - Centrifugar a 13500 x g (15000 rpm) por 2 minutos em Microcentrifuga. Descartar coluna, transferir o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml com o auxílio de Micropipeta (P1000);

6 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 0,5 volumes de etanol (ao redor de 250 µl) 96% gelado, misturar gentilmente pela inversão do tubo;

7 - Transferir 650 µl, com a Micropipeta (P1000), para coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;

8 - Se necessário, repetir o passo 7 com o volume excedente aos 650 µl, utilizando a Micropipeta (P200);

9 - Adicionar 700 µl de tampão RW1 a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;

10 - Reusar o tubo de polipropileno com a coluna rosa;

11 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE à coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml e centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;

12 - Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 2 minutos. Opcional - Transferir a coluna rosa para tubo de polipropileno (*Collection Tube*) de 2 ml e centrifugar a 13500 x g por um minuto para secar a membrana;

13 – Transferir a coluna rosa para tubo de polipropileno de 1,5 ml, adicionar, com a Micropipeta (P200), 50 µl de água (destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada) na coluna. Centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 1 minuto;

14 – Descartar a coluna, fechar o tubo de polipropileno contendo o filtrado. **RNA extraído**;

15 – Identificar o tubo de polipropileno com Canela *Pillot* e manter no Freezer (-10 °C) até posterior uso, no Teste de RT-PCR;

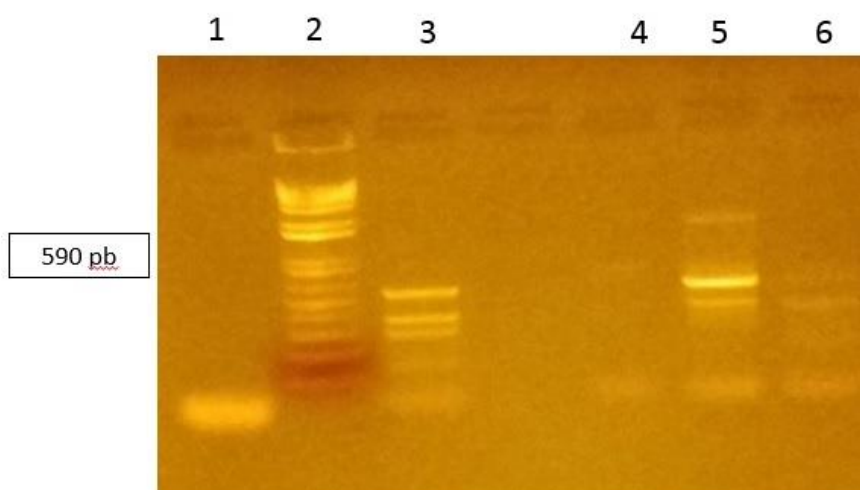
16 – Antes do Teste de RT-PCR, retira-se o tubo de polipropileno identificado do Freezer, coloca-se em caixa de isopor com gelo e, após descongelamento, com o auxílio de Micropipeta (P20) retira-se 4 µl do RNA extraído que será utilizado no Teste de RT-PCR, a partir do uso dos produtos constantes no *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*, os iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie viral e as condições de amplificação do genoma viral assinaladas no Termociclador, conforme registrado no **FOR-RT-PCR.VV** (acompanha o *Kit*);

17 - Após a amplificação no Termociclador das amostras de RNA procede-se a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X, contendo brometo de etídio, a 88 volts por 25 - 30 minutos, e posterior visualização dos *amplicons* (fragmentos genômicos amplificados) em Transiluminador de Luz Ultravioleta;

18 - Registra-se o resultado no formulário **FOR-RT-PCR.VV** associado ao **KIT BromeRNAVirus**.

## RESULTADOS

- O teste pode detectar isolados das espécies virais citadas que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as sequências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*).
- Controles Positivos devem ter a massa molecular de seus respectivos *amplicons* indicada no **FOR-RT-PCR.VV** e facilmente detectável após a eletroforese. A faixa de massa molecular dos *amplicons* indicada no formulário tem relação com a origem do isolado viral amplificado.
- Controle Negativo (amostra sem a presença do RNA extraído) não deve apresentar qualquer amplificação.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar: Controle Negativo (1); 1 kb *plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) (2); Controle Positivo – PMWaV-1 oriundo de folhas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) (3); *Neoregelia cruenta* (4), *Aechmea nudicaulis* (5), *Bromelia antiacantha* (6)

## Limitações

O que se segue é uma descrição de fatores que podem limitar o desempenho do teste ou interferir com os resultados de teste adequados.

- Os iniciadores (*primers*) liofilizados são estáveis durante 1 ano a partir da data de sua confecção, quando armazenados a -10 °C.
- Recomenda-se a utilização da mistura de iniciadores (*primers*) reconstituída em um ensaio. Se forem realizados ensaios subsequentes, a mistura de iniciadores deve ser aliquoteada e armazenada a -10 °C. O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores reconstituídos não está documentado.
- O sucesso do Teste de RT-PCR depende da qualidade do RNA.

## Kit BromeRNA Virus

FOR-RT-PCR.VV – 01/00

1 - IDENTIFICAÇÃO																				
<b>Nome do Ensaio</b> Amplificação de fragmento genômico de espécies de <i>Ampelovirus</i> e/ou <i>Tospovirus</i> a partir de espécies de Bromeliaceae																				
<b>AMOSTRA</b>																				
<b>Número do Registro:</b>  Material - 1. Folhas, 2. Mudanças, 3. Mudanças (plantas) <i>in vitro</i> , 4. Plantas, 5. Plântulas, 6. Raiz  Tipo - RNA (x) – Material a ser analisado ( ) – Vírus																				
<b>Data</b>	<b>Solicitação</b>																			
<b>Responsável pela Reação de RT-PCR</b>	<b>Número do Teste</b>  01	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 2px;">Número</th> <th style="padding: 2px;">Descrição das Amostras</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">1</td><td style="padding: 2px;">Controle Negativo</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">2</td><td style="padding: 2px;">1 kb DNA <i>Ladder</i></td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">3</td><td style="padding: 2px;">Controle Positivo</td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">4</td><td style="padding: 2px;"></td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">5</td><td style="padding: 2px;"></td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">6</td><td style="padding: 2px;"></td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">7</td><td style="padding: 2px;"></td></tr> <tr><td style="text-align: center; padding: 2px;">8</td><td style="padding: 2px;"></td></tr> </tbody> </table>	Número	Descrição das Amostras	1	Controle Negativo	2	1 kb DNA <i>Ladder</i>	3	Controle Positivo	4		5		6		7		8	
	Número	Descrição das Amostras																		
	1	Controle Negativo																		
	2	1 kb DNA <i>Ladder</i>																		
	3	Controle Positivo																		
	4																			
	5																			
	6																			
	7																			
8																				

2 - COMPONENTES DA REAÇÃO		
Componentes	Volume	Quantidade de Amostra para o Gel
1. Água destilada, deionizada (tratada com DEPC) e autoclavada	17 µl	16 µl
2. 2 X <i>Mix Reaction</i>	25 µl	
3. <i>Primer Forward</i> : PMWaV-225 ou PMWaV-223 ou PMWaV-263 ou PMWaV-4LODFf ou PMWaV-5LODFf ou gL3637*	01 µl	
4. <i>Primer Reverse</i> : PMWaV-226 ou PMWaV-224 ou PMWaV-264 ou PMWaV-4LODFr ou PMWaV-5LODFr*	01 µl	
5. <u>SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase</u>	02 µl	
6. RNA extraído com <i>RNeasy Plant Mini kit</i>	04 µl	
<b>Volume Total</b>	50 µl	
PMWaV-225 e PMWaV-226 (PMWaV-1)* PMWaV-223 e PMWaV-224 (PMWaV-2)* PMWaV-263 e PMWaV-264 (PMWaV-3)* PMWaV-4LODFf e PMWaV-4LODFr (PMWaV-4)* PMWaV-5LODFf e PMWaV-5LODFr (PMWaV-5)* gL3637 e gL4435c ( <i>Tospovirus</i> )*		

3 - CICLO UTILIZADO
<b>Termociclador: PTC 200 (MJ Research)</b>
45 °C/ 30 minutos, 95 °C/ 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C/ 30 segundos, 54 °C/ 40 segundos, 72 °C/ 40 segundos, 72 °C por 10 minutos; 4 °C por cinco minutos ( <i>Ampelovirus</i> )
45 °C/ 30 minutos, 95 °C/ 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C/ 30 segundos, 50 °C/ 40 segundos, 72 °C/ 40 segundos, 72 °C por 10 minutos; 4 °C por cinco minutos ( <i>Tospovirus</i> )
<b>Tempo Total: 2h00'</b>

<b>Distribuição no Gel (esquerda para a direita):</b>	<b>Eletroforese:</b>	<b>Título da Fotografia do Gel:</b>
<b>Amostra - 4, 5, 6, 7, 8</b>	<b>Tampão: TAE 1X</b>	Agarose - 1,2% com brometo
<b>Resultado</b>	<b>Voltagem (volts): 88</b>	<b>Fragmento -</b>
Negativo ( ) -	<b>Tempo (minutos): 25-30</b>	<b>Fotografia:</b>
Positivo ( ) -		<ul style="list-style-type: none"> <li>• não tirada ( )</li> <li>• tirada ( )</li> </ul>

#### 4 – OBSERVAÇÃO

Extração do RNA total com *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen Brasil) e Teste de RT-PCR com SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher)

*Primers:*

**PMWaV-225** (5'-ACAggAAggACAACACTCAC-3') e **PMWaV-226** (5'-CgCACAAACTTCAAgCAATC-3') - fragmento esperado – **590 pb** (PMWaV-1)\*

**PMWaV-223** (5'-CCATCCACCAATTTTACTAC-3') e **PMWaV-224** (5'-CATACgAACTAgACTCATAcG-3') - fragmento esperado – **610 pb** (PMWaV-2)\*

**PMWaV-263** (5'-ATTgATggATgTgTATCg-3') e **PMWaV-264** (5'-AgTTCACTgTAgATTTcggA-3') - fragmento esperado – **499 pb** (PMWaV-3)\*

**PMWaV-4LODFf** (5'-AATgACCggCCAACAAGTCT-3') e **PMWaV-4LODFr** (5'-TTCTgTTgCACAACCgACCT-3') - fragmento esperado – **963 pb** (PMWaV-4)

**PMWaV-5LODFf** (5'-TCCATTTACATgCCgACggT-3') e **PMWaV-5LODFr** (5'-TCggCTggTACAgAACACAC-3') - fragmento esperado – **338 pb** (PMWaV-5)

**gL3637** (5'-CCTTTAACAGT(A/T/G) GAAACAT-3') e **gL4435c** (5'-CAT(A/T/G)GC(A/ G)CAAGA(A/G)TG(A/G)TA(A/G)ACAGA-3') - fragmento esperado – **800 pb** (*Tospovirus*)\*\*

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

\*\*\* Zheng, Y.-X.; Yang, C.-J.; Yeh, S.-D.; Jan, F.-J. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on Phalaenopsis orchids. *Eur J Plant Pathol.* 120:199-209. 2008.

<b>Local</b>	<b>Data</b>	<b>Assinatura do Responsável pelo Ensaio</b>

### 5.3 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus quarentenários para o Brasil em orquídeas importadas

#### **KIT OrqQuarVirus**

##### **Uso pretendido**

O *Kit OrqQuarVirus* produzido para fins de diagnóstico de vírus quarentenários para o Brasil, a partir de espécies e/ou híbridos de Orquídeas importadas, foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular destes vírus a fim de impedir sua disseminação no país.

Os vírus quarentenários para o Brasil são os citados nas Instruções Normativas (IN 6/ 2005, IN 52/ 2007, IN 41/ 2008, IN 59/ 2013, IN 01/ 2015) do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que podem incidir em espécies e/ou híbridos de Orquídeas importadas. Tais vírus se distribuem em quatro espécies e/ou possíveis espécies virais [*Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV), *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* (INSV)] assinaladas nos gêneros *Nepovirus*, *Orthotospovirus*, *Potyvirus*.

O *Kit OrqQuarVirus* oferece através do Teste de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), um método diagnóstico sensível e de detecção dos vírus quarentenários para o Brasil acima referenciados sendo que os iniciadores (*primers*) utilizados no Teste de RT-PCR baseiam-se em regiões do genoma viral conservadas e podem detectar estirpes virais ainda não identificadas no país.

##### **Armazenamento**

O *Kit OrqQuarVirus* deve ser armazenado a -10 °C

A mistura de iniciadores (*primers*) liofilizados após reconstituído em 200 µl de água (destilada, deionizada e autoclavada) livre de *RNAse* é estável durante um ano quando armazenado a -10 °C.

O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores (*primers*) reconstituídos não está documentado.



## Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso;
- Usar sempre luvas de látex descartáveis;
- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra;
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *RNase* durante o procedimento;
- O *Kit OrqQuarVirus* foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para se obter êxito nos resultados.

## Reagentes

- Agarose Ultra Pura;
- Água Destilada, Deionizada e Esterilizada;
- Álcool Etílico 95%;
- Brometo de Etídio (10 mg/ml);
- Controle Positivo (DNA amplificado de vírus dos gêneros *Nepovirus* ou *Potyvirus* ou *Orthotospovirus*, existentes no Brasil);
- Dietil Pirocarbonato de Sódio (DEPC);
- Gelo;
- *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Thermo Fischer);
- Marcador de Massa Molecular (1kb DNA *Ladder*);
- Nitrogênio Líquido;
- *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil);
- Solução tampão TAE 10X.

## Materiais e Equipamentos

- Agitador Magnético (Vortex);
- Almofariz e Pistilo;

- Autoclave;
- Balança Analítica;
- Caixa de Isopor;
- Caneta *Pilot*;
- Capela de Exaustão;
- Cuba de Eletroforese;
- Deionizador de Água;
- Destilador de Água;
- Freezer;
- Geladeira;
- Jaleco;
- Luvas de Látex;
- Máquina de Gelo;
- Máquina Fotográfica;
- Microcentrifuga;
- Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Papel Alumínio;
- Papel Toalha;
- Ponteiros para Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Tesoura;
- Termociclador;
- Transiluminador de Luz Ultravioleta;
- Tubos de Polipropileno de 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml.

### **Procedimento Detalhado**

Para executar este procedimento é indispensável o uso de Luvas de látex descartáveis e Jaleco.

1 – Amostras de Orquídea são obtidas e pesadas, em Balança Analítica, nas seguintes proporções: 0,1 g para amostras tenras (MUDAS, PLANTAS, PLÂNTULAS, FOLHAS) ou 0,03 g de amostras espessas (RAIZ, CAULES, FRUTOS, E/ OU SEMENTES) sendo depositadas em almofarizes;

- 2 - Adicionar nitrogênio líquido e pulverizar a amostra com o auxílio do pistilo. Adicionar com o auxílio de micropipeta (P1000), 450 µl de tampão RLT (acrescido de 4,5 µl de *Beta*-mercaptoetanol com o auxílio da Micropipeta P20) à amostra pulverizada. Misturar com o pistilo;
- 3 - Transferir, com o auxílio do pistilo, a suspensão para tubo de polipropileno de 1,5 ml. Fechar o tubo, misturar o conteúdo pela agitação vigorosa em Vortex por 30 segundos;
- 4 - Abrir o tubo, transferir o lisado para coluna lilás (*QIAshredder*) do *kit*, colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Fechar o tubo de polipropileno;
- 5 - Centrifugar a 13500 x g (15000 rpm) por 2 minutos em Microcentrifuga. Descartar a coluna, transferir o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml com o auxílio de Micropipeta (P1000);
- 6 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 0,5 volumes de etanol (ao redor de 250 µl) 96% gelado, misturar gentilmente pela inversão do tubo;
- 7 - Transferir 650 µl, com a Micropipeta (P1000), para a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 8 - Se necessário, repetir o passo 7 com o volume excedente aos 650 µl, utilizando a Micropipeta (P200);
- 9 - Adicionar 700 µl de tampão RW1 a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 10 - Reusar o tubo de polipropileno com a coluna rosa;
- 11 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE à coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 12 - Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml e, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 2 minutos. Opcional - Transferir a coluna rosa para tubo

de polipropileno (*Collection Tube*) de 2 ml e centrifugar, na Microcentrífuga, a 13500 x g por um minuto para secar a membrana;

13 – Transferir a coluna rosa para tubo de polipropileno de 1,5 ml e, adicionar, com a Micropipeta (P200), 50 µl de água (destilada, deionizada, tratada com DEPC e autoclavada) na coluna. Centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 1 minuto;

14 – Descartar a coluna, fechar tubo de polipropileno contendo o filtrado. **RNA extraído**;

15 – Identificar o tubo de polipropileno com Canela *Pillot* e manter no Freezer (-10 °C) até posterior uso, no Teste de RT-PCR;

16 – Antes do Teste de RT-PCR, retira-se o tubo de polipropileno identificado do Freezer, coloca-se em caixa de isopor com gelo e, após descongelamento, com o auxílio de Micropipeta (P20) retira-se 4 µl do RNA extraído que será utilizado no Teste de RT-PCR, a partir do uso dos produtos constantes no *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*, os iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie viral e as condições de amplificação do genoma viral assinaladas no Termociclador conforme registrado no **FOR-RT-PCR.VV** (acompanha o *Kit*);

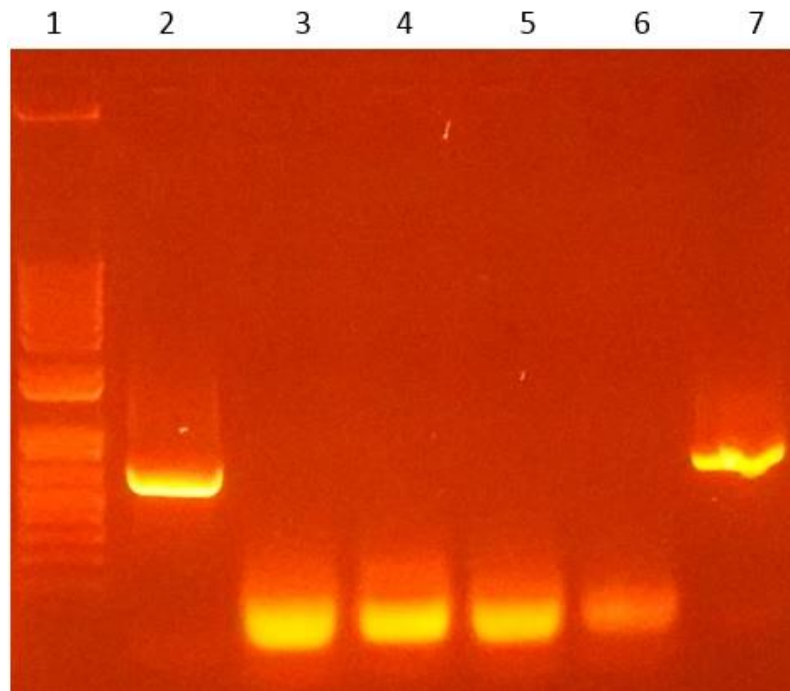
17 - Após a amplificação no Termociclador das amostras de RNA procede-se a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1 X, contendo brometo de etídio, a 88 volts por 25 - 30 minutos, e posterior visualização dos *amplicons* (fragmentos genômicos amplificados) em Transiluminador de Luz Ultravioleta;

18 - *Registra-se o resultado no formulário FOR-RT-PCR.VV associado ao KIT OrqQuarVirus.*

## RESULTADOS

- O teste pode detectar isolados das espécies virais citadas que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as sequências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, EMBL - *European Molecular Biology Laboratory*).

- Controles Positivos devem ter a massa molecular de seus respectivos *amplicons* indicada no **FOR-RT-PCR.VV** e facilmente detectável após a eletroforese. A faixa de massa molecular dos *amplicons* indicada no formulário tem relação com a origem do isolado viral amplificado.
- Controle Negativo (amostra sem a presença do RNA extraído) não deve apresentar qualquer amplificação.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar. 1 kb *plus* DNA Ladder (1); Controle Positivo - *Potyvirus* (2, 7); Amostra foliar plantas importadas de: *Phalaenopsis amabilis* (3), *Dendrobium nobile* (4), *Oncidium nobile* (5); Controle negativo (6).

### Limitações

O que se segue é uma descrição de fatores que podem limitar o desempenho do teste ou interferir com os resultados de teste adequados.

- Os iniciadores (*primers*) liofilizados são estáveis durante 1 ano a partir da data de sua confecção, quando armazenados a -10 °C.
- Recomenda-se a utilização da mistura de iniciadores (*primers*) reconstituída em um ensaio. Se forem realizados ensaios subsequentes, a mistura de iniciadores

deve ser aliquotada e armazenada a -10 °C. O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores reconstituídos não está documentado.

- O sucesso do Teste de RT-PCR depende da qualidade do RNA.

# KIT OrqQuarVirus

FOR-RT-PCR.VV – 01/00

## 1 - IDENTIFICAÇÃO

### Nome do Ensaio

Amplificação de fragmento genômico de CaCV ou INSV ou PhCSV ou ToRSV a partir de mudas de Orquídea

### AMOSTRA

### Número do Registro:

Material - 1. Caules, 2. Estacas com raiz, 3. Estacas sem raiz, 4. Folhas com pecíolos, 5. Frutos, 6. Mudas, 7. Mudas (plantas) *in vitro*, 8. Plantas, 9. Plântulas, 10. Raiz, 11. Sementes, 12. Sementes Pré-germinadas

Tipo - RNA (x) – Material a ser analisado ( ) - Vírus

Data	Solicitação																		
Responsável pela Reação de RT-PCR	Número do Teste 01																		
	<table border="1"><thead><tr><th>Número</th><th>Descrição das Amostras</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)</td></tr><tr><td>2</td><td>1 kb DNA <i>Ladder</i></td></tr><tr><td>3</td><td>Controle Positivo</td></tr><tr><td>4</td><td></td></tr><tr><td>5</td><td></td></tr><tr><td>6</td><td></td></tr><tr><td>7</td><td></td></tr><tr><td>8</td><td></td></tr></tbody></table>	Número	Descrição das Amostras	1	Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)	2	1 kb DNA <i>Ladder</i>	3	Controle Positivo	4		5		6		7		8	
Número	Descrição das Amostras																		
1	Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)																		
2	1 kb DNA <i>Ladder</i>																		
3	Controle Positivo																		
4																			
5																			
6																			
7																			
8																			

## 2 - COMPONENTES DA REAÇÃO

Componentes	Volume	Quantidade de Amostra para o Gel
1. Água destilada e autoclavada	17 µl	16 µl
2. 2 X <i>Mix Reaction</i>	25 µl	
3. <i>Primer</i> CaCV4f ou IS-F ou PhCSV-F ou RdR-F ou Pot 1	01 µl	
4. <i>Primer</i> CaCV777c ou IS-R ou PhCSV-R ou RdR-R ou Pot 2	01 µl	
5. SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	04 µl	
6. RNA extraído com <i>RNeasy Plant Mini kit</i>	02 µl	
Volume Total	50 µl	

## 3 - CICLO UTILIZADO

Termociclador: PTC 200

45 °C/ 30 minutos, 95 °C/ 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C/ 30 segundos, 53 °C/ 60 segundos, 72 °C/ 60 segundos, 72 °C por 10 minutos; 4 °C por cinco minutos.

Tempo Total: 2h10'

Distribuição no Gel (esquerda para a direita):	Eletroforese:	Título da Fotografia do Gel:
Amostra - 4, 5, 6, 7, 8	Tampão: TAE 1X	Agarose - 1,2% com brometo
Resultado	Voltagem (volts): 88	Fragmento -
Negativo ( ) -	Tempo (minutos): 25-30	Fotografia:
Positivo ( ) -		<ul style="list-style-type: none"><li>• não tirada ( )</li><li>• tirada ( )</li></ul>

## 4 - OBSERVAÇÃO

Extração do RNA total com *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen Brasil) e Teste de RT-PCR com SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Thermo Fisher)

Primers:

**CaCV4f** (5'-TCTACCGTCAGGCAACTTACCGAG-3') e **CaCV777c** (5'-ATAATCATCCACAGACAAATTGGCACTAAA-3') - fragmento esperado – **774 pb**

**INSVIS-F** (5'-TAACACAACACAAAGCAAACC-3') e **INSVIS-R** (5'-CCAAATACTACTTTAACCGCA-3') - fragmento esperado – **906 pb**

**PhCSVLODF-F** (5'-TGAAATATCGCACCGGGCT-3') e **PhCSVLODF-R** (5'-GGTGTGGCTGAACCGC-3') - fragmento esperado - **297 pb**

**ToRSVRdR-F** (5'-GAAGAGCTAGAGCCTCAACCAGG-3') e **ToRSVRdR-R** (5'-CGCTGGTAATTGAGTAGCCC-3') - fragmento esperado – **411 pb**

**Gênero Potyvirus - Pot 1** (5'-GACTGGATCCATT(C/G/T)TC(A/G/T)AT(A/G)CACCA-3') e **Pot 2** (5'-GACGAATTCTG(C/T)GA(C/T)GC(C/G/T)GATGG(C/T)TC-3') – fragmento variável (temperatura de anelamento 53°C)

Local	Data	Assinatura do Responsável pelo Ensaio

## 5.4 Protótipo de Kit diagnóstico de vírus em orquídeas para o Brasil

### *KIT OrqVirus*

#### Uso pretendido

O *Kit OrqVirus* produzido para fins de diagnóstico de vírus citados em espécies e/ou híbridos de Orquídeas no Brasil foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular destes vírus a fim de impedir sua disseminação no país.

Os vírus de incidência em espécies e/ou híbridos de Orquídea no Brasil se distribuem em quatro espécies virais [*Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cymbidium mosaic virus* (CyMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Orchid fleck dichorhabdovirus* (OFV)] assinaladas nos gêneros *Cucumovirus*, *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Dichorhabdovirus*.

O *Kit OrqVirus* oferece através do Teste de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), um método diagnóstico sensível de detecção dos vírus acima referenciados sendo que os iniciadores (*primers*) utilizados no Teste de RT-PCR baseiam-se em regiões do genoma viral conservadas e podem detectar estirpes virais ainda não identificadas no país.

#### Armazenamento

O *Kit OrqVirus* deve ser armazenado a -10 °C.

A mistura de iniciadores (*primers*) liofilizados após reconstituído em 200 µl de água (destilada, deionizada e autoclavada) livre de *RNAse* é estável durante um ano quando armazenado a -10 °C.

O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores (*primers*) reconstituídos não está documentado.

#### Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso;
- Usar sempre luvas de látex descartáveis;



- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra;
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *RNase* durante o procedimento;
- O *Kit OrqVirus* foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para obter êxito nos resultados.

## Reagentes

- Agarose Ultra Pura;
- Água Destilada, Deionizada e Esterilizada;
- Álcool Etílico 95%;
- Brometo de Etídio (10 mg/ml);
- Controles Positivos (DNA amplificado de CMV);
- Dietil Pirocarbonato de Sódio (DEPC);
- Gelo;
- *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase* (Thermo Fischer);
- Marcador de Massa Molecular (1kb DNA *Ladder*);
- Nitrogênio Líquido;
- *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN Brasil);
- Solução tampão TAE 10X.

## Materiais e Equipamentos

- Agitador Magnético (Vortex);
- Almofariz e Pistilo;
- Autoclave;
- Balança Analítica;
- Caixa de Isopor;
- Caneta *Pillot*;

- Capela de Exaustão;
- Cuba de Eletroforese;
- Deionizador de Água;
- Destilador de Água;
- Freezer;
- Geladeira;
- Jaleco;
- Luvas de Látex;
- Máquina de Gelo;
- Máquina Fotográfica;
- Microcentrifuga;
- Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Papel Alumínio;
- Papel Toalha;
- Ponteiros para Micropipeta (P20, P200, P1000);
- Tesoura;
- Termociclador;
- Transiluminador de Luz Ultravioleta;
- Tubos de Polipropileno de 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml.

### **Procedimento Detalhado**

Para executar este procedimento é indispensável o uso de luvas de látex descartáveis e Jaleco.

1 – Amostras de Orquídea são obtidas e pesadas, em Balança Analítica, nas seguintes proporções: 0,1 g para amostras tenras (MUDAS, PLANTAS, PLÂNTULAS, FOLHAS) ou 0,03 g de amostras espessas (RAIZ, CAULES, FRUTOS, E/ OU SEMENTES) sendo depositadas em almofarizes;

2 - Adicionar nitrogênio líquido e pulverizar a amostra com o auxílio do pistilo. Adicionar com o auxílio de micropipeta (P1000), 450 µl de tampão RLT (acrescido de 4,5 µl de *Beta*-mercaptoetanol com o auxílio da Micropipeta P20) à amostra pulverizada. Misturar com o pistilo;

- 3 - Transferir, com o auxílio do pistilo, a suspensão para tubo de polipropileno de 1,5 ml. Fechar o tubo, misturar o conteúdo pela agitação vigorosa em Vortex por 30 segundos;
- 4 - Abrir o tubo, transferir o lisado para coluna lilás (*QIAshredder*) do *kit*, colocada no tubo de polipropileno de 2 ml. Fechar o tubo de polipropileno;
- 5 - Centrifugar a 13500 x g (15000 rpm) por 2 minutos em Microcentrifuga. Descartar a coluna, transferir o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml com o auxílio de Micropipeta (P1000);
- 6 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 0,5 volumes de etanol (ao redor de 250 µl) 96% gelado, misturar gentilmente pela inversão do tubo;
- 7 - Transferir 650 µl, com a Micropipeta (P1000), para a coluna rosa (*Mini Spin Column*) colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 8 - Se necessário, repetir o passo 7 com o volume excedente aos 650 µl, utilizando a Micropipeta (P200);
- 9 - Adicionar 700 µl de tampão RW1 a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 10 - Reusar o tubo de polipropileno com a coluna rosa;
- 11 – Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE à coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 15 s. Descartar o filtrado;
- 12 - Adicionar, com a Micropipeta (P1000), 500 µl de tampão RPE a coluna rosa colocada no tubo de polipropileno de 2 ml e, centrifugar, na Microcentrifuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 2 minutos. Opcional - Transferir a coluna rosa para tubo de polipropileno (*Collection Tube*) de 2 ml e centrifugar, na Microcentrifuga, a 13500 x g por um minuto para secar a membrana;
- 13 – Transferir a coluna rosa para tubo de polipropileno de 1,5 ml e, adicionar, com a Micropipeta (P200), 50 µl de água (destilada, deionizada, tratada com

DEPC e autoclavada) na coluna. Centrifugar, na Microcentrífuga, a 8000 x g (10000 rpm) por 1 minuto;

14 – Descartar a coluna, fechar tubo de polipropileno contendo o filtrado. **RNA extraído**;

15 – Identificar o tubo de polipropileno com Canela *Pillot* e manter no Freezer (-10°C) até posterior uso, no Teste de RT-PCR;

16 – Antes do Teste de RT-PCR, retira-se o tubo de polipropileno identificado do Freezer, coloca-se em caixa de isopor com gelo e, após descongelamento, com o auxílio de Micropipeta (P20) retira-se 4 µl do RNA extraído que será utilizado no Teste de RT-PCR, a partir do uso dos produtos constantes no *Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase*, os iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie viral e as condições de amplificação do genoma viral assinaladas no Termociclador conforme registrado no **FOR-RT-PCR.VV** (acompanha o *Kit*);

17 - Após a amplificação no Termociclador das amostras de RNA procede-se a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1 X, contendo brometo de etídio, a 88 volts por 25 - 30 minutos, e posterior visualização dos *amplicons* (fragmentos genômicos amplificados) em Transiluminador de Luz Ultravioleta;

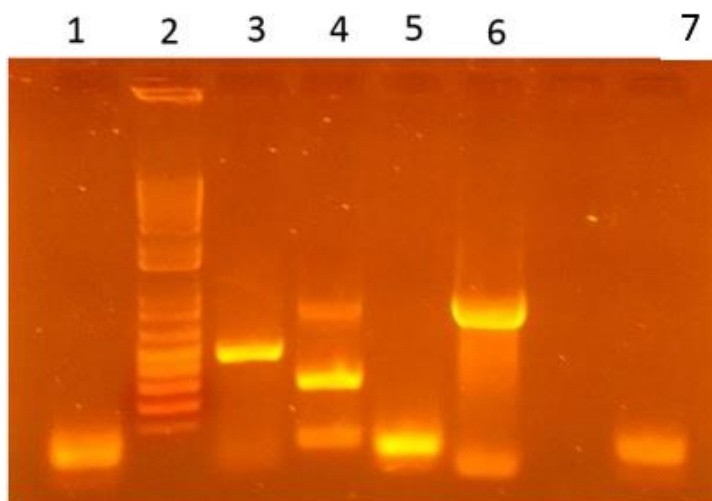
18 - *Registra-se o resultado no formulário FOR-RT-PCR.VV associado ao KIT OrqVirus.*

## RESULTADOS

- O teste pode detectar isolados das espécies virais citadas que ainda não foram detectados ou ainda não tenham as sequências disponibilizadas nos bancos de dados disponíveis (**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*, **EMBL** - *European Molecular Biology Laboratory*).

- Controles Positivos devem ter a massa molecular de seus respectivos *amplicons* indicada no **FOR-RT-PCR.VV** e facilmente detectável após a eletroforese. A faixa de massa molecular dos *amplicons* indicada no formulário tem relação com a origem do isolado viral amplificado.

- Controle Negativo (amostra sem a presença do RNA extraído) não deve apresentar qualquer amplificação.



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídio, de *amplicon* viral através do Teste de RT-PCR a partir de RNA total foliar. Controle Negativo (1, 5); 1 kb *plus DNA Ladder* (2); *Phalaenopsis amabilis* infectada com: CMV (3), CymMV (4), ORSV (6); *Phalaenopsis amabilis* sadia (7)

### Limitações

O que se segue é uma descrição de fatores que podem limitar o desempenho do teste ou interferir com os resultados de teste adequados.

- Os iniciadores (*primers*) liofilizados são estáveis durante 1 ano a partir da data de sua confecção, quando armazenados a -10 °C.
- Recomenda-se a utilização da mistura de iniciadores (*primers*) reconstituída em um ensaio. Se forem realizados ensaios subsequentes, a mistura de iniciadores deve ser aliquoteada e armazenada a -10 °C. O efeito do congelamento e descongelamento dos iniciadores reconstituídos não está documentado.
- O sucesso do Teste de RT-PCR depende da qualidade do RNA.

FOR-RT-PCR.VV – 01/00

1 - IDENTIFICAÇÃO																				
<b>Nome do Ensaio</b> Amplificação de fragmento genômico de CMV ou CyMV ou OFV ou ORSV a partir de mudas de Orquídea																				
<b>AMOSTRA</b>																				
<b>Número do Registro:</b> Material - 1. Folhas, 2. Mudas, 3. Mudas (plantas) <i>in vitro</i> , 4. Plantas, 5. Plântulas, 6. Raiz, 11. Sementes, 12. Sementes Pré-germinadas Tipo - RNA (x) – Material a ser analisado ( ) - Vírus																				
<b>Data</b>	<b>Solicitação</b>																			
<b>Responsável pela Reação de RT-PCR</b>	<b>Número do Teste</b> 01	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Número</th> <th>Descrição das Amostras</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>1 kb DNA <i>Ladder</i></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>Controle Positivo</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Número	Descrição das Amostras	1	Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)	2	1 kb DNA <i>Ladder</i>	3	Controle Positivo	4		5		6		7		8	
		Número	Descrição das Amostras																	
		1	Controle Negativo (amostra sem a presença de RNA extraído)																	
		2	1 kb DNA <i>Ladder</i>																	
		3	Controle Positivo																	
		4																		
		5																		
		6																		
		7																		
8																				

2 - COMPONENTES DA REAÇÃO		
<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>	<b>Quantidade de Amostra para o Gel</b>
7. Água destilada, deionizada (tratada com DEPC) e autoclavada	17 µl	16 µl
8. 2 X <i>Mix Reaction</i>	25 µl	
9. <i>Primer</i> CMVLODF-F ou CYMVLODF-F ou OFVLODF-F ou ORSVLODF-F*	01 µl	
10. <i>Primer</i> CMVLODF-R ou CYMVLODF-R ou OFVLODF-R ou ORSVLODF-R* SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase	01 µl	
	02 µl	
11. RNA extraído com <i>RNeasy Plant Mini kit</i>	04 µl	
<b>Volume Total</b>	50 µl	

3 - CICLO UTILIZADO		
<b>Termociclador:</b> PTC 200 (MJ Research)		
45 °C/ 30 minutos, 95 °C/ 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C/ 30 segundos, 58 °C/ 40 segundos, 72 °C/ 40 segundos, 72 °C por 10 minutos; 4 °C por cinco minutos.		
<b>Tempo Total:</b> 2h10'		
<b>Distribuição no Gel (esquerda para a direita):</b>	<b>Eletroforese:</b>	<b>Título da Fotografia do Gel:</b>
Amostra - 4, 5, 6, 7, 8	<b>Tampão:</b> TAE 1X	Agarose - 1,2% com brometo
<b>Resultado</b>  Negativo ( ) -  Positivo ( ) -	<b>Voltagem (volts):</b> 88	<b>Fragmento -</b>
	<b>Tempo (minutos):</b> 25-30	<b>Fotografia:</b> • não tirada ( ) • tirada ( )

4 – OBSERVAÇÃO
Extração do RNA total com <i>RNeasy Plant Mini kit</i> (Qiagen Brasil) e Teste de RT-PCR com SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase (Thermo Fisher)  <i>Primers:</i>  <b>CMVLODF-F</b> (5'-TATGATAAGAAGCTTGTTCGCGCA-3') e <b>CMVLODF-R</b> (5'-TTTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3') - fragmento esperado – 491-507 pb <b>CYMVLODF-F</b> (5'-CGCCGTATTGCCCTTGTG-3') e <b>CYMVLODF-R</b> (5'-GCGTTATTCAGTAGGGGGTG-3') - fragmento esperado – 844-849 pb <b>OFVLODF-F</b> (5'-GCTAGCCGTCTACGGAGT-3') e <b>OFVLODF-R</b> (5'-AGTTCCTCGATGTTGGGACT-3') - fragmento esperado - 662 pb <b>ORSVLODF-F</b> (5'-ATTTAAGCTCGCTTGGGCT-3') e <b>ORSVLODF-R</b> (5'-CTACCCGAGGTAAGGGGGAA-3') - fragmento esperado – 845-847 pb

<b>Local</b>	<b>Data</b>	<b>Assinatura do Responsável pelo Ensaio</b>

