

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
ISOLADO DO *Hydrangea ringspot virus* EM HORTÊNSIA
NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU
Dezembro - 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM
ISOLADO DO *Hydrangea ringspot virus* EM HORTÊNSIA
NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

Orientadora: Profa. Dra. Renate Krause Sakate
Co-Orientador: Marcelo Agenor Pavan

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus
de Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU
Dezembro – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D696i Dória, Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck, 1980-
Identificação e caracterização de um isolado do *Hydrangea ringspot virus* em hortênsia no estado de São Paulo / Karolina Marie Alix Benedictte Van Sebroeck Dória .- Botucatu : [s.n.], 2008.
x, 53 f. : il., color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Renate Krause Sakate
Co-orientador: Marcelo Agenor Pavan
Inclui bibliografia

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Vírus de RNA. 3. Hortênsia 4. *Hydrangea ringspot virus*. I. Sakate, Renate Krause. II. Pavan, Marcelo Agenor. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu) Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO
Hydrangea ringspot virus EM HORTÊNSIA NO ESTADO DE
SÃO PAULO"

ALUNA: KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

ORIENTADORA: PROFª DRª RENATE KRAUSE SAKATE

CO-ORIENTADOR: MARCELO AGENOR PAVAN

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFª DRª RENATE KRAUSE SAKATE


PROF. DR. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE


PROF. DR. VALDIR ATSUSHI YUKI

Data da Realização: 17 de dezembro de 2008.

“Você é aquilo que interpreta, sente, pensa e registra.

Não há ricos, pobres, intelectuais e iletrados no cerne do funcionamento da mente humana.

Todos somos iguais e devemos tomar os mesmos cuidados se quisermos ser felizes.

Tome consciência de como você interpreta e registra os eventos do dia-a-dia, e você estará investindo em qualidade de vida.

Caso contrário, ainda que você conste na lista como um dos homens mais ricos do mundo, correrá o risco de estar listado nas páginas da emoção como um dos seres mais infelizes...”

Augusto Cury

Dedico com muito amor...

...Aos amores da minha vida

Fabiano

Pai

Mãe

Vó Dita

Teté

Diogo

Kamilla

Sem vocês eu não seria nada! Cada palavra... gesto... olhar... carinho...

Vocês são realmente uma bênção de Deus na minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao meu amor Fabiano, por estar ao meu lado, me ajudando, aconselhando, me amando e principalmente, por ter me agüentando nos momentos em que eu estava simplesmente maluca... insuportável... tensa... e enfim... por estar sempre de braços abertos a minha espera. Amo Você!

Aos meus Pais (Dito e Be)! O que dizer de vocês? Simplesmente Fantásticos! Obrigada por todos os momentos preciosos que passamos juntos. Vocês foram e serão sempre fundamentais na minha vida.

À minha Avó... com todos os seus conselhos, carinhos, gestos e toda a universidade da vida pela qual a senhora passou. Seus ensinamentos ficarão para sempre marcados em mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Renate Krause Sakate por todos os ensinamentos, incentivos, compreensão e competência na condução do trabalho. Obrigada pelas sugestões e críticas construtivas. Foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Valdir Atsushi Yuki por me conceder a chance de desenvolver o trabalho. Obrigada pela oportunidade em poder participar de um projeto tão nobre.

A minha grande amiga e parceira de todos os momentos Juá! Mais do que nunca você foi uma parceira e tanta! Vou sentir falta dos momentos que passamos. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos do Departamento, Tank, Basseto, Marreco, Seiva, Martinha e Cris, meu muito obrigada por tudo.

Aos companheiros do laboratório Mônica, Júlio, Gerson, Davi, Neisa, Márcio, Tatiana, Lívia e Kelly pelos momentos preciosos que passamos juntos.

Aos Professores Edson Luiz Furtado, Nilton Luiz de Souza, Marcelo Agenor Pavan e Antônio Carlos Maringoni pela formação e ensinamentos.

Ào meu “pai” Celso por todo o incentivo e por me fazer sentir importante. Senhor é simplesmente demais.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal meu muito obrigada pelos auxílios.

Ao Paulinho e Norberto por toda a ajuda desprendida no desenvolvimento deste trabalho.

À Sandra da AFLORD por me ajudar no envio das amostras.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

E a todos que contribuíram, de alguma maneira na realização deste projeto.

SUMÁRIO

	Página
1. Resumo.....	1
2. Summary.....	3
3. Introdução.....	5
4. Revisão de Literatura.....	7
4.1 O mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais.....	7
4.2 Vírus associados à hortênsia (<i>Hydrangea macrophylla</i>)	9
5. Objetivos.....	13
6. Material e Métodos.....	14
6.1 Localização Experimental.....	14
6.2 Obtenção dos Isolados Virais.....	14
6.3 Determinação do círculo de Hospedeiros.....	16
6.4 Microscopia eletrônica.....	16
6.5 Purificação do Vírus.....	17
6.6 Produção do Antissoro.....	19
6.7 PTA – ELISA.....	19
6.8 Determinação do Peso Molecular da Proteína Capsidial.....	20
6.9 Extração do RNA Total.....	21
6.10 Detecção do vírus por RT-PCR.....	22
6.11 Purificação do Produto de RT-PCR.....	24
6.12 Preparo de Células Eletrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	25
6.13 Clonagem e Sequenciamento.....	25
6.14 Análise das Seqüências Obtidas.....	27
7. Resultados e Discussões.....	28
7.1 Identificação do HdRSV em hortênsias no Brasil.....	28
7.2 Avaliação da gama de hospedeiros do isolado HdRSV-RB.....	32
7.3 Análise da variabilidade genética dos isolados de HdRSV proveniente de diferentes matrizes de hortênsia.....	37
7.4 Purificação do vírus e produção de antissoro Anti-HdRSV.....	42
8. Conclusões.....	48
9. Considerações Finais.....	49
10. Referências Bibliográficas.....	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Organização genômica do <i>Hydrangea ringspot virus</i> . Adaptado de Hughes, 2005.....	10
2 Representação esquemática da organização do genoma da espécie tipo do gênero <i>Potexvirus</i> (Retirado de Adams et al., 2005).....	11
3. Alinhamento de nucleotídeos realizado com o programa Clustal w (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) entre seqüências de HdRSV depositadas no Genbank. O número de acesso de cada seqüência esta especificada na frente de seu nome. Em verde a região de anelamento dos primers Hyd_senso e Hyd_anti_senso.....	23
4. Sintomas de infecção pelo HdRSV em hortênsias da variedade Renat blue (A e B).....	30
5. Perfil eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8 %. M: Marcador Molecular HighRanger 1Kb DNA Ladder, Marca Norgen; 1: Renat blue sintomática; 2: Hortênsia Sadia – Variedade desconhecida; 3: controle negativo água.....	31
6. Padrão eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8%. M – Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Marca Invitrogen); 1: Hortênsia variedade Azul rendado; 2: Hortênsia var. Azul LZR; 3: Hortênsia var. Rosita; 4: Hortênsia var. “Leuch”; 5: Hortênsia var. LK-49; 6: Hortênsia var. Esconia; 7: Hortênsia var. Branco com renda; 8: Hortênsia var. Vermelho comum; 9: Hortênsia var. Kumiko; 10: Hortênsia var. Branco comum; 11: Hortênsia var. Lav-bla; 12: Hortênsia var. Renat blue; 13: Hortênsia var. Rosa Japonesa; 14: Hortênsia var. Elbtal; 15: Hortênsia var. Leuch; 16: Hortênsia var. Red Baron; 17: Hortênsia var. Renata Stuniger; 18: Controle negativo água; 19: Hortênsia var. Renat Blue infectada.	31
7.: Sintomas de lesão local observados em <i>Chenopodium amaranticolor</i> (A), <i>C. quinoa</i> (B) e <i>C. murale</i> (C) aos 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação.....	32

8. Sintomas de lesão local observados em *Gomphrena globosa* aos 5 e 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, respectivamente, sob condições de casa-de-vegetação.....33
9. Sintomas observados em *Primula malacoides* aos 40 dias após inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação33
10. Sintomas observados em *Nicandra physaloides* aos 8 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação.....34
11. Sintomas observados em *Gomphrena globosa* aos 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, mantidas em condições de temperatura constante de 16°C e fotoperíodo de 12 horas de luz artificial.....35
12. Figura 12: Padrão eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8%. M – Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Marca Invitrogen); 1: *Chenopodium amaranthicolor*; 2:*C. quinoa*; 3:*C. murale*; 4:*Nicotiana occidentalis*; 5:*Nycandra physaloides*; 6:*Gomphrena globosa*; 7: *Nicotiana tabacum* ‘Turkish’; 8:*N.clevelandii*; 9:*N. rustica*; 10:*Primula malacoides*; 11:*N. tabacum* ‘Havana’; 12: Controle negativo água; 13: Hortênsia var. Renat blue.....36
13. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos na região codificadora para a replicase viral dos isolados brasileiros de *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), bem como o HdRSV (números de acesso [AY707100](#) e 6943) com a região correspondente do *Narcissus mosaic virus* (NMV-NC_001441) e *Lily virus X* (LVX- NC_007192). Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).....39
14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos na região codificadora para a replicase viral dos isolados brasileiros de *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), bem como o HdRSV (números de acesso [AY707100](#) e 6943) com a região correspondente do *Narcissus mosaic virus* (NMV-NC_001441) e *Lily virus X* (LVX- NC_007192). Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).....40
15. Árvore filogenética da seqüência de aminoácidos correspondente aos 479bp na região codificadora para a replicase viral entre os isolados brasileiros de HdRSV (Azul LZR; Azul rendado; Vermelho comum; Rosita; Renat blue; Rosa japonesa); HdRSV-[AY707100](#); HdRSV-

6943 com a região correspondente do NMV-NC_001441 e LVX- NC_007192 (outgroups), obtida pelo Programa Mega versão 3.1, utilizando Neighbor-Joining e valor de Bootstrap 2000.....	42
16. Espectrometria da preparação viral purificada obtida com uma combinação de protocolos para PVX.....	44
17. Espectrometria da preparação viral purificada obtida com o protocolo para o NMV (Kendall et al., 2007).....	44
18. Padrão de proteínas observado em gel de poliacrilamida. M: Marcador Proteína BenchMarck TM Pré-Stained Protein Ladder (Invitrogen); 1 e 2: Purificado viral obtido com o protocolo para NMV (Kendall et al., 2007); 3 e 4: Purificado Viral obtido pela combinação de protocolos para PVX.....	45
19. Avaliação através de ELISA indireto do anti-soro produzido para o HdRSV. (ASB 1: Anti soro bruto 1 – protocolo NMV (Kendall et al., 2007); ASB 2: Anti soro bruto 2 – protocolo potexvirus/fedegoso; ASA 1: Anti soro adsorvido protocolo NMV (Kendall et al., 2007); ASA 2: Anti soro adsorvido (protocolo potexvirus/fedegoso). Absorbância a 405nm.....	46

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Dados de exportação e importação de mudas de plantas ornamentais. Dados do site AliceWeb (http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br) *Dados excluem as orquídeas.....	8
2. Amostras coletadas, provável país de importação e proveniência no Brasil.....	15
3. Número de plantas inoculadas, testadas e positivas por RT-PCR para a presença do HdRSV-RB.....	35
4.: Porcentagens de identidade de nucleotídeos (inferior) e aminoácidos (superior) do fragmento de 482bp na região codificadora para a replicase viral entre isolados brasileiros de HdRSV (Azul LZR; Azul rendado; Vermelho comum; Rosita; Renat blue; Rosa japonesa); HdRSV- AY707100 ; HdRSV-6943 com a região correspondente do NMV-NC_001441 e LVX-NC_007192, obtida pelo Programa Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html).....	41
5. Valores de absorvância (A405) obtidos por PTA-ELISA ao avaliar a reação do anti-soro produzido contra o HdRSV – RB, após adsorção ao tecido sadio de <i>C. quinoa</i> . Diluição do anti-soro 1:150 e do extrato de planta 1:10. Hortênsia 1, 2, 3 e flor sabidamente infectadas.....	47

1. RESUMO

A hortênsia é um arbusto semilenhoso muito apreciado como ornamental no Brasil. No Brasil podemos ressaltar a “Região das Hortênsias” no Sul do país, onde esta ornamental é utilizada em projetos de jardinagem em casas e rodovias. A cidade de Gramado têm a hortênsia como sua flor símbolo. No Estado de São Paulo, ela é comumente encontrada na Região de Campos do Jordão.

Plantas de hortênsia apresentando anéis cloróticos e necróticos foram observadas por Yuki et al. (2005) em material proveniente de Arujá, estado de São Paulo. Transmissões por extrato vegetal permitiram a observação de lesões locais cloróticas em *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa*, indicando infecção causada por vírus.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo a identificação e caracterização da espécie viral presente nestas amostras. Inicialmente as amostras foram analisadas por microscopia eletrônica, onde puderam ser observadas partículas alongadas filamentosas, medindo cerca de 490 nm, indicando a provável presença de um potexvirus. Oligonucleotídeos específicos Hyd_senso e Hyd_anti_senso foram desenhados para o *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), um potexvirus encontrado comumente em países

Europeus e nos Estados Unidos. O RNA total foi extraído pelo método de Bertheau et al. (1998), para posterior análise por RT-PCR utilizando-se estes oligonucleotídeos. Dois fragmentos, um em torno de 550 e outro de 250 nucleotídeos foram amplificados e purificados para realização do sequenciamento genético. Uma identidade de nucleotídeos de 96% e 88% para o fragmento maior e menor respectivamente foi observada para HdRSV (número de acesso AJ 707100.1), indicando tratar-se desta espécie viral. O HdRSV até então era uma praga exótica no Brasil, de forma que foi realizada comunicação ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que emitiu parecer favorável à publicação destes dados sob número do processo 21052.015361/2007-08.

Para avaliar a disseminação deste vírus nas matrizes de hortênsia hoje utilizadas na produção comercial no Brasil, foram coletadas 17 amostras da região de Arujá – SP. Foi observado que oito destas encontram-se infectadas pelo HdRSV. Dentre as infectadas foram selecionadas as provenientes das variedades Azul Rendado, Azul LZR, Renat Blue, Rosa Japonesa, Rosita e Vermelho Comum para análise da variabilidade genética do HdRSV no Brasil. Verificou-se que para a porção da replicase viral analisada, os isolados provenientes das variedades Azul LZR, Rosita, Renat Blue e Vermelho Comum não diferiram das seqüências de aminoácidos do HdRSV depositadas no GenBank (números de acesso AY 707100 e NC_006943), enquanto que as provenientes da Rosa Japonesa e Azul Rendado apresentaram pequenas variações.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ISOLATE OF *Hydrangea ringspot virus* COLLECTED FROM HYDRANGEA IN SÃO PAULO STATE.

Author: KAROLINA MARIE ALIX BENEDICTTE VAN SEBROECK DÓRIA

Adviser: RENATE KRAUSE-SAKATE

Co-adviser: Marcelo Agenor Pavan

2. SUMMARY

The hydrangea is an ornamental plant very appreciated in Brazil. In South of Brazil, this plant is used in projects for gardening in houses and highways. Hydrangea is the symbol of Gramado's city. In State of São Paulo this ornamental plant is commonly found in Campos do Jordão.

Hydrangea plants showing leaves with chlorotic and necrotic rings were observed by Yuki (2005) in material proceeding from Arujá, State of São Paulo. Chlorotic local lesions were observed on *Chenopodium quinoa* and *Gomphrena globosa*, after sap transmission, indicating infection caused by virus.

On electron microscope analysis, virus particles with 490 nm could be

visualized indicating infection by a potexvirus. In order to identify the species of virus infecting these plants, specific primers (Hyd_senso and Hyd_anti_senso) were designed for *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), a potexvirus commonly found infecting hydrangea in Europe and United States. Total RNA was extracted following Bertheau et al., 1998 protocol's and the primers were used in RT-PCR. Two fragments, one around 550bp and another one of 250 nucleotides were amplified and sequenced. An identity of nucleotide of 96% and 88%, respectively, was observed for HdRSV (number of access AJ 707100.1), indicating that both fragments amplified were from the virus. As the HdRSV is an exotic pest in Brazil, the occurrence was notified to the Ministry of Agriculture (MAPA) that gave us the permission for publication this data (process 21052.015361/2007-08).

To evaluate the dissemination of this virus in the matrices of hydrangea used in the commercial production in Brazil, 17 samples of the region of Arujá – SP were analysed for the presence of the virus. Eight of them were infected by virus, and the RT-PCR fragment from the varieties Azul Rendado, Azul LZR, Renat Blue, Rosa Japonesa, Rosita and Vermelho Comum were sequenced for analysis of the variability of the virus. In these region, the varieties Azul LZR, Rosita, Renat Blue and Vermelho Comum did not differ from the sequences of HdRSV deposited in the GenBank (access number AY 707100 and NC_006943). The fragment from “Rosa Japonesa” and “Azul Rendado” showed some differences in the aminoacid level.

Keywords: biological characterization, *Hydrangea macrophylla*, *Potexvirus*, RT-PCR, *Saxifragaceae*

3. INTRODUÇÃO

Dentre as plantas ornamentais muito apreciadas no Brasil destaca-se a hortênsia. A hortênsia pertence ao gênero *Hydrangea* (família *Saxifragaceae*). É um arbusto semi-lenhoso, originário da China e Japão, de 1 a 2,5 m de altura, de folhagem e florescimento decorativos. As folhas são denteadas, brilhantes e coriáceas e suas inflorescências são grandes, compactas, com numerosas flores estéreis de cor branca, rósea ou azul, contendo ocasionalmente algumas flores férteis (LORENZI e SOUZA, 2001).

No Brasil a família *Saxifragaceae* é representada pelas espécies ornamentais: *Astilbe x arendsii* Arends (pluma), *Bergenia crassifolia* Frisch (begônia - de - inverno), *Deutzia gracilis* Sieb&Zucc (deutzia - elegante), *Heuchera cylindrica* Douglas (pedra - hume - de - raiz), *Hydrangea arborencens* Linn (hortênsia - silvestre), *Hydrangea macrophylla* Ser. (hortênsia), *Hydrangea paniculata* Sieber (hortênsia - arbustiva), *Hydrangea quercifolia* Bartram (hortênsia - folha - de - carvalho), *Philadelphus caucasicus* Koehne (falso - jasmim), *Philadelphus coronarius* Linn (falso - jasmim, filadelfo) e *Tiarella cordifolia* Linn (flor - de - espuma) (LORENZI e SOUZA, 2001).

A hortênsia é cultivada em vasos ou a pleno sol e em solos alcalinos as

flores tornam-se róseas, enquanto em solos ácidos as flores tornam-se azuis. Costuma ser podada drasticamente no fim do inverno, para florescer na primavera e verão. Aprecia muito clima ameno (LORENZI e SOUZA, 2001).

Para a produção comercial da hortênsia, efetua-se a multiplicação mediante estacas de ponta de ramos podados no outono-inverno e cultivados em local protegido até enraizar. O período de enraizamento varia de 20 a 40 dias, sendo feito sob nebulização intermitente, normalmente em bandejas ou em sacos de polietileno contendo geralmente como substrato areia (ABRIL CULTURAL, 1988).

A propagação vegetativa proporciona inúmeros benefícios, dentre eles a conservação de características genotípicas, a possibilidade de disseminação de espécies com problemas de baixa fertilidade ou escassez de sementes (IRITANI & SOARES, 1983) a obtenção de plantas com características idênticas à planta mãe (GRAÇA & TAVARES, 2000) e, é uma alternativa para a produção de mudas em menor tempo e durante todo o ano (WENDLING & SOUZA JÚNIOR, 2003). Porém, uma desvantagem da produção via propagação vegetativa é a disseminação de patógenos, principalmente os vírus, para as plantas filhas.

Pelo menos quatro espécies de vírus são conhecidas infectando hortênsia em todo o mundo, porém nenhuma ainda foi relatada no Brasil. A primeira suspeita da ocorrência de vírus no Brasil foi levantada em 2005 em hortênsias da região de Arujá (YUKI et al., 2005). Este trabalho constará da identificação e caracterização deste vírus.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O Mercado Brasileiro de Flores e Plantas Ornamentais

A produção e comercialização de flores e plantas ornamentais no Brasil começou em escala comercial na década de 50 com imigrantes portugueses. Na década de 60 entraram neste mercado os imigrantes japoneses e finalmente os imigrantes holandeses, que no início da década de 70 deram um impulso maior à comercialização, implantando um sistema de distribuição pelo país inteiro. Até 1988 o mercado teve um crescimento limitado e uma atuação comercial baseada em centros regionais de comercialização tais como os CEASAS e empresas de distribuição que atendiam a todo o país. A partir de 1989 surgiu o Veiling Holambra que representou uma transformação substancial no mercado e acabou influenciando o comportamento e as práticas do setor (MOTOS, 2000).

O comércio brasileiro vive atualmente uma expansão da agrofloricultura. Pode-se verificar que somente nestes três últimos anos o Brasil exportou praticamente a metade do número de mudas exportadas entre 1996 a 2004, gerando uma renda de US\$ 42 milhões de dólares (Tabela 1). As exportações de flores e plantas ornamentais brasileiras conquistaram um novo recorde em 2007. As vendas do segmento atingiram a marca

de US\$ 35,28 milhões, resultado 9,18% superior ao de 2006. O grupo de produtos que mais se destacou em 2007 foi o de Mudanças de Plantas Ornamentais, que respondeu na média dos últimos cinco anos por 43,74% do total vendido no exterior e por 41,99% no ano de 2007, sendo que a segunda posição do ranking, logo após o crisântemo, ficou por conta do segmento de bulbos, tubérculos, rizomas e similares (JUNQUEIRA e PEETZ, 2007).

Tabela 1: Dados de exportação e importação de mudas de plantas ornamentais. Dados do site AliceWeb (<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>) *Dados excluem as orquídeas

Exportação			
Período	US\$ FOB	Peso Líquido(Kg)	Quantidade mudas
01/1989 a 12/1996	30.813.390	7.724.330*	-
01/1997 a 12/2004	52.690.716	7.593.746	2.185.618.31
01/2005 até 01/2008	42.387.367	3.499.544	1.132.286.211
Importação			
01/1989 a 12/1996	1.882.905	219.070*	-
01/1996 até 12/2004	7.683.285	259.320	32.292.768
01/2005 até 01/2008	2.322.019	53.743	9.602.974

A floricultura brasileira conseguiu expandir recentemente no mercado internacional, saltando do patamar de US\$10 milhões atingidos até 2001, para US\$35 milhões em 2007 em valores exportados (KIYUNA et al., 2008).

O consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil ainda não ultrapassa US\$ 7,00 por habitante/ano, valor 10 vezes menor do que a média europeia de consumo, estimada em US\$ 70 por habitante/ano. Na Noruega o consumo é de US\$ 143 por habitante/ano e, na Suíça, US\$ 170 por habitante/ano (FATOR BRASIL, 2007).

Acredita-se que setor de floricultura brasileira gera atualmente entre 120 mil empregos (entre diretos e indiretos, de acordo com o Sebrae) a 160 mil, caso seja considerada toda a cadeia produtiva que envolve o campo, a distribuição, o comércio varejista e os segmentos de apoio. Segundo a Ibraflor (Instituto Brasileiro de Floricultura), apenas no campo são 25 mil empregos diretos. Na média nacional, são gerados 3,8 empregos diretos por hectare de produção, sendo 81,3% de funcionários contratados e 18,7% dos empregos preenchidos por familiares dos produtores (FATOR BRASIL, 2007).

A produção brasileira de flores e plantas ornamentais ainda é muito

concentrada no estado de São Paulo (70%), mas tem se expandido para todos os estados brasileiros. Outros 25% da produção estão nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná. Os 5% restantes são registrados nos novos pólos que estão sendo criados nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (especialmente no Ceará), onde produtores de Holambra utilizam as terras para o cultivo de rosas para a exportação (SCHOENMAKER, 2007)

De acordo com Schoenmaker (2007), além de maior produtor, o Estado de São Paulo é, também, o maior consumidor e exportador de flores e de plantas ornamentais do Brasil. São Paulo responde por 40% do consumo brasileiro. Somente a capital absorve 25% do volume comercializado no Brasil. O restante abastece os demais estados, sendo o Paraná o principal importador. Portanto, ainda há espaço para ampliar o consumo interno, bem como a exportação e a produção (FATOR BRASIL, 2007).

Fundada em dezembro de 1981, a AFLORD (Associação dos Floricultores da região da Via Dutra) foi criada por Katsuya Araki com objetivo de reunir os diversos produtores que mantinham propriedades às margens da Via Dutra para trocar informações sobre cultivo, comercialização e padronização dos produtos, além de facilitar o acesso à assistência técnica. Hoje, a entidade é formada por 77 produtores das cidades de Taubaté, São José dos Campos, Jacareí, Guararema, Mogi das Cruzes, Biritiba Mirim, Santa Isabel, Guarulhos e Arujá.

4.2 Vírus associados à Hortênsia (*Hydrangea macrophylla*)

Existem pelo menos quatro espécies de vírus associadas a hortênsias. Dentre estes podemos citar duas espécies de vírus pertencentes à família *Flexiviridae*: o *Hydrangea latent virus*, HdLV e *Hydrangea ringspot virus*, HdRSV (ADAMS et al., 2005).

O HdLV foi descrito por Allen et al. (1985) nos Estados Unidos e pertence ao gênero *Carlavirus*. A partícula é formada por um capsídeo não envelopado, filamentosos e flexuosos com tamanho variando de 600 a 700 nm. O genoma é constituído de RNA de fita simples, senso positivo, que codifica seis fases abertas de leitura. A única hospedeira até então verificada como suscetível é a *Hydrangea macrophylla* (ALLEN et al., 1985).

O HdRSV pertence ao gênero *Potexvirus*, e foi descrito por Brierley (1954) e Brierley e Lorentz (1957). São vírus com partículas filamentosas com tamanho em torno de 490 nm. Assim como demais potexvirus, o HdRSV possui o CAP (7 metil guanosinas) no terminal 5' e uma cauda poli adenilada no terminal 3'. O genoma completo consiste em 6.185 nucleotídeos, excluindo a cauda poli A, e contém seis ORFs (open reading frames ou fases abertas de leitura) que codificam proteínas com 156, 26, 12, 8, 24 e 16 kDa, respectivamente. A ORF 1 dá origem a proteína de 156 kDa e é a codificadora para a replicase viral, a ORF 2, 3 e 4 (26 kDa, 12 kDa e 8 kDa respectivamente) correspondem ao “Triple Gene Block” (TGB 1, 2 e 3), que estão envolvidas no movimento do vírus na planta. A ORF 5 (24 kDa), codifica a proteína estrutural, ou seja, a capa protéica, enquanto que a ORF 6 (16 kDa) está inserida na ORF 5 e sua função ainda não está bem esclarecida (HUGHES et al., 2005).

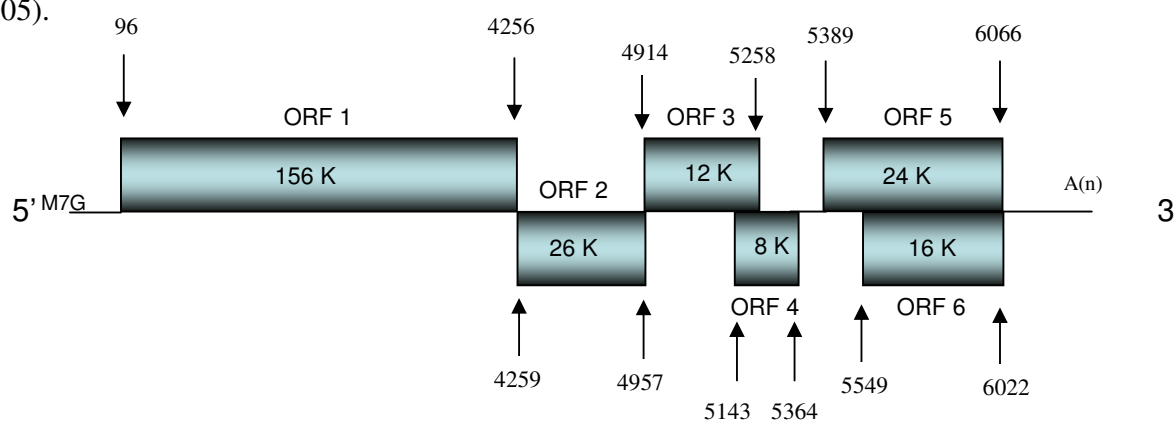


Figura 1: Organização genômica do *Hydrangea ringspot virus*. Adaptado de Hughes et al. (2005).

A replicação do material genético do HdRSV possivelmente utiliza a estratégia de produção de RNA subgenômicos, como pode ser observado para o *Potato virus X*, espécie tipo deste gênero de vírus (Figura 2). O RNA genômico viral é monocistrônico e no terminal 5'- próximo ao gene da RNA polimerase, é prontamente traduzido pelo ribossomo produzindo assim a RNA polimerase viral (150 – 181 kDa) (ADAMS, et al., 2005).

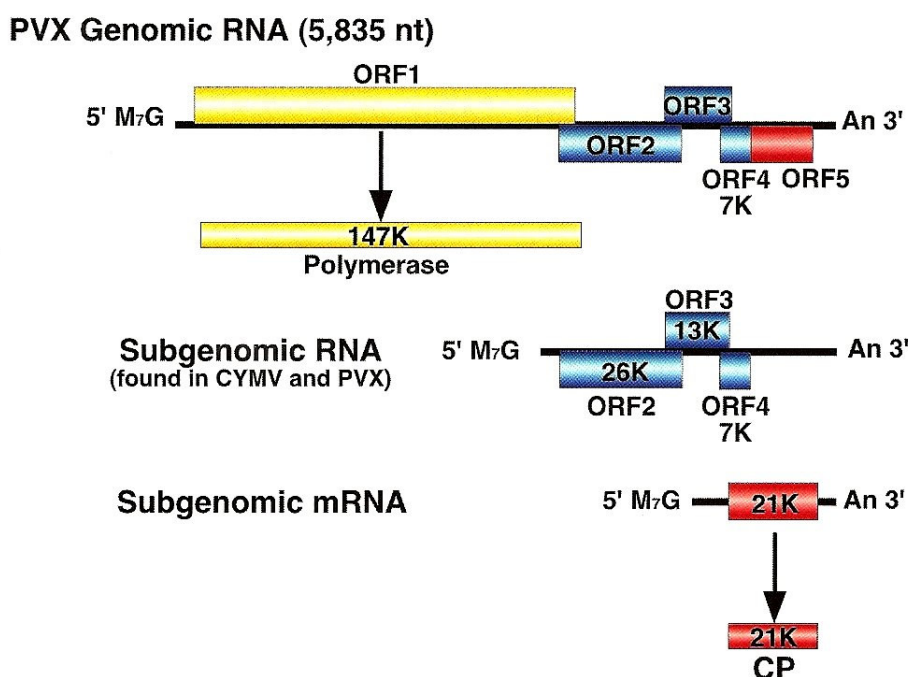


Figura 2. Representação esquemática da organização do genoma da espécie tipo do gênero *Potexvirus* (Retirado de Adams et al., 2005).

O HdRSV já foi relatado nos Estados Unidos, Europa e Nova Zelândia, mas provavelmente esteja em todas as áreas de cultivo da *Hydrangea macrophylla* (KOENIG, 1973). Segundo Adams et al. (2005), o vírus já foi identificado na Bélgica, Canadá, Eslováquia, Dinamarca, França, Alemanha, Irlanda, Itália, Nova Zelândia e Reino Unido, sendo a hortênsia hospedeira natural do vírus.

Experimentalmente, o vírus causa infecção em mais de 20 espécies de 12 famílias de dicotiledôneas e é transmitido por extrato vegetal a partir de plantas infectadas. Em *Gomphrena globosa*, causa lesões locais necróticas com bordas avermelhadas entre 3 a 5 dias após a inoculação. Em *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*, também aparecem lesões locais entre 5 a 7 dias (KOENIG, 1972). O HdRSV infecta sistemicamente a planta ornamental *Primula malacoides*, porém não foram observados sintomas nesta planta (HOLLINGS, 1958).

Não há o conhecimento da transmissão do vírus por vetor. Tentativas utilizando os vetores afídeos *Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae* falharam (HOLLINGS, 1958). Não há relato da transmissão por sementes (BRIERLEY E LORENTZ,

1957).

O HdRSV é fortemente imunogênico e apresenta relacionamento sorológico distante com o *Potato virus X*, *Cactus virus X*, *White clover mosaic virus* e *Clover yellow mosaic virus* (KOENIG, 1973).

A hortênsia ainda pode ser infectada pelo *Hydrangea mosaic virus*, HdMV, observado pela primeira vez por Thomas et al. (1983) no Reino Unido. Essa espécie pertence ao gênero *Ilarvirus*, família *Bromoviridae*. O vírion consiste de um capsídeo, isométrico com diâmetro de 28-30 nm. O genoma é segmentado, tripartido e constituído de cinco segmentos lineares de RNA de fita simples, senso positivo. Podem existir RNA subgenômicos. O genoma completo contém 12.225 nucleotídeos. O RNA 1 contém 4.032 nucleotídeos. O RNA 2 apresenta 3.484 nucleotídeos. O RNA 3 é estimado em 2.677 nucleotídeos. Uma estimativa para o RNA 4 é de que ele contenha 1.161 nucleotídeos. O RNA 4 é um mRNA derivado do RNA 3, que no sentido negativo codifica o RNA 5 com 871 nucleotídeos (BRUNT et al., 1996).

O *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) também é capaz de infectar a hortênsia. Allen et al. (1985) observaram em hortênsia (*Hydrangea macrophylla*) da variedade “Imaculata” que assim como o HdRSV, o TSWV também causa sintomas de anéis circulares. A *Gomphrena globosa*, que é a espécie indicadora mais utilizada para a detecção do HdRSV, também desenvolve lesões locais quando inoculada com o TSWV.

5. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi de identificar a espécie viral presente nas amostras de hortênsias fornecidas pelo Dr. Valdir A. Yuki do Instituto Agronômico de Campinas, IAC, realizar a caracterização biológica, a caracterização molecular parcial por meio do sequenciamento da região codificadora para a replicase viral e avaliar a incidência do vírus nas matrizes utilizadas para a produção comercial.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Localização experimental

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de Virologia, localizado no Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP em Botucatu.

6.2 Obtenção dos isolados virais

A amostra inicialmente estudada e caracterizada foi proveniente de hortênsia variedade Renat Blue (*Hydrangea macrophylla*) exibindo sintomas típicos de anéis circulares cloróticos à marrom provenientes de Arujá – SP. O isolado foi denominado de HdRSV-RB. Para a preservação deste vírus, realizou-se a desidratação do tecido foliar com sintomas, cortando as folhas em tiras finas e colocando-as em frascos na presença de cloreto de cálcio anidro. Também foram coletadas amostras de diferentes matrizes de hortênsia na

região de Arujá-SP utilizadas na produção comercial de mudas (Tabela 2).

Tabela 2 – Amostras coletadas e sua proveniência no Brasil.

Variedade	Origem Brasil
Azul LZR	AFLORD
Azul Rendado	AFLORD
Branco com Renda	AFLORD
Branco Comum	AFLORD
Elbtal	FLOREMA
Esconia	AFLORD
Kumiko	AFLORD
Lav-Bla	AFLORD
Leuch	FLOREMA
Leuch	AFLORD
LK-49	AFLORD
Red Baron	FLOREMA
Renat Blue	AFLORD
Renata Stuniger	FLOREMA
Rosa Japonesa	AFLORD
Rosita	AFLORD
Vermelho Comum	AFLORD

Para os experimentos de transmissão via extrato vegetal as folhas foram maceradas (1:3 peso/volume) em almofariz com tampão de inoculação Fosfato 0,05 M pH 7,0 contendo 0,01M de Sulfito de sódio, utilizando-se como abrasivo o carborundum 600 mesh. Após a inoculação as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de inóculo e abrasivo.

6.3 Determinação do círculo de hospedeiros

Foram avaliadas a transmissão do isolado HdRSV-RB para hospedeiras pertencentes às famílias *Amaranthaceae*: *Gomphrena globosa*, *Chenopodiaceae*: *Chenopodium quinoa*, *C. amaranthicolor* e *C. murale*, *Primulaceae*: *Primula malacoides*, e *Solanaceae*: *Nicandra physaloides*, *Nicotiana clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. tabacum* 'Havana', e *N. tabacum* 'Turkish'.

Estas plantas testes foram obtidas através da semeadura em vasos com capacidade de 3 litros. O solo foi constituído de uma mistura de três partes de terra, uma de areia e uma de esterco de curral curtido, autoclavado a 121°C por 2 horas. Após a germinação foi realizado o transplante, deixando 2 plantas em cada um dos 5 vasos utilizados. Todas as plantas foram inoculadas via extrato vegetal com o HdRSV-RB extraído de hortênsia que apresentava lesões circulares cloróticas, ou necróticas. A infecção foi avaliada por meio de análise visual dos sintomas e por RT-PCR.

6.4 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica foi empregada para a observação das partículas virais em folhas de hortênsia com sintomas de infecção viral, e também para monitorar o processo de purificação do HdRSV-RB. Para análise das amostras foi utilizada a técnica de “leaf dip” descrita por Kitajima (1965).

O tecido vegetal foi macerado em tampão fosfato 0,05M contendo 0,01M de sulfato de sódio, pH 7,0 e utilizou-se uma gota da suspensão (seja do macerado ou do purificado do viral) que foi colocada sobre parafilme. Sobre a gota foi depositada uma grade de cobre (300 mesh) previamente coberta por uma película fina de formvar e tratada com carbono. Após 5 minutos, a telinha foi lavada em água destilada, três vezes consecutivas, e foi contrastada com solução de acetato de uranila a 3% durante 1 minuto. As observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico Phyllips CM 100 do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP-Botucatu.

6.5 Purificação do Vírus

Foram utilizados dois protocolos para a purificação do HdRSV-RB, que foram feitas a partir de folhas de *C. quinoa* aos 21 dias após a inoculação via extrato vegetal.

Protocolo 1 – Descrito para *Narcissus mosaic virus* (KENDALL et al., 2007)

As folhas (100 g) foram refrigeradas de um dia para o outro na geladeira. Estas foram maceradas em tampão 70mM de fosfato de sódio + 0,01M EDTA pH7,0, adicionados de 10mM de β - mercaptoetanol. O macerado foi filtrado em fralda e mensurado seu volume. Foi adicionado à solução igual volume de clorofórmio. A suspensão foi agitada durante 1 minuto, seguido de uma centrifugação a 1.700 g (rotor 70 Ti – Beckman) por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e submetido a uma ultra centrifugação a 87.000 g (rotor 70 Ti – Beckman) por 1h30min. O “péllet” foi ressuspendido no tampão de extração (70mM de fosfato de sódio + 0,01M EDTA pH7,0) na proporção de 0,2ml/g de tecido. Essa suspensão permaneceu em repouso durante a noite na geladeira. No dia seguinte, foi centrifugada a 9.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 9.000 g por 10 minutos. O sobrenadante final foi novamente ultracentrifugado a 87.000 g (rotor 70 Ti – Beckman) por 1h30min. O “péllet” foi ressuspendido no tampão 70mM de fosfato de sódio + 0,01M EDTA pH7,0. Uma almofada de sacarose à 30% (dissolvida em tampão borato 50mM pH 8,2) foi preparada e o sobrenadante novamente ultracentrifugado à 63.000 g (rotor 70 Ti – Beckman) por 3 horas. O “péllet” foi ressuspendido em tampão 10mM Tris – HCl + 5 mM EDTA pH 8,0 durante uma noite.

Protocolo 2: Combinação de diferentes protocolos para purificação do PVX.

O procedimento utilizado foi baseado em alguns protocolos de purificação do PVX. Cento e vinte gramas de folhas de *C. quinoa* infectadas com o HdRSV-RB foram trituradas em 200 ml de tampão 0,5 M de ácido bórico e ajustado o pH a 7,8 com NaOH. O extrato foi filtrado em gaze, obtendo-se um volume de 266ml. O pH da solução foi ajustado a 6,5. Adicionou-se 0,2% (0,532 g) de ácido ascórbico e 0,2% (0,532 g) de sulfato de sódio. Centrifugou-se a 8.000 rpm por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 0,2% de Triton X-100, agitando-se por uma hora seguido de centrifugação a 9.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido (230 ml) e adicionou-se 6% de n-butanol (13,5 ml), mantendo-se em agitação por 45 minutos. Centrifugou-se a 9.500 rpm por 10 minutos. Recuperou-se o sobrenadante (228 ml) e o vírus foi precipitado utilizando-se PEG 8000 a uma concentração final de 8% (18,24 g), na presença de 2% de NaCl (4,46 g), mantendo a mistura em agitação constante a 4°C por 60 minutos. Centrifugou-se a 9.500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuscitado em tampão 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8,0), adicionando-se 20 mL do tampão por tubo (2 tubos: 40 ml), mantendo-se a 4°C durante uma noite. Na manhã seguinte, o “pellet” foi ressuscitado utilizando-se uma pipeta. Adicionou-se ¼ do volume (10 ml) de clorofórmio, seguido de centrifugação a 9.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado para não misturar com a fase orgânica. Centrifugou-se a 27.500 rpm por 70 minutos. O “pellet” foi ressuscitado adicionando-se 1 mL de tampão 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0) por tubo. Os tubos foram mantidos a 4°C por toda a noite. Após a ressuspensão, centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante. Todas as centrifugações foram realizadas no rotor 70 Ti (Beckman).

A integridade das partículas virais foi avaliada ao microscópio eletrônico de transmissão, conforme já descrito. A absorvância na faixa de 230 a 320 nm foi medida utilizando-se o aparelho Nanodrop e a concentração viral foi determinada utilizando-se a fórmula: $\text{Concentração} = \text{Absorvância}_{260\text{nm}} \times \text{diluição} / E^{0.1\%}_{\text{cm},260}$ onde $E^{0.1\%}_{\text{cm},260}$ = coeficiente de Extinção. O coeficiente de extinção utilizado foi de 2,97 descrito para o PVX (NOORDAM, 1973). Os purificados foram armazenados a -20°C.

6.6 Produção de Antissoro

Para a produção de anticorpos policlonais para o *Hydrangea ringspot virus* foram utilizadas duas coelhas da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 4 meses de idade, seguindo a metodologia descrita por Bezerra et al. (1995), com modificações. Para a primeira injeção, purificado viral obtido por ambos os protocolos descritos no item 5 foi emulsificado a 1:1 (v/v) com adjuvante completo de Freund (marca Sigma). Para as demais injeções posteriores o purificado viral foi emulsificado a 1:1 (v/v) no Adjuvante incompleto de Freund (marca Sigma). Foram administradas no total cinco injeções (0,2 mg) intramusculares no coelho, com intervalo semanal, para um total de 1 mg de vírus.

O sangue foi coletado 10 dias após a última injeção através de cortes feitos na veia marginal da orelha do coelho. A amostra de sangue coletada foi coagulada a 4°C por 12 horas, seguida de uma centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, para a obtenção do soro sangüíneo. O soro obtido foi novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e transferido para microtubos (1,5 ml), os quais foram etiquetados e armazenados a -20°C.

6.7 PTA-ELISA

O teste de “Enzyme Linked Immunosobent Assay”(ELISA) do tipo “Plate Trapped Antigen”(PTA) descrito por Mowat e Dawson (1987), com algumas modificações, foi realizado para avaliação do anti-soro obtido. As amostras foram maceradas em presença do tampão carbonato (0,015M de Na₂CO₃, 0,035M NaHCO₃, pH 9,6) na diluição 1:20, sendo então aplicados 100µl de cada amostra por pocinho na placa de ELISA. Foram utilizados quatro pocinhos por amostra. As amostras foram incubadas por 1,5 h a 37°C, seguida de três lavagens sucessivas com PBS-Tween (0,015M KH₂PO₄, 0,14M NaCl, 0,004M Na₂HPO₄, 0,003M KCl, pH 7,4 acrescido de 0,5 ml de Tween 20%). Após as lavagens, 100 µl do anti-soro específico para o HdRSV, diluído 1:150 em tampão Tris-HCl pH 7,2 (0,20M Tris-HCl; 0,15M NaCl) foram aplicados em cada pocinho. A placa foi novamente incubada a 37°C por 1,5 h, sendo posteriormente lavada 3 vezes consecutivas com PBS-Tween. Após, foram aplicados 100 µl/pocinho de Imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina diluída

em tampão Tris-HCl pH 7,2 e incubadas por 1,5 horas, seguido de lavagem com tampão PBS-Tween. Adicionou-se 100 µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (Marca Sigma), diluído em tampão dietanolamida pH 9,8. A placa foi incubada em temperatura ambiente, no escuro e as leituras feitas após uma hora em leitor de ELISA da marca Multiskan Plus (Version 2.03), com filtro de 405nm. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor de absorbância apresentou-se maior do que três vezes a média de absorbância do controle negativo.

Para a adsorção do anti-soro ao tecido de planta sadia (*C. quinoa* sadia) folhas de plantas de *C. quinoa* sadias foram maceradas em tampão 0,2 M Tris-HCl pH 7,2 na proporção 1/10 (p/v). O extrato obtido foi filtrado e acrescentou-se o anti-soro, na diluição 1:10 (anti-soro/extrato de planta). Na etapa do PTA-ELISA que consiste na adição do anti-soro, testou-se as diluições do anti-soro adsorvido diluído em tampão Tris-HCl pH 7,2 nas proporções 1:50, 1:150, 1:450, 1:1:600, 1:750, 1:1200, 1:1800 e 1:2000.

6.8 Determinação do Peso Molecular da Proteína Capsidial

O peso molecular da proteína capsidial (CP) do vírus foi estimado através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. As proteínas dos purificados virais foram extraídas em tampão de dissociação (Tris 0,5 M pH 6,8, SDS 3,8 %, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 19%) na proporção de 1:1 (15 µl de purificado viral para 15 µl do tampão). As amostras foram incubadas em água fervente por 5 minutos para dissociação completa das proteínas, seguida de incubação no gelo por 5 minutos.

As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de separação foi composto de 12,5%, água destilada, Tris 1,5M, pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,05 % e TEMED (3,5 µl). O gel de empilhamento foi composto por acrilamida 4%, água destilada, Tris 1,0M, pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfato de amônio 0,076% e TEMED (3,5 µl). Cada canaleta do gel recebeu 10 µl da amostra a ser analisada. Foi utilizado marcador com peso molecular na faixa de 6.0 a 181.8 KDa (BenchMarktm Pré - Stained Protein Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 90 volts, 60 mA, até a linha frontal do azul de bromofenol atingir o gel separador, em seguida a voltagem foi elevada para 120 volts. A corrida foi interrompida quando as amostras chegaram na base do gel.

O gel foi corado com solução contendo Comassie Brilliant Blue R 250 (0,1g), álcool metílico (45ml), ácido acético glacial (10 ml) e água destilada (45 ml), por um tempo de 30 minutos, em agitação orbital. Em seguida, foi descorado por duas horas com a solução descorante que continha álcool metílico (400 ml), ácido acético glacial (100 ml) água destilada (1500 ml).

6.9 Extração do RNA Total

A extração do RNA total foi realizada segundo Bertheau et al. (1998). As amostras foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS – Tween contendo PVP K25 a 2% (p/v) e Na-DIECA 20 mM. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm em tubos de microcentrífuga a 4°C (Centrífuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se 20 µl de SDS 10%. Os tubos foram incubados a 55°C por 15 minutos, adicionando-se 100 µl de solução de acetato de potássio a 3M e agitando-se bem. Seguiu-se a incubação no gelo por 5 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm (4°C), transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo, em que foi adicionados 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de solução contendo silício, previamente agitada para que o silício fosse ressuspendido. Agitou-se bem o microtubo. Em seguida a solução foi centrifugada por 1 minuto a 5.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o “pellet” duas vezes com 500 µl de solução de lavagem (Tris – HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto), seguida de centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm para cada lavagem. Posteriormente secou-se o “pellet” a vácuo (Speed Vaccum Eppendorf Concentrator 5301) e ressuspendeu-se o RNA em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C, seguido de centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C.

Também foi realizada a extração do RNA total pelo Kit, “Total RNA Purification Kit”, da Norgen Biotek Coporation – Canadá. Cinquenta miligramas de tecido com sintomas foram triturados na presença de nitrogênio líquido e em seguida adicionados 600 µl da solução de lise. Essa solução foi centrifugada por dois minutos à 10.000rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Em seguida, mediu-se o

volume transferido. A esse volume foi adicionado igual volume de etanol 70%. Agitou-se bem. Foram adicionados 600 µl do clarificado à colunas contendo resina e em seguida centrifugado à 10.000 rpm por um minuto. Esta etapa foi repetida até que todo o conteúdo passasse pelas colunas. Adicionou-se então, 400 µl de solução de lavagem seguido de uma centrifugação de um minuto. Repetiu-se a lavagem por duas vezes subsequentes. A coluna foi colocada em microtubo e adicionado 50 µl de Tampão de eluição. Centrifugou-se por dois minutos à 2.000 rpm e por um minuto à 14.000 rpm. O RNA foi armazenado em ultra freezer à -80 °C.

6.10 Detecção do vírus por RT-PCR

Para a detecção molecular do vírus foi utilizada a técnica de transcrição reversa e reação de polimerase em cadeia (RT-PCR) em uma só etapa.

Para isto foram desenhados oligonucleotídeos específicos para o HdRSV, baseando-se em três seqüências de HdRSV disponíveis no Banco de Dados Genbank e depositadas com os seguintes números de acessos: *Hydrangea ringspot virus*, (NC_006943), isolado PD 109 proveniente da Holanda; *Hydrangea ringspot virus partial RdRP gene for putative RNA - directed RNA polymerase, genomic RNA* (AJ550524.1), seqüência proveniente da Itália e *Hydrangea ringspot virus (partial) gene for RNA dependent RNA polymerase (RdRP)* (AJ270987.1), também da Holanda. Os alinhamentos foram realizados com o auxílio do programa Clustal W.

Após o alinhamento, os oligonucleotídeos desenhados para esta espécie viral foram: Hyd_senso 3098 (5' GGA GAC AAT CAA GGC TAG GC 3') e Hyd_anti_senso 3634 (5' TGG GAT TGG TCG AAG GCG G 3'). Desta forma, o fragmento amplificado possui 536 nucleotídeos e amplifica parte da porção codificadora para a replicase viral do HdRSV (Figura 3).

	Hyd_senso	
HdRSV-NC_006943	GGAGACAATCAAGGCTAGGC	50
HdRSV-AJ_270987	GGAGACAATCAAGGCTAGGC	50
HdRSV-AJ_550524	GGAGACAATCAAGGCTAGGC	50

HdRSV-NC_006943	AGGAGTTCTATAAGAAGAAGGACATCGGGGACATCCTCTGGCTGCACTAC	100
HdRSV-AJ_270987	AGGAGTTCTACAAGAAAAAGGACATCGGGGACATCCTCTGGCTGCACTAC	100
HdRSV-AJ_550524	AGGAGTTCTACAAGAGAAGGACATCGGGGACATCCTTTGGCTGCACTAC	100

HdRSV-NC_006943	AAGAAGGCTATGACCCCTCCAGAGGAGCCACTTCCCTTCTCAGAGGATCT	150
HdRSV-AJ_270987	AAGAAGGCTATGACCCCTCCAGAGGAGCCACTTCCCTTCTCAGAGGATCT	150
HdRSV-AJ_550524	AAGAAGGCCATGACCCCTCCGAGGAGCCACTTCCCTTCTCAGAGGATCT	150

HdRSV-NC_006943	CTGGAGACTGTCCGCGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCTA	200
HdRSV-AJ_270987	CTGGAGACTGTCCGCGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCTA	200
HdRSV-AJ_550524	CTGGAGACTGTCCGCGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCTA	200

HdRSV-NC_006943	TGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGGACTTCGAGAAG	250
HdRSV-AJ_270987	TGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGGACTTCGAAAAG	250
HdRSV-AJ_550524	TGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGGACTTCGAGAAG	250

HdRSV-NC_006943	CACCAGATCTTACTCTTCTCAAGTCGCAGTGGGTGAAAAAGATGGAGAA	300
HdRSV-AJ_270987	CACCAAATCTTGCTCTTCTCAAGTCACAGTGGGTGAAAGAAAATGGAGAA	300
HdRSV-AJ_550524	CACCAAATCTTGCTCTTCTCAAGTCACAGTGGGTGAAAGAAGATGGAGAA	300

HdRSV-NC_006943	GCTAGGCGGACCTAAAATTAAGGCTGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAAC	350
HdRSV-AJ_270987	GCTAGGCGGACCCAAAATCAAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAAC	350
HdRSV-AJ_550524	GCTAGGCGGACCCAAAATCAAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAAC	350

HdRSV-NC_006943	AACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATGGCCAGGTACATGAGGAGGTTTC	400
HdRSV-AJ_270987	AACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATGGCCAGGTACATGAGGAGGTTTC	400
HdRSV-AJ_550524	AACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATGGCCAGGTACATGAGAAGGTTTC	400

HdRSV-NC_006943	CGGGAAGCCTTGGGCCAAACCACATCAAGATCAACTGCGAGGCCACCCC	450
HdRSV-AJ_270987	CGGGAAGCCTTGGGCCAAACCACATCAAGATCAACTGCGAGGCCACCCC	450
HdRSV-AJ_550524	CGGGAAGCCTTGGGCCAAACCACATCAAGATCAACTGCGAGGCCACCCC	450

HdRSV-NC_006943	AAAGGACCTTCCCGCTTTATCCAAAACACTACTGGGACTTCAAGCCAGCGT	500
HdRSV-AJ_270987	AAAGGACCTTCCCGCTTTATCCAAAACACTACTGGGACTTCAAGCCAGCGT	500
HdRSV-AJ_550524	ACAGGATCTCTCCCGCTTTGTCCAAAACACTACTGGGACTTCAAGCCAGCGT	500
	* **** * *	
HdRSV-NC_006943	CCTACGTAATGACTTCA	536
HdRSV-AJ_270987	CCTACGTAATGACTTCA	536
HdRSV-AJ_550524	CCTACGTAACGACTTCA	536

	Hyd_anti_senso	

Figura 3: Alinhamento de nucleotídeos realizado com o programa Clustal w (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) entre seqüências de HdRSV depositadas no Genbank. O número de acesso de cada seqüência esta especificada na frente de seu nome. Em verde a região de anelamento dos primers Hyd_senso e Hyd_anti_senso.

A RT-PCR com os oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso foi efetuada em volume de 25 μ l, utilizando-se 2,5 μ l de tampão da enzima 10 X (Tris – HCl 100mM, pH 8,3 e KCl 500mM); 3,5mM de MgCl₂; 0,17% de Triton X-100; 1mM de cada oligonucleotídeo; 0,25 mM de dNTPs; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase; 0,75 U da transcriptase reversa AMV (*Avian myeloblastosis virus*); 2,5 μ l de RNA molde e quantidade suficiente de água DEPC para completar 25 μ l. A condição da RT-PCR foi realizada a 42°C por 30 minutos, desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, 40 ciclos de anelamento a 52°C por 1 minuto, 40 ciclos de polimerização a 72 °C por 1 minuto e polimerização final a 72 °C por 10 minutos.

O produto da RT-PCR (5 μ l), juntamente com o marcador molecular foi visualizado em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5 X (0,1 M de Ácido Bórico; 0,02 mM EDTA pH 8,3) corado com 0,1 μ l/ml de Brometo de Etídeo. Controles positivo, negativo e branco (reação de RT-PCR com água substituindo o RNA molde) foram incluídos na reação de PCR a fim de validar e confirmar a especificidade do método utilizado.

6.11 Purificação do produto de RT-PCR

Aproximadamente 100 μ l do produto obtido no RT-PCR foi purificado extraindo-se a banda do gel de agarose. Para esta etapa de purificação utilizou-se o kit Wizard SV Gel and PCR Clean – Up System (Promega), conforme descrito pelo fabricante. Para isto a porção do gel contendo o fragmento de DNA foi pesada e colocada em microtubos de 1,5 ml de capacidade, e adicionado igual volume da “Membrane Biding Solution”. Esse produto permaneceu em banho-maria (60°C) até dissolução completa do gel (nunca deixando ultrapassar 15 minutos). Essa solução foi colocada em uma coluna contendo resina e incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida foi centrifugada a 14.000 rpm por um minuto. Foi adicionada à coluna 700 μ l de “Membrane Wash Solution” com posterior centrifugação a 14.000 rpm por um minuto. Novamente adicionou-se 500 μ l de “Membrane Wash Solution” com posterior centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos. A coluna foi submetida a mais uma centrifugação por 1 minuto e, transferida para um novo microtubo e o dsDNA foi eluído com 30 μ l de água livre de RNases. O dsDNA purificado foi quantificado e

visualizado em gel de agarose a 1%. As amostras foram armazenadas a -20°C até a realização dos procedimentos de sequenciamento.

6.12 Preparo de Células Competentes de *Escherichia coli*

Para a etapa de clonagem prepararam-se células competentes de *E. coli* estirpe XL1 para serem eletroporadas com o plasmídeo contendo o inserto. Para isto, foi preparada em meio SOB (sem magnésio) uma pré cultura de 5 ml de células de *E. coli* XL 1 preservadas a -80°C. Esta pré-cultura foi deixada durante a noite a 37°C sob agitação constante. No dia posterior, a pré-cultura foi utilizada para inocular 500 ml de meio SOB e incubada a 37°C sob agitação até atingir a densidade ótica de 0.750 D₅₅₀. A suspensão foi coletada em tubos falcon e centrifugada a 2.600 g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o “pellet” foi ressuscitado em glicerol 10% (gelado) e centrifugado novamente a 2.600 g por 15 minutos a 4°C. Mais uma etapa de ressuspensão em glicerol 10% foi realizada e em seguida o excesso de líquido foi retirado dos tubos de centrifuga e o “pellet” ressuscitado com algumas gotas de glicerol 10% e a OD₅₅₀ ajustada a 200-250 unidades/ml. Aliquotas de 80 µl foram armazenadas em microtubos a -80°C até o momento de serem eletroporadas.

6.13 Clonagem e Sequenciamento

Os fragmentos obtidos por RT-PCR de um isolado de HdRSV proveniente da variedade Renat blue foram clonados em vetor comercial pGEM Easy (Promega). Para isto, o produto de RT-PCR foi purificado, utilizando-se os kits comerciais Wizard SV Gel Extration System (Invitrogen) que eliminam restos de oligonucleotídeos não incorporados e em seguida ligado ao vetor pGEM Easy durante uma noite a 4°C, conforme as descrições do fabricante.

Após a etapa da ligação do fragmento ao vetor, este foi eletroporado em células electrocompetentes de *Escherichia coli* utilizando-se o eletroporador BIO-RAD Micropulser. As células de *E. coli* eletroporadas, foram plaqueadas em meio de cultura LBroth Agar contendo ampicilina (concentração de 100 µg/ml), X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactoside) a 2%, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside) a 100 mM.

A presença de plasmídeos recombinantes foi analisada pela técnica de lise alcalina, seguida de análise por restrição enzimática utilizando-se a enzima *EcoRI*. Para isto colônias isoladas de coloração branca foram selecionadas e transferidas para meio LBroth contendo ampicilina a 100µg/ml. Após o crescimento as bactérias foram colocadas em microtubos e precipitadas por 2 minutos a 13000 rpm. Posteriormente foi adicionado 100 µl de solução Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, Glicose 1 M, misturando-se até homogeneizar e mantendo-se por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 200 µl de solução de NaOH 0,2 N e SDS 1% e agitou-se 15 vezes por inversão, mantendo-se por 5 minutos no gelo. Após adicionou-se 150 µl de solução de Acetato de Potássio 3M/5M pH 4,8, agitando-se 10 vezes por inversão e mantendo-se por 5 minutos no gelo. Seguiu-se uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C, transferindo-se o sobrenadante para novos microtubos. Adicionou-se 300 µl de isopropanol, misturando-se bem e centrifugando a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µl de etanol 70% ao “pellet”, centrifugando-se por 1 minuto a 12.000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” secado a vácuo. Após a secagem este foi ressuscitado em 20 µl de água ultra pura autoclavada contendo RNase.

Após a extração dos plasmídeos realizou-se digestão com enzima de restrição *Eco RI*. Na reação de clivagem foram utilizados 6,7 µl de água; 1 µl de tampão 10 X (React 3); 2 µl do miniprep; 0,3 µl de Eco RI (1U/ml), totalizando dessa forma 10 µl de reação. Essa reação foi incubada durante uma hora à 37°C e a presença ou ausência do inserto verificado através de eletroforese em gel de agarose a 0,9%.

As amostras que foram selecionadas para o sequenciamento do gene que codifica a replicase viral foram: Azul LZR, Azul rendado, Renat blue, Rosa Japonesa, Rosita e Vermelho comum.

6.14 Análise das seqüências obtidas

As seqüências obtidas a partir do plasmídeo recombinante ou produtos de PCR foram analisadas utilizando-se os programas BLASTn (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para comparação com demais seqüências disponíveis no Genbank. As análises filogenéticas foram realizadas com a versão 3.1 do programa Mega (Kumar et al., 2004). Como “outgroups” foram utilizadas as seqüências correspondentes dos vírus *Narcissus mosaic virus* (NC_001441) e *Lilly virus X* (NC_007192).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Identificação do HdRSV em hortênsias no Brasil

A partir de plantas de hortênsias da variedade Renat Blue, apresentando sintomas de anéis cloróticos e necróticos nas folhas (Figura 4 A e 4B), foram amplificados dois fragmentos em torno de 250 e 550 pares de bases (Figura 5). O fragmento em torno de 550 bps, na região codificadora para a replicase viral era esperado para os oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso. Para comprovação da identidade viral, ambos fragmentos foram clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e seqüenciados. A identidade de seqüência de nucleotídeos do fragmento de tamanho em torno de 550bp foi de 96 % com a seqüência para o HdRSV (número de acesso AJ 707100), enquanto que os 149 nucleotídeos do segundo fragmento também se anelaram na região codificadora para a replicase viral (ORF 1) do HdRSV (número de acesso AJ 707100), apresentando identidade de nucleotídeos de 88%. Estes resultados indicaram que ambos fragmentos são de origem viral e que o par de oligonucleotídeos é capaz de anelar em duas regiões distintas da replicase viral do HdRSV.

Como se tratou da primeira constatação do HdRSV no Brasil, foi

efetuada a notificação de praga exótica ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), número do processo 21052.015361/2007-08, obtendo-se um parecer favorável para publicação destas informações.

Para avaliar a ocorrência deste vírus nas matrizes de hortênsias hoje utilizadas na produção comercial desta espécie, foram avaliadas 17 matrizes provenientes da região de Arujá, São Paulo, pertencentes à AFLORD e de Mogi Guaçu pertencentes a FLOREMA. Foram encontradas amostras positivas para o HdRSV nas seguintes matrizes: Azul LZR, Azul rendado, Renat blue, Rosa japonesa, Rosita, Vermelho comum (todas pertencentes à AFLORD), e nas matrizes Renata Stuniger e Elbtal (da FLOREMA), como pode ser observado na Figura 6.

Os sintomas observados nas variedades foram desde a presença dos anéis cloróticos, que em alguns casos evoluíram para anéis necróticos (Azul rendado, Azul LZR, Elbtal, Renat blue, Renata Stuniger, Rosa japonesa, Rosita e Vermelho comum). As demais variedades (Branco com renda, Branco comum, Esconia, Kumiko, Lav-bla, Leuch, LK-49 e Red baron) não apresentavam nenhum tipo de sintoma e foram negativas para a presença do HdRSV por RT-PCR.



Figura 4 – Sintomas de infecção pelo HdRSV em hortênsias da variedade Renat blue (A e B).

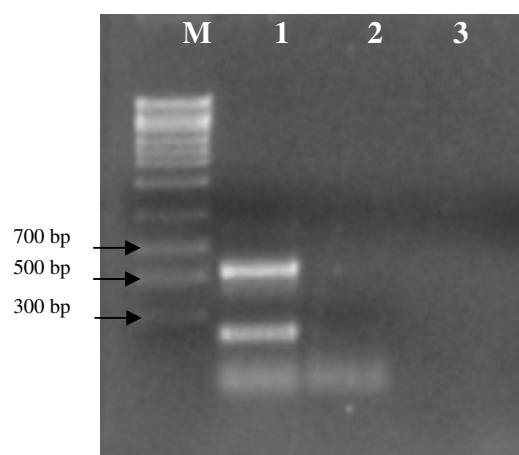


Figura 5: Perfil eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8 %. M: Marcador Molecular HighRanger 1Kb DNA Ladder, Marca Norgen; 1: Renat blue sintomática; 2: Hortênsia Sadia – Variedade desconhecida; 3: controle negativo água.

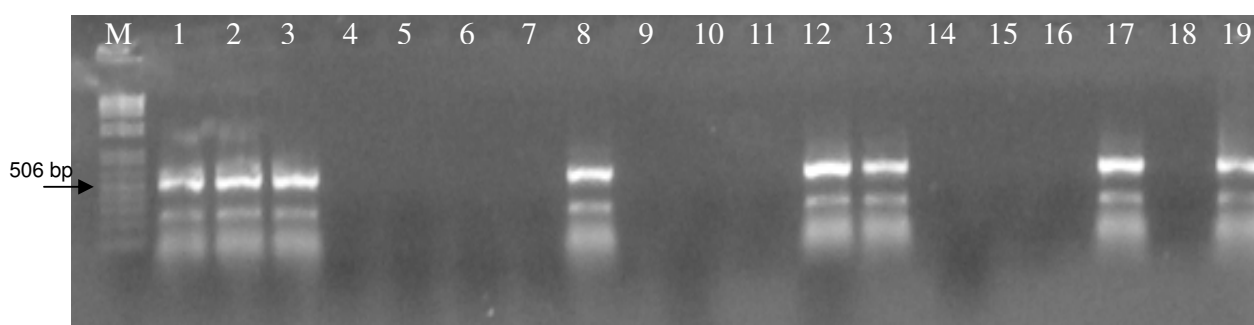


Figura 6. Padrão eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8%. M – Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Marca Invitrogen); 1: Hortênsia variedade Azul rendado; 2: Hortênsia var. Azul LZR; 3: Hortênsia var. Rosita; 4: Hortênsia var. “Leuch”; 5: Hortênsia var. LK-49; 6: Hortênsia var. Esconia; 7: Hortênsia var. Branco com renda; 8: Hortênsia var. Vermelho comum; 9: Hortênsia var. Kumiko; 10: Hortênsia var. Branco comum; 11: Hortênsia var. Lav-bla; 12: Hortênsia var. Renat blue; 13: Hortênsia var. Rosa Japonesa; 14: Hortênsia var. Elbtal; 15: Hortênsia var. Leuch; 16: Hortênsia var. Red Baron; 17: Hortênsia var. Renata Stuniger; 18: Controle negativo água; 19: Hortênsia var. Renat Blue infectada.

7.2. Avaliação da gama de hospedeiros do isolado HdRSV-RB

Diferentes espécies vegetais foram inoculadas com extrato vegetal de hortênsia variedade Renat Blue infectada pelo HdRSV (isolado HdRSV-RB) sob condições de casa de vegetação, com variações termais de 9°C (mínima) até o máximo de 28°C. Foram observados sintomas de lesão local em *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. murale* (Figuras 7A, B, C, respectivamente) e *G. globosa* (Figura 8). Em *Primula malacoides*, foi observado um leve clareamento das nervuras, aos 40 dias após a inoculação (Figura 9). Em *Nicandra physaloides* foi observado um leve amarelecimento das folhas mais velhas aos 8 dias após a inoculação (Figura 10). Não foram observados sintomas em: *N. clevelandii*, *N. tabacum* “Havana”, em *Nicotiana tabacum* 'Turkish', *N. occidentalis* e *N. rustica*.



Figura 7: Sintomas de lesão local observados em *Chenopodium amaranticolor* (A), *C. quinoa* (B) e *C. murale* (C) aos 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação.



Figura 8: Sintomas de lesão local observados em *Gomphrena globosa* aos 5 e 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, respectivamente, sob condições de casa-de-vegetação.



Figura 9: Sintomas de clareamento de nervuras observados em *Primula malacoides* aos 40 dias após inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação .



Figura 10: Sintomas observados em *Nicandra physaloides* aos 8 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, sob condições de casa-de-vegetação.

As mesmas espécies vegetais quando inoculadas com o isolado HdRSV-RB, porém mantidas em condições de BOD, temperatura controlada (16°C) e fotoperíodo de 12 horas de luz artificial, não apresentaram os mesmos sintomas. Observou-se o aparecimento de lesões locais em *C. quinoa*, *C. amaranthicolor*, *C. murale* e *G. globosa*, mas as lesões foram de menor tamanho para todas as espécies acima citadas e como pode ser observado na Figura 11 para a *G. globosa*,. Em condições de casa de vegetação foi observado que durante épocas de temperatura mais amena a hortênsia mostrava sintomas mais evidentes da infecção pelo HdRSV. As condições de BOD neste caso tornaram os sintomas mais fracos, possivelmente por não reproduzirem totalmente as condições ambientais da casa-de-vegetação nas épocas mais amenas.



Figura 11: Sintomas observados em *Gomphrena globosa* aos 7 dias após a inoculação com extrato vegetal do isolado de HdRSV-RB, mantidas em condições de temperatura constante de 16°C e fotoperíodo de 12 horas de luz artificial.

Para a verificação da presença viral via RT-PCR, foram selecionadas plantas de cada uma das espécies de hospedeiras inoculadas sob condição de casa-de-vegetação. A coleta de material vegetal dessas espécies deu-se 10 dias após a inoculação via extrato vegetal. Nesta avaliação foi verificada a presença do fragmento de tamanho esperado em amostras coletadas a partir de *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. murale*, *G. globosa*, *Nicotiana tabacum* 'Turkish', *N. tabacum* 'Havana', *N. clevelandii*, *N. rustica*, *N. occidentalis*, *N. physaloides* e *Primula malacoides* (Tabela 3 e Figura 12).

Tabela 3: Número de plantas inoculadas, testadas e positivas por RT-PCR para a presença do HdRSV-RB.

Espécie testada	Número de plantas inoculadas	Número de plantas testadas/positivas (RT-PCR)
<i>Chenopodium quinoa</i>	10	10/10
<i>C. amaranticolor</i>	10	10/10
<i>C. murale</i>	10	10/10
<i>Gomphrena globosa</i>	10	10/10
<i>N.t. 'Turkish'</i>	8	8/4
<i>N.t. 'Havana'</i>	9	9/0
<i>N. clevelandii</i>	9	9/4
<i>N. rústica</i>	10	9/0
<i>N. occidentalis</i>	8	8/6
<i>Nicandra physaloides</i>	15	10/4
<i>Primula malacoides</i>	10	10/10

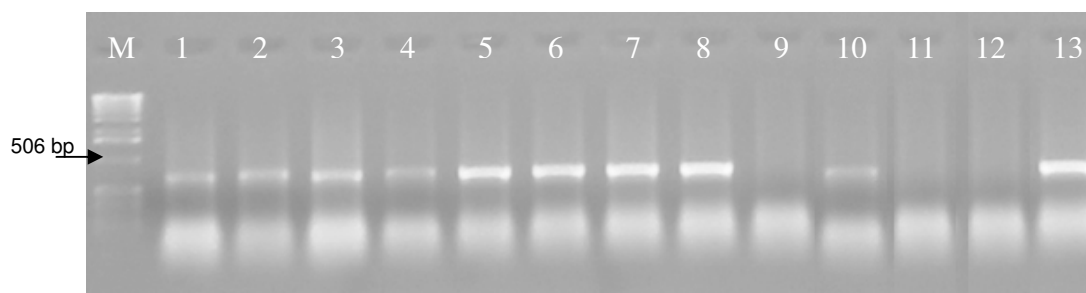


Figura 12: Padrão eletroforético do fragmento amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR, gel de agarose a 0,8%. M – Marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Marca Invitrogen); 1: *Chenopodium amaranticolor*; 2: *C. quinoa*; 3: *C. murale*; 4: *Nicotiana occidentalis*; 5: *Nycandra physaloides*; 6: *Gomphrena globosa*; 7: *Nicotiana tabacum* ‘Turkish’; 8: *N.clevelandii*; 9: *N. rustica*; 10: *Primula malacoides*; 11: *N. tabacum* ‘Havana’; 12: Controle negativo água; 13: Hortênsia var. Renat

Segundo Koenig (1973) o HdRSV causa lesões locais em *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa*, não sendo sistêmico nestas plantas. Em *Primula malacoides* o vírus é assintomático, porém infecta sistemicamente (KOENIG, 1973). Não há relato de outras hospedeiras suscetíveis na literatura. Desta forma, para o isolado HdRSV-RB, foi observada infecção nas mesmas espécies citadas por Koenig (1972), porém de acordo com os resultados obtidos pela detecção por RT-PCR, verificou-se que o vírus é capaz de replicar em *Nicotiana tabacum* ‘Turkish’, *N. clevelandii*, e *N. occidentalis* e *N. physaloides* porém sendo assintomático nestas espécies de plantas. Foi verificada ainda a detecção do vírus extraído a partir de folhas de *C. quinoa*, *C. amaranticolor* e *C. murale* assintomáticas, emitidas após a inoculação por extrato vegetal, indicando infecção sistêmica nestas plantas.

Plantas hospedeiras que não a própria hortênsia, não tem significado importante na epidemiologia do HdRSV, uma vez que neste caso não foi constatado até o momento transmissão do vírus por contato entre plantas e por vetores.

7.3. Análise da variabilidade genética dos isolados de HdRSV provenientes de diferentes matrizes de hortênsia

Foram selecionados os isolados encontrados em Azul LZR, Azul Rendado, Rosa japonesa, Rosita, Renat blue, Vermelho comum para análise da variabilidade molecular do HdRSV encontrado no Brasil. Para isto o fragmento em torno de 500 pares de bases amplificado pelos oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso em RT-PCR foi seqüenciado. Este fragmento é parte da região codificadora para a replicase viral (ORF 1).

A partir do alinhamento de nucleotídeos (Figura 13) e de aminoácidos (Figura 14) obteve-se uma tabela de identidade entre os diferentes isolados brasileiros de HdRSV (Tabela 4). A porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos variou de 94 a 99% e 98-100%, respectivamente, entre os isolados de HdRSV. A árvore filogenética obtida a partir da seqüência de aminoácidos (Figura 16) revela que os isolados provenientes das matrizes Renat Blue, Rosita, Azul LZR e Vermelho Comum são idênticos aos de HdRSV números de acesso AY707100 e NC_006943 provenientes da Europa. Já os provenientes de Rosa Japonesa e Azul Rendado apresentam pequenas variações nesta porção analisada, Esta baixa variabilidade pode ser indicativo da entrada do HdRSV no Brasil possivelmente a partir de material propagativo de hortênsia da Europa e ressalta a importância de um bom sistema de Quarentena Vegetal que impeça a entrada de pragas exóticas no país.

HdRSV_6943	CTGACAATAAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTATAAGAAGAAGGACATCGGG	60
HdRSV_AY707100	CTGACAATAAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTATAAGAAGAAGGACATCGGG	60
Azul_rendado	CTAACAATAAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAGAAGAAGGACATCGGA	60
Azul_LZR	CTGACAATAAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAAAAGAAGGACATCGGG	60
Verm-comum	CTGACAATCAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAGAAGAAGGACATCGGG	60
Rosita	CTGACAATCAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAGAAGAAGGACATCGGG	60
Renat_Blue	CTGACAATCAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAGAAGAAGGACATCGGG	60
Rosa_Japonesa	CTGACAATCAGCAGCCCCGAAGCGAACTGGGAGGAGTTCTACAAGAAGAAGGACATCGGG	60
NMV-NC_001441	TTGGCTATCTCCACGCCTGAAGCAAATTTAAGGGAGTTCAACATGAAACGTGACATTGGC	60
LVX-NC_007192	ATCAAGCTGGCCACACCAGCTGATAACGAGAAAGAAATGCTTATGAAACGGGACATTGGG	60
	* * ** ** * * ** ** * * ** ** ** ** *	

Continuação

HdRSV_6943 GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCTATGACCCTTCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 HdRSV_AY707100 GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCTATGACCCTTCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 Azul_rendado GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCCATGACCCTTCCAGAGGAGCCAAATTCCTTC 120
 Azul_LZR GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCCATGACTCTTCCAGAGGAGCCACTCCCTTC 120
 Verm-comum GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCCATGACCCTCCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 Rosita GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCCATGACCCTCCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 Renat_Blue GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCCATGACCCTCCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 Rosa_Japonesa GACATCCTCTGGCTGCACTACAAGAAGGCTATGACCCTCCCAGAGGAGCCACTTCCCTTC 120
 NMV-NC_001441 GACATTCTGTTTCATGAATTACGCCAAACTGATGTGCTTGCCCCAGAGCCAGTTCCTTC 120
 LVX-NC_007192 GACATACTGTTTCTCAATTACCAAAGGCCATGAAACTGCCCGTCGACCCAATTCCTTTC 120
 ***** ** * * * * * ** * * * * * ** * * * * *

HdRSV_6943 TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCT 180
 HdRSV_AY707100 TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCT 180
 Azul_rendado TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCT 180
 Azul_LZR TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAAAACACTTACCTCTCCAAGCCG 180
 Verm-comum TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCA 180
 Rosita TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCA 180
 Renat_Blue TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCA 180
 Rosa_Japonesa TCAGAGGATCTCTGGAGACTGTCCGCGGCCGAGGTGCAGAACACTTACCTCTCCAAGCCA 180
 NMV-NC_001441 GAAGAGAGGCTATGGAATACTCAGCTGATGAGGTCCGCAATACTTATATTAGCAAACCC 180
 LVX-NC_007192 TCCAAAGAATTGTGGCAAGCATGCCGTGAGGAGGTCCAGGACAAATACCTGCAGAACCC 180
 *

HdRSV_6943 ATGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGACTTCGAGAAGCACCAGATC 240
 HdRSV_AY707100 ATGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGACTTCGAGAAGCACCAGATC 240
 Azul_rendado ATAAACATGCTGAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCAGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 Azul_LZR ATGAACATGCTCAAAAACGGCGAGAGGAGACAATCCCCGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 Verm-comum ATGAACATGCTCAAAAATGGCGAGAGGAGACAATCCCCAGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 Rosita ATGAACATGCTCAAAAATGGCGAGAGGAGACAATCCCCAGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 Renat_Blue ATGAACATGCTCAAAAATGGCGAGAGGAGACAATCCCCAGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 Rosa_Japonesa ATGAACATGCTTAAAAATGGCGAGAGGAGACAATCCCCAGACTTCGAGAAGCACCAAATC 240
 NMV-NC_001441 ATCGGCAATCTGGTGAATGCTGCTTCTCGTCAAAGCCAGACTTCCGAAGAACAAGATC 240
 LVX-NC_007192 TTAGCCAACCTCATTAACGGCAAAGACCGCCAGTCCCCGATTTTCTTAAAGACAAGATA 240
 *

HdRSV_6943 TTAGCTTCTCCTCAAGTCGAGTGGGTGAAAAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCTAAAATT 300
 HdRSV_AY707100 TTAGCTTCTCCTCAAGTCGAGTGGGTGAAAAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCTAAAATT 300
 Azul_rendado CTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCCAAAATC 300
 Azul_LZR TTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCCAAAATC 300
 Verm-comum TTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCCAAAATC 300
 Rosita TTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCCAAAATC 300
 Renat_Blue TTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAGATGGAGAAGCTAGGCGGACCCAAAATC 300
 Rosa_Japonesa TTGCTTCTCCTCAAGTCACAGTGGGTGAAGAAAATGGAGAACTAGGCGGACCCAAAATC 300
 NMV-NC_001441 GCTCTGTTTCTGAAGTCACAATGGGTGAAGAAGACAGAAAACCTGGGAACCTTGAAAGTC 300
 LVX-NC_007192 GCGCTTCTCCTGAAATACAATGGGTAAAAAGACTGAGAAAATCGGGGCCATCAAAGTT 300
 *

HdRSV_6943 AAGGCTGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 HdRSV_AY707100 AAGGCTGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 Azul_rendado AAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCCGTCATGCTGTATGGGACAATG 360
 Azul_LZR AAGGCCGGGCAAACCATAGCTTCAATTCCAACAACACGCTGTCATGCTGTACGGAACATG 360
 Verm-comum AAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCTGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 Rosita AAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCTGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 Renat_Blue AAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 Rosa_Japonesa AAGGCCGGGCAAACCATAGCCTCATTCCAACAACACGCCGTCATGCTGTACGGAACAATG 360
 NMV-NC_001441 AAGCCAGGACAGACCATCGCTTCTTTCATGCAAGAACTGTCATGCTCTATGGCACCATG 360
 LVX-NC_007192 AAACCTGGACAGACTATCGCTTCTTTCATGCAGGACACTGTCATGGTCTATGGCACCATG 360
 *

Continuação

```

HdRSV_6943          GCCAGGTACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATCAACTGC 420
HdRSV_AY707100     GCCAGGTACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATCAACTGC 420
Azul_rendado        GCCAGGTACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATTAAGATTAAGTGC 420
Azul_LZR            GCCAGGTACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAAATCAACTGC 420
Verm-comum          GCCAGATAACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATTAAGTGC 420
Rosita              GCCAGATAACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATCAACTGC 420
Renat_Blue          GCCAGATAACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATCAACTGC 420
Rosa_Japonesa       GCCAGGTACATGAGGAGGTTCCGGGAAGCCTTGGGCCCCAAACCACATCAAGATTAAGTGC 420
NMV-NC_001441       GCGCGCTACTTACGTAAGATGCGGAGAAGATTCCAGCCTGACAACATTTTTTCATCAACTGC 420
LVX-NC_007192       GCAAGATAACATGAGACGCATTTCGAGGGCTTATCAACCTGATAATATCTTCATCACCTGC 420
                    ** * *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HdRSV_6943          GAGGCCACCCCAAAGGACCTTTCCCGCTTTATCCAAAACACTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
HdRSV_AY707100     GAGGCCACCCCAAAGGACCTTTCCCGCTTTATCCAAAACACTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Azul_rendado        GAGGCCACCCCAAAGGATCTTTCCCGCTTCATCCAAAACACTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Azul_LZR            GAGGCCACCCCAAAGGACCTTTCCCGCTTCATCCAAAACACTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Verm-comum          GAGGCCACCCCAAAGGATCTCTCCCGCTTTATCCAAAATTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Rosita              GAGGCCACCCCAAAGGATCTCTCCCGCTTTATCCAAAATTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Renat_Blue          GAGGCCACCCCAAAGGATCTCTCCCGCTTTATCCAAAATTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
Rosa_Japonesa       GAGGCCACCCCGAAGGATCTCTCCCGCTTTATCCAAAATTACTGGGACTTC---AAGCCA 477
NMV-NC_001441       GAAACTACCCAGAAGACCTGGATAAGTTTATTAAGAGTCAGTGGGATTTCTCCAGACCA 480
LVX-NC_007192       GAGAATACACCTGAAGAGCTCAATGAGTGGGCTATGGAGAAGTGGTGCCTCAGGGGAAAT 480
                    ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HdRSV_6943          GC 479
HdRSV_AY707100     GC 479
Azul_rendado        GC 479
Azul_LZR            GC 479
Verm-comum          GC 479
Rosita              GC 479
Renat_Blue          GC 479
Rosa_Japonesa       GC 479
NMV-NC_001441       GC 482
LVX-NC_007192       GC 482
                    **

```

Figura 13: Alinhamento das seqüências de nucleótídeos na região codificadora para a replicase viral dos isolados brasileiros de *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), bem como o HdRSV (números de acesso [AY707100](#) e NC_006943) com a região correspondente do *Narcissus mosaic virus* (NMV-NC_001441) e *Lilly virus X* (LVX- NC_007192). Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>?).

```

HdRSV_6943          LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
HdRSV_AY707100     LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Azul_LZR           LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Renat_Blue         LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Rosita             LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Verm-comum        LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Rosa_Japonesa     LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPLPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
Azul_rendado      LTISSPEANWEEFYKKKDIGDILWLHYKKAMTLPEEPPIPFSEDLWRLSAAEVQNTYLSKP 60
NMV-NC_001441     LAISTPEANLREFNMKRDIGDILFMNYAKLMCLPPEPVPFEERLWKISADEVRNTYISKP 60
LVX-NC_007192     IKLATPADNEKEMLMKRDIGDILFLNYQKAMKLPVDPIPFSKELWQACREEVQDKYLQKP 60
:  :::* * .*: *:*****:::* * * * * *:***.: **: . **:***:***

HdRSV_6943          MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
HdRSV_AY707100     MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Azul_LZR           MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Renat_Blue         MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Rosita             MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Verm-comum        MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Rosa_Japonesa     MNMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
Azul_rendado      INMLKNGERRQSPDFEKHQILLFLKSQWVKKMEKLGPKIKAGQTIASFQQHAVMLYGTM 120
NMV-NC_001441     IGNLVNAASRQSPDFPKNKIALFLKSQWVKKTEKLGTLKVKPGQTIASFMQETVMYGTM 120
LVX-NC_007192     LANLINGKDRQSPDFPKDKIALFLKSQWVKKTEKIGAIKVKPGQTIASFMQDTVMVYGTM 120
:  * * . ***** *: * ***** *: * *: * ***** *:***:***

HdRSV_6943          ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
HdRSV_AY707100     ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Azul_LZR           ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Renat_Blue         ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Rosita             ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Verm-comum        ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Rosa_Japonesa     ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
Azul_rendado      ARYMRRFREALGPNHIKINCEATPKDLSRFIQNYWDFKP 159
NMV-NC_001441     ARYLKMRRRFQPDNIFINCETTPEDLDKFIKSQWDFSR 159
LVX-NC_007192     ARYMRRIRRAYQPDNIFITCENTPEELNEWAMEKWCFRG 159
:  ***:***:*. **: * * ** *:***:*** . * *

```

Figura 14: Alinhamento das seqüências de aminoácidos na região codificadora para a replicase viral dos isolados brasileiros de *Hydrangea ringspot virus* (HdRSV), bem como o HdRSV (números de acesso [AY707100](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AY707100) e NC_006943) com a região correspondente do *Narcissus mosaic virus* (NMV-NC_001441) e *Lily virus X* (LVX- NC_007192). Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>?).

Tabela 4: Porcentagens de identidade de nucleotídeos (inferior) e aminoácidos (superior) do fragmento de 482bp na região codificadora para a replicase viral entre isolados brasileiros de HdRSV (Azul LZR; Azul rendado; Vermelho comum; Rosita; Renat blue; Rosa japonesa); HdRSV-[AY707100](#); HdRSV-NC_006943 com a região correspondente do NMV-NC_001441 e LVX-NC_007192, obtida pelo Programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

	Azul LZR	AzulRend	VermCom	Rosita	RenatBlue	RosaJaponesa	HdRSV- AY707100	HdRSV- 6943	NMV	LVX
Azul LZR	-	98	100	100	100	99	100	100	62	55
AzulRend	94	-	98	98	98	98	98	98	62	55
VermCom	95	95	-	100	100	99	100	100	62	55
Rosita	95	95	99	-	100	99	100	100	62	55
Renat Blue		95	99	99	-	99	100	100	62	55
RosaJaponesa	94	95	98	97	98	-	99	99	62	55
HdRSV- AY707100	95	94	95	95	95	94	-	100	62	55
HdRSV-6943	95	94	95	95	95	94	100	-	62	55
NMV	59	59	60	61	60	60	60	60	-	62
LVX	50	51	52	52	52	50	52	51	59	-

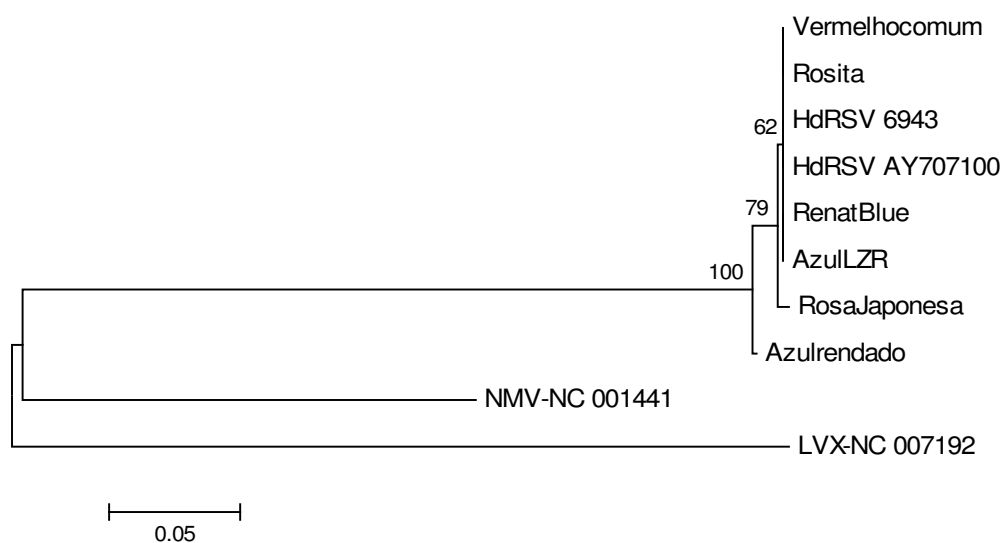


Figura 15: Árvore filogenética da sequência de aminoácidos correspondente aos 479bp na região codificadora para a replicase viral entre os isolados brasileiros de HdRSV (Azul LZR; Azul rendado; Vermelho comum; Rosita; Renat blue; Rosa japonesa); HdRSV-AY707100; HdRSV-NC_006943 com a região correspondente do NMV-NC_001441 e LVX-NC_007192 (outgroups), obtida pelo Programa Mega versão 3.1, utilizando Neighbor-Joining e valor de Bootstrap 2000.

7.4 Purificação do vírus e produção de anti - soro contra o HdRSV

Dois protocolos foram utilizados para purificação do HdRSV, a partir de folhas frescas de *C. quinoa* aos 21 dias após a inoculação. A pureza e concentração dos purificados virais foram analisadas ao espectrofotômetro. Para ambos protocolos de purificação utilizados foi obtido um purificado viral, que quando analisado ao espectrofotômetro apresentou o padrão típico de uma nucleoproteína (Figura 16 e Figura 17), respectivamente. A razão A_{260}/A_{280} foi de 1,36 para o protocolo descrito para potexvirus (combinação de protocolos) e 1,25 para o descrito para o NMV (Kendall et al., 2007). Os valores de A_{260}/A_{280} observados estão na faixa já verificada para outros vírus do gênero *Potexvirus*, cujos valores estão entre 1,2-1,4 (BERCKS, 1970 E ZETTLER et al.,1984 citado por VELAME e MEISSNER FILHO, 2001).

Utilizando-se o coeficiente de extinção para potexvirus igual a $2,97 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^2$ (Noordam, 1973), foi calculada a concentração do vírus para cada uma das purificações virais. Obteve-se em torno de 3,1 mg/mL (protocolo para purificação de PVX) e 25,9 mg/mL (protocolo NMV, KENDALL et al., 2007), evidenciando maior recuperação do vírus a partir deste último protocolo. Isto pôde ser verificado no gel de poliacrilamida, onde uma forte banda de peso molecular em torno de 19 KDa foi observada para o purificado viral proveniente a partir deste protocolo. Uma de menor intensidade, porém de mesmo peso, foi observada para o purificado viral obtido pela combinação de protocolos para PVX. Esta banda possivelmente é a proteína capsidial do HdRSV, uma vez que Hughes et al. (2005) verificaram em preparações purificadas do vírus a presença de uma única banda com massa molecular em torno de 22 KDa em SDS-PAGE.

As preparações purificadas apresentaram rendimento médio de 25,8 mg e 259 mg de vírus por quilo de material processado, utilizando-se respectivamente a combinação de protocolos para PVX e o descrito para o NMV (KENDALL et al., 2007). Além de melhor rendimento, o método descrito por Kendall et al., 2007 é mais rápido e simples. O melhor resultado obtido pode ser consequência do menor número de etapas utilizadas na purificação, o que reduz a possibilidade das partículas virais agregarem e serem perdidas no processo de purificação. Hughes et al. (2005) purificando HdRSV a partir de *C. quinoa* obtiveram rendimentos de 0,92 mg/g de tecido, porém o mesmo protocolo não foi testado.

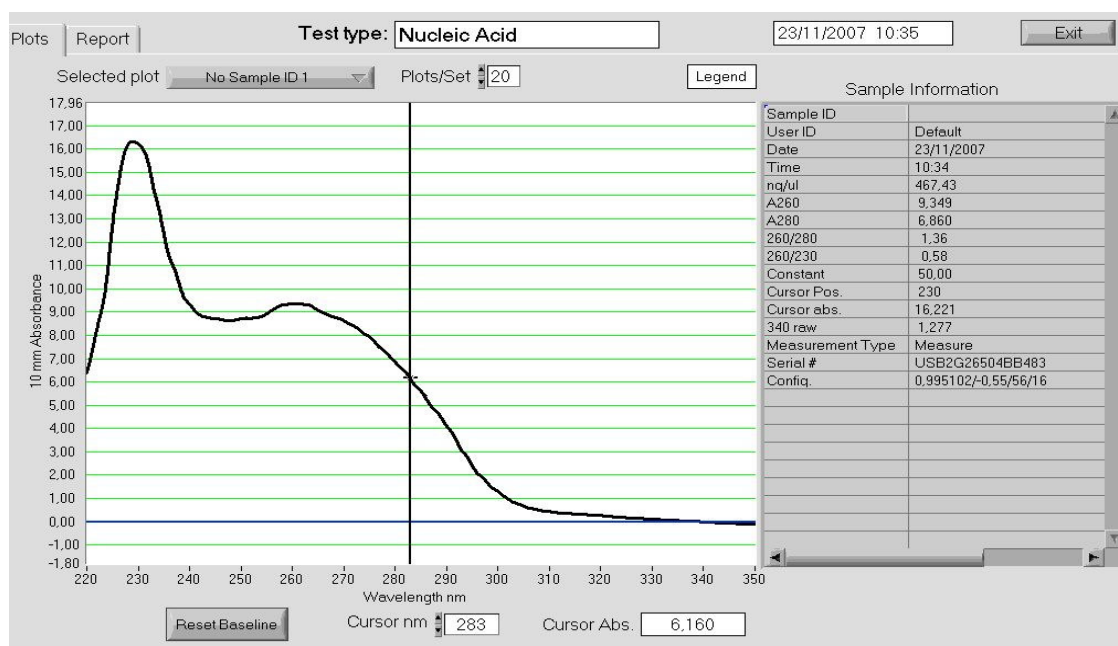


Figura 16: Espectrometria da preparação viral purificada obtida com a combinação de protocolos para o PVX.

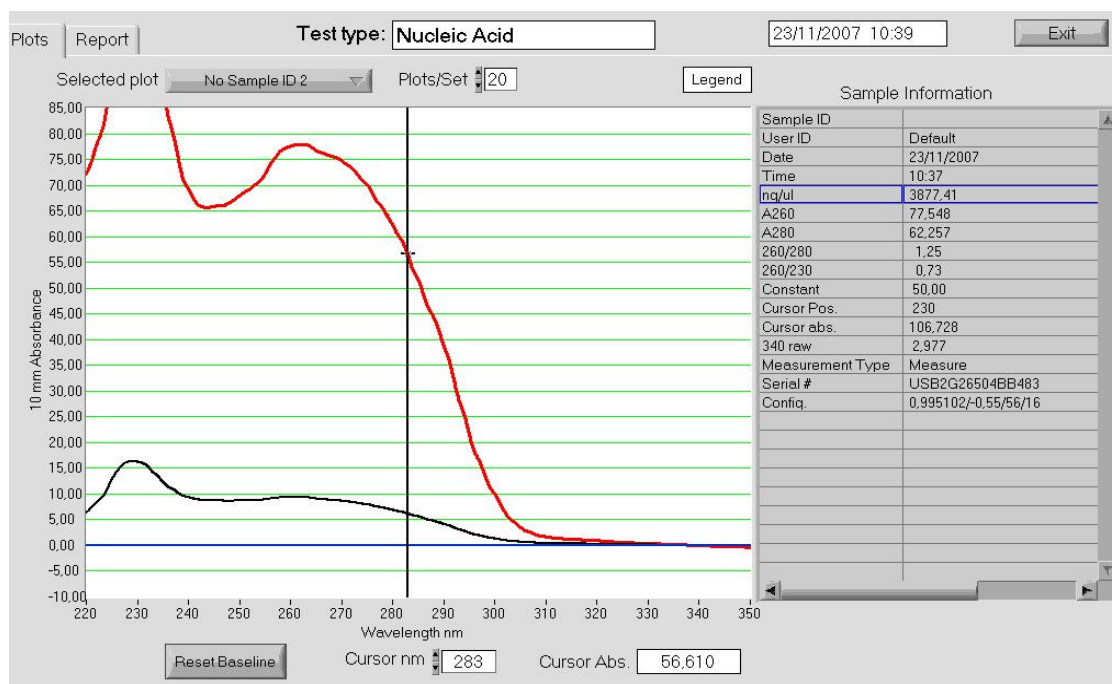


Figura 17: Espectrometria da preparação viral purificada obtida com o protocolo para o NMV (KENDALL et al., 2007), em vermelho.

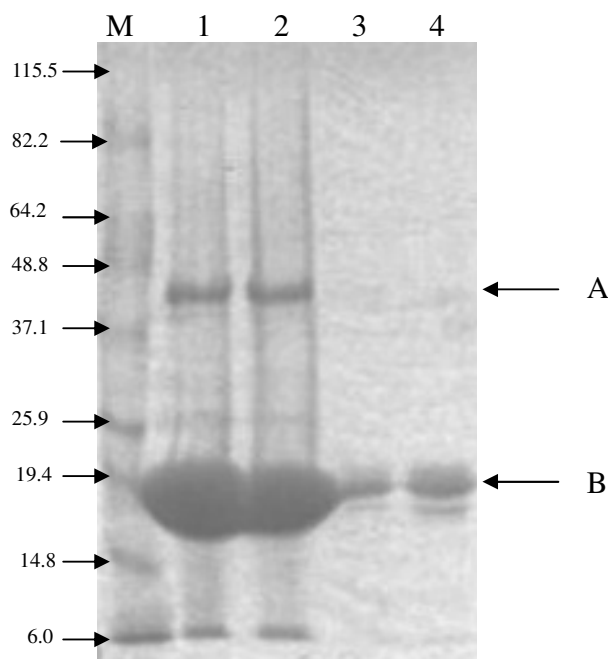


Figura 18: Padrão de proteínas observado em gel de poliacrilamida. M: Marcador Proteína BenchMarck™ Pré-Stained Protein Ladder (Invitrogen); 1 e 2: Purificado viral obtido com o protocolo para NMV (KENDALL et al., 2007); 3 e 4: Purificado Viral obtido pela combinação de protocolos para PVX; A:possivelmente rubisco; B:possivelmente banda capsidial

A partir do purificado viral bruto obtido pelo protocolo descrito para o NMV (KENDALL et al., 2007), e para o protocolo descrito para PVX obteve-se anti-soro produzido em coelhos da raça Nova Zelândia. Utilizando-se o ELISA indireto (PTA-ELISA), sem a adsorção do anti-soro, não foi possível obter reações específicas (Figura 19), indicando que no processo de purificação do vírus foram co-purificadas proteínas vegetais, que promoveram reações inespecíficas do anti-soro. Na Figura 18 pode-se observar uma banda em torno de 45 KDa, que possivelmente corresponde a rubisco (ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase), a enzima mais abundante nas plantas.

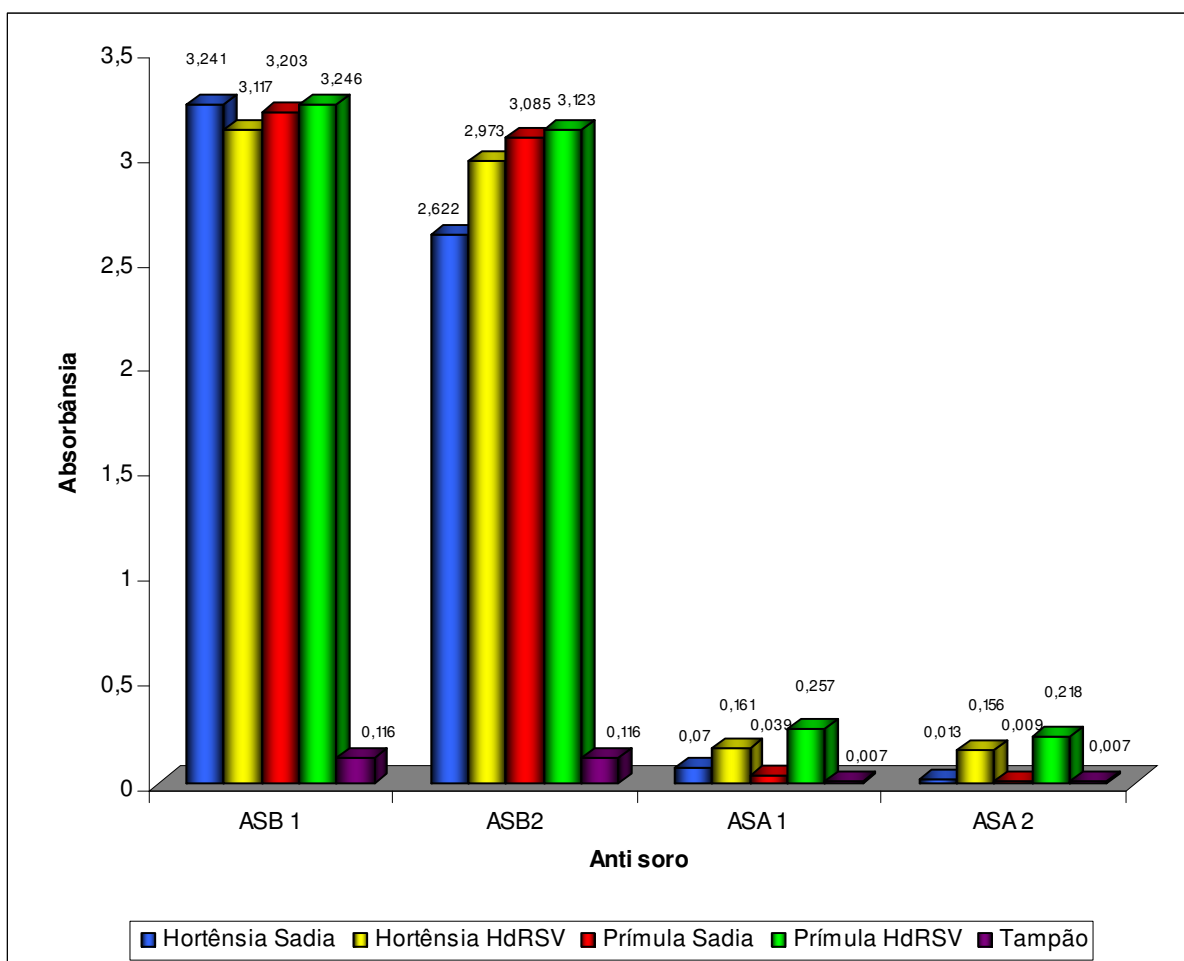


Figura 19: Avaliação através de PTA-ELISA do anti-soro produzido para o HdRSV. (ASB 1: Anti soro bruto 1 – protocolo NMV (KENDALL et al., 2007); ASB 2: Anti soro bruto 2 – protocolo potexvirus/fedegoso; ASA 1: Anti soro adsorvido protocolo NMV (KENDALL et al., 2007); ASA 2: Anti soro adsorvido (protocolo potexvirus/fedegoso). Absorbância a 405 nm.

Após a adsorção do anti-soro com extrato de *C. quinoa* sadia, os valores de absorbância para os extratos de hortênsia e prímula infectada com o HdRSV foram pelo menos três vezes superiores aos da hortênsia e prímula sadia, respectivamente, confirmando que a adsorção permitiu tornar o anti-soro específico (Figura 19). A diluição 1:150 (após-adsorção) do anti-soro foi a que melhor permitiu a detecção do vírus.

Verificou-se que o HdRSV é melhor detectado a partir de prímulas infectadas,

quando comparada à hortênsia (Tabela 3), possivelmente por atingir maior concentração viral nesta planta. Verificou-se também que mesmo em hortênsias, pode ocorrer resultados falso-negativo em plantas sabidamente infectadas. Estas plantas encontravam-se já há um bom tempo na casa de vegetação e no momento do teste não mostravam os sintomas típicos aos causados pelo vírus, apresentando possivelmente baixa concentração viral.

Tabela 5: Valores de absorvância (A405) obtidos por PTA-ELISA ao avaliar a reação do anti-soro produzido contra o HdRSV – RB, após adsorção ao tecido sadio de *C. quinoa*. Diluição do anti-soro 1:150 e do extrato de planta 1:10. Hortênsia 1, 2, 3 e flôr sabidamente infectadas.

Amostra	Valores de Absorvância (Anti-soro protocolo NMV)				Média	Valores de Absorvância (Protocolo PVX)				Média
Hortênsia 1	0,009	0,018	0,050	0,015	0,023	0,039	0,035	0,031	0,033	0,035
Hortênsia 2	0,145	0,144	0,173	0,182	0,161	0,186	0,174	0,126	0,139	0,156
Hortênsia 3	0,014	0,029	0,037	0,022	0,026	0,016	0,029	0,038	0,029	0,028
Hortênsia Flor	0,014	0,029	0,037	0,022	0,026	0,044	0,072	0,039	0,043	0,050
Hortênsia sadia	0,010	0,003			0,007	0,013	0,012			0,013
Prímula doente	0,256	0,265	0,277	0,230	0,257	0,211	0,227	0,202	0,233	0,218
Prímula doente	0,407	0,430	0,402	0,380	0,405	0,255	0,292	0,280	0,301	0,282
Prímula sadia	0,026	0,095	0,032	0,003	0,039	0,014	0,018	0,003	0,001	0,009

8. CONCLUSÕES

- O HdRSV foi encontrado em diferentes matrizes de hortênsia no Estado de São Paulo;
- Trata-se da primeira notificação do HdRSV no Brasil;
- Um teste baseado em RT-PCR com os par de oligonucleotídeos Hyd_senso e Hyd_anti_senso foi obtido e pode ser utilizado na diagnose molecular do vírus;
- O anti-soro produzido para o HdRSV através do método descrito para o NMV (KENDALL et al., 2007), após adsorção em ELISA indireto, tornou-se específico, permitindo sua utilização na indexação de plantas de hortênsia e prímulas;
- *N. tabacum* Turkish, *N. occidentalis*, *N. clevelandii* e *Nycandra physaloides* são hospedeiras assintomáticas para o HdRSV, até então não descritas na literatura;

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do HdRSV ocorrer no Brasil e se encontrar presente em diferentes matrizes de hortênsia hoje utilizadas para produção comercial, o vírus possui uma limitação quanto a sua dispersão, pois até o momento se desconhece transmissão por contato vegetal, bem como por vetores. Como já dispomos de testes de diagnose rápidos e eficientes para o vírus, as matrizes infectadas podem ser substituídas por sadias e teoricamente o vírus poderá ser erradicado do país. Recentemente foi lançada pela Aflord, juntamente com apoio do Dr. Valdir Atsushi Yuki do IAC, Campinas, uma matriz da hortênsia Renat Blue livre de vírus, com a certificação dos órgãos competentes e inclusive testada por RT-PCR com os “primers” desenvolvidos neste trabalho. Este é o primeiro passo para o processo de erradicação do vírus. Cuidados adicionais como o isolamento dessas matrizes em locais adequados, assepsia das tesouras utilizadas na obtenção das estacas (uma vez que a hortênsia é propagada vegetativamente) serão essenciais para manutenção e propagação do material sadio.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL CULTURAL. **Plantas e flores**. São Paulo, 1988. 159 p.

ADAMS et al. **Virus Taxonomy**: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. California: Elsevier Academica Press, 2005, 1259 p.

ALLEN, T.C., McMORRAN, J.P. AND LAWSON, R.H. Isolation of Tomato Spotted Wilt Virus from Hydrangea and four Weed Species. **Plant Disease**. Disponível em:<http://www.apsnet.org/pd/SEARCH/1983/PD_67_429.asp> Acesso em 24 out. 2008

BERTHEAU, Y., D. *et al.* DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). IN: PEROMBELON, M. C. M.; van der WOLFF. J. M. **Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes**. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.

BEZERRA, D.R., LIMA, J.A.A. & XAVIER FILHO, J. Purificação e caracterização de um isolado cearense do vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro. *Fitopatologia Brasileira* 20:553-560.1995

BRIERLEY, P. Symptom in the florists hydrangea caused by tomato ringspot virus and an

unidentified sap-transmissible virus. **Phytopathology**, 44; 696-699. 1954.

BRIERLEY, P.; LORENTZ, P. Hydrangea ringspot virus, the probable cause of 'running out' of the florist's hydrangea. **Phytopathology**, 47; 39-43, 1957.

BRUNT, A.A; CRABTREE, K.; DALLWITZ, M.J.; GIBBS, A.J.; WATSON, L.; ZUCHER, E.J. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide>. (eds.) 1996 Plant Viruses Online Acesso em 11/11/2008.

FATOR BRASIL. **Potencial brasileiro faz com que produtores de flores e plantas invistam no mercado interno**. Portal Fator Brasil 05/09/2007 Disponível em: <http://www.revistafatorbrasil.com.br/ver_noticia.php?not=18455#> Acesso em 12/11/2008.

GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R. Propagação vegetativa de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**: um guia para ações municipais e regionais. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Colombo: Embrapa Florestas, 2000. p. 175-197.

HOLLINGS, J. Hydrangea ringspot in Britain. *Journal of Horticultural Science*, v.33, p.275-281, 1958.

HUGHES, P.L.; LAWRENCE, J.E.; SCOTT, S.W. The complete nucleotide sequence of hydrangea ringspot virus. **Archives of Virology** (2005) 150: 2339-2345.

ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>

IRITANI, C.; SOARES, R. V. Indução do enraizamento de estacas de *Araucaria angustifolia* através da aplicação de reguladores de crescimento. **Silvicultura**, São Paulo, v. 8, n. 28, p. 313-317, 1983. Edição dos Anais do 4º Congresso Florestal Brasileiro, Belo Horizonte.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M.S. Exportações de flores e plantas ornamentais superam US\$ 35 milhões em 2007: recorde e novos desafios para o Brasil. **Hortica**. <http://www.hortica.com.br/artigos/Balanc_Floricultura_2007.pdf> Acesso em 12/11/2008.

KENDALL, A.; BIAN, W.; JUNN, J.; McCULLOUGH, I.; GORE, D.; STUBBS, G. Radial density distribution and symmetry of a *Potexvirus*, narcissus mosaic virus. **Virology**, v. 357;

Issue 2; 20 Jan. 2007, p.158-164.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. *Journal of Electron Microscopy*, v.14, p.119-121, 1965.

KIYUNA, I.; ANGELO, J.A.; COELHO, P.J. Floricultura Brasileira: novos arranjos no comércio exterior. *Análises e Indicadores do Agronegócio*. V.3; n.5; maio 2008. in: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTex.php?codTexto=9280>>

KOENIG, R. Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus x and cactus virus x during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Virology*, 50(1), 263-266. Out 1972.

KOENIG, R. Hydrangea ringspot virus., 1973
in:<<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=114>> Acesso em 23/08/2008

KUMAR,S.; TAMURA, K.; e NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163, 2004.

LORENZI, H.; SOUZA H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Rev. e ampl., Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2001, 1088p.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v.15, p.233-237, 1987.

MOTOS, J.R. A produção de flores e plantas ornamentais no Brasil e no Mundo. **Flores de Corte**, 2000.
in:<http://www.portaldoagrovit.com.br/agro/seminario_internacional_de_cultivo_protegido/a_producao_de_flores_e_plantas.pdf>. Acesso em: 11/10/2008

NOORDAM, D. Identification of plant viruses. *Methods & Experiments*. Wageningen, 1973. 207p.

SCHOENMAKER, K. “Potencial brasileiro faz com que produtores de flores e plantas invistam no mercado interno” in: <http://www.revistafatorbrasil.com.br/ver_noticia.php?not=18455> Acesso em 11/11/2008.

THOMAS, B.J., BARTON, R.J. and TUSZYNSKI, A. (1983). *Ann. appl. Biol.* **103**: 261. apud: Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.' URL Disponível em: <<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>>

VELAME, K. V.C. & MEISSNER FILHO, P.E. Purificação e produção de anti-soro para o vírus do mosaico comum da mandioca. *Magistra*, v. 13, n. 2, 2001.

WENDLING, I.; SOUZA JÚNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 3., 2003, Chapecó. *Anais*. [Chapecó]: EPAGRI, 2003. s. 3-1. Seção: conservação, melhoramento e multiplicação. Feira do Agronegócio da Erva-mate, 1., 2003, Chapecó.

YUKI, V A ; CHAGAS, C. M. ; HOJO, H. ; KATO, S. M. ; YABASE, M. K. ; KUNIYUKI, H. Provável ocorrência de um Potexvirus em *Hydrangea macrophylla*. In: XXVIII Congresso Paulista de Fitopatologia, 2005, São Paulo, SP.. Summa Phytopathologica. Botucatu, SP. : Grupo Paulista de Fitopatologia, 2005. v. 31. p. 97-98.