

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

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS INFECTANDO ORQUÍDEAS  
NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**LETÍCIA APARECIDA DE MORAES**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de  
Plantas).

BOTUCATU - SP

Fevereiro - 2013

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

**INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS INFECTANDO ORQUÍDEAS  
NO ESTADO DE SÃO PAULO.**

**LETÍCIA APARECIDA DE MORAES**

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

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP - campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Agronomia (Proteção de  
Plantas).

BOTUCATU - SP  
Fevereiro - 2013

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

M827i Moraes, Leticia Aparecida de, 1985-  
Incidência e caracterização dos vírus infectando orquídeas no Estado de São Paulo / Leticia Aparecida de Moraes.  
- Botucatu : [s.n.], 2013  
xii , 81 f.: il. ,color, grafs., tabs.

Dissertação(Mestrado)- Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013  
Orientador: Marcelo Agenor Pavan  
Co-orientador: Renate Krause Sakate  
Inclui bibliografia

1. Vírus de plantas. 2. Orquídeas - São Paulo (Estado).  
3. Orquídeas - Doenças e pragas. I. Pavan, Marcelo Agenor.  
II. Sakate, Renate Krause. II. Universidade Estadual Paulista.  
"Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

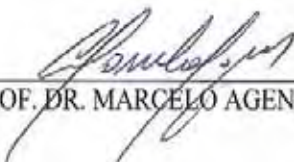
TÍTULO: “INCIDÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DOS VÍRUS INFECTANDO  
ORQUÍDEAS NO ESTADO DE SÃO PAULO”

ALUNA: LETICIA APARECIDA DE MORAES

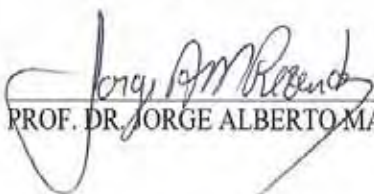
ORIENTADOR: PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

COORIENTADORA: PROFA. DRA. RENATE KRAUSE SAKATE

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. MARCELO AGENOR PAVAN

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. KELLY CRISTINA GONÇALES ROCHA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE

Data da Realização: 27 de fevereiro de 2013.

## AGRADEÇO A DEUS

&amp;

Dedico com amor aos meus pais, Jussara e Dinorah, por sempre apoiarem os meus estudos e priorizarem minha formação. O amor de vocês me fortalece. Ao meu irmão Tiago, meu companheiro Edmilson e toda sua família, os quais me adotaram desde o momento que nos conhecemos, e tornaram meu cotidiano muito mais agradável. Aos amigos de Botucatu pelo companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas – campus de Botucatu, assim como ao Departamento de Defesa Fitossanitária pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

Ao Prof. Marcelo Agenor Pavan pela orientação, conselhos e apoio durante o curso. Tais requisitos foram essenciais para o desenvolvimento do presente trabalho e com certeza ajudaram a formar o meu perfil profissional.

À Profa. Renate Krause Sakate pela ajuda, conselhos e contribuições neste trabalho.

Aos professores Antônio Carlos Maringoni, Edson Luiz Furtado, Carlos Alberto Raetano pelos ensinamentos e estímulo.

A todos orquidófilos, produtores de orquídeas e ao Prof. Lee Gerald que colaboraram disponibilizando as plantas analisadas neste trabalho.

Ao Ricardo Giória e à Marcia Maria Guimarães Kobori, pelos conselhos e a disposição à ajudar sempre que foi necessário.

Aos amigos de laboratório: Kelly Rocha, Milena Leite de Oliveira, Leysimar Ptzir, Júlio Marubayashi, Denise Nozaki, Tatiana Mituti, Monika Fecury, Bruno de Marchi, Cristiane Melo, Kessia Pantoja, Isabel Hoffmann e Daiana Bampi pelo coleguismo e principalmente pela amizade....

Aos funcionários do Departamento de Proteção Vegetal (Defesa Fitossanitária), Paulinho e Domingos.

Agradeço imensa e eternamente aos meus pais, Jussara e Dinorah, pelo apoio, dedicação, força e amor que sempre me fizeram sentir e ser capaz de conquistar tudo aquilo que eu quisesse. Muito obrigada por acreditarem em mim, sempre.

À família Caetano dos Santos por torcerem por mim, pelo apoio e imenso carinho.

À Edmilson, pela confiança e amor que sempre me proporcionaram motivação e muita alegria de viver.

Meu “muito obrigada” todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram a conquistar e vencer esta etapa.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VII
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	XI
<b>1. RESUMO</b> .....	1
<b>2. SUMMARY</b> .....	3
<b>3. INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
4.1. Orquídeas e o mercado de flores do Brasil.....	7
4.2. Principais viroses de orquídeas.....	9
4.2.1. Organização genômica do <i>Cymbidium mosaic virus</i> .....	11
4.2.2. Organização genômica do <i>Odontoglossum ringspot virus</i> .....	11
4.2.3. Organização genômica do <i>Orchid fleck virus</i> .....	12
4.3. Transmissão de CymMV, ORSV e OFV.....	13
4.4. Sintomatologia e gama de hospedeiras.....	13
4.5. Diagnose.....	17
4.6. Controle.....	17
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
5.1. Levantamento.....	19
5.1.1. Material vegetal.....	19
5.2. Caracterização sorológica, biológica e molecular.....	21
5.2.1. Testes sorológicos.....	21
5.2.1.1. Detecção de CymMV, ORSV, TSWV e CymRSV.....	21
5.2.1.2. Detecção de Potyvirus.....	22
5.2.2. Gama de hospedeiras.....	22
5.2.3. Extração de RNA Total.....	23
5.2.4. Obtenção de oligonucleotídeos para a região codificadora da proteína capsidial de CymMV e ORSV.....	24
5.2.5. Transcrição Reversa e Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR) .....	27
5.3. Sequenciamento.....	28
5.4. Estudo dos sintomas.....	28
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	29

**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
6.1. Testes com os oligonucleotídeos desenhados para a região codificadora da proteína capsial de CymMV e ORSV.....	29
6.2. Levantamento.....	30
6.2.1. ELISA e RT-PCR.....	30
6.3. Gama de hospedeiras.....	36
6.4. Sequenciamento.....	37
6.5. Sintomatologia.....	40
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>8. OBSERVAÇÕES ADICIONAIS.....</b>	<b>58</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema do genoma do vírus CymMV.....	11
<b>Figura 2.</b> Esquema do genoma do vírus ORSV.....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema do genoma do vírus OFV.....	13
<b>Figura 4.</b> Alinhamento de acessos do GenBank de CYMMV pelo Clustal W, para a identificação dos oligonucleotídeos senso (vermelho) e antisenso (rosa), desenhados para obter a extensão total do gene decodificador da proteína capsidial. Os códons marcados em amarelo indicam o iniciador (ATG) e o finalizador (TAA) do gene. Acessos: Taiwan: AY571289.1, Singapura: U62963.1, Japão: AB197937.1, China: HQ681906.1.....	25
<b>Figura 5.</b> Alinhamento de acessos do GenBank de ORSV pelo Clustal W, para a identificação dos oligonucleotídeos senso (verde) e antisenso (cinza), desenhados para obter a extensão total do gene decodificador da proteína capsidial. Os códons marcados em amarelo indicam o iniciador (ATG) e o finalizador (TAA) do gene. Acessos: Taiwan: AY571259.1, Singapura: U34586.1, Coat_protein: U89894.1.....	26
<b>Figura 6.</b> Teste com controles positivos e negativos com o novo par de oligonucleotídeos desenhados para CymMV. Um fragmento de tamanho aproximado de 700 bp foi obtido como esperado.....	29
<b>Figura 7.</b> Teste com controles positivos e negativos com o novo par de oligonucleotídeos desenhados para ORSV. Um fragmento de tamanho aproximado de 500 bp foi obtido como esperado.....	30
<b>Figura 8.</b> Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de CymMV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. <i>Potato virus X</i> foi utilizado como outgroup.....	39
<b>Figura 9.</b> Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de ORSV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. <i>Tobacco mosaic virus</i> foi utilizado como outgroup.....	40
<b>Figura 10.</b> Folhas de <i>Dendrobium</i> sp. infectadas com CymMV apresentando pequenas manchas cloróticas espalhadas por toda a superfície foliar.....	41

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 11.</b> Folha de <i>Phalenopsis</i> sp. infectada com CymMV apresentando manchas cloróticas e necrose.....	42
<b>Figura 12.</b> Folha de <i>Cattleya</i> sp. infectada com CymMV apresentando manchas necróticas deprimidas espalhadas por toda a superfície foliar.....	42
<b>Figura 13.</b> Botões abortados de <i>Rhynchosstilis gigantea</i> infectada com CymMV.....	43
<b>Figura 14.</b> Planta de <i>Rhynchosstilis gigantea</i> infectada com CymMV. apresentando lesões enegrecidas.....	43
<b>Figura 15.</b> Flor de planta de <i>Cymbidium</i> sp. infectada com CymMV apresentando pequenas lesões.....	44
<b>Figura 16.</b> Folha de <i>Angraecum sesquipadale</i> infectada com CymMV apresentando estrias necróticas deprimidas com leve halo clorótico.....	44
<b>Figura 17.</b> Folha de <i>Laelia tenebrosa</i> infectada por CymMV apresentando manchas necróticas deprimidas por toda a folha.....	45
<b>Figura 18.</b> Folhas de <i>Laelia purpurata</i> com sintomas de mosaico infectadas com CymMV.....	45
<b>Figura 19.</b> Folha de <i>Oncidium</i> sp. infectada com CymMV apresentando mosaico.....	46
<b>Figura 20.</b> Diferença no porte das plantas de <i>Dendrobium</i> sp. entre uma sadia (esquerda) e infectadas com vírus (plantas central e direita com infecção mista de CymMV e ORSV).....	47
<b>Figura 21.</b> <i>Phalaenopsis</i> sp. com infecção mista de CymMV e ORSV apresentando manchas cloróticas.....	47
<b>Figura 22.</b> <i>Phalaenopsis</i> sp. com infecção mista de CymMV e ORSV apresentando linhas cloróticas.....	48
<b>Figura 23.</b> Manchas cloróticas (A) e estrias necróticas (B) ao longo das folhas de uma planta de <i>Cymbidium</i> sp. infectada com ORSV.....	49
<b>Figura 24.</b> Folha de <i>Phalenopsis</i> sp. infectada com ORSV.....	50
<b>Figura 25.</b> Planta de <i>Denphale</i> sp. apresentando mosaico em todas suas folhas em decorrência de infecção por ORSV.....	50
<b>Figura 26.</b> Folhas de <i>Cymbidium</i> sp. infectadas por ORSV apresentando manchas anelares com formato de losango por toda extensão da folha.....	51

## LISTA DE FIGURAS

## Página

<b>Figura 27.</b> Folha de <i>Dendrobium</i> sp. infectado por OFV. Apresenta manchas necróticas pontuais que se agrupam em regiões da folha, formando focos necróticos.....	52
<b>Figura 28.</b> Folhas de <i>Oncidium</i> sp. infectado por OFV. A. O sintomas consistem em anéis necróticos concetricos por toda a extensão das folhas. B. Presença de anéis cloróticos (em menor quantidade) e necróticos por toda superfície foliar.....	53
<b>Figura 29.</b> Folha de <i>Cymbidium</i> sp. infectado por OFV. As folhas apresentam pontuações necróticas reunidas em focos e distribuídas por toda a superfície foliar.....	54
<b>Figura 30.</b> Folhas de <i>Oncidium</i> sp. infectadas por OFV mostrando manchas necroticas anelares sutis circundadas por halo clorótico.....	54
<b>Figura 31.</b> Folha de <i>Arundina</i> sp. infectada por OFV mostrando manchas necroticas circundadas por halo clorótico.....	55
<b>Figura 32.</b> Planta de <i>Cymbidium</i> sp. infectada por <i>Sclerocium rolfsii</i> e ORSV. A planta estava assintomática à presença do vírus.....	58
<b>Figura 33.</b> Efeito do ataque de ácaros à <i>Dendrobium</i> sp.....	59
<b>Figura 34.</b> Amarelecimento nas pontas das folhas de <i>Dendrobium</i> sp. por deficiência nutricional.....	59
<b>Figura 35.</b> Queimaduras causadas por fitotoxidez em <i>Dendrobium</i> sp. (A) e <i>Phalaenopsis</i> sp. (B).....	60
<b>Figura 36.</b> Sintomas de Antracnose em folhas de <i>Oncidium</i> sp.....	61
<b>Figura 37.</b> Defeito genético em <i>Oncidium</i> sp.....	61
<b>Figura 38.</b> Em A e B variegação de origem genética em folhas de orquídeas.....	62
<b>Figura 39.</b> Formação de limo sobre folhas de orquídeas devido alta umidade.....	63
<b>Figura 40.</b> Planta de <i>Phalaenopsis</i> sp. com folhas arroxeadas devido a exposição à baixas temperaturas.....	63
<b>Figura 41.</b> Folha de <i>Laelia purpurata</i> apresentando pontuações de cor púrpura devido ao acúmulo de antocianinas.....	64
<b>Figura 42.</b> Planta de <i>Laelia</i> sp. com necroses em suas folhas, porém não apresentava-se infectada por CymMV, ORSV, OFV, CymRSV, TSWV ou <i>Potyvirus</i> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

## Página

<b>Figura 43.</b> Plantas de <i>Oncidium</i> sp. com pontuações necróticas em suas folhas, porém não apresentavam-se infectadas por CymMV, ORSV, OFV, CymRSV, TSWV ou <i>Potyvirus</i> .....	65
--	----

**LISTA DE QUADROS E TABELAS****Página**

<b>Quadro 1.</b> Espécies suscetíveis à infecção de CymMV e ORSV.....	16
<b>Tabela 1.</b> Períodos, quantidades, e locais que as coletas foram realizadas, entre maio de 2011 e dezembro de 2012, no estado de São Paulo, Brasil.....	20
<b>Tabela 2.</b> Resultado geral dos testes de ELISA e RT-PCR realizados nas amostras coletadas (total de amostras / positivas).....	31
<b>Tabela 3.</b> Comparativo de amostras com infecção mista (total de amostras/positivas).....	32
<b>Tabela 4.</b> Incidência dos vírus CymMV, ORSV e OFV nos gêneros de orquídeas cultivadas em 14 municípios do Estado de São Paulo.....	33

## 1. RESUMO

As doenças causadas por vírus são um dos principais entraves sanitários nos sistemas de produção de orquídeas, uma vez que promovem consideráveis danos ao seu valor comercial, já que afetam diretamente sua estética e produtividade. São escassos os estudos relacionados aos principais vírus que ocorrem nessa planta ornamental em condições brasileiras. Em termos mundiais, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) e *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) prevalecem e são os vírus de maior importância econômica. Tendo em vista esta questão, o presente trabalho objetivou avaliar, através de métodos sorológicos e moleculares, 385 amostras pertencentes a diferentes gêneros de orquídeas oriundas do estado de São Paulo a fim de estabelecer qual o(s) de maior importância fitossanitária. A análise de detecção foi realizada através do *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), com os antissoros comerciais contra: CymMV, ORSV, *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e para o gênero *Potyvirus*. Para a análise de variabilidade, oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar a região codificadora da proteína capsidial do CymMV e ORSV, bem como foi obtido da literatura um par de primers para detecção do *Orchid fleck virus* (OFV). O vírus de maior prevalência foi o CymMV, presente em 274 amostras (71,16%), seguido do ORSV presente em 61 amostras (15,85%), e OFV em 11 amostras (2,85%). Os demais vírus testados não foram identificados em nenhuma das amostras analisadas. Os sintomas causados pelo CymMV e ORSV são muito variáveis, além de serem confundidos com fatores abióticos, problemas nutricionais e fitotoxidez. Aparentemente a expressão de sintomas está relacionada ao gênero e idade da planta, bem como aos fatores climáticos das

regiões de cultivo. Quanto a variabilidade genética de CymMV e ORSV, foi observada identidade de nucleotídeos entre 98% - 97% e 100% - 99%, respectivamente, com as sequencias depositadas no GenBank.

---

Palavras-chave: Vírus de plantas, Orquídeas – São Paulo (Estado), Orquídeas – Doenças e pragas.

INCIDENCE AND CHARACTERIZATION OF THE VIRUSES INFECTING ORCHIDS OF SÃO PAULO STATE. Botucatu, 2013. 81 p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LETÍCIA APARECIDA DE MORAES

Adviser: MARCELO AGENOR PAVAN

Co adviser: RENATE KRAUSE SAKATE

## 2. SUMMARY

Diseases caused by viruses are a major constraint in the production systems of orchids, as they promote considerable damage to its commercial value, as it directly affects their productivity and aesthetics. There are few studies related to major viruses that occur in this ornamental plant in the Brazilian conditions. Globally, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) and *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) are prevalent and the virus of greatest economic importance. Considering this issue, the present study aimed to evaluate, through serological and molecular methods, 385 samples of different orchid genera from São Paulo state in order to establish what is(are) the most important virus(es). As for the *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), commercial antisera were used against: CymMV, ORSV, *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) and the genus *Potyvirus*. Primers were designed to amplify the coding region of the capsidial protein CymMV and ORSV and a pair of

primers for detection of *Orchid fleck virus* (OFV) was obtained from the literature. The the most prevalent virus was CymMV, present in 274 samples (71.16%), followed by ORSV present in 61 samples (15.85%) and OFV in 11 samples (2,85%). The other viruses tested were not identified in any of the samples analyzed. Symptoms caused by CymMV and ORSV are very variables, and are commonly confused with abiotic factors, nutritional problems and phytotoxicity. Apparently is related to gender and age of the plant, as well as the climate factors. As the genetic variability of CymMV e ORSV, was observed nucleotide identity between 98% - 97% and 100% - 99%, respectively, with the sequences deposited in GenBank.

---

Key words: Plant viruses, Orchids – São Paulo (State), Orchids – Diseases and plagues

### 3. INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae é considerada a mais numerosa de todo o Reino Vegetal, com mais de 800 gêneros, 35.000 espécies e 120.000 híbridos (FARIA, et al., 2010). No Brasil, este grupo apresenta mais de 200 gêneros e 2.300 espécies catalogados (SOUZA; LORENZI, 2005). Estas plantas possuem um maior número de representantes nos ambientes tropicais e subtropicais (MORAES, 2002).

As orquídeas devem apresentar folhas e flores de boa qualidade, tal como qualquer ornamental, o que implica, entre outros fatores, na ausência de doenças e pragas. (CARDOSO, 2005; KUBO, 2006). Dentre os principais patógenos que infectam as orquídeas estão os vírus, os quais além de depreciarem quantitativa e qualitativamente as plantas, também apresentam dificuldade de controle (SHEEHAN, 1980; BICALHO, 1992; BATCHELOR, 1993).

São conhecidos mais de 50 vírus que infectam orquídeas (AJJIKUTTIRA; WONG, 2005). De acordo com a literatura, em termos mundiais, o vírus do gênero *Potexvirus* que causa o mosaico do *Cymbidium* (*Cymbidium mosaic virus* - CymMV) e o vírus do gênero *Tobamovirus* que causa a mancha anelar do *Odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot virus* - ORSV) são os mais comumente identificados infectando orquídeas de variados gêneros e conseqüentemente são de maior importância fitossanitária.

No Brasil, como em muitos outros países tropicais, o cultivo e comércio de espécies nativas e introduzidas de orquídeas tem se tornado expressivo nos últimos anos. Entretanto, não há informações atuais sobre a prevalência destes vírus que afetam as orquídeas tanto em plantações comerciais, colecionadores ou em seus ambientes

naturais, apesar dos danos e prejuízos que os vírus trazem aos produtores e orquidófilos. A falta de esclarecimento se deve, entre outros fatores, ao fato de muitas vezes os vírus promoverem infecções assintomáticas, ou desordens fisiológicas e a ação de fatores abióticos serem confundidos com sintomas virais. (FREITAS, 1996; GIORIA, 2002).

Devido esta lacuna, o presente trabalho teve como objetivos a detecção, caracterização molecular e análise da diversidade genética e sintomática dos vírus que infectam as orquídeas no Estado de São Paulo, seguido de um estudo da variabilidade sintomatológica dos vírus de maior relevância presentes em vários gêneros de orquídeas para auxiliar na identificação mais rápida e reduzir a incidência dessas viroses.

## **4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Orquídeas e o mercado de flores do Brasil**

As orquídeas são plantas monocotiledôneas que correspondem a cerca de 7% de todas as fanerógamas distribuídas na terra (DRESSER, 1981). A família Orchidaceae é considerada a mais numerosa de todo o Reino Vegetal, com mais de 800 gêneros, 35.000 espécies e uma infinidade de híbridos obtidos comercialmente ( FARIA, et al., 2010).

Estas plantas possuem um maior número de representantes nos ambientes tropicais e subtropicais (MORAES, 2002), apesar de serem consideradas cosmopolitas, de modo que surgem desde próximo ao Círculo Polar Ártico e estendem-se até os arredores da Terra do Fogo (DRESSER, 1981). Apresentam vários habitats de crescimento devido sua grande variabilidade genética. Crescem sobre as árvores (epífitas), sobre as rochas (litófitas) e sobre o solo (terrestres), sendo que a maioria dos indivíduos da família é epífita (ABDELNOUR; MUÒOZ, 1997).

Assim, pela possibilidade de se estabelecer em diversos habitats, as diversas plantas da família Orchidaceae despertam grande interesse comercial, uma vez que as orquídeas podem ser cultivadas em grande diversidade de condições (CARDOSO, 2005). Igualmente, deve-se considerar que o elevado número de espécies e híbridos possibilita a ocorrência de grande variedade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores, o que também auxilia a tornar essas plantas de grande importância econômica e permite

que sejam produzidas em todo o mundo, sempre com grande aceitação no mercado (FREITAS, 1996; CARDOSO, 2005).

Embora apresentem alto custo de produção, já que as técnicas agronômicas empregadas são, em geral, exclusivas para o sucesso de seu cultivo, as orquídeas são muito apreciadas mundialmente. Tal custo está relacionado ao lento desenvolvimento que as espécies da família apresentam, acarretando em maior tempo de cultivo antes de sua comercialização. Esta característica contribui para elevação do valor unitário dessas plantas (CARDOSO, 2005; VICHATO et al., 2007).

Em 2007, as exportações de mudas de orquídeas representaram US\$ 233,91 mil e crescimento de 43,62% em relação a 2006. Tiveram como destinos principais os EUA (32,84%), seguidos da Alemanha (25,19%), Japão (19,38%), Hong Kong (6,85%), Holanda (6,22%), Rússia (4,10%) e Taiwan (1,62%). No Brasil, originaram-se dos Estados do Mato Grosso do Sul (40,35%), Santa Catarina (35,78%), Rio de Janeiro (8,83%), Espírito Santo (6,46%), Rio Grande do Sul (4,32%) e Paraná (4,25%) (IBRAFLOR, 2007). No ano de 2010, o faturamento do mercado de flores do Brasil foi de R\$ 3,8 bilhões. No ano de 2011, por sua vez, o faturamento foi de R\$ 4,3 bilhões, demonstrando um crescimento de 5 milhões (IBRAFLOR, 2011).

Em 2011, as mudas de orquídeas importadas pelo Brasil do Japão, Holanda e Tailândia somadas representaram 15,66% do total, com crescimento de 67,43% sobre o mesmo período do ano anterior. Neste caso, estas plantas não são consideradas material de propagação vegetal, mas sim destinadas para produção final, ou seja o consumo, especialmente importantes nos ascendentes mercados de *Phalaenopsis*, *Cymbidium*, *Vandas*, entre outras (IBRAFLOR, 2011).

A floricultura brasileira vem adquirindo notável desenvolvimento nos últimos anos e se caracteriza como um dos mais promissores segmentos da horticultura intensiva no campo do agronegócio nacional. Observa-se, em todo o Brasil, um movimento marcado por fortes índices de crescimento da base produtiva e inclusão de novos pólos regionais na produção de flores e plantas ornamentais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008).

## 4.2. Principais viroses de orquídeas

Segundo Ajjikuttira et al. (2002), já foram relatados mais de 50 vírus infectando orquídeas, embora a maioria destes ainda não esteja completamente caracterizada. O *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) e o *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), pertencentes aos gêneros *Potexvirus* e *Tobamovirus* respectivamente, são os vírus mais identificados infectando orquídeas de variados gêneros, apresentam distribuição geográfica abrangente e conseqüentemente são de maior importância econômica, em termos mundiais.

De acordo com Gibbs et al. (2000), ao redor de seis vírus do gênero *Potyvirus* foram relatados infectando orquídeas: *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) (LESEMANN; KOENIG, 1985), *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Dasheen mosaic virus* (DaMV) (JORDAN et al., 2002), *Dendrobium mosaic virus* (DeMV), *Calanthe mild mosaic virus* (CaMMV) (GARA et al. 1998), *Ceratobium mosaic virus* (CerMV) (MACKENZIE et al. 1998; VAN REGENMORTEL et al. 2000) e *Vanilla mosaic virus* (VanMV) (ZETTLER et al. 1990). Cabe mencionar que o VanMV foi espécie tentativa do gênero *Potyvirus*, porém foi caracterizado por Farreyol et al. (2006) como uma estirpe de *Dasheen mosaic virus* que infecta exclusivamente o gênero *Vanilla*, e o *Dendrobium mosaic virus* é um membro do subgrupo do *Bean common mosaic virus* (HU et al., 1995). Em 2007, Guaragna et al. sugeriram mais duas espécies de *Potyvirus* infectando orquídeas do gênero *Spiranthes*, os quais nomearam de *Spiranthes mosaic virus 2* e *Spiranthes mosaic virus 3*, contudo, no ICTV de 2012 somente o *Spiranthes mosaic virus 3* manteve seu nome e o *Spiranthes mosaic virus 2* foi renomeado como *Freesia mosaic virus*.

Dentre os dezesseis tospovirus existentes, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Impatiens necrotic spot virus* (INSV) foram detectados em orquídeas no Haváí e na Califórnia (HU et al., 1993). Recentemente em Taiwan, foi isolado o *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), pertencente à esse gênero, em plantas de *Phalaenopsis*, as quais apresentavam anéis cloróticos como sintomas (ZHENG et al., 2010).

Dentre os demais vírus que infectam orquídeas, há relatos de espécies de vírus de outros gêneros também, tais como o *Cucumber mosaic virus* (CMV), do gênero *Cucumovirus*, relatado na Polinésia Francesa infectando *Vanilla tahitensis* (FARREYOL et al., 2001), na Índia (MADHUBALA et al., 2005) e em orquídeas na

Coréia (CHANG et al., 1991); e o *Tombusvirus* CymRSV (*Cymbidium ringspot virus*) na Inglaterra (HOLINGS et al., 1977). Na tentativa de detectar a presença de *Cymbidium ringspot virus*, 420 amostras de orquídeas foram testadas por Siegmann et al. (1998) nos Estados Unidos, porém este não foi encontrado. Freitas et al. (1999), que conduziu um levantamento de vírus em orquídeas no Brasil em 900 amostras, também não o detectou. Ao que parece, o CymRSV é raro, sendo que sua aparição se conteve em seu primeiro relato.

Em 2007, Kawakami et al. descobriram e sequenciaram o genoma completo de uma nova espécie de potexvirus infectando orquídeas do gênero *Phaius* no Japão. O novo vírus recebeu o nome de *Phaius virus X*.

A mancha da orquídea, causada pelo *Orchid fleck virus* (OFV), foi detectada pela primeira vez no Japão em orquídeas do gênero *Cymbidium* (DOI et al., 1969). Este vírus foi posteriormente relatado em vários gêneros de orquídeas em diversas localidades, tais como Alemanha (LESEMANN; DORAISWANY, 1975), Austrália (DOI et al., 1977), Brasil (KITAJIMA et al., 2010; KUBO, 2006), Costa Rica (FREITAS-ASTÚA et al., 2002), Coréia (CHANG et al. 1991), Dinamarca (CHILDERS, 2003) e Estados Unidos (GIBBS et al., 2000).

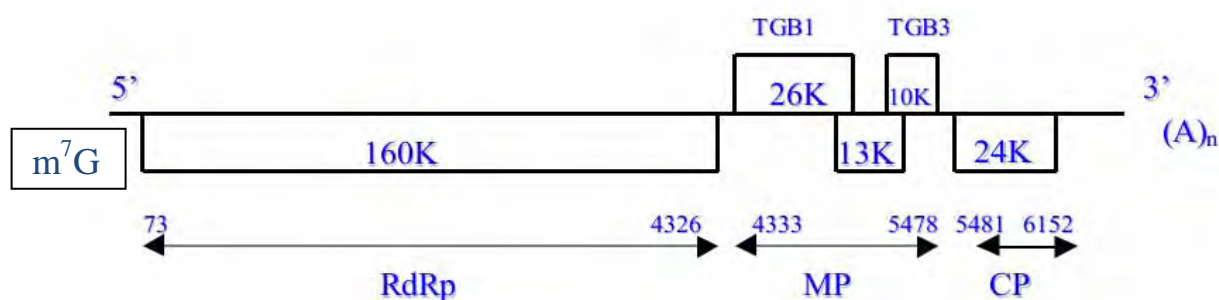
Este vírus é transmitido pelo ácaro *Brevipalpus californicus* (KUBO, 2005; MAEDA, 1998; KONDO et al., 2003). Sabe-se que o OFV pode se apresentar de duas formas: como OFV-N (nuclear) ou OFV-C (citoplasmático), dos quais o tipo nuclear é o mais comum. Segundo Kubo (2006), o OFV-N e o OFV-C parecem se tratar de vírus distintos por apresentarem diferenças morfológicas em suas partículas, devido ao local de maturação do vírus na célula (observado por microscopia eletrônica) e por diferirem quanto à sequência do gene codificador da capa proteica viral.

O OFV foi inicialmente classificado como um rhabdovirus tentativo, sendo que sua diferença dos demais do grupo consiste em seu genoma bipartido (KUBO, 2006; ADAMS, et al., 2011). Em 2006, Kondo et al. propuseram a criação de um novo gênero, o *Dichorhabdovirus*, porém atualmente o OFV é designado como “unassigned” pelo ICTV pelo fato de ainda não se ajustar em nenhum grupo.

No Brasil, além da presença dos dois vírus mais frequentes na literatura, CymMV e ORSV, houve constatação da presença de CMV na espécie *Dendrobium nobile* relatado por Nobrega em 1947 e Alexandre et al. em 2005, e também foi encontrado em vários gêneros de orquídeas o OFV (KITAJIMA et al., 2010).

#### 4.2.1. Organização genômica do *Cymbidium mosaic virus*

O CymMV pertence ao gênero *Potexvirus*, cuja espécie tipo é o *Potato virus X*. Os vírus deste grupo são tipicamente flexuosos e filamentosos, e as partículas apresentam 450-550 nm de comprimento (FRANCKI, 1970). Partículas virais de CymMV medem 480 nm de comprimento e 13 nm de largura. O genoma do CymMV consiste em uma cadeia simples senso positiva de RNA, de 6227 nucleotídeos de comprimento, com CAP ( $m^7G$ ) no terminal 5' e cauda poli-A no terminal 3' (WONG et al., 1997). Como com todos os *Potexvirus*, o genoma apresenta cinco ORFs (Open Reading Frames) que constituem a RNA polimerase RNA dependente (replicase - RdRp), de 160 KDa e localizada entre os nucleotídeos 73/4326; o Triple Gene Block (movimento - TGB), de 26KDa/13KDa/10KDa, localizados entre os nucleotídeos 4333/5478; e uma proteína de revestimento (proteína da capa proteica - CP), de 24 KDa, localizada entre os nucleotídeos 5481/6152 (ADAMS, et al., 2011) (Figura 1.).

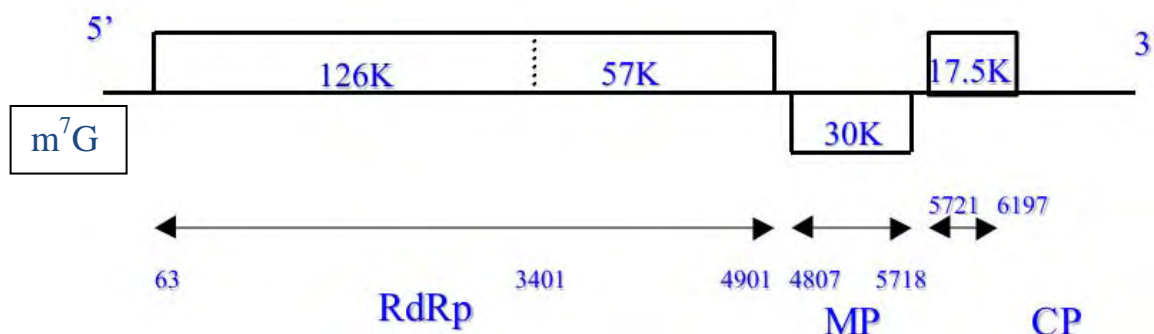


**Figura 1.** Esquema do genoma do CymMV(AJIKUTIRA, 2003).

#### 4.2.2. Organização genômica do *Odontoglossum ringspot virus*

O ORSV pertence ao gênero *Tobamovirus*, cuja espécie tipo é o *Tobacco mosaic virus*. Suas partículas virais são rígidas e em forma de haste, de aproximadamente 18 x 300 nm, com um núcleo central oco de 4 nm de diâmetro (WEBSTER; GRANOFF, 1994). Este vírus apresenta um genoma de RNA de fita simples senso positiva, de 6609 nucleotídeos de comprimento, com CAP ( $m^7G$ ) no terminal 5' e não apresenta cauda Poli-A no terminal 3'(AJIKUTIRA, 2003). Codifica os genes das RdRp (replicase) de 126/183 kDa localizada entre os nucleotídeos 63-3401/4901, a MP

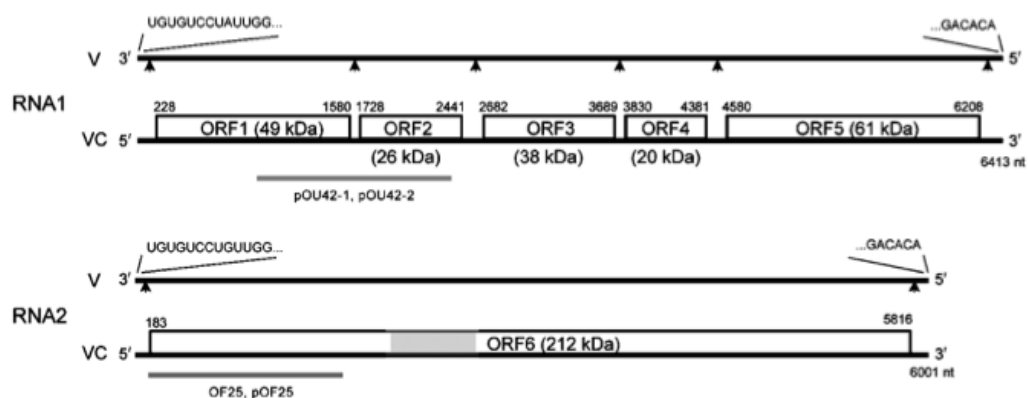
(movimento) de 33 kDa localizada entre os nucleotídeos 4807-5718 e o gene da CP (capa proteica) de 18 kDa localizado entre os nucleotídeos 5721-6197 (ADAMS, et al., 2011) (Figura 2.).



**Figura 2.** Esquema do genoma do ORSV (AJJIKUTIRA, 2003).

#### 4.2.3. Organização genômica do *Orchid fleck virus*

A espécie OFV atualmente é classificada como “unassigned” segundo o ICTV, pois não se enquadra no gênero *Rhabdovirus*, devido à estrutura genômica bipartida. As partículas virais são em forma de bastonete, não envelopados, com aproximadamente 32-40nm de largura e 100-150nm de comprimento e sua maturação ocorre no núcleo celular (CHANG et al., 1976; KONDO et al., 2003). O genoma bipartido é constituído por duas fita de RNA senso negativo, RNA 1 e RNA 2, com 6.413 e 6.001 nucleotídeos, respectivamente. O RNA 1 codifica proteínas de 49 kDa (ORF1), 26 kDa (ORF2), 38 kDa (ORF3), 20 kDa (ORF4) e 61 kDa (ORF5), e o RNA2 codifica uma única proteína de 212 kDa (ORF6). As proteínas codificadas pelas ORF1, ORF5 e ORF6 possuem similaridades significantes (21–38 % de identidade) com proteínas do nucleocapsídeo (N), glicoproteína (G) e polymerase (L), respectivamente, de outros *Rhabdovirus*, ao passo que as proteínas codificadas pelas ORF2, ORF3 e ORF4 não possuem similaridades relevantes com outras proteínas (KONDO et al., 2006).



**Figura 3.** Esquema do genoma do OFV (KONDO et al., 2006).

### 4.3. Transmissão de CymMV, ORSV e OFV

As espécies CymMV e ORSV são transmitidas principalmente por ferramentas contaminadas empregadas para a poda, divisão das plantas ou corte das flores (MOREIRA et al., 1999; AJJIKUTIRA, 2003), por propagação vegetativa e também experimentalmente pela inoculação de extrato vegetal infectado em plantas indicadoras (GONZÁLEZ-SEGÑANA, 1989). Estes vírus são relativamente estáveis ao calor e são capazes de manter a infectividade por longos períodos na seiva da planta (FRANCKI, 1970; WISLER et al., 1986), e eventualmente podem ser transmitidos através de vasos ou substratos contaminados (LAWSON, 1995). Não há evidências da transmissão por vetores ou sementes (NAMBA & IISHI, 1971).

A transmissão de OFV é feita principalmente pelo ácaro *B. californicus*, cuja relação com o vírus é do tipo circulativa propagativa (KONDO et al., 2003). Também é possível transmitir este vírus por inoculação de extrato vegetal de plantas infectadas para outros gêneros de plantas (KONDO et al. 1995).

### 4.4 Sintomatologia e gama de hospedeiras

Isolados da espécie de CymMV podem induzir sintomas brandos de clorose, redução no tamanho da planta e traços de mosaico nas folhas, ou sintomas mais severos, como manchas anelares, cloróticas ou necróticas em folhas, necrose em flores, descontinuidade da coloração, deformação floral e aborto de botões (ZETTLER et al., 1990; HU; FERREIRA, 1994; FREITAS, 1996).

Segundo Chang et al. (1991) e Chung et al. (2010), isolados de ORSV, por sua vez, podem causar mosqueados, estrias, mosaicos e manchas anelares nas folhas, e as flores infectadas podem mostrar manchas anelares e descontinuidade da coloração. No entanto, alguns isolados de ambos os vírus podem infectar plantas sem mostrar sintomas.

Clones vegetais de plantas de orquídeas suscetíveis a ambas as espécies de vírus podem mostrar-se assintomáticas e algumas vezes com sintomas de infecção com níveis diferentes de severidade. Sabe-se que estes sintomas podem se manifestar de modo variável em função de fatores bióticos e abióticos, como a idade do tecido vegetal, o ambiente, o gênero da planta, entre outros (WONG et al.,1994), o que dificulta bastante a detecção e identificação de vírus em orquídeas com base apenas nos sintomas.

Segundo Moreira et al. (1999), plantas de *Phaius tankervilleae* infectadas por CymMV e sintomáticas, mantidas em estufas de cultivo, não mostraram diminuição do vigor e nem na produção de novos bulbos. Afirmaram ainda, que o período de floração, a qualidade, tamanho, forma e a cor não foram alterados, quando comparados com as plantas saudáveis. Entretanto, após o terceiro e quarto dia da abertura das flores entraram em fase de senescência. Em alguns casos as sépalas das flores das plantas infectadas apresentaram clorose e anéis brancos.

Chung et al. (2010), por sua vez, ao avaliarem os danos que infecções virais causaram em 41 plantas de *Cymbidium* originadas por cultura de tecido, observaram uma redução no tamanho dos bulbos de 2,7 a 52%, dependendo das cultivares.

Além das plantas de orquídeas, outras plantas podem ser infectadas sistemicamente por estes vírus (Quadro 1) como *Nicotiana benthamiana*, hospedeiro comum para ambos os vírus. Esta planta infectada por CymMV apresenta sintomas de longas estrias cloróticas em suas folhas, e por ORSV, mosaicos leves nas folhas e distorção de folhas emergentes (AJJIKUTIRA, 2003).

Os sintomas de OFV também são variados, quando comparados entre os gêneros de orquídeas. Segundo Kubo (2006), de maneira geral, as plantas infectadas por este vírus podem apresentar anéis necróticos concêntricos em torno de uma lesão necrótica central, lesões necróticas ovaladas com halo clorótico, e pontuações pequenas e necróticas na superfície foliar.

O OFV foi relatado em vários gêneros de orquídeas pelo mundo: *Angraecum*, *Aspasia*, *Baptistonia*, *Bifrenaria*, *Brassia*, *Bulbophyllum*, *Calanthe*, *Cattleya*, *Coelogyne*, *Colmanara*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Diplocaulobium*, *Dockrillia*, *Encyclia*, *Flickingeria*, *Hormidium*, *Liparia*, *Masdevallia*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Oncidium x Odontoglossum*, *Paphiopedilum*, *Pascatorea*, *Phaius*, *Phalaenopsis*, *Polystachya*, *Renanthera*, *Stanhopea*, *Stenia*, *Trigonidium*, *Vanda*, *Zygopetalum* (KITAJIMA et al., 2001). Após este levantamento, Kitajima e Freitas (2002) fizeram novas constatações deste vírus em *Eria*, *Oncidium*, *Trichopilia*, *Xylobium*.

**Quadro 1.** Espécies suscetíveis à infecção de CymMV e ORSV (AJJIKUTIRA, 2003).

CymMV	ORSV
<i>Cassia occidentalis</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>Cassia tora</i>	<i>Cassia occidentalis</i>
<i>Cattleya</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>
<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Cymbidium alexanderi</i>
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Gomphrena globosa</i>
<i>Cymbidium</i>	<i>Nicotiana clevelandii</i>
<i>Datura stramonium</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>
<i>Epidendrum</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
<i>Gomphrena globosa</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>Laelia</i>	<i>Odontoglossum grande</i>
<i>Laeliocattleya</i>	<i>Tetragonia tetragonioides</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Zinnia elegans</i>
<i>Oncidium</i>	
<i>Oryza sativa</i>	
<i>Phalaenopsis</i>	
<i>Tropaeolum majus</i>	
<i>Vanda</i>	
<i>Vanda fragrans</i>	
<i>Zinnia elegans</i>	
<i>Zygopetalum</i>	

#### 4.5. Diagnose

Para a identificação e o diagnóstico corretos, são necessários testes laboratoriais que apresentem sensibilidade e especificidade suficientes para a detecção e determinação da espécie viral. Normalmente, para diagnose de vírus em orquídeas, são empregados testes sorológicos (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*), moleculares (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) além de observações ao microscópio eletrônico de transmissão, que permitem a visualização direta das partículas virais (MOREIRA et al., 1999; ARIAS, 2002).

A necessidade das análises refere-se a variabilidade de sintomas observados dos diversos gêneros de plantas de orquídeas. De acordo com Freitas (1996), plantas de orquídeas infectadas podem mostrar-se assintomáticas, enquanto que alguns sintomas característicos de infecção viral podem mostrar resultado negativo para a presença de vírus. Alguns sintomas resultantes de infecção por fungos e bactérias ou exposição intensa à luz são facilmente confundidos com aqueles induzidos por vírus. Por outro lado, sintomas do tipo amarelecimento generalizado, semelhantes aos causados por deficiência de nitrogênio, podem estar associados ao ORSV em alguns gêneros de orquídeas (ALEXANDRE; DUARTE, 2012).

#### 4.6. Controle

Não há referências sobre o controle de viroses em cultivos de orquídeas. O que tem sido adotado é a prevenção para evitar a entrada de vírus nas áreas de produção de orquídeas, uma vez que ambos CymMV e ORSV não apresentam vetores. O primeiro passo é separar plantas de diferentes idades, uma vez que orquídeas mais velhas têm maior probabilidade de estar infectadas. (ALEXANDRE; DUARTE, 2012).

Deste modo, algumas práticas devem ser adotadas para evitar a transmissão dos vírus para as demais plantas: desinfecção química (imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial a 10%, por 10 min, seguida de lavagem com água ou imersão em álcool 70%; imersão em solução de trifosfato de sódio a 55% por 5 minutos; ou em solução de hidróxido de sódio à 1% por 5 minutos (PUGSLEY, 1952; HU et al., 1994, citados por FREITAS, 1996) ou desinfecção térmica (flambagem a 150 °C por 15-20 segundos) dos instrumentos de corte; lavagem das mãos com água e sabão; incineração das

plantas reconhecidamente infectadas; não reutilização de substrato; utilização de plantas livres de vírus para propagação e cultivo por semeadura, uma vez que o CymMV e o ORSV não são transmitidos por semente. Uma vez que dentre os mais de 50 vírus de orquídeas relatados possuem variados vetores, como ácaros, tripses e afídeos, deve-se atentar para o controle químico destes e eliminar as plantas hospedeiras alternativas aos arredores das áreas de cultivo (FREITAS, 1999).

No entanto, quando há necessidade de se multiplicar uma planta de grande interesse que encontra-se infectada por vírus, métodos com quimioterapia, a cultura de tecidos e termoterapia, isoladamente ou em conjunto, podem ser empregadas (FREITAS, 1996).

Quando se fala em cultura de tecidos em orquídeas, sabe-se que o tamanho do meristema retirado é de grande importância, não somente para o desenvolvimento do tecido *in vitro*, como também para a eliminação dos vírus (ISHII, 1974, citado por FREITAS, 1996). A baixa sobrevivência de meristemas deve-se à perda pela infecção do vírus (escape de tecido infectado), danos mecânicos, ressecamento e oxidação do explante (PIERIK, 1987, citado por FREITAS, 1996).

Assim, gêneros que apresentam alta taxa de oxidação, como a *Cattleya*, não podem ser micropropagados com meristemas pequenos demais, ao passo que a limpeza viral também não se sucede, já que o fragmento meristemal será grande o suficiente para manter os vírus. Portanto, o sucesso da limpeza clonal por cultura de tecidos depende não só do tamanho do meristema, como também do gênero de orquídea, já que outros, como o *Cymbidium*, podem ser cortados diminutamente (0,1-0,3 mm) sem sofrer oxidação e ter o vírus CymMV eliminado (INOUE, 1984).

Não existe, até o momento, um método curativo capaz de atuar exclusivamente sobre os vírus, como é feito para demais patógenos. Portanto, prevenir é a melhor opção para o produtor (ALEXANDRE; DUARTE, 2012).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Levantamento**

#### **5.1.1. Material vegetal**

Amostras de tecido foliar sintomáticas e assintomáticas de orquídeas de vários gêneros foram coletadas em diferentes regiões geográficas do estado de São Paulo, provenientes de produtores, de coleções de orquidófilos, e de empresas exportadoras. As coletas foram realizadas em diferentes épocas, nos seguintes municípios: Atibaia, Aparecida, Arujá, Araras, Arthur Nogueira, Botucatu, Bragança Paulista, Campinas, Holambra, Piracicaba, Pirassununga, Santo Antonio, São João da Boa Vista, São Manuel, Sorocaba, Suzano, Mogi das Cruzes e Ribeirão Preto (Tabela 1).

**Tabela 1.** Períodos, quantidades, e locais que as coletas foram realizadas, entre maio de 2011 e dezembro de 2012, no estado de São Paulo, Brasil.

Coletas	Período de Coletas	Nº de	
		amostras	Localidade
1	Maio 2011	15	Mogi das Cruzes
2	Junho 2011	23	Holambra
3	Julho 2011	43	Botucatu
4	Agosto 2011	21	Bragança Paulista
5	Agosto 2011	25	Arthur Nogueira
6	Setembro 2011	1	Sorocaba
7	Novembro 2011	49	Suzano
8	Janeiro 2012	16	São João da Boa Vista
9	Fevereiro 2012	6	Ribeirão Preto
10	Fevereiro 2012	1	Araras
11	Março 2012	30	Aparecida
12	Março 2012	2	Campinas
13	Junho 2012	47	Arujá
14	Agosto 2012	15	Piracicaba
15	Outubro 2012	16	São Manuel
16	Outubro 2012	10	Pirassununga
17	Outubro 2012	5	Santo Antônio
18	Dezembro 2012	60	Atibaia
<b>Total</b>		<b>385</b>	

As folhas foram coletadas com material cortante previamente esterilizado para impedir a possível transmissão de vírus. As amostras foram acondicionadas em embalagens individuais, identificadas, e levadas ao Laboratório de Virologia do Departamento de Proteção de Plantas da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP de Botucatu, no qual foram analisadas por sorologia e testes moleculares. Quando as visitas às propriedades não foram possíveis, as amostras foram enviadas por correio, de

modo que as orientações sobre como extrair as amostras, bem como com as acondicionar, foram passadas ao coletor.

## **5.2. Caracterização sorológica, biológica e molecular dos isolados**

### **5.2.1. Testes sorológicos**

Os testes de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) foram realizados para a detecção dos vírus CymMV, ORSV, CymRSV (*Cymbidium ringspot virus*), TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) e o gênero *Potyvirus*, sendo o último através de um antissoro universal. Os antissoros foram todos obtidos da empresa Agdia, e a condução dos testes foi de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

#### **5.2.1.1. Detecção de CymMV, ORSV, CymRSV e TSWV**

Para a detecção de CymMV, ORSV, CymRSV e TSWV utilizou-se o método *Direct Antibody Sandwich-ELISA* (DAS-ELISA).

Foram adicionados em cada pocinho, 100 µL de anticorpo, diluído 1:200 em tampão carbonato (1,59g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2g de NaN<sub>3</sub>, em 1.000 mL de água destilada), e incubado por 4 horas a temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens da placa com PBS-Tween. As amostras foliares foram então maceradas em General Extract Buffer (1,3g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 0,2g de NaN<sub>3</sub>, 2,0g albumina de ovo de galinha, 20 mL de Tween-20, dissolvidos em 1.000 mL de PBS-Tween) e 100 µL do macerado foi adicionado em cada pocinho e incubado por 16 horas à 4 °C.

A placa foi então lavada novamente com PBS-Tween por 8 vezes, e em seguida foi adicionado o conjugado, diluído em tampão ECI (1:200), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 8 vezes. A revelação foi feita utilizando a enzima p-nitrofenilfosfato (1,0 mg/mL) diluída em 5 mL de tampão Tris 0,2 M (Sigma). Após 60 minutos, a leitura da placa foi efetuada em leitor automático de microplaca, em absorvância de 405 nm.

### 5.2.1.2. Detecção de *Potyvirus*

Para a detecção do gênero *Potyvirus* foi utilizado o teste de ELISA-indireto, através de um antissoro policlonal universal para a detecção do gênero, no qual inicialmente as amostras foram maceradas em tampão de extração Indirect Sample Extraction (1,59g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,93g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,2g de NaN<sub>3</sub>, 20g de Polyvinylpyrrolidona (PVP) dissolvidos em 1000 mL de água destilada), e 100 µL do macerado foi adicionado às cavidades das placas e incubados por 2 horas em temperatura ambiente.

A placa foi então lavada por 7 vezes em tampão PBS-Tween (NaCl (8,0g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,5g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2g), KCl (0,2g), Tween 20 (500 µL) dissolvidos em 1000 mL de água destilada obtendo uma solução final com pH 7.4). Seguiu-se com a adição do anticorpo, diluído (1:200) em ECI Buffer (20g de Polyvinylpyrrolidona (PVP), 2,0g de albumina bovina, 0,2g de NaN<sub>3</sub>) e incubado por 16 horas à 4°C, seguido de lavagem por 7 vezes com tampão PBS-Tween.

Em seguida foi adicionado o conjugado, diluído em ECI Buffer (1:200), e incubado por 2 horas, seguido de lavagem por 7 vezes em tampão PBS-Tween. A revelação foi feita utilizando a enzima p-nitrofenilfosfato (1,0 mg/mL) diluída em 5 mL de tampão Tris 0,2 M (Sigma). Após 60 minutos, a leitura da placa foi efetuada em leitor automático de microplaca, em absorbância de 405 nm.

### 5.2.2. Gama de hospedeiras

Para a caracterização biológica, plantas de *Cassia occidentalis*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana* (FREITAS, 1996; AJJIKUTIRA, 2003) foram inoculadas com 3 isolados, preservados *in vivo* em duas plantas de orquídeas *Rhinconthylis gigantea* (dois isolados; um de CymMV, outro de ORSV) e *Oncidium* sp. (apresentava-se com infecção mista para as duas espécies). Assim, cada isolado contou com 36 plantas indicadoras (seis de cada espécie).

Para macerar o tecido, utilizou-se tampão fosfato de potássio 0,05M pH 8.0 e como abrasivo o carborundum (600 mesh). Após inoculação, as plantas foram lavadas e mantidas em casa-de-vegetação. Este teste foi repetido três vezes: o

primeiro teve início dia 16 de maio de 2011; o segundo, 8 de outubro de 2011; e o último, 9 de janeiro de 2012.

As avaliações quanto à presença de sintomas foram realizadas periodicamente após inoculação, totalizando 36 dias, subdivididos em períodos de seis dias entre uma observação e outra. A presença viral foi checada pelo teste de ELISA utilizando-se antissoros para CymMV e ORSV.

### **5.2.3. Extração de RNA total**

As extrações de RNA viral presente nas amostras foram realizadas através de dois métodos.

No método descrito por Bertheau e colaboradores (1998), as folhas foram trituradas (1:5 p/v) em tampão PBS-Tween contendo PVP K25 a 2 % (p/v) e Na-DIECA 20 mM, e centrifugadas em tubos de microcentrífuga por 10 minutos a 13.000 rpm (Centrifuga Eppendorf 5804 R). Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, acrescentando-se SDS a 1 %. Após incubação a 55°C por 15 minutos, foram adicionados 100 µl de solução de acetato de potássio a 3M e seguindo por agitação da solução. Posteriormente as amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 700 µl de NaI 6 M e 5 µl de uma solução contendo silício. A solução foi bem agitada e mantida por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi centrifugada por um minuto a 5.000 rpm, o sobrenadante descartado e o 'pellet' lavado duas vezes com 500 µl de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e igual volume de etanol absoluto. Após centrifugação por 1 minuto a 5.000 rpm, o 'pellet' foi secado a vácuo e o RNA ressuspendido em 400 µl de água Milli-Q tratada com DEPC, seguido de incubação por 5 minutos a 55°C e centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante (300 µl) foi então transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. Uma alíquota de 5 µl foi utilizada para a RT-PCR.

Devido ao excessivo e rápido processo de oxidação de algumas amostras de folhas de orquídeas, principalmente as pertencentes ao gênero *Cattleya*, foi utilizado nitrogênio líquido no momento da maceração das amostras, seguindo o método descrito acima.

A extração de RNA viral das amostras de folhas de orquídeas também foi realizada com o uso do Kit de extração Total RNA Purification, marca Norgen. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizou-se uma alíquota de 5µL para a RT-PCR.

#### 5.2.4. Obtenção de oligonucleotídeos para a região codificadora da proteína capsidial de CymMV e ORSV

O RT-PCR foi conduzido com pares de oligonucleotídeos para detecção de CymMV, ORSV e OFV (*Orchid fleck virus*).

Para a confecção dos oligonucleotídeos para CymMV e ORSV foram alinhadas multiplas sequencias do Banco de dados de DNA GenBank, de diversas localidades mundiais, afim de se obter um oligonucleotídeo de identificação abrangente (Fig. 4 e Fig. 5). O alinhamento multiplo foi feito atraves do programa Mega 5.0, e sua visualização pelo Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

```
Taiwan      CATAACATAGACGGGGCGTCTATTACTATCACTAACTGCCCCGATCCTGCATCTATATT
Singapore   CATAACATAGACGGGGCGTCTATTACTATCACTAACTGCCCCGATCCTGCAGCTATATT
Japan       CATAACATAGACGGGGCGTCTATTACTATCACTAACTGCCCCGATCCTGCAGCTATATT
China       CATAACATAGACGGGGCGTCTATTACTATCACTAACTGCCCTGATCCTGCAGCTATATT
*****

Taiwan      AAATAAAGTAGCCATAGGCCCTGGCGAGGGTTAAGTTACCACAATAATTTGAAATAATC
Singapore   AAATAAAGTAGCTATAGGCCCTGGCGAGGGTTAAGTTACCACAATAATTTGAAATAATC
Japan       AGATAAAGTAGCCATAGGTCCCTGGCGAGGGTTAAGTTACCACAATAACTTGAAATAATC
China       AAATAAAGTAGCCATAGGCCCTGGCGAGGGTTAAGTTACCACAATAATTTGAAATGATC
* *****

Taiwan      ATGGGAGAGCCCACTCCAAGTCCAGCTGCTCACTTACTCCGCTGCCGACCCCACTTCCGCA
Singapore   ATGGGAGAGCCCACTCCAGCCCACTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCCACTTCTGCA
Japan       ATGGGAGAGCCCACTCCGACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCCACTTCTGCA
China       ATGGGAGAGCCCACTCCAAGTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCCACTTCTGCA
*****

Taiwan      CCCAAGTTGGCCGACCTGGCTGCCATTAAGTACTCACCTGTCCACCTCCTCCATCGCCACC
Singapore   CCCAAAATTGGCCGACCTGGCTGCCATTAAGTACTCACCTGTCCACCTCCTCCATCGCCACC
Japan       CCCAAGTTGGCCGACCTGGCTGCCATTAAGTACTCACCTGTTACCTCCTCCATCGCCACC
China       CCCAAGTTGGCTGACCTGGCTGCCATCAAGTACTCACCTGTCCACCTCCTCCATTGCCACC
** * *****

Taiwan      CCCGAAGAAATTAAGGCCATAACCAATTGTGGGTTAACAACCTTGGCCTCCCCGCTGAC
Singapore   CCCGAAGAAATCAAGGCCATAACCAATTGTGGGTTAACAACCTTGGCCTCCCCGCTGAC
Japan       CCCGAAGAAATCAAGGCCATAACCAATTGTGGGTTAACAACCTTGGCCTCCCCGCTGAC
China       CCCGAAGAAATCAAGGCCATAACCAATTGTGGGTTAACAACCTTGGCCTCCCCGCGAC
*****
```

Taiwan	ACCGTAGGTACCGCGGCCATTGACCTGGCCCGCGCCTACGCTGACGTCGGGGCGTCCAAG
Singapore	ACCGTAGGTACCGCGGCCATTGACCTGGCCCGTGCCTACGCTGACGTCGGGGCGTCCAAG
Japan	ACCGTAGGTACCGCGGCCATTGACCTGGCCCGCGCCTACGCTGACGTCGGGGCGTCCAAG
China	ACAGTAGGTACTGCGGCCATTGACCTGGCTCGCGCCTACGCTGACGTCGGGGCGTCCAAG ** ***** **
Taiwan	AGTGGTACCCTGCTCGGTCTCTGCCTACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGCC
Singapore	AATGCTACCCTGCTCGGTTTCTGCCTACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGCC
Japan	AGTGTACCCTGCTCGGTTTCTGCCTACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGCC
China	AGTGTACCCTGCTTGGTTTCTGCCTACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGCC * * ***** **
Taiwan	GCGCAGATCTTCGTGGCCAACGTACCCCCCGCCAGTTTTGCGCTTACTACGCAAAAGTG
Singapore	GCGCAGATCTTCGTAGCCAACGTACCCCCCGCCAGTTTTGCGCTTACTACGCAAAAGTG
Japan	GCGCAGATCTTCGTGGCCAACGTACCCCCCGCCAGTTTTGCGCTTACTACGCAAAAGTG
China	GCGCAGATCTTCGTGGCCAACGTACCCCCCGCCAGTTTTGCGCTTACTACGCAAAAGTG *****
Taiwan	GTGTGGAATCTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCCCGCCAACCTGGGCCAAGGCTGGTTTC
Singapore	GTGTGGAATCTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCCCGCCAACCTGGGCTAAGGCTGGTTTC
Japan	GTGTGGAATCTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCCCGCCAACCTGGGCCAAGGCTGGTTTC
China	GTGTGGAACCTGATGCTGGCTACTAACGATCCGCTGCCAACCTGGGCCAAGGCTGGTTTC *****
Taiwan	CAGGAGGATACCCGGTTTGCCGCCTTCGACTTCTTCGATGCCGTTGATTCCACTGCCGCG
Singapore	CAGGAGGATACCCGGTTTGCCGCCTTCGACTTCTTCGATGCCGTCGATTCCACTGCCGCG
Japan	CAGGAGGATACCCGGTTTGCCGCCTTCGACTTCTTCGATGCCGTCGATTCCACTGCCGCG
China	CAGGAGGATACCCGGTTTGCTGCATTCGACTTCTTCGATGCAGTCGATTCCACTGCCGCG ***** **
Taiwan	CTGGAGCCTGCTGAATGGCAGCGCCGCCCTACTGACCGTGAACGTGCTGCGCACTCGATA
Singapore	CTGGAGCCTGCTGAATGGCAGCGCCGCCCTACTGACCGTGAACGTGCTGCGCACTCGATC
Japan	CTGGAGCCTGCTGAATGGCAGCGCCGCCCTACTGACCGTGAACGTGCTGCGCACTCGATC
China	TTGGAGCCTGCTGAATGGCAGCGCCGCCCTACCGACCGTGAACGTGCTGCGCACTCAGTC ***** *
Taiwan	GGGAAGTACGGCGCCCTTGCCCGCCAGCGTATCCAAAACGGCAACCTCATCACCAACATT
Singapore	GGGAAGTACGGCGCCCTTGCCCGTCAGCGCATCCAAAACGGCAACCTCATCACCAACATT
Japan	GGGAAGTACGGCGCCCTTGCCCGTCAGCGTATCCAAAACGGCAACCTCATCACCAACATT
China	GGGAAGTACGGCGCCCTTGCCCGTCAGCGTATCCAAAACGGCAACCTCATCACCAACATT *****
Taiwan	GCCGAGGTCACCAAGGGCCATCTTGCTCCACTAACACTCTCTATGCTCTGCCTGCACCC
Singapore	GCAGAGGTCACCAAGGGCCATCTTGCTCCACCAACACCCTCTATGCTCTGCCTGCACCC
Japan	GCCGAGGTCACCAAGGGCCATCTTGCTCCACCAACACTCTCTATGCTCTGCCTGCACCC
China	GCCGAGGTCACCAAGGGCCATCTTGCTCCACCAACACTCTCTATGCTCTGCCTGCACCC ** *****
Taiwan	CCTACTGAA <span style="background-color: yellow;">TAA</span> CGC <span style="background-color: pink;">CAA</span> ACT <span style="background-color: pink;">TAATAAGGCGTGTGGTTTT</span> CTAAAGTTGTTTCCACTAC
Singapore	CCTACTGAA <span style="background-color: yellow;">TAA</span> CGC <span style="background-color: pink;">CAA</span> ACT <span style="background-color: pink;">TAATAAGGCGTGTGGTTTT</span> CTAAAGTTGTTTCCACTAC
Japan	CCTACTGAA <span style="background-color: yellow;">TAA</span> CGC <span style="background-color: pink;">CAA</span> ACT <span style="background-color: pink;">TAATAAGGCGTGTGGTTTT</span> CTAAAGTTGTTTCCACTAC
China	CCTACTGAA <span style="background-color: yellow;">TAA</span> CGC <span style="background-color: pink;">CAA</span> ACT <span style="background-color: pink;">TAATAAGGCGTGTGGTTTT</span> CTAAAGTTGTTTCCACTAC *****

**Figura 4.** Alinhamento de sequencias de nucleotídeos de CymMV pelo Clustal W, para a identificação dos oligonucleotídeos senso (vermelho) e antisense (rosa), desenhados para obter a extensão total do gene decodificador da proteína capsial. Os códons marcados em amarelo indicam o iniciador (ATG) e o finalizador (TAA) do gene. Acessos: Taiwan: AY571289.1, Singapura: U62963.1, Japão: AB197937.1, China: HQ681906.1.

```

Taiwan      GTGTTGTAGATGATATTGTGGTTAGTAATGGTGTAGTAGTATTCGTATTGATGATGATT
Singapore   GTGTTGTAGATGATATTGTGGTCGGTAATGGTGTAGTAGTATTCGTATTGATGATGATT
coat_protein GTGTTGTAGATGATATTGTGGTTGGTAATGGTGTAGTAGTATTCGTATTGATGATGATT
*****

Taiwan      GTGAGTCATTTGACGCACAATCTGATTCGTATTGAATATGTCCTTACACTATTACAGACCC
Singapore   GTGAGTCATTTGACGCACAATCTGATCCGTATTGAATATGTCCTTACACTATTACAGACCC
coat_protein GTGAGTCATTTGACGCACAATCTGAATCGTATTGAATATGTCCTTACACTATTACAGACCC
*****

Taiwan      GTCTAAGCTGGCTTATTTAAGCTCGGCTTGGGCTGACCCCAATTCACTAATCAACCTTTG
Singapore   GTCTAAGCTGGCTTATTTAAGCTCGGCTTGGGCTGACCCCAATTCACTAATCAACCTTTG
coat_protein GTCTAAGCTGGCTTATTTAAGCTCGGCTTGGGCTGACCCCAATTCACTAATCAACCTTTG
*****

Taiwan      TACCAATTCTCTGGGTAATCAGTTCCAAACACAACAAGCTCGAACAACTGTTCAACAGCA
Singapore   TACCAATTCTCTGGGTAATCAGTTCCAAACACAACAAGCTCGAACAACTGTTCAACAGCA
coat_protein TACCAATTCTCTGGGTAATCAGTTCCAAACACAACAAGCTCGAACAACTGTTCAACAGCA
*****

Taiwan      GTTTGCTGATGTTTGGCAGCCGGTTCCTACTTTGACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCCGCTGG
Singapore   GTTTGCTGATGTTTGGCAGCCGGTTCCTACTTTGACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCCGCTGG
coat_protein GTTTGCTGATGTTTGGCAGCCGGTTCCTACTTTGACCAGTAGGTTCCCTGCAGGCCGCTGG
*****

Taiwan      TTACTTCAGAGTTTATCGCTATGATCCTATATTAGATCCTTTAATAACTTTCTTAATGGG
Singapore   TTACTTCAGAGTTTATCGCTATGATCCTATATTAGATCCTTTAATAACTTTCTTAATGGG
coat_protein TCACTTCAGAGTTTATCGCTATGAACCTTATACTAGAACCTTTAATAACTTTCTTAATGGG
* *****

Taiwan      TACTTTTGATACTCGTAATAGAATAATCGAGGTAGAAAATCCGCAGAATCCGACAACCTAC
Singapore   TACTTTTGATACTCGTAATAGAATAATCGAGGTAGAAAATCCGCAGAATCCGACAACCTAC
coat_protein TACTTTTGATACTCGTAATAGAATAATCGAGGTAGAAAATCCGCAGAATCCGACAACCTAC
*****

Taiwan      GGAAACATTAGATGCAACTCGTAGAGTTGATGATGCAACTGTAGCAATAAGATCTGCAAT
Singapore   GGAAACATTAGATGCAACTCGTAGAGTTGATGATGCAACTGTAGCAATAAGATCTGCAAT
coat_protein GGAAACATTAGATGCAACTCGTAGAGTTGATGATGCAACTGTAGCAATAAGATCTGCAAT
*****

Taiwan      AAATAATCTATTAAATGAGTTAGTTAGGGGAACTGGTATGTACAATCAAGTCTCATTGGA
Singapore   AAATAATCTATTAAATGAGTTAGTTAGGGGAACTGGTATGTACAATCAAGTCTCATTGGA
coat_protein AAATAATCTATTAAATGAGTTAGTTAGGGGAAATGGTATGTACAATCAAGTCTCATTGGA
*****

Taiwan      GACGATGTCTGGACTTACTTGGACCTCTTCCATAATTTAGGAAAATAACGTTGATA
Singapore   GACGATGTCTGGACTTACTTGGACCTCTTCCATAATTTAGGAAAATAACGTTGATA
coat_protein GACGATGTCTGGACTTACTTGGACCTCTTCCATAATTTAGGAAAATAACGTTGATA
*****

Taiwan      GTGTTGAACATATCCGTGGTGCATACGATAATGCATAGTGTTATCCCTCCACTTAAATCG
Singapore   GTGTTGAACATATCCGTGGTGCATACGATAATGCATAGTGTTATCCCTCCACTTAAATCG
coat_protein GTGTTGAACATAGGGCTGGTGCATACGATAATGCATAGTGTTATCCCTCCACTTAAATCG
*****

Taiwan      AAGGGTTTTCTACTGCGGATAATGTAGGTTTCCTGGCCCA
Singapore   AAGGGTTTTCTACTGCGGATAATGTAGGTTTCCTGGCCCA
coat_protein AAGGGTTTTCTACTGCGGATAATGTAGGTTTCCTGGCCCA
*****

```

**Figura 5.** Alinhamento de sequências de nucleotídeos de ORSV pelo Clustal W, para a identificação dos oligonucleotídeos senso (verde) e antisense (cinza), desenhados para obter a extensão total do gene decodificador da proteína capsidial. Os códons marcados em amarelo indicam o iniciador (ATG) e o finalizador (TAA) do gene. Acessos: Taiwan: AY571259.1, Singapura: U34586.1, Coat\_protein: U89894.1.

Dessa forma, os oligonucleotídeos desenhados para CymMV foram: CymMVF (5' - CTG CCC TGA TCC TGC AGC - 3') e CymMVR (5' AAA ACC ACA CGC CTT ATT AAG TTT G 3'). Para ORSV, por sua vez: ORSVF (5' TAT TGT GGT CGG TAA TGG 3') e ORSVR (5' TAT CCG CAG TGA AAA ACC C 3').

Os oligonucleotídeos utilizados na detecção de OFV foram obtidos de Kubo (2006) e correspondem ao par: OFV F (5' TGT CAT AGC CGA CAT AA ACA CC 3') e OFV R (5' TGT AGA GCT TGC GAG ATA CAG G 3'), o qual amplifica um fragmento de 320 pb e é específico para a detecção de OFV N (OFV tipo nuclear).

### **5.2.5. Transcrição Reversa e Reação de Polimerização em Cadeia (RT-PCR)**

Para todos os vírus analisados, foi utilizado o teste de RT-PCR em uma só etapa, utilizando-se o GoTaq (Promega).

Para um volume de 50 µl de reação, adicionou-se 10 µL de GoTaq Buffer, 0,3 µl de cada oligonucleotídeo, 0,3 µl de dNTP, 0,05 µl da enzima transcriptase reversa AMV (Avian myeloblastosis virus, marca Promega a 15 unidades/µL), 0,25 µl da enzima GoTaq, 5,0 µL de RNA e 33,8 µl de água livre de RNAses.

A RT-PCR para CymMV e ORSV consistiu de 1 ciclo à 42°C por 30 minutos, 1 ciclo à 94°C por 2 minutos, 34 repetições dos ciclos à 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 10min.

A RT-PCR para OFV consistiu de 1 ciclo de 42°C por 30 minutos, 1 ciclo de 94°C por 2 minutos, 30 repetições de 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Foram retirados 7 µL da reação de RT-PCR para análise em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,1 M de ácido bórico, 0,02 mM EDTA pH 8,3). Utilizou-se o marcador 1kb Ladder Plus da Invitrogen. O gel foi corado com GelRed™ (Biotium) e visualizado em transiluminador.

### 5.3. Sequenciamento

Isolados representativos foram selecionados para sequenciamento da região codificadora da proteína capsidial. Para isto o fragmento foi purificado com os Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) ou pelo QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen). Após a purificação os produtos foram quantificados utilizando-se o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e enviados para sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado pelas instituições: Macrogen (Seoul, Korea); a Plataforma de Sequenciamento do Centro de Estudos de Genoma Humano da USP; ou a Universidade Estadual Julio Mesquita Filho (Campus de Rubião).

As amostras sequenciadas foram analisadas pelo programa ‘NCBI BLAST’ (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Clustal W (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), e a construção da árvore filogenética foi realizada utilizando-se o programa MEGA 5.0.

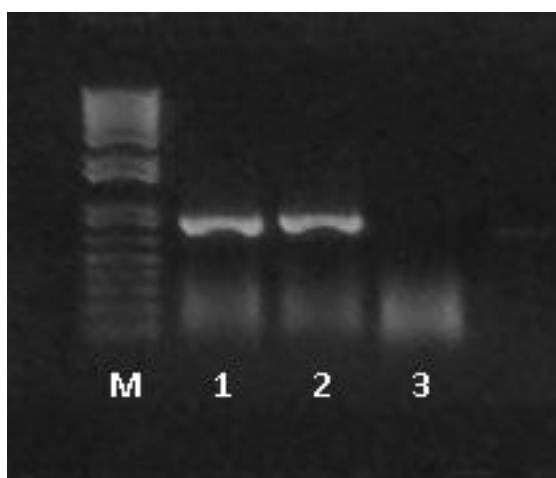
### 5.4. Estudo de variabilidade de sintomas

Os sintomas de todas as plantas analisadas foram descritos e fotografados, de modo a ser feita uma comparação da expressão dos sintomas de determinado vírus dentro de um mesmo gênero e entre gêneros de orquídeas, e assim, estabelecer um estudo sobre a variabilidade de formas de manifestação dos vírus, principalmente o CymMV e ORSV, devido sua prevalência.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

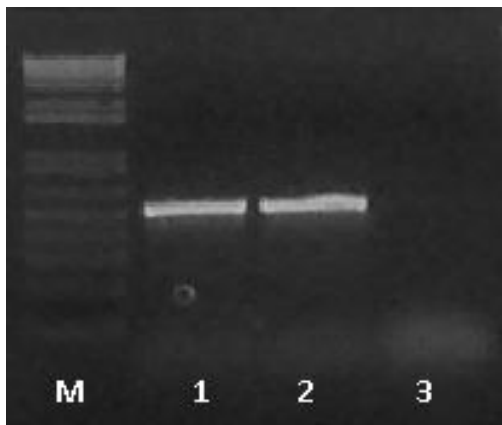
### 6.1. Testes de eficiência dos oligonucleotídeos desenhados para a região codificadora da proteína capsial de CymMV e ORSV

Os oligonucleotídeos específicos para CymMV e ORSV foram testados com amostras provenientes dos produtores e mostraram-se eficientes para amplificação da região total da capa protéica do vírus (fragmento de aproximadamente 700 bp e 500 bp, respectivamente). Amostras positivas para CymMV foram testadas com primers específicos de ORSV, e vice versa, porém não foi verificada amplificação inespecífica com os mesmos (Fig. 6 e Fig. 7).



**Figura 6.** Gel de agarose obtido a partir do teste com o novo par de oligonucleotídeos desenhados para CymMV. Um fragmento de tamanho aproximado de 700 bp foi obtido

como esperado. M: Marcador molecular Ikb plus DNA Ladder; 1 e 2: controles positivos de CymMV; 3: controle negativo.



**Figura 7.** Gel de agarose obtido a partir do teste com o novo par de oligonucleotídeos desenhados para ORSV. Um fragmento de tamanho aproximado de 500 bp foi obtido como esperado. M: Marcador molecular Ikb plus DNA Ladder; 1 e 2: controles positivos de ORSV; 3: controle negativo.

## 6.2. Estudo de incidência dos vírus nas orquídeas

### 6.2.1. ELISA e RT-PCR

Do total de 385 amostras foliares analisadas, 274 foram positivas para cymMv, 61 para ORSV e 11 para OFV. Não foi verificada a presença de TSWV, CymRSV, ou o gênero *Potyvirus* (Tabela 2).

Foram realizadas análises por RT-PCR e ELISA para todas as amostras. No decorrer da realização dos testes, observou-se maior sensibilidade na detecção realizada pelo RT-PCR, quando comparado ao ELISA (dado não apresentado). Neste último, resultados positivos que geraram dúvida quanto a confirmação da presença viral, devido ao baixo grau de absorvância, foram confirmados pelo teste molecular. Segundo o protocolo do fabricante, deve-se considerar positivos os testes que apresentem valor de absorvância em 405 nm três vezes maior que o apresentado pelo controle negativo. Tendo em vista este fato, em algumas situações durante este levantamento, amostras verdadeiramente positivas teriam sido desconsideradas, caso fosse somente realizado o teste de ELISA.

Apesar de em ambos os testes as amostras foliares de orquídeas terem sido maceradas com nitrogênio líquido, em uma tentativa de sanar a oxidação das folhas, observou-se que o macerado tamponado do ELISA de alguns gêneros, em especial *Cattleya* sp., tornavam-se escurecidos em poucos minutos. A oxidação pode ser uma explicação para a menor eficácia do ELISA, em comparação ao RT-PCR, um vez que para a realização da extração de RNA, provavelmente devido a composição dos tampões envolvidos neste procedimento, observou-se menor oxidação dos macerados.

**Tabela 2.** Resultado geral dos testes de ELISA e RT-PCR realizados nas amostras coletadas (total de amostras / positivas).

<b>Localidade</b>	<b>CymMV</b>	<b>ORSV</b>	<b>CymRSV</b>	<b>TSWV</b>	<b>OFV</b>	<b>Potyvirus</b>
Atibaia	60/46	60/11	60/0	60/0	60/7	60/0
Aparecida	30/7	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Arujá	47/38	47/12	47/0	47/0	47/0	47/0
Araras	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
Arthur Nogueira	25/19	25/20	25/0	25/0	25/0	25/0
Botucatu	43/34	43/2	43/0	43/0	43/0	43/0
Bragança Paulista	21/15	21/7	21/0	21/0	21/0	21/0
Campinas	2/2	2/1	2/0	2/0	2/0	2/0
Holambra	23/18	23/5	23/0	23/0	23/0	23/0
Mogi das Cruzes	15/3	15/0	15/0	15/0	15/0	15/0
Piracicaba	15/14	15/0	15/0	15/0	15/4	15/0
Pirassununga	10/7	10/0	10/0	10/0	10/0	10/0
Ribeirão Preto	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0
Santo Antônio	5/5	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0
São João da Boa Vista	16/12	16/1	16/0	16/0	16/0	16/0
São Manuel	16/11	16/0	16/0	16/0	16/0	16/0
Sorocaba	1/1	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
Suzano	49/41	49/2	49/0	49/0	49/0	49/0
<b>Total</b>	<b>385/274</b>	<b>385/61</b>	<b>385/0</b>	<b>385/0</b>	<b>385/11</b>	<b>385/0</b>
<b>Porcentuais</b>	<b>71,16%</b>	<b>15,85%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>2,85%</b>	<b>0%</b>

**Tabela 3.** Comparativo de amostras com infecção simples e mista (total de amostras/positivas).

<b>Localidade</b>	<b>CymMV</b>	<b>ORSV</b>	<b>CymMV+ORSV</b>
Atibaia	60/40	60/5	60/6
Aparecida	30/7	30/0	30/0
Arujá	47/34	47/8	47/4
Araras	1/1	1/0	1/0
Arthur Nogueira	25/3	25/4	25/16
Botucatu	43/32	43/0	43/2
Bragança Paulista	21/10	21/2	21/5
Campinas	2/1	2/0	2/1
Holambra	23/15	23/2	23/3
Mogi das Cruzes	15/3	15/0	15/0
Piracicaba	15/14	15/0	15/0
Pirassununga	10/7	10/0	10/0
Ribeirão Preto	6/0	6/0	6/0
Santo Antônio	5/5	5/0	5/0
São João da Boa Vista	16/11	16/0	16/1
São Manuel	16/11	16/0	16/0
Sorocaba	1/1	1/0	1/0
Suzano	49/39	49/0	49/2
<b>Total</b>	<b>385/234</b>	<b>385/21</b>	<b>385/40</b>
<b>Porcentuais</b>	<b>60,77%</b>	<b>5,45%</b>	<b>10,38%</b>

**Tabela 4.** Incidência dos vírus CymMV, ORSV e OFV (infecção simples e mista) nos gêneros de orquídeas cultivadas em 18 municípios do Estado de São Paulo (total de amostras / positivas).

Gênero	CymMV	%	ORSV	%	OFV	%	CymMV+ ORSV	%
<i>Angraecum</i>	10/4	40%	10/0	-	10/0	-	10/0	-
<i>Arundina</i>	4/0	-	4/0	-	4/4	100%	4/0	-
<i>Brassia</i>	9/2	22,3%	9/1	11,2%	9/0	-	9/0	-
<i>Bulbophyllum</i>	16/9	56,2%	16/1	6,2%	16/0	-	16/2	33,4%
<i>Cattleya</i>	43/31	72%	43/5	11,6%	43/0	-	43/4	9,3%
<i>Cymbidium</i>	63/28	44,5%	63/6	9,5%	63/1	1,6%	63/9	14,3%
<i>Denphale</i>	2/0	-	2/1	50%	2/0	-	2/0	-
<i>Dendrobium</i>	39/25	64%	39/2	5,1%	39/2	5,1%	39/5	12,8%
<i>Dendrochilum</i>	3/0	-	3/0	-	3/0	-	3/0	-
<i>Epidendrum</i>	8/6	75%	8/0	-	8/0	-	8/0	-
<i>Encyclia</i>	1/0	-	1/0	-	1/0	-	1/0	-
<i>Jumelia</i>	2/0	-	2/0	-	2/0	-	2/0	-
<i>Laelia</i>	32/22	68,7%	32/1	3,1%	32/0	-	32/1	3,2%
<i>Habernaria</i>	1/0	-	1/0	-	1/0	-	1/0	-
<i>Miltonia</i>	21/16	76%	21/0	-	21/0	-	21/3	14,3%
<i>Oncidium</i>	46/30	65,2%	46/1	2,1%	46/4	8,7%	46/5	10,9%
<i>Paphiopedilum</i>	5/2	40%	5/0	-	5/0	-	5/0	-
<i>Phalaenopsis</i>	52/43	82,7%	52/2	3,8%	52/0	-	52/5	9,6%
<i>Rhynchontilis</i>	7/4	157,1%	7/0	-	7/0	-	7/3	42,8%
<i>Vanda</i>	3/0	-	3/0	-	3/0	-	3/0	-
Desconhecidos	18/12	66,7%	18/1	5,6%	18/0	-	18/3	16,7%

As análises demonstram a prevalência do vírus CymMV nas orquídeas do estado de São Paulo, tendo este sido encontrado em 274 plantas, ou seja, 71,16% de incidência nas 385 amostras analisadas. Estes resultados mostraram também que apenas 61 amostras apresentaram infecção por ORSV, o que representa 15,85% de incidência, bem como que grande parte das amostras infectadas com ORSV (40 de 61, ou seja, 65,57%) apresentaram infecção mista com CymMV. Observou-se que a distribuição do CymMV foi relativamente alta e uniforme entre as cidades e os gêneros de orquídeas analisados, ao passo que o ORSV foi encontrado em maior frequência na cidade de Arthur Nogueira, e em menor escala nas cidades de Atibaia e Arujá (Tabela 3), porém sua distribuição entre os gêneros de orquídeas foi em geral baixa (Tabela 4). Não foram detectados os vírus TSWV, CymRSV e pertencentes ao gênero *Potyvirus* em nenhuma das cidades de coleta.

Apenas 11 amostras estavam infectadas por OFV, e estas apresentavam sintomas bastante expressivos e característicos (vide item 6.5 “Sintomatologia”), bem como foram detectadas em somente duas cidades, Atibaia e Piracicaba. Uma possível explicação para a baixa incidência deste vírus neste levantamento é devido os sintomas serem muito acentuados, e as plantas descartadas assim que detectadas no local de cultivo. Não foi observada presença de infecção mista de OFV com quaisquer outro vírus estudado.

No levantamento feito por Kubo em 2006, foram coletadas 172 amostras de orquídeas de diversos gêneros e de diferentes localidades mundiais. Apesar dos sintomas característicos em 100% das amostras, 76 delas estavam infectadas com OFV, o que representou 44,18% de incidência.

Em 1996, Freitas executou um levantamento no estado de São Paulo e no orquidário de coleção da ESALQ/USP, no qual 1773 amostras de orquídeas foram testadas por ELISA para a presença de CymMV, ORSV, CMV, CymRSV e DsMV. Houve infecção por CymMV em 7,5% das amostras, 7,3% por ORSV, e o complexo viral CymMV+ORSV foi encontrado em 4,6% das amostras. Os vírus CMV, CymRSV e DsMV não foram encontrados.

As incidências de CymMV, ORSV e OFV em 104 orquídeas comerciais dos gêneros *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* e *Oncidium* foram testadas via RT-PCR por Kim et al. (2010) na Coreia. Oitenta e nove orquídeas estavam infectadas com ORSV e trinta e três com CymMV. A incidência de infecção mista foi de 85,6%, ou

seja, 28 amostras apresentaram ambos os vírus. Não houve infecção somente por CymMV e somente uma amostra de *Cymbidium* estava infectada com OFV.

No Havaí, Hu et al. (1992) testaram 132 amostras de orquídeas obtidas de produções locais. Cinquenta e nove estavam infectadas com CymMV e vinte e três com ORSV. Vinte e duas amostras apresentaram infecção mista. Somente uma amostra estava infectada TSWV e outra com um *Potyvirus*, e em ambos os casos, as amostras correspondiam a clones de *Dendrobium* sp.

Siegmann et al. (1998) ao analisarem 420 amostras de orquídeas de diversos gêneros e oriundas dos Estados Unidos, observaram que 294 estavam infectadas com CymMV e 283 com ORSV, sendo que 42 estavam com infecção mista. O CymRSV não foi detectado neste levantamento.

Em 1997, Takana et al. conduziram um levantamento dos vírus infectando as orquídeas da Tailândia e concluíram que das 442 plantas estudadas, 228 estavam infectadas somente com CymMV, 5 somente com ORSV e 97 apresentaram infecção mista. Eles salientaram a maior importância do vírus CymMV para a região, visto sua maior incidência.

Em Cingapura, por sua vez, um grande levantamento foi feito em 1994 por Wong et al., o qual envolveu 2333 amostras oriundas de quatro grandes produtores e do Jardim Botânico de Cingapura. Das amostras oriundas dos produtores, que somaram 1146 plantas de diversos gêneros, 56,4% estavam infectadas somente por CymMV, 4% somente com ORSV, e 14,2% apresentou infecção mista. No Jardim Botânico, por sua vez, das 1187 amostras analisadas, 34,5% estavam infectadas com CymMV, 0,3% com ORSV, e 8,3% das amostras apresentaram infecção mista.

O que pôde-se observar a partir dos trabalhos citados é que de maneira geral o CymMV é o vírus mais comum infectando orquídeas em diversas regiões do mundo, seguido do ORSV, em menor escala, porém com excessões, como foi no estudo realizado na Coreia por Kim et al. (2010), no qual o número de infecções por ORSV foi superior ao de CymMV, e nos Estados Unidos, no levantamento de Siegmann (1998), no qual o número de infecções por ORSV e CymMV quase se igualaram. As infecções mistas mantiveram-se sempre presentes, de modo que em algumas situações ela apresentou números relevantes.

No presente trabalho, houve a prevalência do vírus CymMV (71,16%), o vírus ORSV foi detectado em menor escala (15,85%) e a taxa de infecção

mista foi de 10,85%. Ao comparar com os resultados do levantamento de Freitas (1996), é interessante observar a drástica mudança no índice de incidência que os vírus CymMV e ORSV obtiveram nos últimos 16 anos nas orquídeas do Estado de São Paulo, uma vez que a autora detectou estes vírus em 7,5% e 7,3% de suas amostras, ao passo que este presente trabalho obteve incidência de 71,16% e 15,85%, respectivamente. A quantidade de infecções mistas de CymMV e ORSV também aumentaram: de 4,6% para 10,85%. No trabalho da autora, seu levantamento foi ainda comparado ao de González-Segñana (1989), realizado 8 anos antes em Viçosa, cujos resultados foram semelhantes (aproximadamente 8% de incidência de viroses em orquídeas). Todavia, vale resaltar que no trabalho citado, as coletas foram randomicas, ao passo que neste presente, houve preferencia de amostras sintomáticas para a realização das análises.

Os presentes resultados demonstram uma situação preocupante para os produtores de orquídeas da região paulista, uma vez que houve um expressivo aumento na incidencia de CymMV e ORSV em orquídeas da região em menos de 20 anos.

### **6.3. Gama de hospedeiras**

Com o objetivo de observar da viabilidade do uso de plantas suscetíveis para sanar o problema da oxidação das folhas das orquídeas durante as análises, foram utilizadas hospedeiras dos quais ambos os vírus compartilham. A partir de folhas de orquídeas de *Rhinconthylis gigantea* e *Oncidium* sp. sabidamente infectadas com CymMV e ORSV, plantas indicadoras, descritas por Ajikutira (2003), foram inoculadas via extrato vegetal.

Cada um dos três isolados utilizados contou com seis repetições para cada uma das hospedeiras testadas: *Cassia occidentalis*, *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* e *Nicotiana benthamiana*, totalizando 108 plantas no teste. Não foi observado êxito na transmissão via extrato vegetal do CymMV e ORSV, tendo sido as plantas avaliadas por 36 dias após a inoculação.

Foi realizada reinoculação dos respectivos isolados nas plantas testadas após o 20º dia a partir da primeira tentativa de inoculação. A presença dos vírus foi testada por ELISA direto, o qual confirmou que ambos os vírus estavam ausentes nas plantas indicadoras inoculadas.

É interessante observar que diversos autores (WISLER et al., 1981; HU et al., 1995; GARA et al., 1997; VEJARATPIMOL et al., 1999; AJJIKURIRA, 2003; NAVALISKIENE et al., 2005; LEE; CHANG, 2006; LAKANI et al., 2010), não relatam dificuldade na transmissão por extrato vegetal destes vírus.

Aparentemente, os resultados obtidos neste trabalho teve forte influencia do clima no qual o experimento foi realizado, bem como à variabilidade genética existente dentro das espécies utilizadas como hospedeiras.

#### **6.4. Análise da variabilidade genética de CymMV e ORSV**

Após realizar o teste com os oligonucleotídeos desenhados para a região da proteína capsial de CymMV e ORSV, quinze isolados representativos de CymMV e sete de ORSV foram selecionados para sequenciamento, e a partir do alinhamento de nucleotídeos das amostras com acessos do GenBank de diversas localidades mundiais, através do programa Mega 5.0, obteve-se as árvores filogenéticas (Figuras 8 e 9).

Com relação ao CymMV foi possível verificar, em termos de aminoácidos (Apendice 1), que o grau de identidade foi de 100% a 92%, e entre os nucleotídeos, a porcentagem de identidade variou entre 98% e 97% entre as sequências depositadas no GenBank, sendo que as amostras ficaram reunidas em um único grande grupo. O ORSV, por sua vez, mostrou um grau de identidade de nucleotídeos entre 100% e 99%, e de aminoácidos de 100% a 99,4% (Apêndice 2). Ambos apresentaram número de aminoácidos similares aos previamente publicados, de 223 para o CymMV e 158 para o ORSV.

Pode-se dizer que a taxa de variabilidade genética de isolados brasileiros de CymMV e ORSV, em termos de gene da capa proteica, é baixa. Significa que os isolados são muito similares, uma vez que nenhum padrão de agrupamento em particular, como por exemplo, por localidade geográfica ou hospedeiro foi observado, possivelmente devido ao fato de muitas mudas e plantas para propagação serem importadas de diferentes regiões mundiais.

Dados similares foram obtidos por Ajjikutira (2003), em cujo estudo isolados de CymMV e ORSV de Cingapura revelaram 89.1% - 99.7% e 97.4% - 99.3% de identidade entre os nucleotídeos, e 93.2% - 100% e 96.2% - 99.3% de

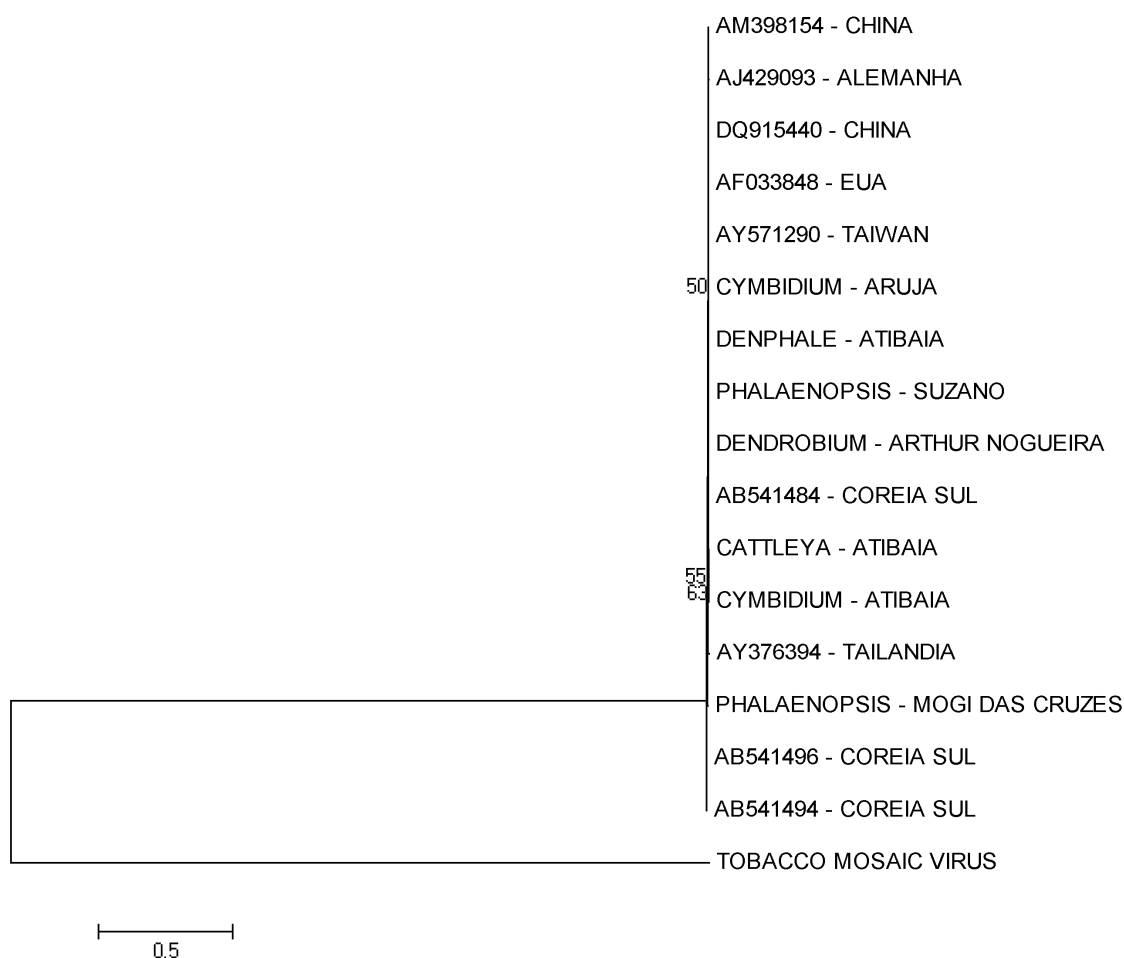
homologia foi observada entre seus aminoácidos, respectivamente. Isolados de CymMV e ORSV provenientes da Coreia, por sua vez, mostraram 90% e 96.6% - 99.7% de homologia em termos de nucleotídeos, e 98.2% e 96.2% - 100% de identidade entre seus aminoácidos, respectivamente.

Choi, Wong e Ryu, em 2006, observaram que isolados de CymMV e ORSV presentes em plantas de *Cymbidium* e *Phalaenopsis* revelaram 84.3% e 94,3% de identidade entre seus aminoácidos, e quando comparados a outras sequencias conhecidas de isolados CymMV e ORSV apresentaram 66.4% - 100% e 91.8% - 100%, respectivamente.

As altas taxas de conservação das sequencias dos isolados brasileiros, comparados aos de outros países, supõem que ambos genes codificadores da CP dos vírus CymMV e ORSV são possíveis candidatos para prover resistência para orquídeas de diferentes localidades geográficas. Estes dados podem ser úteis para a seleção de regiões altamente conservadas do gene da CP destes vírus para desenvolver experimentos com orquídeas transgênicas (AJJIKUTIRA, 2003; CHOY; RYU; WONG, 2006).



**Figura 8.** Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsial de diferentes isolados de CymMV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. *Potato virus X* foi utilizado como outgroup.



**Figura 9.** Árvore filogenética da sequência de nucleotídeos da porção da proteína capsidial de diferentes isolados de ORSV. A árvore foi construída utilizando neighbor-joining, com valor de bootstrap de 2000. *Tobacco mosaic virus* foi utilizado como outgroup.

## 6.5. Sintomatologia

Apesar da grande variabilidade de sintomas em gêneros de orquídeas observados, algumas amostras foliares analisadas apresentavam-se assintomáticas à presença do/s vírus. Com relação ao CymMV e ORSV, pôde-se notar grande variabilidade de manifestação de sintomas, quando comparadas em orquídeas de diferentes ou do mesmo gênero.

Segundo o observado, de maneira geral, a sintomatologia do CymMV consistiu em manchas cloróticas ou necróticas, deprimidas ou não, que podem aparecer ao mesmo tempo ou não, na forma de estrias longas ou mosaicos, em grandes ou pequenas quantidades, bem como pode haver aborto de botões florais. O sintoma de “color break” (descontinuação da cor) nas flores não foi observado em nenhuma das amostras ou nas propriedades, porém foi observada manchas em flores de *Cymbidium* sp. infectadas. Das 274 amostras positivas para a presença de CymMV, 97 (35,4%) apresentavam-se assintomáticas.

As fotos a seguir são de algumas amostras foliares analisadas e demonstram a variabilidade de sintomas que a presença do CymMV pode gerar nas orquídeas de diversos gêneros.



**Figura 10.** Folhas de *Dendrobium* sp. infectadas com CymMV apresentando pequenas manchas cloróticas espalhadas por toda a superfície foliar.



**Figura 11.** Folha de *Phalenopsis* sp. infectada com CymMV apresentando manchas cloróticas e necrose.



**Figura 12.** Folha de *Cattleya* sp. infectada com CymMV apresentando manchas necróticas deprimidas espalhadas por toda a superfície foliar.



**Figura 13.** Botões abortados de *Rhynchostilis gigantea* infectada com CymMV.



**Figura 14.** Planta de *Rhynchostilis gigantea* infectada com CymMV. apresentando lesões enegrecidas.



**Figura 15.** Flor de planta de *Cymbidium* sp. infectada com CymMV apresentando pequenas lesões.



**Figura 16.** Folha de *Angraecum sesquipedale* infectada com CymMV apresentando estrias necróticas deprimidas com leve halo clorótico.



**Figura 17.** Folha de *Laelia tenebrosa* infectada por CymMV apresentando manchas necróticas deprimidas por toda a folha.



**Figura 18.** Folhas de *Laelia purpurata* com sintomas de mosaico infectadas com CymMV.



**Figura 19.** Folha de *Oncidium* sp. infectada com CymMV apresentando mosaico.

Com relação ao ORSV, das 61 amostras que estavam infectadas com este vírus, 40 estavam com infecção mista com CymMV. De maneira geral, as plantas que apresentaram infecção mista tinham como sintomas mosaicos, manchas cloróticas definidas e subdesenvolvimento da planta (Figuras 20-22). Não foram observadas plantas assintomáticas quando infectadas com ambos os vírus.

As 21 plantas que estavam infectadas somente com o ORSV, 9 (42,8%) apresentavam-se assintomáticas, porém algumas se destacaram quanto à sintomatologia, como a *Denphale* sp. (Figura 25), que apresentou um mosaico severo sobre todas suas folhas, e o *Cymbidium* sp. (Figura 26), que possuía anéis necróticos em forma de lozangos. As demais mostraram mosaicos, manchas cloróticas definidas nas folhas e anéis cloróticos deprimidos.



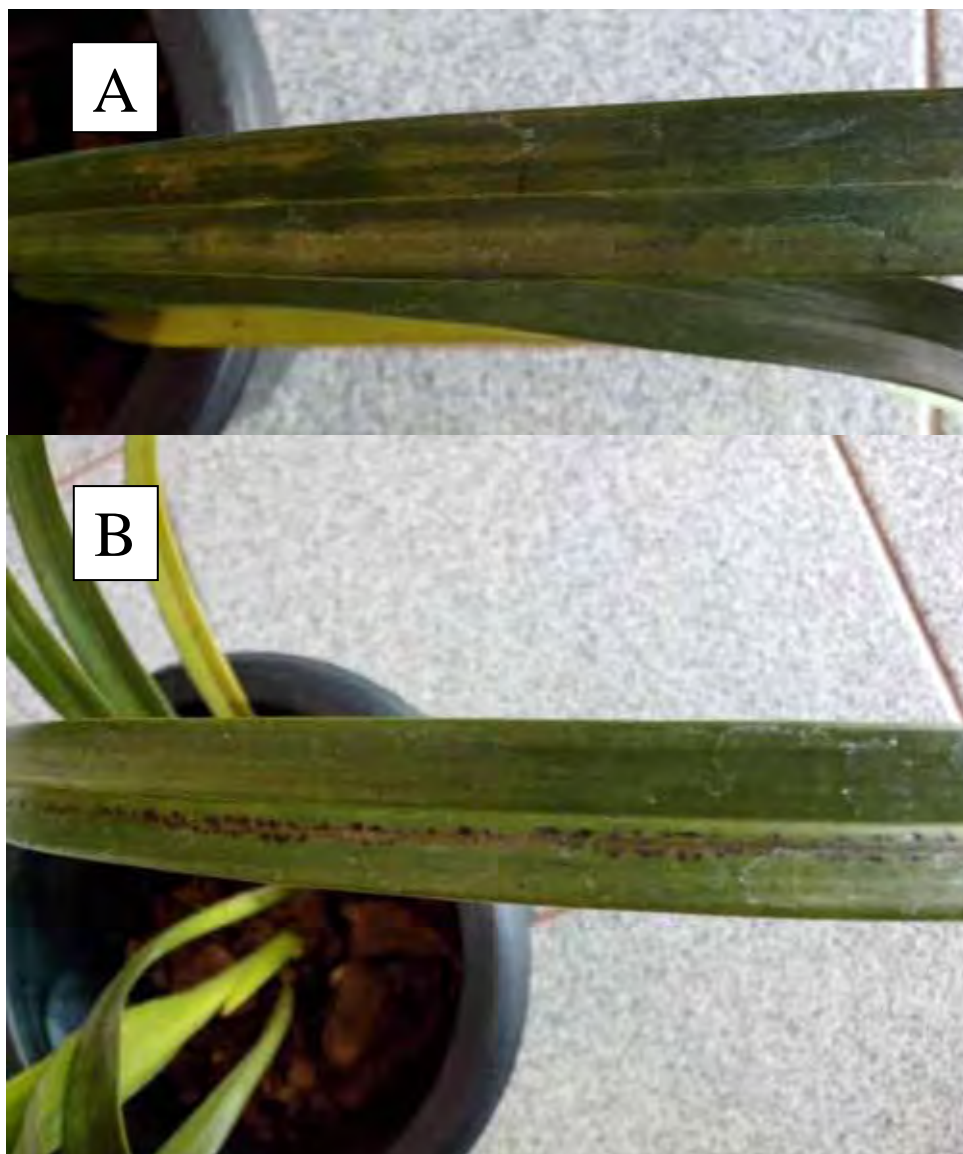
**Figura 20.** Diferença no porte das plantas de *Dendrobium* sp. entre uma sadia (esquerda) e infectadas com vírus (plantas central e direita com infecção mista de CymMV e ORSV).



**Figura 21.** *Phalaenopsis* sp. com infecção mista de CymMV e ORSV apresentando manchas cloróticas.



**Figura 22.** *Phalaenopsis* sp. com infecção mista de CymMV e ORSV apresentando linhas cloróticas.



**Figura 23.** Manchas cloróticas (A) e estrias necróticas (B) ao longo das folhas de uma planta de *Cymbidium* sp. infectada com ORSV.



**Figura 24.** Folha de *Phalenopsis* sp. infectada com ORSV.



**Figura 25.** Planta de *Denphale* sp. apresentando mosaico em todas suas folhas em decorrência de infecção por ORSV.

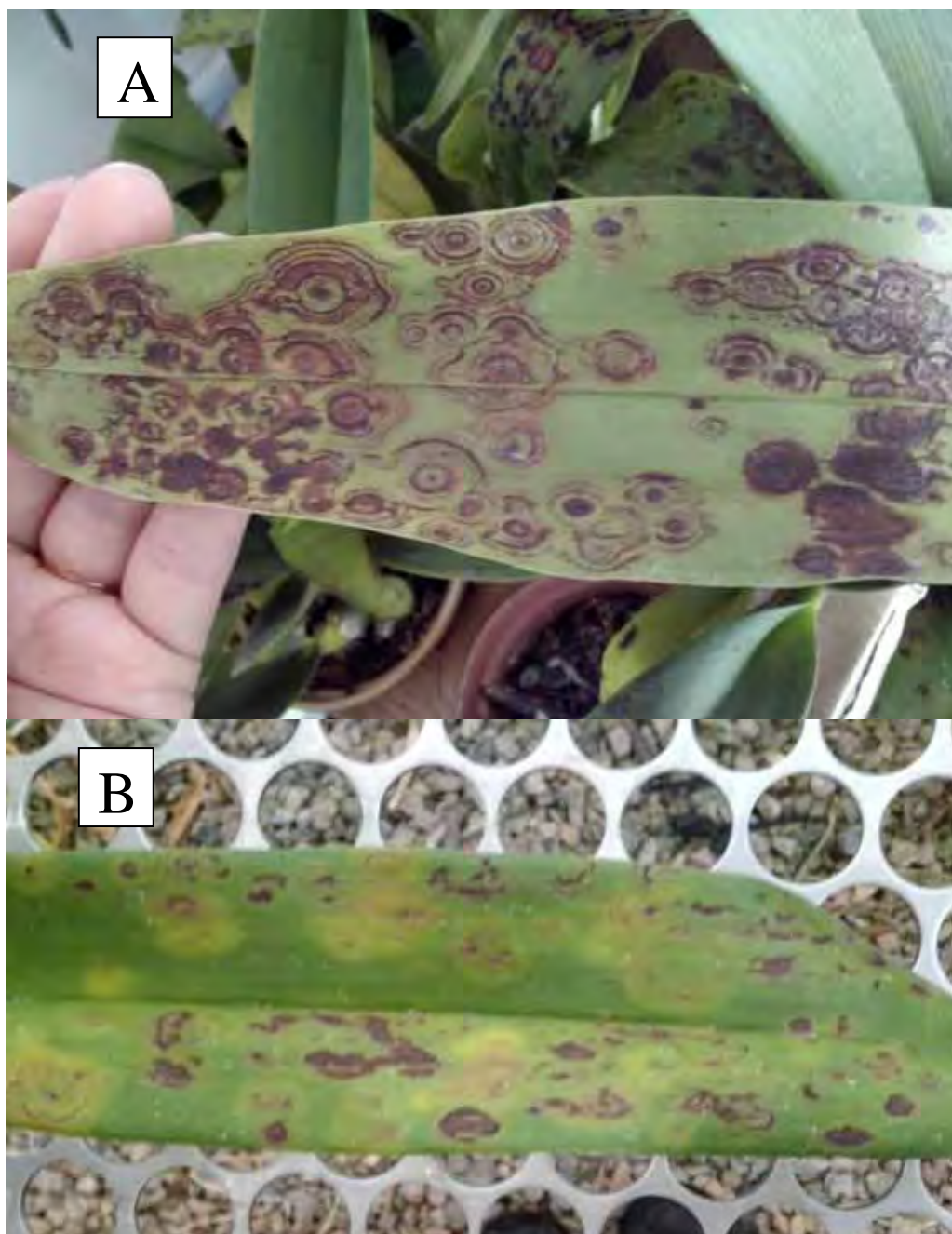


**Figura 26.** Folhas de *Cymbidium* sp. infectadas por ORSV apresentando manchas anelares com formato de losango por toda extensão da folha.

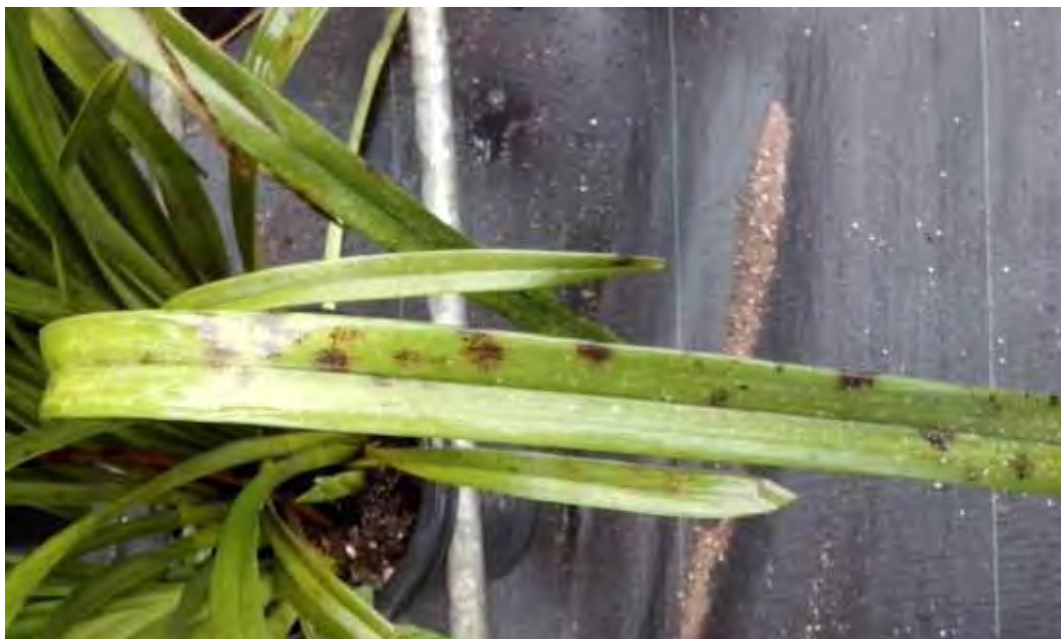
Quanto ao OFV, por sua vez, somente 11 plantas estavam infectadas com esse vírus, com sintomas bastante característicos de presença viral. Todas as plantas infectadas por este vírus apresentavam sintomas, os quais foram variados, de acordo com o gênero infectado. Tal variabilidade de sintomas em infecções por OFV foi igualmente observada por Kubo (2006). Não foram detectadas infecções mistas entre OFV e outro vírus testado. O gênero *Oncidium* sp. apresentou grande quantidade de anéis necróticos concentricos sobre toda a superfície foliar em uma variedade e pequenas manchas necroticas cercadas por halos cloróticos em outra (Figuras 28 e 30), *Dendrobium* sp. mostrou pontuações necróticas deprimidas e pequenas reunidas em certas regiões da superfície foliar (Figura 27), *Cymbidium* sp. mostrou manchas necróticas localizadas, regulares e circulares ao longo de suas folhas (Figura 29), e *Arundina* sp. por sua vez, mostrou manchas necroticas cercadas por halos cloróticos ao longo de sua superfície (Figura 31).



**Figura 27.** Folha de *Dendrobium* sp. infectado por OFV. Apresenta manchas necróticas pontuais que se agrupam em regiões da folha, formando focos necróticos.



**Figura 28.** Folhas de *Oncidium* sp. infectado por OFV. A. O sintomas consistem em anéis necróticos concetricos por toda a extensão das folhas. B. Presença de anéis cloróticos (em menor quantidade) e necróticos por toda superfície foliar.



**Figura 29.** Folha de *Cymbidium* sp. infectado por OFV. As folhas apresentam pontuações necróticas reunidas em focos e distribuídas por toda a superfície foliar.



**Figura 30.** Folhas de *Oncidium* sp. infectadas por OFV mostrando manchas necróticas anelares sutis circundadas por halo clorótico.



**Figura 31.** Folha de *Arundina* sp. infectada por OFV mostrando manchas necroticas circundadas por halo clorótico.

Neste trabalho, não foi possível estabelecer um padrão de comportamento fisiológico dos gêneros de orquídeas à infecção dos vírus CymMV e ORSV. Freitas (1996) em seu trabalho também observou o problema de identificar infecções virais baseado em sintomas, e salientou que a comprovação da suspeita de infecção viral somente será obtida após testes sorológicos, microscopia eletrônica, e moleculares.

De fato, a variabilidade de sintomas é grande, independente do vírus em questão, e o padrão sintomatológico não se mantém nem mesmo dentro de um mesmo gênero. Aparentemente, o tipo de manifestação de sintomas está relacionado à variabilidade genética das plantas de orquídeas, as quais possuem uma infinidade de espécies e híbridos. Sabe-se que as condições climáticas exercem influência sobre a manifestação de sintomas de vírus em orquídeas (WISLER, 1989), porém através de Freitas (1996) e também por meio deste presente trabalho, foi possível perceber que a sintomatologia está muito relacionada com o gênero da planta, visto que, como observado pela autora, as condições climáticas dos locais de coleta eram semelhantes.

Observou-se que a severidade dos sintomas aparentemente está relacionada à idade das plantas, ou quanto tempo ela permanece no local de cultivo, de modo que quanto mais velha a planta, mais severos os sintomas. Isso pode explicar também a falta de sintomas em boa parte das amostras, uma vez que a maioria delas eram plantas novas, retiradas de estufas de produção antes do ponto de comercialização.

Freitas (1996) estudou o efeito da idade na infecção por CymMV e ORSV em orquídeas do Estado de São Paulo. Foram feitas análises em 893 plantas de *Cymbidium* e *Phalaenopsis* provenientes de Atibaia-SP, nas quais observou-se que plantas novas, recém introduzidas na produção, encontravam-se praticamente livre de vírus. Porém, a medida que eram analisadas plantas com mais idade, notou-se que a incidência da doença aumentava proporcionalmente, coincidentemente com o aumento dos tratos culturais. O mesmo não foi observado nas plantas matrizes, as quais eram mantidas em estufas separadas daquelas de produção comercial, e apesar de antigas, mantinham-se saudáveis. A autora friza, portanto, a relação importante entre incidência de vírus e quantidade de tratos culturais aos quais as plantas são submetidas.

Segundo os resultados obtidos do estudo da variabilidade genética do gene codificador da proteína capsidial dos isolados brasileiros de CymMV e ORSV, a grande gama de sintomas não parece estar relacionado à variabilidade genética dos vírus, uma vez que o grau de variabilidade observado no estudo filogenético foi baixo.

## 7. CONCLUSÕES

- O vírus CymMV é o de maior incidência nas orquídeas do Estado de São Paulo, em relação ao ORSV;
- O OFV parece ter ocorrência restrita, visto que foi detectado apenas em Atibaia e Piracicaba.
- A variabilidade genética do gene codificador da proteína capsidial dos isolados brasileiros dos vírus CymMV e ORSV é baixa,
- A variada gama de sintomas que o CymMV e o ORSV podem desencadear nos diversos gêneros de orquídeas existentes não está relacionada à variabilidade genética do gene da CP;
- Não foi possível transmitir os vírus CymMV e ORSV via extrato vegetal para plantas indicadoras.

## 8. OBSERVAÇÕES ADICIONAIS

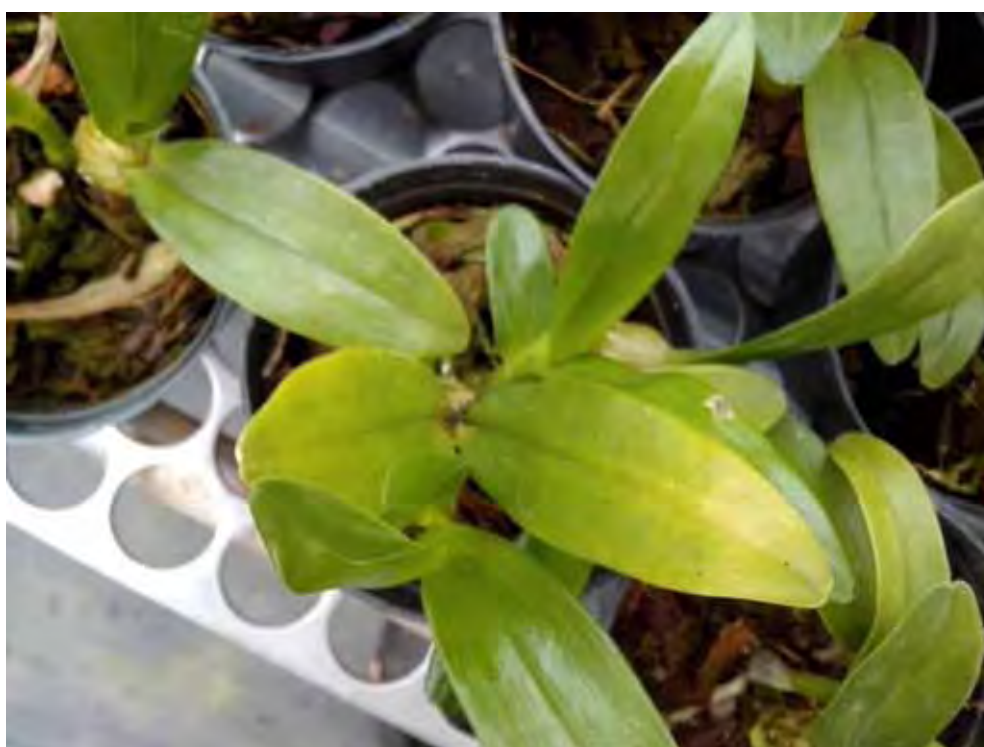
Além dos sintomas causados por vírus, foram observadas muitas plantas com sintomas causados por outros patógenos, fatores fisiológicos, fitotoxidez e fatores abióticos que são comumente confundidos com infecções virais. Seguem fotos destes casos observados durante a execução deste trabalho.



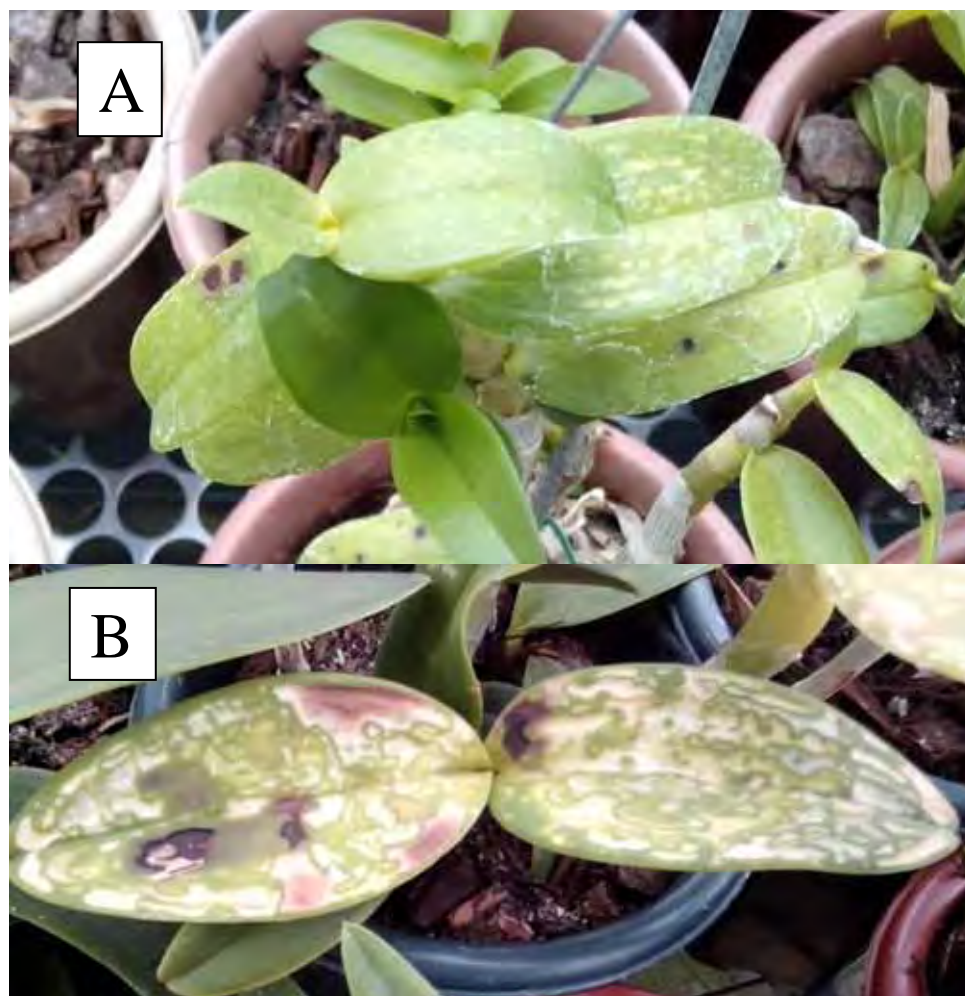
**Figura 32.** Planta de *Cymbidium* sp. infectada por *Sclerotium rolfsii* e ORSV. A planta estava assintomática à presença do vírus.



**Figura 33.** Efeito do ataque de ácaros à *Dendrobium* sp.



**Figura 34.** Amarelecimento nas pontas das folhas de *Dendrobium* sp. por deficiência nutricional.



**Figura 35.** Queimaduras causadas por fitotoxidez em *Dendrobium* sp. (A) e *Phalaenopsis* sp (B).



**Figura 36.** Sintomas de Antracnose em folhas de *Oncidium* sp.



**Figura 37.** Defeito genético em *Oncidium* sp.



**Figura 38.** Em A e B variação de origem genética em folhas de orquídeas.



**Figura 39.** Formação de limo sobre folhas de orquídeas devido alta umidade.



**Figura 40.** Planta de *Phalaenopsis* sp. com folhas arroxeadas devido a exposição à baixas temperaturas.



**Figura 41.** Folha de *Laelia purpurata* apresentando pontuações de cor púrpura devido ao acúmulo de antocianinas.



**Figura 42.** Planta de *Laelia* sp. com necroses em suas folhas, porém não apresentava-se infectada por CymMV, ORSV, OFV, CymRSV, TSWV ou Potyvirus.



**Figura 43.** Plantas de *Oncidium* sp. com pontuações necróticas em suas folhas, porém não apresentavam-se infectadas por CymMV, ORSV, OFV, CymRSV, TSWV ou *Potyvirus*.

## 9. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABDELNOUR, A.; A. MUÑOZ. 1997. **Informe final: Rescate, establecimiento, multiplicación y conservación in vitro de germoplasma de orquídeas en vías de extinción.** Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, 1997, 23p.

ADAMS, M. J.; ACCOTTO, G. P.; AGRONOVSKY, A. A.; BAR-JOSEPH, M.; BOSCIA, D.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; COUTTS, R. H. A.; DOLJA, V. V.; FALK, B. W.; FOSTER, G. D.; GONSALVES, D.; JELKMANN, W.; KARASEV, A.; MARTELLI, G. P.; MAWASSI, M.; MILNE, R. G.; MINAFRA, A.; NAMBA, S.; ROWHANI, A.; VETTEN, H. J.; VISHNICHENKO, V. K.; WISLER, G. C.; YOSHIKAWA, N.; ZAVRIEV, S. K. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J. ; DESSELBERG, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** London: Elsevier, 2011c., 1259 p.

ALEXANDRE, M.A.V.; RIVAS, E.B.; TOZETTO, A.R.P.; DUARTE, L.M.L. **An annotated list on the natural occurrence of viruses in ornamental plants in Brazil.** Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil, 2005, 54 p.

ALEXANDRE, M.A.V.; DUARTE, L.M.L. **CymMV e ORSV: os vírus mais frequentes em orquídeas.** Comunicado técnico. Instituto Biológico, 2012. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=180](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=180)>. Acesso em: 13 de julho de 2012.

AJIKUTTIRA, P.A. **Genetic Variability and Interactions of Cymbidium Mosaic Virus and Odontoglossum Ringspot Virus**, 2003. 166 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – National University of Singapore, Cingapura, 2003.

AJIKUTTIRA, P.A., LIM-HO, C.L., WOON, M.H., RYU, K.H., CHANG, C.A., LOH, C.S. AND WONG, S.M. Genetic variability in the coat protein genes of two viruses: Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus. **Archives of Virology**, v.147, p.1943-1954, 2002.

AJIKUTTIRA, P.; LOH, C.S.; WONG, S.M. Reciprocal function of movement proteins and complementation of long-distance movement of Cymbidium mosaic virus RNA by Odontoglossum ringspot virus coat protein. **Journal of General Virology**, v.86, p.1543-1553, 2005.

ARIAS, B.O. **Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas**, 2002. 69 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia em Biotecnologia)-Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2002.

BATCHELOR, S.R. Your first orchid – diseases and insects. **American Orchid Society Bulletin**, v.62, n.11, p.1142-1149, 1993.

BERTHEAU, Y.; FRECHON, D.; TOTH, I.K.; HYMAN, L.J. 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**. Dundee:Scottish Crop Research Institute Occasional Publication, 1998.

BICALHO, H.D. Orquídeas. In: SIMPÓSIO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1., Maringá, 1992. **Manual de Floricultura**. Maringá: UEM, p. 212-214, 1992.

BLANCHFIELD, A.L.; MACKENZIE, A.M.; GIBBS, A.; KONDO, H.; TAMADA, T.; WILSON, C.R. Identification of Orchid Fleck virus by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction and Analysis of Isolate Relationships. **Jornal of Phytopatology**, Berlin, v. 149, n. 11-12, p. 713-718, 2001.

CARDOSO, J.C. **Pragas das orquídeas: identificação, controle e manejo**. Fundação Sunji Nishimura de Tecnologia Faculdade de Ciências Agrônômicas. 1ª Ed. Pompéia: Bless Editora, 2005. 129 p.

CHANG, M.U.; CHUN, H.H.; BAEK, D.H.; CHUNG, J.D. Studies on the viruses in orchids in Korea: Dendrobium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Orchid fleck virus, and unidentified potyviruses. **Korean Journal of Plant Pathology**, Seoul, v. 7, p. 118-129, 1991.

CHANG, M.U.; ARAI, K.; DOI, Y.; YORA, K. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. **Annual Phytopatology Society of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 156-167, 1976.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* e *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1/3, p. 5-28, 2003.

CHOY, S.H.; RYU, K.H.; WONG, S.M. Comparison of Coat protein genes of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus from *Phalaenopsis* and *Cymbidium* in Korea. **Acta Horticulturae**, v.722, 2006.

CHUNG, B.N.; YOON, J.Y.; KIM, M.S. Viral Infection of tissue cultured orchids and evaluation of damages. **Plant Pathology**, v.26, p. 194-197, 2010.

CLARCK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p. 475-483, 1977.

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

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. Orchid fleck virus. **Description of Plant Viruses**, CMI/AAB, Kew, n. 183, p. 1-3, 1977.

DRESSER, R. L., **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 352 p.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de Orquídeas**. 1ª Ed. Londrina: Editora Mecenias, 2010. 208 p.

FARREYOL, K.; PEARSON, M.N.; GRISONI, M.; LECLERCQ-LE QUILEC, F. Severe stunting of *Vanilla tahitensis* in French Polynesia caused by Cucurbit mosaic virus (CMV), and the detection of the virus in *V. fragrans* in Reunion Island. **Plant Pathology**, v. 50, p. 414, 2001.

FARREYROL, K.; PEARSON, M. N.; GRISONI, M.; COHEN, D.; BECK, D. Vanilla mosaic virus isolates from French Polynesia and the Cook Islands are Dasheen mosaic virus strains that exclusively infect vanilla. **Archives of Virology**, n.5, p.905-919, 2006. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-005-0680-0>>. Acesso em 18 de outubro de 2012.

FRANCKY, R.I.B. **Cymbidium Mosaic Virus**. Kew: C.M.I/C.A.B/A.A.B., 1970. n.p. (C.M.I/A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, 27).

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

FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Incidence of orchid viruses in the state of Sao Paulo, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v.24, p.125-130, 1999.

FREITAS-AUTUA, J.; MOREIRA, L.; RIVERA, C.; RODRIGEZ, C.M.; KITAJIMA, E.W. First report of *Orchid fleck virus* in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, p. 1402-1402, 2002.

GARA, I. W.; KONDO, H.; MAEDA, T.; INOUE, N.; TAMADA, T. *Calanthe mild mosaic virus*, a new potyvirus causing a mild mosaic disease of calanthe orchid in Japan. **Journal of Phytopathology**, v. 146, n. 7, p. 357-363, 1998.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04704.x>>. Acesso em 23 de outubro de 2012.

GUARAGNA, M.A.; OBINNA, N.; RAMON, J. Detection and characterization of two previously undescribed Potyviruses in the terrestrial Orchid *Spiranthes cernua*. **Acta Horticulturae**, v. 722, 2006.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**. v.63, p.9-16, 1997.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A.; BLANCHFIELD, A.; CROSS, P.; WOLSON, C.; KITAJIMA, E.W.; NIGHTINGALE, M.; CLEMENTS, M. Viruses of orchids in Australia: their identification, biology and control. **Australian Orchid Review**, Lewisham, v. 65, p. 10-12, 2000.

GIORIA, R.; SOUZA, A.P.; PEDRAZZOLI, D.S.; KITAJIMA, E.W.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M.; VENDRAMIM, J.D.; PARRA, J.R.P. **Doenças e Pragas que atacam as orquídeas**. Piracicaba: Cymk Quality, 2002. 62 p.

GONZÁLEZ-SEGÑANA, L.R.G. **Propriedades de um isolado do vírus da mancha anelar do *Odontoglossum* e a sua detecção em orquídeas**. 1989. 56 p. Dissertação (M.S) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1989.

HOLLINGS, M.; STONE, O.M.; BARTON, R.J. Pathology, soil transmission and characterization of cymbidium ringspot, a virus from *Cymbidium* orchids and white clover (*Trifolium repens*). **Annual Applied Biology**, v. 85, p.365-370, 1977.

HU, J.S.; WANG, M.; FERREIRA, S.; OGATA D. Tomato spotted wilt virus on *Oncidium* orchids in Hawaii. **Plant Disease**, v.76, p. 426, 1992.

HU, J.S.; FERREIRA, S.; WANG, M.; XU, M.Q. Detection of *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Tomato spotted wilt virus*, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. **Plant Disease**. v.77, p.464-468, 1993.

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

HU, L.S.; FERREIRA, S. Orchid viruses – detection, transmission and management of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses in dendrobium in Hawaii. **American Orchid Society Bulletin**, v.63, n.8, p.896-898, 1994.

HU, J. S.; FERREIRA, S.; WANG, M.; BORTH, W. B.; MINK, G.; JORDAN, R. Purification, host range, serology, and partial sequencing of Dendrobium Mosaic Potyvirus, a New member of the *Bean Common Mosaic virus* group. **The American Phytopathological Society**. 1995.

IBRAFLOR INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **Análise conjuntural da evolução das exportações de flores e plantas ornamentais do Brasil janeiro a dezembro de 2007**. Holambra, 2007, 8 p.

IBRAFLOR INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **Release Imprensa**. Holambra, 2011, 4 p.

IBRAFLOR INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORICULTURA. **Boletim de Análise Conjuntural do mercado de Flores e plantas Ornamentais no Brasil, junho de 2011.** Holambra, 2011, 5 p.

INOUE, N. Effect of antiserum treatment on the production of virus-free Cymbidium by means of meristem culture: abstract. **Nogaku Kenkyu**, v.60, n.3, p. 132-133, 1984.

ISHII, M. Partial elimination of virus from doubly infected orchids by meristem explants culture. **Acta Horticulturae**. v.36, p.229-234, 1974.

JORDAN, R., GUARAGNA, M.A., KINARD, G. AND LYNN, S. Detection and first report of *Dasheen mosaic virus* and a second potyvirus infecting the terrestrial orchid *Spiranthes cernua*. **Acta Horticulturae**, v.568, p.253-260, 2002.

Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/568/568\\_37.htm](http://www.actahort.org/books/568/568_37.htm)>. Acesso em 21 de dezembro de 2012.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. Producción y comercialización de plantas ornamentales em Brasil. **Horticultura Internacional**, Reus, n. 55, p. 16-19, 2007. Disponível em: <[http://www.hortica.com.nr/artigos/Plantas Ornamentais en Brasil.pdf](http://www.hortica.com.nr/artigos/Plantas%20Ornamentales%20en%20Brasil.pdf)>. Acesso em 12 de maio de 2012.

KAWAKAMI, K.; FUJI, S.; MIYOSHI, K. Complete nucleotide sequence of a new potexvirus, "Phaius virus X", isolated from *Phaius flavus* Lindl. **Archives of Virology**, v. 153, p. 527-531, 2007.

KIM, S.R.; YOON, J.; CHOI, G.S; CHANG, M.U.; CHOI, J.K.; CHUNG, B.N. Molecular Characterization and Survey of the Infection Rate of Orchid fleck virus in Commercial Orchids. **The Plant Pathology Journal**. v.26, n.2, p. 130-138, 2010.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTUA, J. Na annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.67, n.3, p. 348-371, 2010.

KITAJIMA, E.W.; BLUMNCSCHEIN, A. ; COSTA, A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.81, n.3, p.280-186, 1972.

KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; MACKENZIE, A.; REZENDE, J.A.M.; GIORIA, R.; GIBBS, A. Comparative cytopatology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of Orchid fleck virus. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.67, n.3, p. 231-237, 2001.

KONDO, H.; MATSUMOTO, J.; MAEDA, T.; INOUE, N. Host range and some properties of orchid fleck virus isolated from oriental *Cymbidium* in Japan. **Bulletin Research Institute of Bioresource**, Okayama University v.2, p.151-161, 1995.

KONDO, H.; MATSUMOTO, J.; MAEDA, N.; TAMADA, T. **Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* transmission, biological properties, and genome structure.** **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1/3, p.215-223, 2003.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. *Orchid fleck virus* is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, v.87, p.2413-2421, 2006.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. *Orchid fleck virus*. In: KING, A. M. K, LEFKOWITZ, E., ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier, 2011c. p.1206.

KUBO, K.S. **Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus”-OFV)**, 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LAKANI, I.; SUASTIKA, G.; MATTJIK, N.; DAMAYANTI, T.A. Identification and characterization of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) from Bongor, Indonesia.

**Journal of Biosciences**, v.17, n.2, p.101-104, 2010. Disponível em:

<<http://journal.ipb.ac.id/index.php/hayati>>. Acesso em: 22 de junho de 2012.

LAWSON, R.H.; HSU, H. Orquid. In: LOSEBENSTEIN, G.; LAWSON, R.H.; BRUNT, A.A., (Ed.) **Virus and virus-like diseases of bulb and flower crops**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1995. cap.36, p.409-420.

LEE, S.C.; CHANG, Y.C. Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA. **Plant Pathology Bulletin**, v.15, p. 187-196, 2006.

LESEMANN, D.; DORAISWAMY, S. Bullet-shaped virus like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlim, v. 38, p. 27-39, 1975.

LESEMANN, D.E.; KOENIG, R. Identification of *Bean yellow mosaic virus* in *Masdevallia*. Acta Horticulturae. v.164, p.347-354, 1985. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/164/164\\_39.htm](http://www.actahort.org/books/164/164_39.htm)>. Acesso em: 11 de junho de 2012.

MACKENZIE, A. M.; NOLAN, M; A WEI, K.-J.; CLEMENTS, M. A.; GOWANLOCK, D.; A WALLACE, B. J.; GIBBS, A. J. Ceratobium mosaic potyvirus: another virus from orchids. **Archives of Virology**, v.143, n.5, p.903-914, 1998. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s007050050341>>. Acesso em 11 de junho de 2012.

MADHUBALA, R.; BHADRAMURTHY, V.; BHAT, A.I.; HAREESH, P.S.; RETHEESH, S.T.; BHAI, R.S. Occurrence of Cucumber mosaic virus on vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. **Journal of Biosciences**, v.30, n.3, p.339-350, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF02703671>>. Acesso em 12 de junho de 2012.

MAEDA, T.; KONDO, H.; MISUHATA, K.; TAMADA, T. Evidence that orchid fleck vírus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite *Brevipalpus californicus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, Edinburg. **Proceedings**. Edinburg, 1998, v.3, p. 13-18.

MORAES, C.P. **Fenologia e anatomia dos órgãos reprodutivos de *Catasetum fimbriatum* L. cultivados sob diferentes intensidades luminosas.** 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MOREIRA, L.; VILLALOBOS, W.; RODRÍGUES-CEREZO, E.; RIVERA, C. Infección de la orquídea terrestre *Phaius Tankervilleae* (Orchidaceae) con potexvirus del mosaico del *Cymbidium* (CymMV) en Costa Rica. **Biologia Tropical**, v. 47, n. 3, San José, 1999.

MOTA, L.D.C.; DELLA VECCHIA, M.G.S.; GIORIA, R.; KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; CAMARGO, L.E.A.; AMORIM, L. Pfaffia mosaic virus: a new potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, p.368-373, 2004.

NAMBA R AND ISHII M. Failure of aphids to transmit the ORSV and CymMV to orchid plantlets derived from meristem cultures. **Phytopathology**, v. 61, p.582-583, 1971.

NAVALINKIENE, M.; RAUGALAS, J.; SAMUITIENE, M. Viral diseases of flower plants, identification of viruses affecting orchids (*Cymbidium* Sw.). **Biologija**, n.2, p.29-34, 2005.

NÓBREGA, N.R. Uma doença de vírus em orquídea. **O Biológico**, v.13, p.62, 1947.

PIERIK, R.L.M. **In vitro culture of higher plants.** Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1987. 344 p.

PUGSLEY, A.T. The use of trisodium phosphate as an inactivating agent for plant viruses. **Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**, p. 41-43, 1952.

TANAKA, S.; ITO, S.; KAMEYA-IWAKI, M.; SOM-MARTYA, P. Detection of *Cymbidium* mosaic Potexvirus and *Odontoglossum* ringspot Tobamovirus from Thai orchids by rapid immunofilter paper assay. **Plant Disease**, v.81, p.167-170 1997.

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

SHEEHAN, T.J. Orchids. In: LARSON, L.A. (Ed.) **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, cap.5, 1980, p.133-164.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, E.B. CARSTENS, M.K. **Virus taxonomy: Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press. San Diego, California, USA, 2000, 1162 p.

VEJARATPIMOL, R.; CHANNUNTAIPAT, C.; PEWNIM, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; MINAMIURA, N. Detection and Serological relationships of Cymbidium mosaic Potexvirus Isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.2, p.161-168, 1999.

VICHIATO, M.R.M. Alongamento de plantas de *Dendrobium nobile* Lindl. Com pulverização de ácido giberélico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.16-20, 2007.

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

WISLER, G.C.; ZETTLER, F.W.; PURCIFULL, D.E. A serodiagnostic technique for detecting *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **The American Phytopathological Society**, v.72, n.7, 1981.

WISLER, G.C. **How to control orquid viruses**. Gainesville: Maupin House Publ., 1989. 118 p.

WONG SM, MAHTANI PH, LEE KC, YU HH, TAN Y, NEO KK, CHAN Y, WU M AND CHNG CG. Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis. *Archives of Virology*, v.142, p.383-391, 1997.

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

ZHENG, Y.X.; CHEN, C.C. Complete nucleotide sequence of capsicum chlorosis virus isolated from *Phalaenopsis* orchid and the prediction of the unexplored genetic information of tospoviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 421-432, 2010.

ZETTLER, F.W.; KO, N.J.; WISLER, G.C.; ELLIOTT, M.; WONG, S.M. Viruses of orchids and their control. **Plant Disease**, v.74, n.9, p.621-626, 1990.



PHALAEENOPSIS - ARTHUR N. TVGTAAIDLARAYADVGASKSATLLGFCPTKPDVRRALAAQIFVANVTPRQFCAYYAKV 120  
 CATTLEYA - ARUJÁ TVGTAAIDLARAYADVGASKSATLLGFCPTKPDVRRALAAQIFVANVTPRQFCAYYAKV 120  
 EF125178.1 - HAVAÍ TVGTAAIDLARAYADVGASKSATLLGSCPTKPDVRRALAAQIFVANVTPRQFCAYYAKV 120  
 AY376392.1 - TAILANDIA TVGAAIDLARAYADVGASKSATLLGVCPKPDVRRASLAAKIFVANVNPRQFCAYYAKV 120  
 EPIDENDRUM - MOGI DAS C. TVGTAAIDLARAYADVGASKSATLLGFCPTKPDVRRALAAQIFVANVTPRQFCAYYAKV 120  
 \*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

AB197937.1 - JAPÃO VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 AB541572.1 - COREIA SUL VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 DENDROBIUM - ATIBAIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 PHALAEENOPSIS - APARECIDA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 RHYNCHOSTISLIS - ARUJÁ VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 LAELIA - ARARAS VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 PHALAEENOPSIS - ATIBAIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 AB693982.1 - INDONESIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 CATTLEYA - S. J. B. VISTA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 AY571289.1 - TAIWAN VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 U62963 - CINGAPURA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 HQ681906.1 - CHINA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 AM055720.1 - INDIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 ONCIDIDIUM - BOTUCATU VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 ONCIDIDIUM - BRAGANÇA P. VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 MILTONIA - HOLAMBRA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 CATTLEYA - SUZANO VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 BULBOPHYLUM - MOGI DAS C. VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 LAELIA - ATIBAIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 PHALAEENOPSIS - ARTHUR N. VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 CATTLEYA - ARUJÁ VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 EF125178.1 - HAVAÍ VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 AY376392.1 - TAILANDIA VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 EPIDENDRUM - MOGI DAS C. VWNMLLATNDPPANWAKAGFQEDTRFAAFDFDFAVDSTAALPAEWQRRPTDREAAHSI 180  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

AB197937.1 - JAPÃO GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 AB541572.1 - COREIA SUL GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 DENDROBIUM - ATIBAIA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 PHALAEENOPSIS - APARECIDA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 RHYNCHOSTISLIS - ARUJÁ GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 LAELIA - ARARAS GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 PHALAEENOPSIS - ATIBAIA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 AB693982.1 - INDONESIA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPGPPTGK 224  
 CATTLEYA - SÃO JOÃO BOA VISTA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 AY571289.1 - TAIWAN GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 U62963 - CINGAPURA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 HQ681906.1 - CHINA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 AM055720.1 - INDIA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHAESTNTLYSLPAPPE- 223  
 ONCIDIDIUM - BOTUCATU GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 ONCIDIDIUM - BRAGANÇA P. GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 MILTONIA - HOLAMBRA GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223  
 CATTLEYA - SUZANO GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE- 223

BULBOPHYLUM - MOGI DAS CRUZES	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
LAELIA - ATIBAIA	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
PHALAENOPSIS - ARTHUR N.	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
CATTLEYA - ARUJÁ	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
EF125178.1 - HAVAI	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
AY376392.1 - TAILANDIA	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223
EPIDENDRUM - MOGI DAS CRUZES	GKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPE-	223

\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*

## APÊNDICE 2

### Alinhamento da sequência de aminoácidos correspondente a região da proteína capsidial de ORSV.

CATTLEYA - ATIBAIA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
DENDROBIUM - ARTHUR N.	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
PHALAEOPSIS - SUZANO	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
CYMBIDIUM - ATIBAIA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
DENPHALE - ATIBAIA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
CYMBIDIUM - ARUJÁ	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
PHALAEOPSIS - MOGI DAS C.	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AY571290 - TAIWAN	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AY376394 - TAILANDIA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AB541496 - COREIA SUL	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AF033848 - EUA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
DQ915440 - CHINA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AB541494 - COREIA SUL	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AB541484 - COREIA SUL	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AM398154 - CHINA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGNQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
AJ429093 - ALEMANHA	MSYITITDPSKLAYLSSAWADPNLINLCTNSLGYQFQTQQARTTVQQQFADVWQFPVPTLT	60
	*****	

CATTLEYA - ATIBAIA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
DENDROBIUM - ARTHUR N.	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
PHALAEOPSIS - SUZANO	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
CYMBIDIUM - ATIBAIA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
DENPHALE - ATIBAIA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
CYMBIDIUM - ARUJÁ	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
PHALAEOPSIS - MOGI DAS C.	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AY571290 - TAIWAN	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AY376394 - TAILANDIA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AB541496 - COREIA SUL	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AF033848 - EUA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
DQ915440 - CHINA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AB541494 - COREIA SUL	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AB541484 - COREIA SUL	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AM398154 - CHINA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
AJ429093 - ALEMANHA	SRFPAGAGYFRVYRYDPIILDPLITFLMGTFDTRNRIIEVENPQNPTTTEFLDATTRVDDA	120
	*****	

CATTLEYA - ATIBAIA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
DENDROBIUM - ARTHUR NOGUEIRA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
PHALAEOPSIS - SUZANO	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
CYMBIDIUM - ATIBAIA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
DENPHALE - ATIBAIA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
CYMBIDIUM - ARUJÁ	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
PHALAEOPSIS - MOGI DAS CRUZES	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AY571290 - TAIWAN	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AY376394 - TAILANDIA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AB541496 - COREIA SUL	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AF033848 - EUA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
DQ915440 - CHINA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AB541494 - COREIA SUL	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AB541484 - COREIA SUL	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AM398154 - CHINA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
AJ429093 - ALEMANHA	TVAIRSAINNLLNELVRGTGMYNQVSFETMSGLTWTSS	158
	*****	