

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Deteccão e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de
diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas
 (“Orchid fleck virus” – OFV)**

Karen Sumire Kubo

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Karen Sumire Kubo
Engenheiro Florestal

Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” – OFV)

Orientador:

Prof. Dr. **ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Kubo, Karen Sumire

Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas ("Orchid Fleck virus" – OFV) / Karen Sumire Kubo. - - Piracicaba, 2006.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Acari 2. Mancha anelar 3. Orquídea 4. Variação genética em plantas 5. Vetores de doenças de plantas 6. Vírus de plantas I. Título

CDD 635.93415

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

"A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico. Durante a revisão os erros se escondem, fazem-se positivamente invisíveis. Mas, assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimos, verdadeiros sacis a nos botar a língua em todas as páginas. Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar..."

Monteiro Lobato

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima pela orientação, condições de trabalho proporcionadas e oportunidade de crescimento profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

À amiga e co-orientadora Dra. Juliana Freitas-Astúa e Dr. Gustavo Astúa, pela amizade, atenção e discussões que contribuíram muito com a realização e aprimoramento deste trabalho.

Ao Departamento de Fitopatologia da ESALQ/USP e seus professores, pela formação profissional e oportunidade de aprendizado com grandes nomes da fitopatologia.

Ao professor Dr. Gilberto José de Moraes pelo auxílio fundamental na identificação dos ácaros.

Ao Dr. Marcos Machado e ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos amigos do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC, Renata, Juliana B., Gisele, Juliana baiana, Adriano, Kleber, Silvia, Kelly, Val e Chica, pela ajuda em tempo integral, amizade, compreensão e companheirismo.

Aos pesquisadores Msc. Eliane Locali, Dra. Alessandra Alves de Souza, Dr. Helvécio Della Coletta Filho, Dra. Maria Luísa Targon pelo auxílio e sugestões.

À pesquisadora Dra. Anne Mackenzie, pelo envio de material australiano.

Ao Dr. José Carlos Rodrigues, pelo envio de material.

Ao prof. Dr. José Cavassin Tosin, pela minha introdução no mundo da fitopatologia.

Aos funcionários do Orquidário da ESALQ/USP, Josué, Jair e Angelino pela atenção e identificação de orquídeas.

Às bibliotecárias Eliana e Sílvia, pela eficiência e boa vontade na correção desta dissertação.

Às Associações de Orquidófilos do Paraná e de Joinville pela atenção, hospitalidade e interesse neste trabalho.

Aos meus amigos do NAP/MEPA, Dr. Paulo de Tarso, Renato, Renata Gomes, Msc. Renata Faier, Dr. Francisco e Msc. Marcelo pelo companheirismo e auxílio prestado em momentos diversos.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação em Fitopatologia pela amizade e sugestões.

Ao Daniel Dias Rosa pelas risadas e soluções em todas as vezes em que eu me desesperei na tentativa de interpretar a “sopa de letrinhas”. E Cris, Franklin e Fabrício pela demonstração de amizade.

Às minhas amigas que me lembraram que a dança sempre será meu refúgio, Cíntia, Débora, Camila, Betsy, Dani, Karon e tantas outras.

À minha grande amiga Cláudia Gai, pelo companheirismo, amizade e pelo melhor presente.

Aos meus gatos, Gilly Bean, Sony e Zeus por me darem motivos para estar sempre alerta.

À Coca-Cola e Nestlé, pela Coca-Cola e Alpino respectivamente, por produzirem os melhores antídotos contra o sono.

Ao Percy e Cia do Circo por manterem minha mente e corpo sãos durante estes dois anos e me ajudarem a eliminar as calorias ingeridas com os itens citados anteriormente.

À minha família pelo apoio e compreensão (ou não) nos meus momentos de ausência e por todo o apoio durante estes dois anos.

Ao Rodrigo, meu namorado, grande amigo, co-autor, companheiro, pela compreensão nos momentos difíceis, por se preocupar, por estar sempre comigo e nunca me deixar pensar em desistir.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Ácaros do gênero <i>Brevipalpus</i>	11
2.2 Vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i> sp.	13
2.2.1 Vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” – OFV).....	18
2.3 Variabilidade genética em vírus.....	21
2.3.1 Fontes de variabilidade genética em vírus.....	23
2.3.2 Evolução de fitovírus.....	24
2.3.3 Estimativa de distância genética.....	25
2.3.3.1 SSCP (<i>Single strand conformational polymorphism</i>).....	26
2.3.3.2 Seqüenciamento de DNA para análise de variabilidade.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material vegetal.....	31
3.2 Obtenção dos ácaros.....	31
3.3 Análises de microscopia.....	32
3.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	32
3.3.2 Estudos anatômicos/histológicos.....	33
3.4 Análises moleculares.....	33
3.4.1 Extração do RNA total a partir de folhas de orquídeas.....	33
3.4.2 Extração do RNA total a partir de ácaros <i>Brevipalpus californicus</i>	34
3.4.3 Extração de dsRNA (RNA dupla fita) de folhas de orquídeas.....	35
3.4.4 Síntese de cDNA.....	36
3.4.5 Otimização do diagnóstico.....	36
3.4.5.1 Desenho de novos “primers”.....	36
3.4.5.2 Hibridização.....	38
3.4.5.2.1 <i>Dot Blot</i>	38

3.4.5.2.2 <i>Direct tissue print</i> (Impressões de tecido).....	40
3.4.6 Obtenção de DNA purificado de gel para SSCP.....	40
3.4.7 SSCP.....	40
3.4.8 Seqüenciamento dos “amplicons”.....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 Material vegetal.....	44
4.2 Ácaros.....	46
4.3 Análises de microscopia.....	47
4.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	47
4.3.2 Estudos anatômicos/histológicos.....	48
4.4 Análises moleculares.....	53
4.4.1 Extração de dsRNA (RNA dupla fita).....	53
4.5 Detecção do OFV.....	54
4.5.1 Desenho de novos “primers”.....	54
4.5.1.1 Detecção no ácaro.....	55
4.5.2 Hibridização.....	56
4.6 Diagnose.....	58
4.7 SSCP.....	58
4.8 Seqüenciamento dos amplicons.....	65
5 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES.....	82
ANEXOS.....	92

RESUMO

Deteção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” – OFV).

O vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” - OFV), transmitido pelo ácaro *Brevipalpus californicus*, causa manchas cloróticas e necróticas em orquídeas de vários gêneros e foi relatado em diversos países. O diagnóstico de "orchid fleck", doença causada pelo OFV, tem sido feito através da análise dos sintomas, sorologia, observação de cortes ultrafinos de tecido infectado em microscópio eletrônico de transmissão ou RT-PCR. No entanto, apesar de testes moleculares serem frequentemente mais eficientes e específicos que outros métodos, os "primers" disponíveis na literatura nem sempre detectam o vírus em baixas concentrações no tecido vegetal, ou amplificam regiões da planta sadia. Com base nas seqüências nucleotídicas da capa protéica viral depositadas no GenBank foram desenhados novos “primers”, que amplificam um fragmento de 326 pb. Esses “primers” foram utilizados para a deteção do OFV por RT-PCR e para a marcação com digoxigenina de sondas para hibridização. A variabilidade de um fragmento do gene da capa protéica deste vírus foi estudada por polimorfismo conformacional de fita simples ("Single strand conformational polymorphism" – SSCP) e seqüenciamento de nucleotídeos. Quarenta e oito amostras de 18 gêneros de orquídeas foram coletadas no Brasil, Costa Rica e Austrália. As análises dos padrões de SSCP resultaram em seis haplótipos diferentes e em agrupamentos baseados na origem geográfica das amostras. Amostras representando cada um desses padrões foram seqüenciadas e comparadas com aquelas disponíveis no GenBank. A análise de SSCP provou ser eficiente para fornecer informações preliminares sobre a variabilidade do OFV. No entanto, apenas através do seqüenciamento de nucleotídeos das amostras foi possível determinar a real variabilidade das mesmas.

Palavras-chaves: Mancha da orquídea; Orquídeas; VTB; *Brevipalpus californicus*; Variabilidade genética

ABSTRACT

Detection and nucleocapsid gene variability of Orchid fleck virus isolates from different geographic origins.

Orchid fleck virus (OFV), transmitted by the mite *Brevipalpus californicus*, causes chlorotic and necrotic ringspots in many orchid genera and was reported in several countries. The diagnosis of the Orchid fleck disease has been performed by symptomatology, transmission electron microscopy, serology or RT-PCR. Even though the molecular tests are usually more efficient and specific than other methods, the available primers did not always detect the OFV in low concentrations or sometimes amplified healthy plant samples. Based on the nucleotide sequences of the coat protein gene (*cp*) available in the GenBank, new primers were designed. These primers amplified a 326 pb specific OFV fragment and were used for RT-PCR and as hybridization probes. The variability of a fragment of the *cp* of this virus was investigated by “single strand conformational polymorphism (SSCP)” and nucleotide sequencing. Forty eight samples of 18 genera of orchids were collected from Brazil, Costa Rica and Australia. The SSCP analysis resulted in six different haplotypes and demonstrated a clustering in samples based on geographical origin. Samples representing the different SSCP patterns were sequenced and compared with those available in the GenBank. The SSCP analysis proved to be efficient to provide preliminary information about OFV variability. However, only through nucleotide sequencing it was possible to determine the actual variability amongst the samples.

Keywords: Orchid fleck virus; Orchids; BTV; *Brevipalpus californicus*; Genetic variability

1 INTRODUÇÃO

As orquídeas são monocotiledôneas correspondentes à cerca de 7% de todas as plantas fanerógamas distribuídas atualmente no globo terrestre (DRESSLER, 1981). Esta família é considerada a mais numerosa de todo o reino vegetal, com mais de 800 gêneros, 25.000 espécies naturais (SHEEHAN, 1980) e mais de 140.000 espécies híbridas obtidas comercialmente através de cruzamentos (Paske¹, comunicação pessoal). Estas plantas são cosmopolitas, surgindo desde muito próximo ao Círculo Polar Ártico, estendendo-se até as proximidades da Terra do Fogo (DRESSLER, 1981). No entanto, possui um maior número de representantes nos ambientes tropicais e subtropicais (MORAES, 2002).

Teoricamente o cultivo de orquídeas de qualquer parte do mundo é possível, desde que cada espécie tenha as condições mínimas para a sobrevivência, garantidas por uma estufa que reproduza as condições climáticas de sua origem (Paske¹, comunicação pessoal).

O elevado número de espécies e híbridos possibilita a ocorrência de grande variedade de formas, tamanhos e cores de folhas e flores, o que torna essas plantas de grande importância econômica e faz com que sejam produzidas em todo o mundo, sempre com grande aceitação no mercado de vaso e de corte (FREITAS, 1996).

Por se tratarem de plantas ornamentais, as orquidáceas devem apresentar folhas e flores de boa qualidade, o que implica, entre outros fatores, na ausência de pragas e patógenos. Dentre os principais patógenos que infectam orquídeas estão os vírus, os quais além de depreciarem quantitativa e qualitativamente as plantas, também apresentam dificuldades de controle (SHEEHAN, 1980; BICALHO, 1992; BATCHELOR, 1993).

Muitas orquídeas compradas e vendidas por produtores amadores e comerciais estão infectadas por vírus. Estes produtores são mais influenciados pelas características florais das plantas do que pelo seu aspecto fitossanitário. Uma planta recém-adquirida pode ser fonte de inóculo de vírus, servindo de foco para infecções subsequentes. Uma das características deste ramo da horticultura é o intercâmbio intenso das orquídeas, responsável pela distribuição mundial destas plantas, bem como de suas doenças e vetores (LESEMANN, 1980).

De acordo com Zettler et al. (1990) existem 50 vírus que infectam orquídeas, mas segundo Lawson e Hsu, (1995) são conhecidos apenas 27. Não foram encontradas informações

¹ PASKE, W. – Sociedade Paranaense de Orquidófilos

atualizadas a respeito do número exato de vírus descritos nestas plantas, sendo que a maioria destes não está ainda completamente caracterizada.

O vírus da mancha das orquídeas (“Orchid fleck virus” - OFV) causa lesões cloróticas e necróticas em vários gêneros de orquídeas e é transmitido de forma persistente pelo ácaro *Brevipalpus californicus* (Banks). Este vírus apresenta distribuição cosmopolita e é reconhecido como um dos patógenos virais importantes desta cultura. Esta distribuição universal do OFV levanta a questão sobre a variabilidade dos isolados encontrados em diferentes partes do mundo e a indicação de um possível centro de origem. O seqüenciamento completo do genoma do OFV (KONDO et al., 1998; 2003) permitiu desenvolver ferramentas moleculares que não só facilitam sua detecção e identificação, mas também meios para avaliar sua variabilidade baseada na leitura da seqüência de partes de seu genoma. Uma avaliação preliminar da variabilidade do OFV baseado em uma seqüência amplificada por RT-PCR de amostras coletadas de diferentes regiões geográficas distinguiu dois isolados muito distintos dos demais (BLANCHFIELD et al., 2001).

No presente trabalho propôs-se otimizar o método de diagnóstico do OFV baseado em RT-PCR através da alteração dos “primers” utilizados, consolidar o uso de sondas para detecção por hibridização (dot-blot e direct tissue printing) e estudar a variabilidade do vírus através do uso da técnica do SSCP “*Single Strand Conformational Polymorphism*”, com base nas seqüências do gene codificador da capa protéica viral, em amostras coletadas em diferentes partes do país e procedentes do exterior.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácaros do gênero *Brevipalpus*

A família Tenuipalpidae possui mais de 622 espécies distribuídas por 30 gêneros (CHILDERS et al., 2003a). Os ácaros desta família são conhecidos como ácaros planos e ocorrem geralmente em locais de clima tropical ou subtropical (BAKER; TUTTLE, 1987).

O gênero *Brevipalpus* é reconhecido como o grupo mais importante dentro da família Tenuipalpidae. Esses ácaros têm tamanho entre 200 a 410 µm de comprimento (HARAMOTO, 1969; BAKER; TUTTLE, 1987), sendo alongados, achatados dorsoventralmente e de coloração avermelhada. *Brevipalpus* é um gênero polífago e apresenta distribuição cosmopolita, tendo sido

encontrado na África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, América do Sul e Ilhas do Pacífico (HARAMOTO, 1969).

A importância dos ácaros do gênero *Brevipalpus* vem crescendo, tornando-se evidente seu potencial como praga de plantas, especialmente por sua capacidade de transmitir vírus (CHILDERS et al., 2003b; KITAJIMA et al., 2003a, b; KONDO et al., 2003; RODRIGUES et al., 2003).

Dentro das espécies de *Brevipalpus*, as três espécies de maior importância econômica são: *B. californicus* (Banks), *B. obovatus* Donnadieu e *B. phoenicis* (Geijskes). Estes ácaros foram relatados em 928 espécies de plantas em 513 gêneros distribuídas em 139 famílias (CHILDERS et al., 2003a). Entre as hospedeiras estão monocotiledôneas, dicotiledôneas, plantas anuais, perenes, ornamentais entre outras. O *B. californicus* foi identificado em 316 espécies de plantas hospedeiras, sendo encontrado geralmente em espécies de orquídeas e árvores; o *B. obovatus* em 451 espécies de plantas hospedeiras, como herbáceas, arbustivas e ornamentais e o *B. phoenicis* em 486 espécies de plantas hospedeiras suculentas, cactáceas, herbáceas e ornamentais (CHILDERS et al., 2003a).

Segundo Childers et al. (2003b), muitos dos ácaros *Brevipalpus* se reproduzem por partenogênese telítica com fêmeas produzindo fêmeas; os machos são raramente encontrados (cerca de 1% da população). A reprodução sexuada pode ocorrer, embora seja pouco freqüente. As fêmeas das espécies *B. obovatus*, *B. phoenicis* e *B. californicus* são haplóides, com dois cromossomos geneticamente distintos (HELLE; BOLLAND, 1972; WEEKS et al., 2001). Uma bactéria endossimbiótica seria responsável pela feminilização dos machos (WEEKS et al., 2001), possivelmente do grupo “*Candidatus Cardinium*” (CHIGIRA; MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005b).

O ciclo de vida típico dos *Brevipalpus* consiste de quatro estágios ativos: larva, protoninfa, deutoninfa e adulto, sendo que entre cada ínstar o ácaro passa por períodos de imobilidade chamados de protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida (HARAMOTO, 1969). A postura dos ovos acontece em locais protegidos. Os ovos são geralmente postos individualmente, mas agrupamentos podem ocorrer (HARAMOTO, 1969).

A diferenciação entre *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus* é realizada com base em diferenças no padrão das setas dorsais no histerossoma e no número de solenídios no par de pernas II. *B. californicus* e *B. phoenicis* apresentam dois solenídios na extremidade do par de

pernas II, enquanto *B. obovatus* apresenta um único. *B. californicus* apresenta seis pares de setas dorsais no histerossoma, enquanto *B. phoenicis* e *B. obovatus* apresentam cinco pares (WELBOURNE et al., 2003).

2.2 Vírus transmitidos por *Brevipalpus*

Os vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) têm em comum, além do vetor, semelhanças na sintomatologia causada nas plantas hospedeiras, morfologia das partículas virais e efeitos citopatológicos (KITAJIMA et al., 2003a). Os sintomas nos hospedeiros consistem em lesões locais (cloróticas, necróticas ou manchas verdes) nas folhas, ramos e frutos os quais raramente se tornam sistêmicos (KITAJIMA et al., 2003a). Estudos iniciais sobre a leprose dos citros (*Citrus leprosis virus* – CiLV), apresentaram a hipótese de etiologia fúngica, sendo apontados os fungos *Colletotrichum gloesporioides*, *Hormodendron* sp., e *Cladosporium herbarium* var. *citri* como possíveis patógenos, embora o postulado de Koch não houvesse sido completado (revisado por RODRIGUES et al., 2003). Com a demonstração do envolvimento dos ácaros *Brevipalpus* com a leprose, Vergani (1945) sugeriu que estas lesões seriam resultantes de toxinas injetadas na planta durante a alimentação do ácaro. Esta hipótese foi contestada e a etiologia viral das lesões foi provada por microscopia eletrônica (KITAJIMA et al., 1972; COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2000b; DOMINGUES et al., 2001), transmissão mecânica (COLARICCIO et al., 1995) e enxertia de tecidos (KNORR, 1968; CHAGAS; ROSSETI, 1980).

Os vírus transmitidos por *Brevipalpus* são divididos em tipos nuclear (-N) e citoplasmático (-C), sendo diferenciados com base no seu local de maturação na célula e na morfologia das partículas (KITAJIMA et al., 2003a).

Os vírus do tipo nuclear foram encontrados pela primeira vez em orquídeas infectadas pela mancha da orquídea (“Orchid fleck virus” – OFV) (DOI et al., 1969; KITAJIMA et al., 1974; DOI et al., 1977; KITAJIMA et al., 2001; KONDO et al., 2003) e posteriormente foram encontrados em vários casos como em alguns isolados de leprose dos citros tipo nuclear (nuclear type of “*Citrus leprosis virus*” – CiLV-N), mancha anular do cafeeiro (“*Coffee ringspot virus*” - CoRSV), mancha clorótica do *Clerodendron* (“*Clerodendron ringspot virus*” - CIRSV), mancha clorótica do *Hibiscus* (“*Hibiscus chlorotic spot virus*” - HCSV), mancha anular do *Malvaviscus*

(“*Malvavirus ringspot virus*”) ente outros (KITAJIMA et al., 2003a). A principal característica destes vírus é a formação de um viroplasma elétron-transparente no núcleo da célula hospedeira. As partículas virais têm forma de bastonetes curtos, com largura de 40 a 50 nm e comprimento de 100 a 110 nm, que podem aparecer dispersos no viroplasma ou no nucleoplasma. Essas partículas ocorrem comumente associadas perpendicularmente à membrana interna do envelope nuclear e podem ainda estar presentes no citoplasma, freqüentemente associadas às membranas do retículo endoplasmático e empurrando a membrana da mesma forma que no envelope nuclear. Freqüentemente formam arranjos de membranas dispostas em círculo e os vírions organizados radialmente, gerando configurações conhecidas como “roda de carroça” (LESEMANN et al., 1975). Em raras ocasiões, partículas isoladas e providas de membrana têm sido encontradas no lúmen do retículo endoplasmático, aparentemente tendo completado o processo de brotação (KITAJIMA et al., 2003a).

Os vírus do tipo citoplasmático foram encontrados pela primeira vez em amostras de folha afetadas pela “lepra explosiva”, um isolado do CiLV da Argentina (KITAJIMA et al., 1972). Posteriormente foram encontrados na maioria dos isolados brasileiros de CiLV e tem sido referido como do tipo citoplasmático da leprose dos citros (CiLV-C) (COLARICCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003). Exemplos de outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* do tipo citoplasmático seriam: Mancha anular de *Solanum violaefolium* (*Solanum violaefolium* ringspot virus - SvRSV), pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus – PFGSV), mancha verde do *Hibiscus* (*Hibiscus* green spot virus - HGSV), mancha anular do *Ligustrum* (*Ligustrum* ringspot virus - LiRSV), entre outros. As partículas são curtas, baciliformes e com membrana, apresentando largura de 60 a 70 nm e comprimento de 120 a 150 nm. Estas ocorrem isoladas ou agrupadas sempre no lúmen do retículo endoplasmático. Ocasionalmente, as partículas baciliformes podem ser encontradas na cavidade perinuclear, possivelmente migrando do retículo endoplasmático. Diferente do tipo nuclear, o viroplasma dos vírus do tipo citoplasmático ocorre como inclusões citoplasmáticas elétron densas e vacuoladas, de forma e dimensões variadas (KITAJIMA et al., 2003a; KITAJIMA et al., 2003b).

Em algumas hospedeiras podem ser encontrados o tipo nuclear e o citoplasmático como em citrus (KITAJIMA et al., 1972), *S. violaefoleum* (KITAJIMA; MORAES, 2000; KUBO et al., 2004; KITAJIMA et al., 2004), *Clerodendron* (KITAJIMA; MORAES, 2000), *Hibiscus* (KITAJIMA et al., 1999; KITAJIMA; RODRIGUES, 2001) e orquídeas (DOI et al., 1977;

FREITAS-ASTÚA et al., 1999). No caso de *Hibiscus* e *Clerodendron*, puderam-se constatar, por microscopia eletrônica, casos de co-infecção pelos dois tipos, até mesmo numa mesma célula (KITAJIMA et al., 2003a), sugerindo que são distintos, não havendo interferência entre eles. Além disso, ao menos no caso da leprose dos citros, foi confirmado que os tipos nuclear e citoplasmático apresentam sequências nucleotídicas diferentes, uma vez que pares de “primers” ao longo do genoma do CiLV-C não amplificaram amostras com CiLV-N (FREITAS-ASTÚA et al., 2005).

A diferenciação dos tipos nucleares e citoplasmáticos é possível algumas vezes por comparação de lesões foliares. Existe uma tendência de o tipo citoplasmático causar manchas verdes em folhas senescentes, e do tipo nuclear induzir manchas cloróticas em folhas verdes, como é possível observar na Figura 1 (KITAJIMA et al., 2003a). No caso do CiLV essa tendência não é observada, uma vez que as lesões do tipo nuclear ou citoplasmático são sempre cloróticas. No entanto, as lesões foliares causadas por CiLV-C (Figura 2A) são em geral maiores e menos amareladas que aquelas causadas pelo CiLV-N; além disso, o CiLV-C tende a formar halos concêntricos de goma em torno das lesões. O CiLV-N (Figura 2B) tende a formar lesões amareladas com um ponto necrótico em seu centro, o qual pode evoluir tomando grandes áreas da folha.

OFV (KONDO et al., 1995), CoRSV (BOARI et al., 2003) e CIRSV (ALCÂNTARA et al., 2005), todos do tipo nuclear, podem ser transmitidos mecanicamente com relativa facilidade para diversas plantas teste, tornando-se sistêmicos em algumas delas quando estas são submetidas a temperaturas em torno de 29 a 32°C por um período de duas semanas. O OFV foi purificado com sucesso por Kondo et al. (1995), o CoRSV e o CIRSV por Boari et al. (2004, 2006), respectivamente. Esses são também os únicos vírus transmitidos por *Brevipalpus* para os quais existem anti-soros (KONDO et al., 1998; BOARI et al., 2004, 2006), sendo que no estudo de relacionamento sorológico entre OFV e CoRSV obteve-se uma reação cruzada de baixa intensidade (BOARI et al., 2004). Embora o CiLV-N seja um vírus do tipo nuclear e transmitido por *B. phoenicis*, não foi possível até o momento transmiti-lo mecanicamente e tampouco purificá-lo a partir de citros.

A maioria dos vírus de planta apresenta como material genômico o ácido ribonucléico de fita simples (ssRNA). Em alguns casos a sua forma replicativa, na forma de dsRNA (RNA de fita dupla), pode ser detectada por eletroforese. Em função disso, o dsRNA vem sendo utilizado como

indicativo de infecção viral (VALVERDE et al., 1990). A detecção do dsRNA é realizada por perfis eletroforéticos, indicando pesos moleculares e número de bandas, que ajudam na indicação dos prováveis grupos de vírus (DODDS et al., 1984). O dsRNA pode ser também de origem endógena da planta ou constituição genômica de vírus como o reovírus e os vírus crípticos (RODRIGUES, 2000).



Figura 1 – Sintomas de vírus transmitidos por *Brevipalpus*: **1** – *Hedera canariensis* com vírus do tipo citoplasmático, **2** – *Clerodendron x speciosum* com vírus do tipo nuclear, **3** – *Schefflera actinophylla* com vírus do tipo citoplasmático, **4** – *Clerodendron thompsonae* com vírus do tipo citoplasmático, **5** – *Ligustrum* sp. com vírus do tipo citoplasmático, **6** – *Solanum violaeifolium* com vírus do tipo citoplasmático, **7** – *Hibiscus rosa-sinensis* com vírus do tipo citoplasmático, **8** – *Malvaviscus arboreus* com vírus do tipo nuclear, **9** - *Hibiscus rosa-sinensis* com vírus do tipo nuclear



Figura 2 – Diferenças de sintomas foliares entre CiLV-C e CiLV-N. **2A** – lesões de CiLV-C. **2B** – lesões de CiLV-N

A partir de lesões de leprose do tipo citoplasmático, Colariccio et al. (2000) e Rodrigues et al. (2000a) puderam extrair dsRNA, obtendo duas bandas de alto peso molecular. Os materiais

EUA (LESEMANN; DORAISWAMY, 1975; DOI et al., 1977; CHANG et al., 1991; KITAJIMA et al., 1974, 2001; GIBBS et al., 2000; FREITAS-ASTÚA et al., 2002b; CHILDERS, 2003a). Aparentemente, o OFV não causa lesões em flores (BLANCHFIELD et al., 2001).

O OFV foi inicialmente classificado como um rhabdovirus tentativo, tendo como diferença aos demais, seu genoma bipartido, tamanho das partículas e vetores (KONDO et al., 1998; JACKSON et al., 2005). Segundo Jackson et al. (2005), o CoRSV e o CiLV-C têm morfologia das partículas similares ao OFV e podem formar um novo grupo dentro da família *Rhabdoviridae*.

Na revisão feita por Kitajima et al. (2001) e Gibbs et al. (2000) menciona-se a detecção de partículas de OFV nos seguintes gêneros de orquídeas: *Angraecum*, *Aspasia*, *Baptistonia*, *Bifrenaria*, *Brassia*, *Bulbophyllum*, *Calanthe*, *Cattleya*, *Colmanara*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Diplocaulobium*, *Dockrillia*, *Encyclia*, *Flickingeria*, *Hormidium*, *Liparis*, *Masdevallia*, *Maxillaria*, *Miltonia*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Phaius*, *Paphiopedilum*, *Pescatorea*, *Phalaenopsis*, *Polstachya*, *Renanthera*, *Stanhopea*, *Stenia*, *Trigonidium*, *Vanda* e *Zygopetalum*.

Maeda et al. (1998) provaram no Japão que o vetor do OFV é o ácaro *Brevipalpus californicus* (Banks) (*Acari: Tenuipalpidae*) e os dados foram comprovados por Ferreira et al. (2003) no Brasil.

Maeda et al. (1998) mostraram ainda que 17 espécies de plantas distribuídas por 12 famílias foram infectadas por OFV através do *B. californicus*. A maioria das plantas inoculadas apresentou sintomas de lesões locais, mas as orquídeas como *Cymbidium*, *Calanthe*, *Dendrobium* e *Phalaenopsis* apresentaram infecção sistêmica na forma de lesões cloróticas ou necróticas após 1-2 meses. A única não Orchidaceae infectada sistemicamente foi a *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae). As plantas que produziram lesões locais foram: *T. expansa* (Aizoaceae), *Amaranthus lividus* L. (Amaranthaceae), *Vinca major* L. (Apocinaceae), *Lactuca laciniata* Makino (Compositae), *Pharbitis nil* (L.) Choisy (Convolvulaceae), *Acalypha australis* L. (Euphorbiaceae), *Cassia tora* L., *P. vulgaris* (Leguminosae), *Hibiscus manihot* L., *H. syriacus* L. (Malvaceae), *Citrus hassaku* Hort. Ex Tanaka (Rutaceae) e *Datura stramonium* L. (Solanaceae).

O OFV pode ser transmitido por ninfas e adultos do *B. californicus*, mas não por suas larvas. O tipo de transmissão deste vírus foi determinado por um experimento em que o ácaro foi alimentado em folhas infectadas e passou por um período de 3 semanas se alimentando em folhas de chá (*Camellia sinensis*), planta imune ao OFV. A imuno-marcação demonstrada através de

microscopia eletrônica de transmissão em extrato do ácaro revelou partículas deste vírus, mesmo após o período de 3 semanas sem alimentação em plantas infetadas, demonstrando então que o *B. californicus* transmite o vírus de forma persistente (KONDO et al., 2003).

Foi ainda possível transmitir este vírus por inoculação mecânica para *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Petunia hybrida* utilizando tampão fosfato 0,01M pH 7,0. Em temperaturas superiores a 30°C lesões locais cloróticas ou necróticas apareceram após 2 a 3 semanas e sintomas sistêmicos ocorreram em espécies de *Dendrobium* e *Cymbidium*, mas não nas demais (KONDO et al., 1995). A infecção nestas plantas foi comprovada por contrastação negativa (CHANG et al., 1976).

Nas células das orquídeas infectadas pode-se verificar além das partículas virais, inclusões celulares do tipo viroplasma elétron-transparente (KONDO et al., 2003). Os vírions podem ser observados dispersos pelo viroplasma, às vezes lado a lado; eles podem ainda ficar dispostos perpendicularmente à membrana interna do envelope nuclear. O complexo vírion-membrana pode ainda formar um complexo com o envelope nuclear ou o retículo endoplasmático, formando estruturas tubulares ou cilíndricas, que em seções ultrafinas aparecem radialmente arranjadas como “rodas de carroça”. Os vírions envelopados são raramente encontrados no retículo endoplasmático (LESEMANN; DORAISWAMY, 1975). Kondo et al. (1995) produziram anti-soro a partir do OFV purificado que tem sido usado para imunodeteção deste vírus. Este anti-soro também permitiu demonstrar inequivocamente, por imunolocalização *in situ*, que as partículas em forma de bastonetes representam os vírions e que o viroplasma nuclear contém nucleocapsídeo viral. Foi demonstrado também que o anticorpo reconhece igualmente isolados de OFV da Austrália, Japão, Brasil (KITAJIMA et al., 2001) e Costa Rica (FREITAS-ASTÚA et al., 2002b).

Kondo et al. (1998) determinaram a seqüência completa do OFV por biblioteca de cDNA utilizando “primers” randômicos. O Northern Blot sugere que o seu genoma é de fita negativa dividido em duas partes. O genoma é constituído de duas moléculas de RNA de fita simples, o RNA 1 com 6.413 nucleotídeos e o RNA 2 com 6.001 nucleotídeos. As regiões terminais 3' e 5' dos dois RNAs possuem seqüências conservadas e complementares. O RNA 1 possui 5 ORFs que codificam proteínas de 49, 26, 38, 20 e 61 kDa. As proteínas de 49 e 61 kDa apresentam similaridades com a nucleoproteína e a glicoproteína de nucleorhabdovirus de plantas como o *Sonchus yellow net virus* (SYNV) e *Rice yellow stunt virus* (RYSV). O RNA 2 possui uma única

e longa ORF de 212 kDa, com similaridade à polimerase de vírus da família *Rhabdoviridae*. Estes resultados sugerem a similaridade do OFV com os rhabdovirus; entretanto o OFV se diferencia por possuir genoma bipartido. Embora Kondo et al. (1998) tenham seqüenciado completamente o OFV, a seqüência completa tornou-se disponível nos bancos de dados de seqüências mundiais apenas em 2006, dificultando qualquer trabalho anterior à esta data envolvendo o genoma deste vírus.

Blanchfield et al. (2001) desenharam um par de “primers” para amplificar um fragmento de aproximadamente 800 pb do gene que codifica a capa protéica do OFV, com intuito de seqüenciar este gene a partir de orquídeas infectadas de diferentes gêneros e países. O “primer” potydT/SP6 consiste na seqüência 5’- GATTTAGGTGGACACTATAGT₁₇- 3’ e o “primer” mN2 (5’-TGCAGGAATATAGCCGACATGTT- 3’), desenhado com base em uma região do gene da nucleoproteína do isolado japonês do OFV. Neste experimento foram seqüenciados materiais do Brasil, Japão, Alemanha, África do Sul, Havaí e ainda amostras de quatro estados australianos, incluindo 13 diferentes gêneros de orquídeas. Os resultados demonstram que existem pelo menos duas seqüências distintas de OFV, o primeiro representado pelo isolado japonês do qual o “primer” foi derivado e de um isolado da Alemanha; e o primeiro incluiu todos os outros 33 isolados encontrados em orquídeas em diferentes continentes. Foi possível ainda detectar eficientemente o OFV por dsRNA, a hibridização por sondas não radioativas e RT-PCR (FREITAS-ASTÚA et al., 2002; LOCALI et al., 2003a).

Deve-se mencionar que além do OFV, tipicamente nuclear (OFV-N), recentemente têm sido detectadas orquídeas com sintomas essencialmente similares aos induzidos pelos isolados do OFV-N, mas que revelam efeitos citopáticos do tipo citoplasmático (FREITAS-ASTÚA et al., 1999). Estes isolados serão referidos como OFV-C e suas relações com outros vírus transmitidos por *Brevipalpus*, do tipo citoplasmático, ainda são desconhecidas.

2.3 Variabilidade genética em vírus

Populações de fitovírus são geneticamente heterogêneas, propriedade reconhecida há muito tempo pela virologia de plantas (GARCÍA-ARENAL et al., 2001). Assim como para outros organismos, o ciclo replicativo pode gerar indivíduos geneticamente diferentes de seus parentais (GARCÍA-ARENAL et al., 2003).

A constituição genética de um organismo é seu genótipo. Para organismos haplóides, haplótipo tem o mesmo significado que genótipo. Desta forma, em uma população de vírus podem ocorrer muitas variantes (mutantes), com diferentes genótipos ou haplótipos (GARCÍA-ARENAL et al., 2001).

O potencial de variabilidade dos fitovírus é tão grande que um único isolado não é composto de uma única seqüência, mas de uma população de variantes (chamada quasispecies), que apresentam pequenas alterações em torno de uma seqüência consenso (HOLLAND et al., 1982). A teoria das quasispecies foi proposta inicialmente por Eigen para descrever matematicamente a evolução de uma única população replicando com elevadas taxas de erro (EIGEN; SCHUSTER, 1977; EIGEN, 1996).

A diversidade de seqüências de nucleotídeos entre vírus, tanto dentro quanto entre espécies é enorme, principalmente se comparada com a maioria dos organismos vivos. Por exemplo, dois indivíduos diferentes do mesmo isolado de fitovírus são geralmente mais diferentes em seqüência de nucleotídeos do que seres humanos e chimpanzés (ROOSSINCK, 1997).

Inicialmente, os variantes genéticos eram caracterizados por diferenças nas propriedades biológicas como os sintomas causados em diferentes hospedeiros, gama de hospedeiros ou propriedades de transmissão dos vetores. O desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a caracterização de propriedades virais além das relacionadas com a interação com hospedeiros e vetores resultou em uma mudança drástica na perspectiva de estudos sobre variabilidade genética em vírus (GARCÍA-ARENAL et al., 2003).

Com o avanço científico que possibilitou a determinação em curto prazo de seqüências de nucleotídeos e a necessidade de se analisar possibilidades e risco de novas estratégias de controle, como a utilização de plantas transgênicas, o interesse em estudar a variabilidade genética e evolução de fitovírus aumentou, desencadeando em um grande número de publicações relatadas a este assunto (ROOSSINCK, 1997; CAÑIZARES et al., 2001; GARCÍA-ARENAL et al., 2001; AJJIKUTTIRA et al., 2002; SCHIRMER et al., 2005).

Evidências de variações genéticas em populações virais foram relatadas pela primeira vez em 1926, derivada da possibilidade de isolar variantes que causavam diferentes sintomas no mesmo hospedeiro (KUNKEL, 1947). Essas variantes foram encontradas inicialmente pelo isolamento de sintomas atípicos em plantas infectadas sistemicamente. Foi observado também

que inoculações em diferentes hospedeiros (YARWOOD, 1979) ou em diferentes condições de temperatura poderiam gerar alterações nas propriedades virais (VAN VLOTEN-DOTING, 1988).

refere apenas aos erros que se estabelecem e são detectáveis dentro da população (DOMINGO; HOLLAND, 1994).

Malpica et al. (2002) realizaram um estudo utilizando o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* - TMV) como modelo, analisando a natureza das mutações em vírus de RNA. A maior parte das mutações era de inserções e deleções sendo que metade destas envolvia três bases ou mais. Dados similares só haviam sido relatados anteriormente para um reovírus e para um archeon (PATHAK; TEMIN, 1990; GROGAN et al., 2001). Cerca de 35% destes mutantes eram ainda mutantes múltiplos, uma característica que não ocorre com nenhum outro espectro de mutantes (MALPICA et al., 2002). Estes dados demonstram que a maioria das mutações em TMV, e possivelmente em outros vírus de RNA, não são de natureza adaptativa, mas sim derivadas da replicação rápida do genoma instável de RNA, concordando com o trabalho de Drake e Holland (1999).

Entretanto, García-Arenal et al. (2001) afirmam que algumas evidências sugerem que a pouca diversidade de população e a estabilidade genética é a regra. As populações de vírus de plantas geralmente consistem de poucos haplótipos, geralmente com um deles prevalente e os demais pouco frequentes.

2.3.2 Evolução de fitovírus

A distribuição e a frequência de um variante genético podem mudar com o tempo, e este processo é chamado de evolução. O estudo da evolução é indispensável para o desenvolvimento de estratégias de controle dos fitovírus (GARCÍA-ARENAL et al., 2003).

A mutação, a recombinação e o rearranjo regem a evolução viral. Estes elementos geram diversidade no genoma viral, fazendo com que existam variantes suficientes para que a ação da seleção natural ocorra (ROOSSINCK, 1997). A seleção é um processo pelo qual os variantes mais adaptados ao ambiente têm sua frequência aumentada (seleção positiva) na população viral, enquanto os variantes menos adaptados têm sua frequência diminuída (seleção negativa ou seleção de purificação). A seleção pode resultar em diminuição da diversidade dentro da população, mas pode aumentá-la entre populações, uma vez que sob diferentes pressões de seleção diferentes variantes podem ser selecionados (GARCÍA-ARENAL et al., 2001).

O alto potencial de variação genética por mutação ou recombinação não precisa necessariamente resultar em grande diversidade na população de um vírus, uma vez que fatores como seleção natural e o efeito de “gargalo” das mutações deletérias reduzem a variabilidade genética viral (GARCÍA-ARENAL et al., 2001). De fato, a replicação repetida em cada ciclo de infecção gera uma grande proporção de mutações em cada genoma viral, muitas das quais são deletérias. Esta talvez seja uma das razões que leva à baixa infectividade específica de vírus de RNA. Isso talvez explique a vulnerabilidade das populações de vírus de RNA ao aumento nas taxas de mutação, as quais as levam rapidamente à extinção (HOLLAND et al., 1990).

Embora as taxas de mutação sejam similares para todos os vírus de RNA, a frequência de mutação varia drasticamente para diferentes vírus (ROOSSINCK, 1997). Muitos estudos revelaram a ausência de variação significativa em tobamovírus (MOYA et al., 1993; FRAILE et al., 1996), enquanto o vírus satélite do TMV apresenta um nível muito maior de diversidade, mesmo sendo replicado pelo “helper” da replicase do tobamovírus (KURATH et al., 1993). Uma grande variabilidade também foi encontrada no vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV) e seus RNAs satélites (KURATH; PALUKAITIS, 1989; ARANDA et al., 1993). Esta diferença pode ser refletida na diferença de gama de hospedeiros; o CMV possui uma ampla gama de hospedeiros experimentais e naturais (PALUKAITIS et al., 1992), enquanto os tobamovírus possuem uma gama natural de hospedeiros muito menor, ainda que existam mais hospedeiras experimentais para estes vírus do que encontradas na natureza (FRAILE et al., 1995). Pode-se especular então que a grande frequência de mutação do CMV permitiu sua adaptação para maior número de hospedeiros (ROOSSINCK, 1997). Na família *Luteoviridae*, o *Potato leafroll virus* possui uma pequena gama de hospedeiros e pouca frequência de mutação enquanto o *Beet western yellows virus* apresenta gama maior de hospedeiros e maior variação (DEMIRANDA et al., 1995).

2.3.3 Estimativa de distância genética

As estimativas das distâncias genéticas podem derivar de dados da composição de aminoácidos das proteínas virais ou de comparações sorológicas utilizando tanto anti-soros monoclonais como policlonais (VANRENMORTEL, 1982). A distância genética pode ainda ser estimada a partir de fingerprint T1 da ribonuclease (MOYA et al., 1993), por análise de RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism) (NEI; TAJIMA, 1981), e por SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), embora esta última técnica não permita uma estimativa direta (ARANDA et al., 1995; KOENIG et al., 1995). A análise de seqüências de nucleotídeos de genes virais permite dados mais detalhados tanto para estimativa de distância genética quanto para identificação de variantes genéticas (GARCÍA-ARENAL et al., 2003).

O método mais apropriado para estimativa filogenética dos fitovírus ainda não foi definido (WEILLER et al., 1995) e deve ser considerado cuidadosamente, uma vez que diferentes métodos podem resultar em estimativas distintas (HILLIS et al., 1994).

A variabilidade do gene da capa protéica do vírus do mosaico do *Cymbidium* (*Cymbidium mosaic virus* - CyMV) e da mancha anular do *Odontoglossum* (*Odontoglossum ringspot virus* - ORSV) foi estudada por Ajjikuttira et al. (2002). Os isolados de CyMV não puderam ser agrupados de acordo com hospedeiros ou origem geográfica e apresentaram alta similaridade tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos. Na análise do ORSV foi detectada baixa variabilidade e também não foi possível agrupar os isolados de acordo com hospedeiros ou origem geográfica.

2.3.3.1 SSCP (“Single strand conformational polymorphism”)

O SSCP é uma técnica que se baseia no fato de o DNA de dupla fita, quando parcialmente desnaturado, migrar como dois fragmentos de DNA fita simples em eletroforese com gel de poliacrilamida. A migração das duas fitas depende da seqüência de nucleotídeos e da conformação adquirida nas condições de eletroforese. Mesmo pequenas diferenças nas seqüências podem alterar a conformação das fitas e, conseqüentemente, o padrão eletroforético (SOUZA et al., 2001). Isto permite a análise da variabilidade genética gerada por pequenas modificações nos genótipos virais. Apesar de a técnica de SSCP detectar mutações de apenas uma base (LEE et al., 1988; SAVOV et al., 1992), foi demonstrado também que alguns haplótipos com o mesmo padrão de SSCP são diferentes em um ou poucos nucleotídeos (RUBIO et al., 1996; AYLLÓN et al., 1999).

O SSCP é uma técnica muito utilizada na caracterização de fitovírus (KOENIG et al., 1995). De fato, muitos trabalhos demonstram a presença de variabilidade em diferentes isolados de um mesmo vírus por este método.

A análise de SSCP para o gene da capa protéica de 17 isolados do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* - CTV) de diferentes localidades, demonstrou a presença de 11 haplótipos distintos (RUBIO et al., 1996). Roistacher e Moreno (1991) constataram que um grande número de isolados com diferentes características biológicas e moleculares de CTV ocorrem no mundo. Segundo Kano et al. (1991) e Moreno et al. (1993), este fato pode ser decorrente da mudança de hospedeiros ou da transmissão por afídeos. Estes mesmos autores sugerem que estas alterações nas propriedades virais podem acontecer porque um único isolado de campo de CTV possui uma população com diferentes genótipos e durante a transmissão por afídeos ou enxertia, pode ocorrer transmissão preferencial de determinados grupos de genótipos. Estas suposições são controversas. García-Arenal et al. (2001) sugere que o hospedeiro não influencia na diferenciação da população viral.

O trabalho de Souza et al. (2002) demonstrou, ainda com o CTV, que existe relação entre diferentes regiões de cultivo e a variabilidade do gene que codifica a capa protéica, embora a variação encontrada entre isolados dentro das populações de uma mesma região de cultivo seja sempre maior quando comparadas às variações entre regiões. Deve-se notar que o padrão de diversidade do CTV brasileiro é muito maior que a relatada em outros países. O CTV deve estar presente na planta como uma mistura de haplótipos diferentes, sendo que esta pode apresentar uma variedade de sintomas, dependendo da combinação de haplótipos e susceptibilidade da planta. O SSCP tem sido utilizado para identificar as estirpes severas desta doença (SAMBADÉ et al., 2002).

A análise da variabilidade genética por SSCP demonstrou a presença de pouca variabilidade entre isolados de *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) de diferentes regiões, sendo observada a presença de duas subpopulações distintas correlacionadas com sua localização geográfica: uma no leste e outra no oeste do globo terrestre (RUBIO et al., 2001a).

O *Citrus leaf blot virus* (CLBV) também teve sua variabilidade genética estudada, e entre 37 isolados, foram encontrados cinco haplótipos diferentes, sendo um deles o predominante com cerca de 80% das amostras analisadas (VIVES et al., 2002). Essa diversidade foi considerada baixa se comparada com a do CTV na Espanha, e a justificativa dos autores é de que a população de CLBV neste país pode derivar de uma origem única, uma vez que a introdução do vírus é recente na região. Neste mesmo trabalho, os resultados do SSCP foram comparados com o sequenciamento genético dos isolados, e houve concordância.

Rubio et al. (2001a) observaram que para o CYSDV não existe correlação entre a distância genética entre os isolados, a origem geográfica e os hospedeiros dos quais os isolados são obtidos. A baixa variabilidade genética entre isolados geograficamente distantes também foi observada para dois tobamovírus (RODRÍGUEZ-CEREZO et al., 1999), dois crinivírus (RUBIO et al., 1999; 2001a) e para o CTV (RUBIO et al., 2001b).

O único estudo de variabilidade genética realizado com vírus causadores de lesões locais no hospedeiro foi desenvolvido por Locali et al. (2004). Este estudo, em que se utilizou a técnica de SSCP para determinar a variabilidade do CiLV-C, evidenciou a baixa variabilidade genética em materiais coletados em nove regiões geográficas diferentes, sendo encontrados apenas dois haplótipos, um deles dominante.

2.3.3.2 Seqüenciamento de DNA para análise de variabilidade

Na década de 70 foram desenvolvidas as técnicas iniciais que permitiram a determinação da seqüência de nucleotídeos de fragmentos de DNA purificados. Dentre estas técnicas destacou-se o método de Sanger, em que o DNA a ser seqüenciado é utilizado como molde para a síntese “in vitro”, pela DNA polimerase, de uma série de réplicas parciais, todas começando no mesmo ponto, mas terminando em regiões diferentes ao longo da cadeia de DNA (SANGER, 1977). A chave deste método é a utilização de dideoxinucleotídeos trifosfatados (ddNTPs) em que o grupo hidroxila (3') da ribose, presente na maioria dos deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), é trocado por um hidrogênio. Deste modo, quando um ddNTP é incorporado na cadeia de DNA, ele bloqueia a adição do próximo dNTP. Isso se deve ao fato de que a ausência da hidroxila na ribose do ddNTP incorporado na cadeia não permite a liberação da energia necessária para a formação da ligação fosfodiéster com o próximo dNTP, interrompendo a continuidade da síntese de DNA. A reação de seqüenciamento pelo método de Sanger é realizada normalmente em quatro tubos diferentes, um para cada ddNTP (ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP), onde são adicionados os dNTPs normais, os “primers” iniciadores, um dos ddNTPs, a enzima Taq DNA polimerase e o DNA a ser seqüenciado. A reação em cadeia da polimerase amplifica a região delimitada pelos “primers”, de modo que sempre que um ddNTP é incorporado a síntese é interrompida. Como o processo é repetido diversas vezes durante a amplificação, fragmentos de DNA de vários tamanhos são gerados, todos terminando na mesma base. O produto das quatro reações é

observado em eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo cada reação aplicada em canaletas diferentes. Isso permite com que seja possível montar a seqüência de nucleotídeos baseando-se nos pesos moleculares dos diversos fragmentos gerados dentro de cada reação e entre as reações (ALBERTS et al., 1994).

Atualmente o seqüenciamento de DNA é realizado em equipamentos automatizados que realizam o processo de seqüenciamento rapidamente. Os seqüenciadores automáticos baseiam-se também no método proposto por Sanger, entretanto a reação de seqüenciamento é preparada em um único tubo para os quatro ddNTPs, sendo cada um marcado com fluoróforos de cores diferentes. O seqüenciador é capaz de reconhecer o comprimento de onda emitido de cada um dos ddNTPs, permitindo que um software especializado monte as seqüências à medida que o leitor do aparelho reconheça o fluoróforo da base adicionada.

O seqüenciamento de DNA é atualmente uma ferramenta chave dentro das mais variadas linhas de pesquisa que envolvem a biologia molecular. Não diferentemente, as técnicas de seqüenciamento têm grande aplicabilidade na virologia de plantas. Através do seqüenciamento é possível caracterizar o genoma completo ou parte do genoma viral. Os estudos de filogenia e evolução molecular com base nas seqüências de nucleotídeos permitem diferenciar claramente populações virais, suas taxas de mutações e seu padrão de evolução. A determinação do nível de estabilidade genética de uma população viral tem relação direta com a resistência dos hospedeiros às infecções, de modo que a alta variabilidade genética indica uma maior capacidade adaptativa aos mecanismos de defesa do hospedeiro. As seqüências de nucleotídeos podem fornecer informações sobre a seqüência de aminoácidos das proteínas responsáveis pela maquinaria molecular viral, permitindo um maior entendimento das funções das mesmas no ciclo de infecção viral.

O seqüenciamento completo e a análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da capa viral e das supostas proteínas de movimento (p7 e p9) de isolados do vírus do mosqueado do cravo (*Carnation mottle virus* - CarMV) demonstrou que este vírus possui uma estabilidade genética alta e que provavelmente o evento de especiação para a diferenciação deste gênero dentro da família *Tombusviridae* foi conseqüência da pressão de seleção em diferentes regiões genômicas (CAÑIZARES et al., 2001). A hipótese dos autores para esta alta estabilidade está relacionada à presença de uma seleção negativa que poderia limitar a presença de regiões variáveis no genoma dos carmovirus.

A análise das seqüências dos genes das capas protéicas virais de isolados de CyMV e ORSV de diferentes regiões geográficas demonstrou não existir uma região particular de variabilidade em cada um dos vírus, indicando também uma estabilidade genética relativamente alta. Estas seqüências conservadas, observadas tanto para CyMV quanto para ORSV, sugerem que os genes das capas protéicas de ambos são prováveis candidatos para conferir resistência às orquídeas cultivadas em diferentes localizações geográficas (AJJIKUTTIRA et al., 2002).

Recentemente, Codoñer et al. (2005) traçaram o padrão de evolução molecular da família *Bromoviridae* com base nas proteínas de movimento e do nucleocapsídeo codificadas pelo RNA 3 viral. Analisando seqüências genômicas depositadas em bancos de seqüências mundiais, os autores traçaram a relação filogenética e o padrão evolutivo dos gêneros *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus* e *Oleavirus* pertencentes à família *Bromoviridae*, sugerindo a inexistência de uma taxa constante de evolução molecular. Estes sugerem ainda que a taxa de substituições de aminoácidos foi variável ao longo das linhagens, fato associado à seleção natural ocorrida em cada hospedeiro ou à incapacidade da RNA polimerase reparar danos durante a replicação.

As técnicas de SSCP e seqüenciamento foram utilizadas por Lin et al. (2003) para a avaliação da diversidade genética de isolados californianos de CMV. Estes autores observaram que as repetições das análises de SSCP para um dos isolados não apresentavam o mesmo padrão de bandeamento para cada repetição. Os dados obtidos com o seqüenciamento demonstraram que se tratava de um inóculo composto de uma população mista de CMV. Deste modo, a utilização da técnica de seqüenciamento em conjunto com a técnica de SSCP produziu resultados que permitiram uma análise mais detalhada da constituição genética das populações virais de CMV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Folhas de orquídeas dos gêneros: *Amblostoma* sp., *Bulbophyllum* sp., *Cattleya* sp., *Cymbidium* sp., *Dendrobium* sp., *Dendrochilum* sp., *Encyclia* sp., *Epidendron* sp., *Maxillaria* sp., *Miltonia* sp., *Octomeria* sp., *Odontoglossum* sp., *Oncidium* sp., *Phaius* sp.,

A identificação dos ácaros foi realizada por microscopia de luz. Os espécimens foram montados em lâminas de vidro contendo meio de Hoyer's e permaneceram 48 horas em estufa a 60°C para clarificação e secagem do meio de montagem, com posterior observação da estruturas morfológicas em microscópio de luz (ML) Zeiss Axiophot com registro digital das imagens. Os ácaros do gênero *Brevipalpus* podem ser diferenciados pelo número de solenídeos (seta ômega) no tarso da perna 2, sendo existentes um em *B. obovatus* e dois em *B. phoenicis* e *B. californicus* e ainda pelo número de setas dorsais, cinco em *B. phoenicis* e *B. obovatus* e seis em *B. californicus*.

3.3 Análises de microscopia

3.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Os materiais vegetais infectados com OFV foram observados através do Microscópio Eletrônico de Transmissão (Zeiss EM 900) e foram registradas partículas de OFV-N e OFV-C com intuito de caracterizar melhor as diferenças entre os dois tipos do vírus causador da mancha da orquídea. O material foi processado conforme Kitajima (1998).

As amostras de lesões causadas por OFV-C e OFV-N foram fixadas em Karnovsky modificado (2,5% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato pH 7,0 (0,05M) com CaCl₂ (0,001M) (KITAJIMA; LEITE, 1999) por pelo menos 16 horas.

A solução foi descartada e as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos em tampão cacodilato (0,05M), sendo posteriormente fixadas em ácido ósmico (OsO₄) em tampão cacodilato 0,05M por cerca de 1 hora. As amostras foram lavadas em água destilada e fixadas em acetato de uranila 0,5% durante 16 horas. As amostras foram então desidratadas por 10 minutos em acetona com diluições de 30%, 50%, 70%, 90% por 10 minutos e em acetona 100% por 3 vezes de 10 minutos. As amostras foram infiltradas com acetona e resina Spurr (1:1) durante 5 horas e com resina Spurr pura por 16 horas. As amostras foram então transferidas para formas de silicone com resina pura e foram polimerizadas por 48h a 70°C.

Para a obtenção de secções ultrafinas, as amostras emblocadas em resina Spurr foram desbastadas utilizando-se um “trimmer” (Leica EM Trim) e os cortes ultrafinos foram feitos em

ultramicrotomo “Ultracut E” (Reichert), utilizando navalha de vidro. As secções foram colocadas em telinhas de cobre de 300 mesh.

3.3.2 Estudos anatômicos/histológicos

Este estudo foi realizado para se verificar a existência de diferenças nas alterações anatômicas causadas por OFV-N e OFV-C, de acordo com protocolo de Apezatto-da-Glória et al. (1995).

Folhas de orquídeas sadias (*Oncidium* sp.), com OFV-N (*Miltonia* sp.) ou OFV-C (*Jumellea* sp.) foram fixadas em solução Karnovsky modificada (KITAJIMA; LEITE, 1999) com auxílio de vácuo para melhorar a infiltração. As amostras foram então desidratadas em série de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltradas e emblocadas em resina metacrilato da Reichert-Jung. Foram feitas secções de 5 µm de espessura em microtomo rotativo manual e as secções foram coradas com toluidina azul e montadas em lâminas de vidro para avaliar as alterações anatômicas e histológicas. Um microscópio de luz (ML) Zeiss Axiophot com registro digital das imagens foi utilizado para exames das secções.

3.4 Análises moleculares

3.4.1 Extração do RNA total de folhas de orquídeas

O RNA total das orquídeas foi extraído pelo método de Gibbs e Mackenzie (1997) adaptado. Foram macerados de 50 a 100 mg de lesões foliares em microtubos de 1,5 mL do tipo “Eppendorf” com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A este macerado foi acrescentado o tampão de lavagem “Wash Buffer” (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M de NaCl e 0,05% BSA) e as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um vortex, sendo centrifugadas em seguida a 13.400g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi então adicionado o tampão CTAB (2% CTAB; 1,4 M de NaCl e 1 M de Tris-HCl pH 8,0 contendo 0,5% de β-mercaptoetanol) e agitado no vortex. Após agitação, as amostras foram incubadas a 55°C em banho-maria por 20 minutos. Adicionou-se então 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) às amostras e estas foram novamente agitadas em vortex. Após a

agitação, as amostras foram centrifugadas a 13.400g por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e colocada em novo tubo. A lavagem com clorofórmio: álcool isoamílico foi repetida a fim de obter um RNA mais limpo. Após nova remoção da fase aquosa e transferência para outro tubo, foi acrescentado 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol, as amostras foram agitadas por inversão e armazenadas em freezer – 20°C por 15 minutos. A amostra foi novamente centrifugada a 13.400g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 70% e houve nova centrifugação de 13.400g durante 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em liofilizador. O pellet foi ressuspenso em 20 µL de H₂O DEPC (Dimetil pirocarbonato) e as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C.

3.4.2 Extração do RNA total a partir de ácaros *Brevipalpus californicus*

Foram encontrados 30 ácaros *B. californicus* em *Mitonia* sp., e 10 em *Xylobium* sp., estas duas plantas haviam sido testadas anteriormente para a presença de OFV-N por RT-PCR apresentando resultado positivo. Como controle negativo de OFV-N foram utilizados 10 *B. californicus* encontrados em *Jumellea* sp. e 20 em *Coelogyne* sp. infectadas apenas com o OFV-C.

Os ácaros foram coletados, colocados em microtubos de 1,5 mL do tipo “Eppendorf” e congelados em freezer -80°C por 15 minutos. Centrifugaram-se os tubos para que os ácaros se concentrassem no fundo, e estes foram macerados com auxílio de um bastão de vidro. Adicionou-se 50 µL do tampão CTAB contendo 0,5% de β-mercaptoetanol e após agitação no vortex as amostras foram incubadas a 55°C em banho-maria por 15 minutos. Adicionou-se então 150 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) às amostras e estas foram novamente agitadas em vortex. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 13.400g por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e colocada em novo tubo. A lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico foi repetida a fim de obter um RNA mais limpo. Após nova remoção da fase aquosa e transferência para outro tubo, foi acrescentado 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5 M e 1 volume de isopropanol, as amostras foram agitadas por inversão e armazenadas em freezer – 20°C por 10 minutos. A amostra foi novamente centrifugada a 13.400g por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foram adicionados 150µL de etanol 70% e houve nova centrifugação de 13.400g

durante 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco em liofilizador. O pellet foi ressuspensionado em 5 μ L de H₂O DEPC e as amostras foram armazenadas em freezer – 80°C.

3.4.3 Extração de dsRNA (RNA dupla fita) de folhas de orquídea

Para extração do dsRNA seguiu-se protocolo utilizado para CTV (DODDS et al., 1984) e adaptado para a extração de CiLV-C por Locali (2002). O material extraído consistiu de folhas de *Jumellea* sp. infectadas com o OFV-C e de *Oncidium* sp. infectadas com OFV-N.

Dois gramas de lesões cloróticas com aparência de novas foram pesados e macerados em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido; esse macerado foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL contendo 7,0 mL de 2x STE (1x STE = 0,05M Trizma base; 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA pH 6,8); 7,0 mL de fenol; 7,0 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1); 1,6 mL de 20% SDS. Os tubos foram agitados durante 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 8.000g, a 4°C, durante 10 minutos. A fase líquida foi transferida para outro tubo e a concentração do etanol foi ajustada para 16%. Este material foi aplicado em uma coluna de CF-11 (celulose fibrosa – Whatman) (CHOI; RANGLES, 1997) preparada em 1x STE contendo 16% de etanol (2g CF-11; 50 mL de 1x STE + 16% de etanol). Lavou-se a coluna com 80 mL de 1x STE contendo 16% de etanol e com 5 mL de 1x STE. O dsRNA foi eluído com 20 mL de 1x STE, adicionando-se etanol ao eluído para uma concentração final de 16%. A amostra foi aplicada em uma segunda coluna de CF-11 usando 1 g de CF-11 diluída em 35 mL de 1x STE com 16% de etanol. A coluna foi lavada com 2,5 mL de 1x STE e o dsRNA foi eluído em 6 mL de 1x STE. A precipitação do dsRNA foi feita com 0,1 volumes de 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 3 volumes de etanol, durante 16 horas a -20°C. O tubo foi centrifugado a 12.000g durante 25 minutos a 4°C, lavado com 70% etanol, seco em liofilizador e ressuspensionado em 25 μ L de água destilada. A análise do dsRNA foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% preparado em TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001M EDTA) contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídio.

3.4.4 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 3 μL do RNA para folhas e 5 μL para ácaros; 1 μL de 2,5 mM de dNTP, 1 μL de “random primers” (Invitrogen) e 7,5 μL de H_2O

3.4.5.2 Hibridização

A hibridização foi testada como alternativa de diagnose na forma de “dot blot” e “direct tissue printing” (KUBO et al., 2006a). Foram testadas amostras de OFV-N, OFV-C e outros vírus transmitidos por *Brevipalpus*, de forma a verificar a especificidade da sonda. Os VTBs testados foram: CoRSV, CIRSV, PFGSV, CiLV-C, CiLV-N, SvRSV-C e SvRSV-N, nos respectivos hospedeiros sadios e infectados: café, clerodendron, maracujá, citros e *Solanum violaeifolium*.

A sonda utilizada foi feita a partir de produto de RT-PCR positivo do OFV clonado em *E. coli*. Para tal, foi realizado PCR diretamente da colônia de *E. coli* DH5 , utilizando-se 3 µL da bactéria ressuspensa em 100µL de água MilliQ, 2,5 µL de dNTP marcado com digoxigenina do Kit “DIGG DNA Labeling” (Roche Molecular Biochemicals), 2,5 µL de tampão 10x; 0,9 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de OFV-F 10 mM; 0,5 µL de OFV-R 10 mM; 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e H₂O destilada deionizada esterilizada para 25 µL de volume final. Os ciclos utilizados no termociclador foram iguais aos descritos em item anterior. Os resultados das amplificações foram avaliados em gel de agarose 1% preparado em TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001M EDTA) contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídio por meio de eletroforese.

3.4.5.2.1 “Dot Blot”

Foram colocados 2 µL do RNA extraído de orquídeas doentes e sadias mais 1,2 µL de tampão SSC 20x (NaCl 3M, e 0,8 µL de formaldeído desnaturados por 60°C por 15 minutos e imediatamente colocados em gelo em membrana de nylon “Hybond N” (Amersham).

A fixação foi feita em forno UV (120 mJ) após a secagem da membrana à temperatura ambiente. A hibridização foi feita de acordo com o item a seguir.

Para a pré-hibridização as amostras foram incubadas em uma quantidade de solução de dois mL por cm². A solução de pré-hibridização consistiu de 10 mL de formamida deionizada; 0,5 mL de SDS 5%; 6 mL de SSC 20x (NaCl 3M, Extrato de sódio); 2 mL de Denhardt 50x [5g de Ficoll, 5g de Polivinilpirrolidona (PVP), 5g de albumina bovina (BSA) e H₂O para 500 mL] e 200 µL de DNA e esperma de salmão desnaturado em água fervente por 10 minutos e colocado imediatamente no tampão de hibridização. A pré-hibridização foi realizada a 65°C durante 4 horas.

A solução de hibridização foi composta de 10 mL de formamida deionizada; 0,5 mL de sódio dodecil sulfato 5% (SDS); 6 mL de SSC 20x; 2 mL de H₂O e 200 µL de DNA e esperma de salmão e 25 µL da sonda previamente desnaturados em água fervente por 10 minutos e colocado imediatamente no tampão de hibridização. A hibridização foi realizada por 16 horas a 65°C.

A solução de hibridização foi descartada e as membranas foram lavadas duas vezes em 20 mL de Solução 1 (2x SSC e 0,1% SDS) durante 15 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada uma lavagem com 20 mL de Solução 2 (0,1x SSC e 0,1% SDS) durante 1 hora a 60°C.

O processo de detecção foi realizado em temperatura ambiente. Após o descarte da Solução 2 foram adicionados 20 mL de Tampão 1 (0,1 M de ácido maleico; 0,15 M NaCl, pH 7,5) contendo 0,3% de “Tween 20” (USB). A incubação foi feita por um período de 5 minutos. Foram então adicionados 20 mL do Tampão 2 (1% de bloqueador do Kit de detecção da Roche Molecular Biochemicals em tampão 1) e a incubação foi feita por 30 minutos. O tampão foi descartado e foram adicionados 15 mL de Tampão 2 contendo anti-digoxigenina-AP conjugado em uma diluição de 1:5000, e foi feita nova incubação por 30 minutos.

As membranas foram lavadas duas vezes com 20 mL de Tampão 1 durante 15 minutos, foram então adicionados 20 mL de Tampão 3 (0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5) e foi feita uma incubação durante 30 minutos. Foram adicionados 15 mL de Tampão 3 contendo CSPD (Roche) a uma diluição de 1:200 e foi feita uma incubação durante 5 minutos. O tampão foi descartado e as membranas foram secas em temperatura ambiente. Após a secagem das membranas, estas foram, envolvidas em filme plástico e colocadas em contato com um filme de raios-X “HYPERfilme-MP” (Amersham) no interior de um cassete. Este cassete foi incubado a 37° por 1 hora.

Os filmes foram revelados em solução de revelação “Kodak GBX – developer and replenisher” (Kodak) por dois minutos, lavados em água por 30 segundos, fixados em solução de fixação “Kodak GBX – fixer and replenisher” (Kodak) e lavados em água por 30 segundos.

Os filmes foram analisados depois de secos.

3.4.5.2.2 “Direct Tissue Printing” (Impressões de tecido)

Folhas de orquídeas doentes e sadias foram cortadas transversalmente e o tecido foi aplicado sobre a membrana fazendo-se uma leve pressão. A fixação foi feita em forno UV (120 mJ) após a secagem da membrana à temperatura ambiente.

Antes de iniciar a hibridização, as membranas foram pré-tratadas com uma solução de 2 M de β -mercaptoetanol durante 10 minutos, e depois lavadas duas vezes em água.

A hibridização foi realizada conforme descrito anteriormente.

3.4.6 Obtenção de DNA purificado do gel para SSCP

Produtos de RT-PCR foram purificados do gel de agarose 0,7% utilizando-se o Kit de Purificação de produto de PCR e DNA em gel “GFX” (Amersham), conforme especificações do fabricante.

3.4.7 SSCP

A avaliação dos padrões de SSCP foi feita a partir do produto de PCR das regiões genômicas correspondentes à capa protéica purificados de gel de agarose (KUBO et al., 2006b). Foram analisadas plantas de oito diferentes origens geográficas e 18 gêneros. Para análise por SSCP, aos fragmentos foi adicionado um volume da solução desnaturante (95% de formamida, 20 mM de EDTA e azul de bromofenol), sendo em seguida desnaturados a 95°C por 10 min. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 10% (16 x 20 cm x 1mm BIO-RAD Protean II xi) utilizando o tampão TBE 10x (Tris Base 108 g/L, Ácido bórico 55g/L, EDTA 0,5M pH 8,0 40 mL/L) na concentração 1x. A corrida foi realizada a 100 volts por 16 horas a 25°C. Os géis foram corados com nitrato de prata utilizando-se o procedimento de Beidler et al. (1982). Os fragmentos foram analisados pela comparação das diferenças conformacionais das fitas simples desnaturadas após a eletroforese.

Para esta análise foi realizado um teste com amplicons purificados a partir do gel de agarose e não purificados, uma vez que se o resultado obtido fosse o mesmo, optaria-se pela amostra não purificada, o que diminuiria o custo e o tempo empregado na técnica.

Foram montadas matrizes de acordo com ausência e presença de bandas; para análise de similaridade genética foi utilizado o fator de correção de Jukes e Cantor (1969). O agrupamento das amostras foi realizado pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average) e o bootstrapping foi conduzido com 100 repetições. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote de softwares Phylip 3.65 (FELSESTEIN, 1989). Foram montadas matrizes levando-se em consideração todas as bandas presentes no gel e considerando apenas as bandas predominantes, de forma a comparar os resultados entre si e com o seqüenciamento e verificar de que forma os resultados são mais confiáveis.

3.4.8 Seqüenciamento dos “amplicons”

3.4.8.1 Clonagem dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram utilizados para ligação em Kit de clonagem “T.A. Cloning Kit” (Invitrogen) de acordo com recomendações do fabricante.

O plasmídeo foi então inserido em células competentes se *Escherichia coli* da linhagem DH5 através da transformação por choque térmico. A transformação foi realizada colocando-se em contato a reação de ligação e as células competentes, e incubando-se em gelo por 1 hora. Posteriormente a reação foi colocada em banho-maria a 42°C por 1 minuto e 30 segundos e então foi imediatamente transferida para o gelo por 2 minutos. Cada tubo recebeu 1 mL de meio SOC (10 g de triptona bacteriana, 5 g de extrato de levedura; 0,585 g de NaCl, 186 mg de KCl; 10 mL e glicose 2 M; H₂O Milli-Q estéril para 1 L). As células foram incubadas em shaker a 37°C por 1 hora sob agitação de 300 rpm.

Em placas de Petri descartáveis foi vertido meio de cultura LB sólido (10 g/ L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 7,5 g/L de ágar bacteriológico) contendo 100 µg/mL de ampicilina. Sobre o meio de cultura espalhou-se 100 µL de IPTG (100 mM) e 20 µL de X-Gal (50 mg/mL), após a secagem das placas foram espalhados 100 µL de cultura de células e as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

3.4.8.2 Seleção de clones positivos

Oito clones de cor branca e sem colônias satélite de cada amostra (demonstradas na Tabela 1) foram selecionados para o seqüenciamento de acordo com seus padrões no gel de SSCP. Os clones foram coletados com palitos de madeira autoclavados e transferidos para microplacas de 96 poços contendo 400 µL de meio Cicle Growth (SIGMA) acrescido de ampicilina (50 µL/mL). As microplacas foram seladas com adesivo e a multiplicação dos clones foi realizada por 16 horas a 37°C.

3.4.8.3 Preparação de plasmídeos em microplacas

Os plasmídeos foram extraídos pela metodologia Boiling Prep. As placas foram centrifugadas por 6 minutos a 3000 rpm para sedimentar as células, o adesivo foi removido e o sobrenadante foi descartado, invertendo-se posteriormente a placa sobre papel absorvente por 1 minuto.

Recolocou-se o adesivo e a placa foi colocada no freezer -80°C por 15 minutos e após na estufa a 37°C por 10 minutos. Foram então adicionados 25 µL de água Milli-Q autoclavada e a placa foi agitada no vortex por 5 minutos. Foram adicionados 70 µL da solução de lise (STET-Tween 20) e a placa foi novamente agitada no vortex por 1 minuto.

Incubou-se a placa em temperatura ambiente por 5 minutos e as placas foram colocadas em um tubo de 1,5 mL.

mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂), 0,5 µL do “primer” do vetor de clonagem (SP6 5 pmols), 0,4 µL de Big Dye e 5,1 µL de H₂O Milli-Q estéril. A reação foi centrifugada por alguns segundos e colocada no termociclador (Eppendorf - Mastercycle Gradient) com o programa consistindo de 1 ciclo de 96°C por 2 minutos, 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C de 30 segundos e 60°C por 4 minutos com o ciclo final de 4°C.

A precipitação foi realizada com 80 µL de isopropanol 65% a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo em seguida centrifugada a 3.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca em papel absorvente antes da adição de 200 µL de etanol 60%. Foi realizada outra centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, a lavagem com etanol 60% foi repetida e o sobrenadante foi descartado, sendo o “pellet” seco em temperatura ambiente.

3.4.8.5. Análise das seqüências

Os eletroesferogramas das seqüências obtidas foram submetidos à análise pelo programa “Phred-Phrap-Consed” (EWING et al., 1998). Para verificação do alinhamento das seqüências foi utilizado o programa CAP 3 (HUANG; MADAN, 1999). Através destes programas foram retiradas as seqüências das regiões correspondentes aos vetores empregados na clonagem e foi feito o alinhamento das seqüências similares para a montagem de uma seqüência consenso de cada amostra. Essas seqüências foram submetidas à consulta de similaridade com outras seqüências já depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As ferramentas utilizadas para esta consulta foram BlastN e BlastX.

As seqüências consenso e polimórficas de cada amostra foram selecionadas e alinhadas com as nove seqüências de OFV disponíveis no GenBank, denominadas 003Australia, XAustralia, 047Germany, 591Australia, 053South Africa, YBrazil, 005Brazil, 023Germany e ZGermany. As análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa MEGA version 3.1 (KUMAR et al., 2004) A distância genética foi calculada utilizando-se o fator de correção de Jukes e Cantor (1969). As amostras ZGermany e 023Germany, já previamente analisadas por Blanchfield et al. (2001) e consideradas distintas das demais, foram utilizadas como grupo externo para enraizar o dendrograma.

As seqüências de nucleotídeos foram transformadas em aminoácidos para se verificar se as alterações observadas nas seqüências de nucleotídeos teriam efeito potencial na funcionalidade do gene (Apêndices A e B). A distância entre seqüências de aminoácidos foi calculada pelo método de Jones-Taylor-Thornton utilizando o programa Phylip 3.65 (FELSESTEIN, 1989); este programa foi utilizado também para a montagem do dendrograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average) tendo sido o “bootstrapping” conduzido com 100 repetições.

4 Resultados e Discussões

4.1 Material Vegetal

O material vegetal foi registrado para observação de sintomas nos diferentes gêneros de orquídeas. Como já descrito anteriormente a sintomatologia foi variável, dependendo do gênero e da espécie da planta (Figura 3).

Análises citopatológicas feitas preliminarmente indicaram que a maioria das amostras de OFV era do tipo nuclear (OFV-N), mas algumas se revelaram do tipo citoplasmático (OFV-C).

Na Figura 3, (A) a (N) apresentam sintomas de plantas infectadas com o OFV-N e (O) e (P) apresentam sintomas de infecção por OFV-C. Como é possível observar, os sintomas de OFV são variados e diferentes para cada gênero analisado. Por exemplo: *Bulbophyllum lobii* (A) apresenta manchas necróticas circulares e ovaladas com halos cloróticos ao seu redor. Em *Schomburgia* sp. (B) as lesões são pequenas e necróticas; em *Dendrochilum setipes* (C) as manchas são necróticas e circulares; *Brassia chloroleuca* (D) apresenta lesões necróticas e deprimidas formando anéis concêntricos. Em *Amblostoma* sp. (E) as lesões são necróticas e circulares; em *Phaius grandiflora* (F) grandes anéis necróticos aparecem circundados de grandes áreas cloróticas. Em *Dendrobium densiflorum* (G), as lesões cloróticas aparecem com pequenas manchas necróticas deprimidas formando anéis. Nas folhas de *Epidendrum bambusifolium* (H1) as lesões são escuras e sem forma definida, em *Epidendron latilabile* (H2) as lesões possuem um centro necrótico e anéis necróticos deprimidos em torno deste. Em *Oncidium stenotis* (I1) as lesões aparecem na forma de pequenas manchas necróticas, em *Oncidium* sp. (I2) as lesões necróticas formas manchas maiores e circulares, em *O. ornithorhynchum* (I3) as lesões são

arredondadas com o centro necrótico. Em *Prostechea auriculigerum* (J1) as lesões são necróticas e deprimidas circundadas por halos cloróticos, *P. prismatocarpum* (J2) as lesões são necróticas anelares com um ponto necrótico no centro, *Prostechea* sp. (J3) apresenta grandes anéis necróticos com pequenas manchas necróticas distribuídas no seu interior, *Prostechea* sp. (J4) as lesões necróticas são pequenas com halo clorótico amarelo ao seu redor, *P. calamari* (J5) as lesões são muito pequenas e necróticas.



Figura 3 – As folhas de A a N apresentam sintomas de OFV-N e O e P de OFV-C. **A** – *Bulbophyllum lobii*, **B** – *Schomburgia* sp., **C** – *Dendrochilum setipes*, **D** – *Brassia chloroleuca*, **E** – *Amblostoma* sp., **F** – *Phaius grandiflora*, **G** – *Dendrobium densiflorum*, **H1** – *Epidendron bambusifolium*, **H2** – *E. latilabile*, **I1** – *Oncidium stenotis*, **I2** – *Oncidium* sp., **I3** – *O. ornithorhynchum*, **J1** – *Prostechea auriculigerum*, **J2** – *P. prismatocarpum*, **J3** – *Prostechea* sp., **J4** – *P. ionoplebium*, **J5** – *P. calamari*, **K1** – *Maxillaria subulata*, **K2** – *M. valenzuelana*, **L1** – *Miltonia spectabilis*, **L2** – *M. moureliana* x *M. regnellii*, **L3** – *M. candida* x *M. regnellii* sp., **M** – *Pleurothallis* sp., **N** – *Octomeria* sp., **O** – *Jumellea* sp., **P** – *Coelogyne* sp.

Em *Maxillaria subulata* (K1) as lesões são necróticas e muito pequenas, em *M. valenzuelana* (K2) as lesões são circulares, necróticas, muito próximas umas das outras. *Miltonia spectabilis* (L1) apresenta anéis concêntricos muito próximos uns dos outros com a área entre os anéis clorótica, os híbridos *M. moureliana* x *M. regnellii* (L2) e *M. candida* x *M. regnellii* (L3) os anéis necróticos são pequenos e se concentram dentro de faixas cloróticas no mesmo sentido das nervuras. Na Figura M de *Pleurothallis* sp. observa-se uma macha escura com as bordas cloróticas. Em *Octomeria* sp. (N) as lesões são necróticas pequenas e com os bordos cloróticos. Os gêneros *Jumellea* sp. (O) e *Coelogyne* sp. (P), ambos infectados com OFV-C, apresentam anéis necróticos com centros e bordas cloróticas, e pequenos anéis necróticos com o centro clorótico, respectivamente.

Como é possível observar, é muito difícil estabelecer um padrão para diferenciar lesões do tipo citoplasmático e nuclear em orquídeas, uma vez que os sintomas variam muito de gênero para gênero e até mesmo dentro destes. Além disso, podem ocorrer infecções mistas com outros vírus de orquídeas como o CyMV e ORSV, causando alteração nos sintomas padrões de OFV. Em orquídeas não acontece a distinção de sintomas como para *Clerodendron* sp., *Hibiscus* sp. e *Malvaviscus* sp., em que os respectivos vírus do tipo nuclear tendem a causar manchas cloróticas em folhas verdes e os do tipo citoplasmático tendem a causar manchas verdes em folhas senescentes. Não foi possível observar também diferenças similares às observadas nas duas formas de CiLV. Não se constatou ainda caso de co-infecção pelo OFV-C e OFV-N na mesma planta.

4.2 Ácaros

A identificação dos ácaros foi realizada por microscopia de luz (Figura 4A), observando-se estruturas morfológicas como: número de solenídeos (seta ômega) no tarso da perna 2 (Figuras 4B e 4C) e número de setas dorsais (Figuras 4D e 4E). Nesta análise foram encontrados dois solenídios no tarso do par de pernas 2 e seis setas dorsais, demonstrando-se tratar do ácaro *Brevipalpus californicus*.

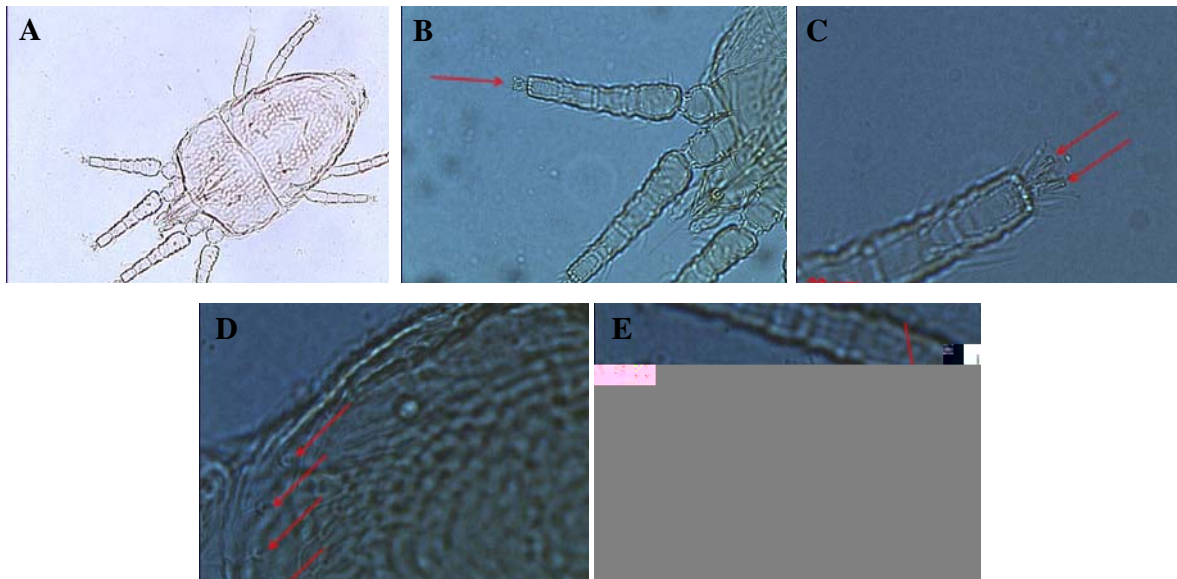


Figura 4 – Análise microscópica de *Brevipalpus californicus*. **A.** Microscopia de luz da região dorsal; **B.** Tarso do par de pernas 2 demonstrado pela seta; **C.** Solenídios no tarso do par de pernas 2 demonstrado pela seta; **D.** Quatro primeiras setas dorsais; **E.** Duas últimas setas dorsais

4.3 Análises de Microscopia

4.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Foram analisados diversos materiais de orquídeas sintomáticas com o intuito de se localizar não só o OFV-N, mas também o OFV-C. Amostras com sintomas similares ao do OFV e com resultado de PCR negativo para o vírus foram emblocadas e cortadas com o intuito de atingir este objetivo.

Nas orquídeas infectadas com o OFV-N foram encontradas partículas não envelopadas, baciliformes com aproximadamente 100 a 150 nm de comprimento e 32 a 40 nm de largura. Nestas amostras foram encontrados viroplasmas elétron-transparentes e algumas vezes partículas organizadas lado a lado (Figura 5A) ou ainda estando dispostas perpendicularmente às membrana do retículo endoplasmático (rodas de carroça – Figura 5B).

Em alguns materiais com manchas anelares a partir dos quais não foi possível amplificar o OFV-N, foram encontradas partículas baciliformes, 70-80 nm de largura por 110-120 nm de comprimento (Figura 5C), com inclusão do tipo viroplasma elétron-denso (Figura 5D). Este vírus foi identificado como um VTB da forma citoplasmática e é reconhecido como OFV-C.

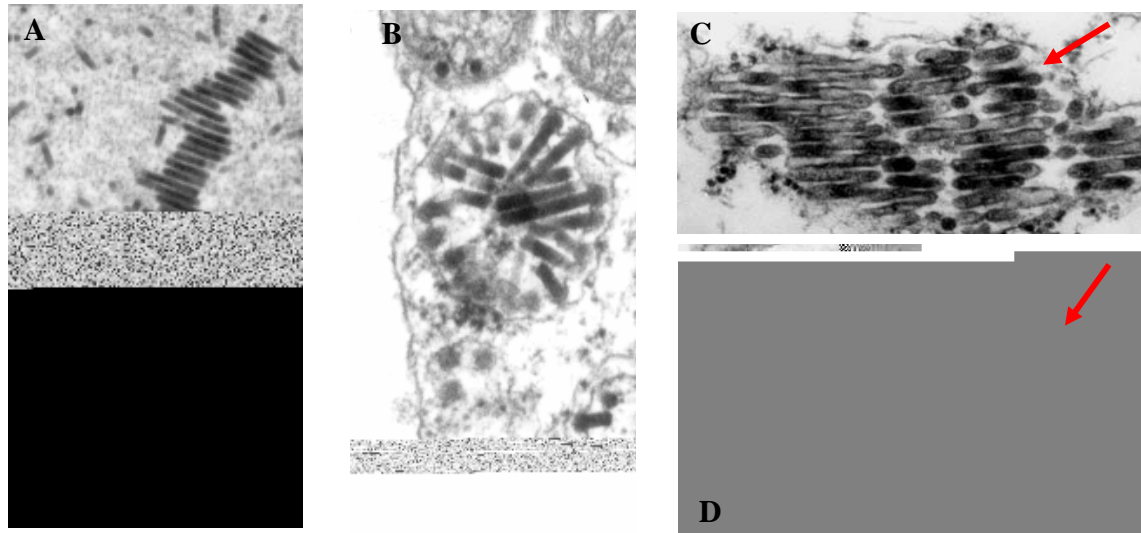


Figura 5 – Microscopia eletrônica de cortes ultrafinos de folhas infectadas com OFV-N e OFV-C. **A.** Partículas de OFV-N enfileiradas. **B.** Inclusões do tipo “roda de carroça” de OFV-N. **C.** Viroplasma de formato alongado de OFV-C (seta). **D.** Partículas virais de OFV-C, baciliformes, agrupadas e cortadas longitudinalmente (seta)

4.3.2 Estudos anatômicos/ histológicos

Em secção transversal de folhas de *Oncidium* sp. sadias (Figura 6), observa-se na face adaxial e abaxial, uma camada de células epidérmicas. As células que constituem a epiderme adaxial são ligeiramente maiores e tendem mais à forma isodiamétrica, em relação às células da face abaxial. Em algumas células podem ser observados conteúdos densos, provavelmente mucilagem.

As células que constituem o clorênquima apresentam-se num arranjo compacto, todos tendendo a isodiamétricas, não ocorrendo diferenças acentuadas na morfologia celular, embora o diâmetro das 4 – 5 camadas adjacentes à epiderme adaxial se apresente ligeiramente maior. O conteúdo citoplasmático apresenta-se distribuído de forma periférica à parede celular, com

grandes vacúolos. Na porção abaxial do clorênquima podem ser observados espaços intercelulares, mostrando um arranjo menos compacto que o parênquima da porção adaxial.

Na região mediana do mesofilo nota-se um feixe vascular sem as características típicas das monocotiledôneas, cujo arranjo dos vasos forma caricaturas. No entanto, o feixe é circundado por uma camada de células da bainha que envolve o xilema, o floema e o parênquima do floema.

Na porção abaxial do clorênquima notam-se feixes de fibras de esclerênquima, espaçados regularmente entre si. O número de fibras varia entre os feixes de fibras.

Nas plantas de *Jumellea* sp. infectadas com OFV-C (Figura 7), algumas características das folhas apresentam-se alteradas, principalmente em regiões mais próximas à lesão.

As células mais afetadas pela infecção viral são as do parênquima. Geralmente apresentam-se hipertrofiadas e com conteúdos de naturezas distintas. Em algumas células ocorre acúmulo de material granular (Figura 7A), formando agrupamentos amorfos distribuídos ao acaso no interior do vacúolo, já que o citoplasma provavelmente esteja degenerado. Outras células mostram o acúmulo de substâncias lipídicas (Figura 7B) que tomam todo o seu interior, impossibilitando a identificação da integridade do citoplasma. Este foi confirmado através de testes histoquímicos por 'sudan'. A hipertrofia de células do parênquima foi notada em lesões foliares de laranjeira causadas pelo CiLV-C (MARQUES et al., 2004) e de *Solanum violaeifolium* infectada por SvRSV (FERREIRA, 2005). Não há informação sobre o processo que induz tal hipertrofia na infecção pelos VTBs do tipo citoplasmático.

Em algumas regiões, geralmente nas adjacências da epiderme adaxial podem ser notadas células hipertrofiadas com o conteúdo vazio e com a parede celular pouco densa, ou ainda, já com a ausência da parede celular formando apenas um espaço, visto que a célula foi degenerada. Alguns agrupamentos de células, geralmente da porção abaxial, mostram-se com intensa plasmólise (Figura 7C), e as células adjacentes que ainda não apresentam a plasmólise estão com os plastídios e o núcleo hipertrofiados, características estas que não ocorrem em situações anteriores.

Além dessas alterações, a degeneração celular é intensa e inespecífica, não havendo, para este tipo de alteração citológica, padrões determinados para poder caracterizar, por exemplo, este vírus. Desta forma, as alterações que ocorrem simultaneamente como acima descritos, juntamente com a degeneração celular, podem indicar e provavelmente auxiliar na identificação.

Nas plantas de *Miltonia* sp. infectadas com o vírus do tipo nuclear (OFV-N) podem ser observadas alterações distintas quando comparadas às plantas infectadas com o vírus do tipo citoplasmático. Nestas, a principal alteração celular observada é a intensa hipertrofia do núcleo das células do clorênquima (Figura 8A, 8B e 8C). Estas células mostram material cromático na periferia e uma zona central mais rarefeita que deve corresponder ao viroplasma intranuclear, discernível na microscopia eletrônica.

A primeira camada adjacente à epiderme adaxial, que na planta sadia é constituída por células de mesmo tamanho, com forma tendendo a isodiamétrica, apresentam-se nas plantas doentes com a forma alterada, além de apresentarem uma ligeira hipertrofia (Figura 8B, 8C e 8D). Em algumas regiões o calapso de células do parênquima induz depressões na epiderme adaxial ou abaxial (Figura 8A e 8D). Geralmente ocorrem em regiões próximas à lesão.

Nas células de parênquima com o núcleo hipertrofiado pode-se notar o acúmulo de substância mucilaginosa na região periférica à parede celular. Em algumas células pode-se observar a degeneração citoplasmática (Figura 8B e 8C), provavelmente devido ao acúmulo desta substância mucilaginosa.

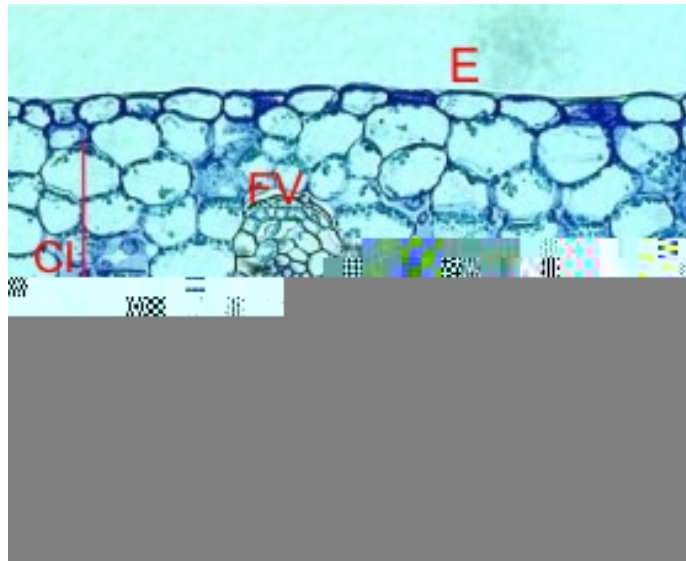


Figura 6 – Secção transversal de folhas de *Oncidium* sp. sadia. **E** – epiderme, **Cl** – clorênquima, **FV** – feixe vascular e **ff** – feixe de fibras

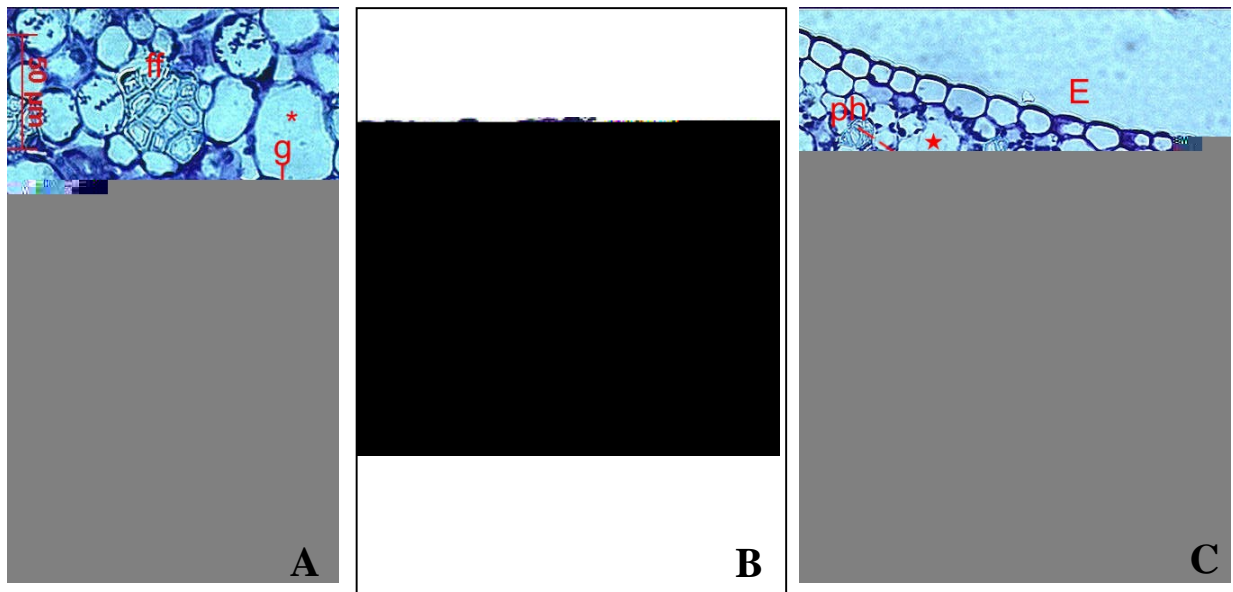


Figura 7 – Secções transversais de tecido de *Jumellea* sp. infectado com OFV-C. **ff** – feixe de fibras, **g** – acúmulo de material granular, **FV** – feixe vascular, * - hipertrofia, **lp** – substâncias lipídicas, **E** – epiderme, **ph** – plastídeos hipertrofiados, **p** – plasmólise, estrela indica hipertrofia seguida de degeneração celular

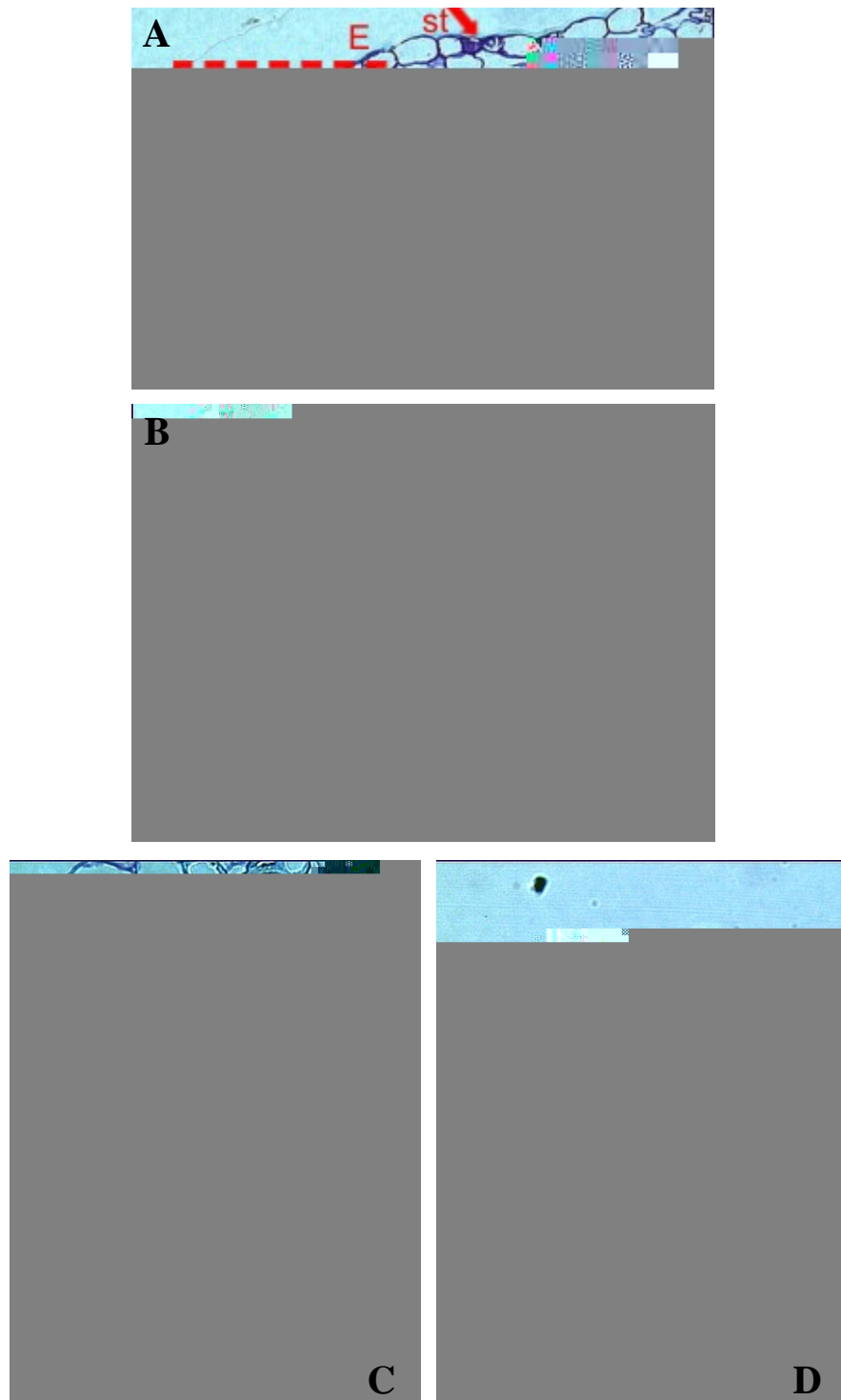


Figura 8 – Secções transversais de folhas de *Miltonia* sp. infectadas com OFV-N. **E** – epiderme, **st** – estômato, **FV** – fibras vasculares, **Nh** – núcleos com hipertrofia, **D** – depressão na epiderme, **ff** – feixe de fibras, **e** – esclerênquima, * - hiperplasia

4.4 Análises moleculares

4.4.1 Extração de dsRNA (double stranded RNA)

Foi possível extrair o dsRNA de tecidos vegetais infectados tanto com OFV-N quanto com OFV-C, sendo observados em gel de agarose padrões diferentes para os dsRNAs de cada um dos tipos (Figura 9). Através do dsRNA para OFV-N observou-se a presença de dois fragmentos próximos com aproximadamente 6 Kb e 6,5 Kb, e dois fragmentos bem distintos para OFV-C, sendo um deles de aproximadamente 9 Kb e outro em torno de 5 Kb. Em plantas sadias a extração de dsRNA não demonstrou a presença de bandas relacionadas ao OFV, fato que comprova a eficiência da extração de dsRNA para a diagnose inicial da doença.

O tamanho do dsRNA extraído da forma nuclear do OFV está de acordo com os dados publicados por Kondo et al. (2003) em que o RNA 1 possui 6.413 nucleotídeos e o RNA 2 6.001 nucleotídeos. Na Figura 9, em 1, pode-se observar a presença destes dois fragmentos relativos ao OFV-N. A forma citoplasmática de OFV (Figura 9, canaletas 2 e 3), entretanto, apresenta dois fragmentos com o RNA 1 e o RNA 2 com tamanhos muito próximos ao dos RNAs 1 e 2 de CiLV-C, conforme demonstrado por Locali et al., (2003a). Embora o tamanho dos fragmentos não seja o mesmo, o padrão é semelhante ao do dsRNA de SvRSV obtido por Ferreira (2005), que apresentou fragmentos de 3 Kb e 10 Kb. Estes resultados demonstram uma diferença de padrão de dsRNAs entre OFV-C e OFV-N, fato também observado por Freitas-Astúa² para este e outros vírus de forma nuclear e citoplasmática transmitidos por *Brevipalpus* (comunicação pessoal).

Deste modo, o dsRNA pode ser utilizado tanto para a caracterização inicial do genoma quanto para a diferenciação dos tipos citoplasmáticos e nucleares dos vírus transmitidos por *Brevipalpus*.

² FREITAS-ASTÚA, J. Embrapa Milho e Sorgo/ Centro APTA Citros Sylvio Moreira.

4.5 Detecção do OFV

4.5.1 Desenho de novos “primers” e detecção *in planta*

Para otimizar o diagnóstico do OFV foram desenhados, com base nas seqüências de nucleotídeos que codificam a capa protéica viral de isolados brasileiros depositadas no GenBank, os “primers” OFV-F (5'TGTCATAGCCGACATAAACACC3') e OFV-R (5'TGTAGAGCTTGCGAGATACAGG3'). A partir destes “primers” foram realizadas reações de RT-PCR com diversos gêneros de orquídeas infectados ou não com o OFV-N com o intuito de testar a eficiência dos mesmos. Pôde-se concluir que os “primers” OFV-F e OFV-R foram efetivos na identificação do OFV-N em plantas de orquídeas infectadas com o vírus, sendo observada em eletroforese a presença de uma banda única no tamanho de aproximadamente 320pb, concordando com os 326pb esperados. Das 174 orquídeas testadas por RT-PCR (Anexo 1), 76 foram positivas para a presença do vírus.

Estes “primers” não amplificaram as amostras de tecido sadio e tampouco amostras de orquídeas infectadas com “*Cymbidium mosaic virus- CyMV*” e “*Odontoglossum ringspot virus – ORSV*” (dados não demonstrados), sendo estes vírus de grande importância econômica e distribuição mundial. A fim de verificar a especificidade destes “primers” para outros VTBs, também foram feitos testes com plantas de maracujá sadias e infectadas com PFGSV (um VTB do tipo citoplasmática) e plantas de café sadias e infectadas com CoRSV (um VTB do tipo nuclear) (Figura 10).

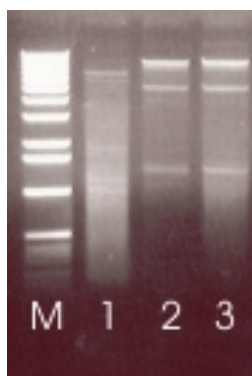


Figura 9 – dsRNA de OFV em gel de agarose 1%. Canaleta 1 – dsRNA de OFV do tipo nuclear, canaletas 2 e 3 – dsRNA de OFV do tipo citoplasmático



Figura 10 – Teste dos “primers” OFV-F e OFV-R. Canaleta 1 – OFV-N positivo, 2 – OFV-N negativo, 3 – café com CoRSV, 4 – café sadio, 5 – maracujá com PFGSV e 6 – maracujá sadio.

Estes “primers” foram testados também com o tipo citoplasmático do OFV (OFV-C), fato que não obteve resultados positivos. Isto é considerado mais uma evidência de que o OFV-C e o OFV-N são vírus distintos.

Na Figura 10 pode-se observar que a amostra de orquídea infectada com o OFV-N foi claramente amplificada pelos “primers” OFV-F e OFV-R, enquanto nada foi amplificado nas amostras de café com e sem CoRSV e maracujazeiro, com e sem PFGSV.

4.5.1.1 Detecção no ácaro

A detecção do OFV diretamente dos ácaros foi realizada utilizando-se ácaros coletados de *Xylobium* sp. e *Miltonia* sp. infectadas com OFV-N, uma vez que Freitas-Astúa et al. (2005) e Novelli et al. (2005a) puderam detectar desta forma o CiLV-C. Para o controle negativo foram utilizados ácaros coletados de *Jumellea* sp. e *Coelogyne* sp. infectadas com OFV-C. Entre as amostras coletadas, foi possível amplificar as duas pertencentes aos ácaros das plantas infectadas com o OFV-N. Na Figura 11 pode-se observar que a banda amplificada a partir de 10 ácaros de *Xylobium* sp. teve maior intensidade que a amplificada a partir de 30 ácaros de *Miltonia* sp., isso ocorreria porque a quantidade de ácaros não seria necessariamente proporcional à quantidade de vírus presentes no interior dos mesmos. A quantidade de vírus depende de quantos ácaros se alimentaram sobre as lesões de OFV. Freitas-Astúa³ obteve resultado similar em um teste com *Brevipalpus phoenicis* infectados com CiLV-C, em que a quantidade de ácaros não foi necessariamente proporcional à intensidade das bandas obtidas (comunicação pessoal).

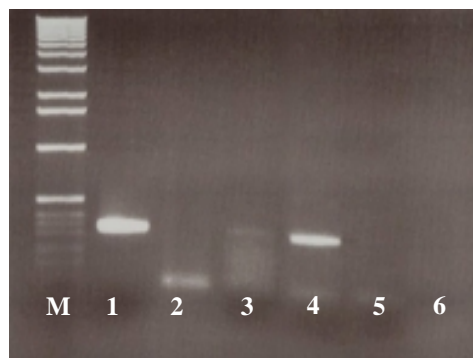


Figura 11 – RT-PCR a partir de ácaros em gel de agarose 1%. **1** – controle positivo, **2** – controle negativo, **3** – 30 ácaros de *Xylobium* sp. com OFV-N, **4** – 10 ácaros de *Miltonia* sp. com OFV-N, **5** – 10 ácaros de *Jumellea* sp. com OFV-C, **6** – 10 ácaros de *Coelogyne* com OFV-C

³ FREITAS-ASTÚA, J. Embrapa Milho e Sorgo/ Centro APTA Citros Sylvio Moreira.

4.5.2 Hibridização

A hibridização dos RNAs extraídos de orquídeas com ou sem sintomas de OFV foi realizada com sondas de cDNA marcadas a partir do RT-PCR de OFV-N com os “primers” OFV-F e OFV-R. Pôde-se observar que estas sondas reconheceram amostras infectadas com o OFV que apresentavam alta titulação do vírus (Figura 12). Amostras com concentração baixa de RNA podem resultar em falsos negativos. As mesmas amostras utilizadas para a hibridização foram utilizadas para uma reação de RT-PCR (Figura 13). Pode-se observar que os dados obtidos através da hibridização estão de acordo com os dados obtidos com o RT-PCR (Figura 12 e 13). Nota-se ainda que a técnica de RT-PCR demonstrou ser mais sensível que a técnica de hibridização, observando-se claramente a diferença de intensidade das bandas, relacionadas à concentração de RNA viral da amostra. O fato de ser uma técnica relativamente rápida e de alta sensibilidade faz com que o RT-PCR seja uma das técnicas mais indicadas para o diagnóstico inicial da doença.

Para o controle da especificidade das sondas de OFV-N, foram feitos testes de hibridização com RNAs extraídos de orquídeas com infecção por OFV-C, OFV-N e orquídeas sadias (Figura 14) e ainda com outros VTBs como: CoRSV, CIRSV, PFGSV, CiLV-C, CiLV-N, SvRSV-C e SvRSV-N. Foi possível observar que as sondas foram altamente específicas para OFV-N, não reagindo para as amostras infectadas por OFV-C. Este resultado demonstra mais uma vez que os tipos nuclear e citoplasmático de OFV tratam-se de vírus diferentes e que os “primers” OFV-F e OFV-R são muito específicos para amostras de OFV-N, observado também pelo RT-PCR das amostras utilizadas para esta hibridização (Figura 15). Os demais VTBs testados também não reagiram com a sonda, como apontado na Figura 16, o que significa que todos os vírus testados diferem geneticamente do OFV.

O “direct tissue printing” não foi eficiente, pois nenhuma das amostras foi reconhecida pela sonda. Isto deve decorrer do baixo título do vírus no pouco tecido analisado.



Figura 12 – Membrana de hibridização. **1** – amostra com RNA concentrado, **2** e **3** – com baixa concentração de RNA e **4** – negativo

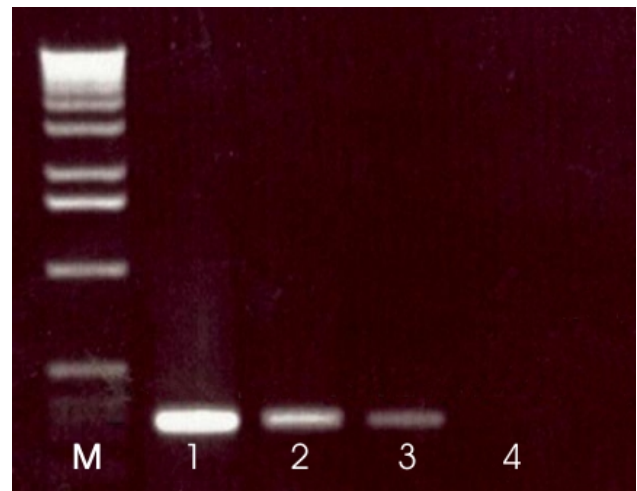


Figura 13 – Gel com mesmas amostras aplicadas na hibridização **1** – amostra com amplicon concentrado, **2** e **3** – com baixa concentração de amplicons e **4** – negativo

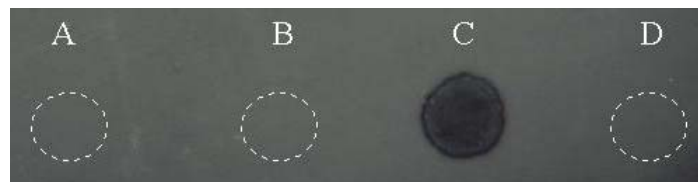


Figura 14 – Membrana de hibridização. **A** – Amostra de OFV-C, **B** – amostra de OFV-C, **C** – amostra de OFV-N, **D** – amostra negativa

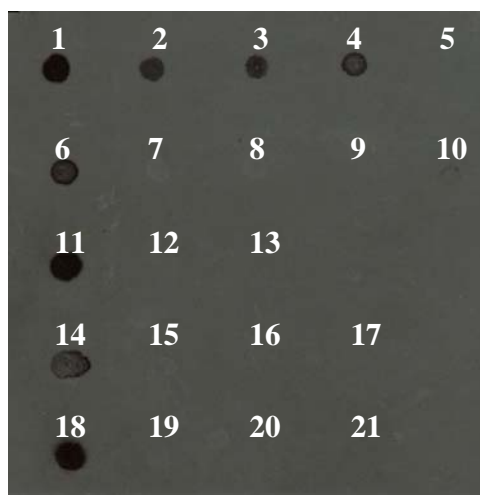


Figura 16 – Membrana de hibridização com sondas do OFV-N. As amostras **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **11**, **14** e **18** são controles positivos; a amostra **5** é controle negativo. **7**- CoRSV, **8**- café sadio, **9**- CIRSV, **10**- *C.quinoa* sadia, **12**- PFGSV, **13**- maracujá sadio, **15**- CiLV-C, **16**- CiLV-N, **17**- citrus sadio, **19**- SvRSV-C, **20**- SvRSV-N, **21**- *Solanum violaeifolium* negativo



Figura 15 – **1** amostra de OFV-N, **2** – amostra negativa, **3** – amostra de OFV-C, **4** – amostra de OFV-C

4.6 Diagnose

Das 174 orquídeas testadas por RT-PCR (Anexo 1), 76 foram positivas para amplificação com os “primers” OFV-F e OFV-R, e destas foi possível purificar 48 para análise por SSCP. A perda de cDNA de de várias amostras durante o processo de purificação impediu a sua análise por SSCP. Para exemplificar, a Figura 17 demonstra o gel utilizado para a purificação de bandas, foi possível extrair o DNA das bandas 1 e 2, e da 3 não, pois a concentração de DNA não é suficiente para análise por SSCP.

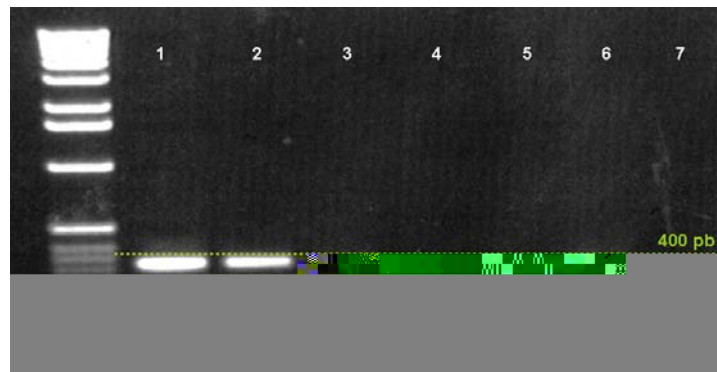


Figura 17 – 1 e 2 OFV-N positivo com boa concentração de amplicons, 3 – OFV-N positivo com quantidade insuficiente de amplicons para purificação, 4,5,6 e 7 amostras negativas

4.7 SSCP

A tentativa de se realizar o SSCP com amplicons não purificados a partir gel está demonstrada na Figura 18A que sugere a existência de dois haplótipos de cada amostra. No entanto, quando os amplicons foram purificados a partir do gel de agarose (Figura 18B) previamente ao SSCP, ficou evidente a presença de um único haplótipo em cada amostra. Assim tais experimentos são mais precisos se os amplicons forem purificados. Resultados semelhantes foram obtidos por Locali (2002) e Souza et al. (2002).



Figura 18 – Perfis de SSCP. **A.** Amplicons não purificados em gel de SSCP. **B.** Amplicons purificados em gel de SSCP

Das 76 amostras de orquídeas positivas para OFV, 48 foram purificadas e analisadas por SSCP. Nas análises de SSCP foram encontrados seis haplótipos diferentes (Figura 19), sendo o haplótipo 1 predominante nas diferentes regiões geográficas brasileiras analisadas. Dentre as plantas infectadas com este haplótipo (64,6% do total) está uma *Oncidium stenatis* proveniente do Havaí (amostra 8, trazida para o orquidário da ESALQ em 1957). Esta planta pode possuir o mesmo haplótipo de OFV das plantas brasileiras por ter sido infectada no próprio orquidário da ESALQ. O haplótipo 2 (6,3%) foi encontrado em uma *Miltonia* sp. proveniente da Bahia (amostra 33) e nas duas amostras provenientes da Costa Rica (amostras 156 e 159). Embora a amostra 35 (híbrido de *M. moureliana* x *M. regnelii*) também seja proveniente da Bahia, ela se encontra infectada com um haplótipo distinto do anterior, o haplótipo 3 (14,6% do total de amostras). O haplótipo 4, presente em uma *O. maculata* de um orquidário da cidade de Curitiba (amostra 71) parece distinto de todos os demais (2,1% do total). O haplótipo 5 (8,3% do total) é proveniente de duas *Prostecheas* sp. (amostras 124 e 125) do orquidário da ESALQ. Originalmente, as plantas vieram de localidades bastante distintas, a primeira da Costa Rica e a segunda do município de Santo Antônio do Itambé, localizado no estado de Minas Gerais. No entanto, é possível que esse haplótipo do OFV tenha sido transmitido de uma planta para outra no orquidário. O haplótipo 6 (4,2% do total) foi encontrado apenas nos dois materiais vegetais obtidos em Canberra, na Austrália (amostras 171 e 172, *Cymbidium* sp. e *Dendrobium* sp., respectivamente).

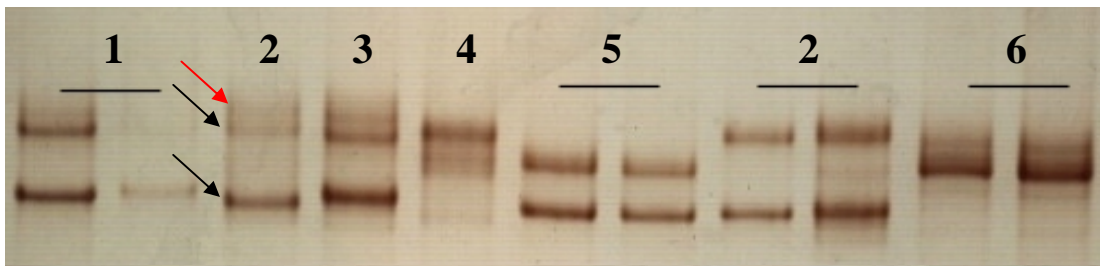


Figura 19 – Gel de SSCP demonstrando 11 amostras e entre elas 6 haplótipos diferentes de OFV. A seta preta indica uma banda principal e a seta vermelha uma banda secundária

Deve-se atentar ao fato de que o orquidário do Departamento de Genética da ESALQ é provavelmente uma das maiores coleções de orquídeas do Brasil, e por possuir finalidade acadêmica, ali são mantidas espécies de várias procedências e gêneros, mesmo sem valor comercial. Muitas das plantas mantidas neste local para estudos foram coletadas no seu ambiente natural e poderiam ter trazidos diferentes haplótipos naturais de OFV. Mas há possibilidades de

alguns deles terem sobrepujado outros e os que atualmente foram identificados sejam os que melhor se adaptaram às condições existentes (ambiente, hospedeiras, vetor).

Na Figura 19 pode-se ainda observar a presença de bandas principais e secundárias, fato que pode influenciar no resultado das análises. Como o SSCP é baseado no polimorfismo das fitas do cDNA no gel de poliacrilamida e a conformação da fita de DNA pode ser alterada por vários fatores, é normal que existam variações na sua interpretação (RUBIO et al., 1996). O gel de SSCP separa as duas fitas de DNA e é esperado que exista um número par de bandas, fato que nem sempre se confirma, uma vez que a concentração da amostra pode não ser suficiente para tornar uma banda correspondente a um haplótipo não dominante, ou ainda porque a mobilidade de duas fitas diferentes pode ser parecida devido a sua similaridade de conformação.

Na primeira análise, foram levadas em consideração todas as bandas na Figura 19, a matriz foi montada com as mesmas amostras utilizadas para o seqüenciamento (Figura 20A), de forma a confrontar os dados e verificar a eficiência do SSCP para a análise de variabilidade genética e avaliar qual a melhor forma de utilização dos dados fornecidos por esta técnica para este vírus. Na segunda análise, foram consideradas apenas as bandas principais que foram

Tabela 1 – Origem geográfica, gêneros e haplótipos encontrados nas amostras.

País	Cidade	Gênero	Amostra	(conclusão)
				Haplótipo
Brasil	Joinville	Não identificado	89	1
		<i>Cattleya intermédia</i>	88	1
	Joinville	Não identificado	80	
		<i>Encyclia</i> sp.	82	1
	Piracicaba	<i>Amblostoma</i> sp.	48	1
		<i>Dendrobium densiflorum</i>	7	1
		<i>Dendrochilum setipes</i>	40	1
		<i>Epidendrum</i> sp.	15	1
		<i>Epidendrum latilabile</i>	38	1
		<i>Maxillaria valenzuelana</i>	137	1
		<i>Miltonia moureliana</i> x <i>M. regnellii</i>	35	3
		<i>Miltonia</i> sp.	33	1
		<i>Miltonia spectabilis</i>	21	1
		<i>Octomeria</i> sp.	17	1
		<i>Oncidium ornithorhynchum</i>	43	1
		<i>Miltonia regnellii</i> x <i>M. moureliana</i>	18	1
		<i>Oncidium</i> sp.	49	3
		<i>Oncidium sphacelatum</i>	9	1
		<i>Oncidium stenotis</i>	8	1
		<i>Oncidium trilobum</i>	36	3
		Não identificado	32	3
		Não identificado	47	1
		Não identificado	64	3
		<i>Phaius grandiflora</i>	121	5
	<i>Pleurothallis</i> sp.	16	1	
	<i>Pleurothallis</i> sp.	44	1	
	<i>Prostechea auriculigerum</i>	123	5	
	<i>Prostechea prismatocarpum</i>	124	5	
	<i>Prostechea</i> sp.	125	5	
	<i>Tetragamestus</i> sp.	39	1	
Porto Alegre	Não identificado	65	1	
	Ubatuba	<i>Cattleya</i> sp.	2	1
Costa Rica	San Jose	<i>Trichopilia</i> sp.	156	2
		<i>Cymbidium</i> sp.	159	2
Austrália	Canberra	<i>Cymbidium</i> sp.	171	6
		<i>Dendrobium</i> sp.	172	6

A Figura 20 corresponde às árvores das matrizes citadas anteriormente, sendo que a Figura 20A foi montada considerando todas as bandas do gel e a Figura 20B considerando apenas as bandas principais. Existem diferenças tanto no agrupamento das amostras nos dendrogramas quanto nas análises de distância genética. Isso aconteceu porque quando as bandas mais fracas foram consideradas, não foi possível constatar-las em todas as amostras, possivelmente por causa da baixa concentração do material, ou pela sobreposição de duas bandas. Pode-se então incluir erros de interpretação na montagem da matriz.

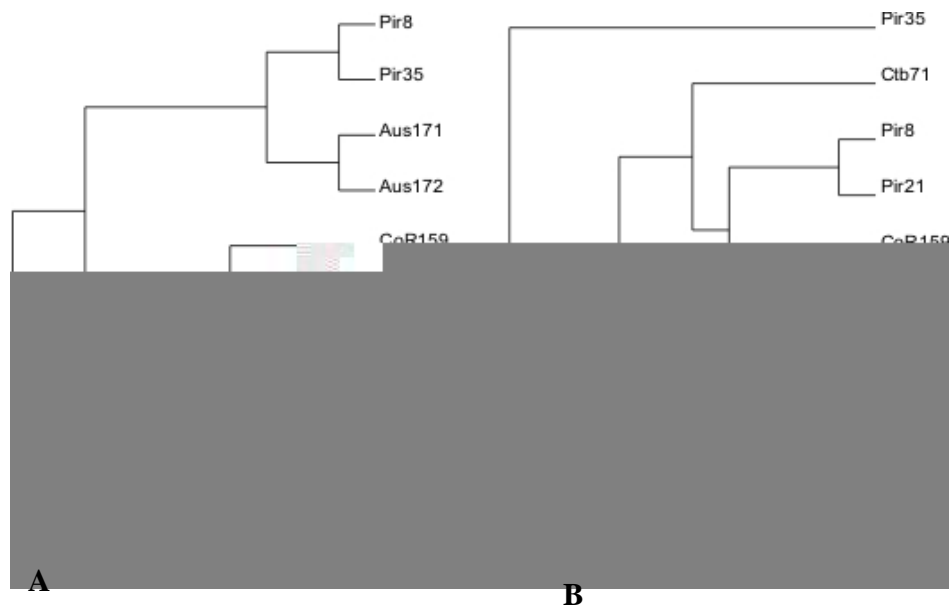


Figura 20 – Dendrograma de similaridade genética baseado em Nei (1972), gerado por UPGMA entre isolados de OFV provenientes de diversas regiões baseado na técnica de SSCP. **A**-dendrograma considerando todas as bandas, **B**- dendrograma considerando apenas as bandas principais

A fim de evitar maiores erros na interpretação dos dados de SSCP, foram consideradas nesta análise apenas as bandas principais.

A árvore completa está demonstrada na figura 21. As amostras se agrupam formando uma clade predominante, comportando a maior parte dos isolados brasileiros, e em outras clades menores, comportando amostras estrangeiras e exceções brasileiras. A amostra 33, por exemplo, coletada no orquidário do Departamento de Genética da ESALQ, mas proveniente da Bahia, encontra-se na mesma clade das amostras 156 e 159 da Costa Rica, enquanto as amostras australianas se encontram em uma mesma clade. Os resultados obtidos por SSCP permitem observar a existência de variabilidade genética entre os isolados analisados. Embora alguns

isolados brasileiros se agrupem em clades diferentes da maioria, e em alguns casos com isolados australianos ou costarriquenhos, pode-se observar a predominância no agrupamento em relação à localidade de origem das plantas analisadas. Os isolados que se mantiveram em clades diferentes dos de suas regiões de origem podem indicar a presença de variabilidade no gene da capa protéica viral em relação aos outros isolados. Isso se deve provavelmente a mutações neste gene, ou ao intercâmbio das plantas analisadas, uma vez que algumas das plantas coletadas no orquidário da ESALQ vieram de localidades variadas, algumas delas do exterior.

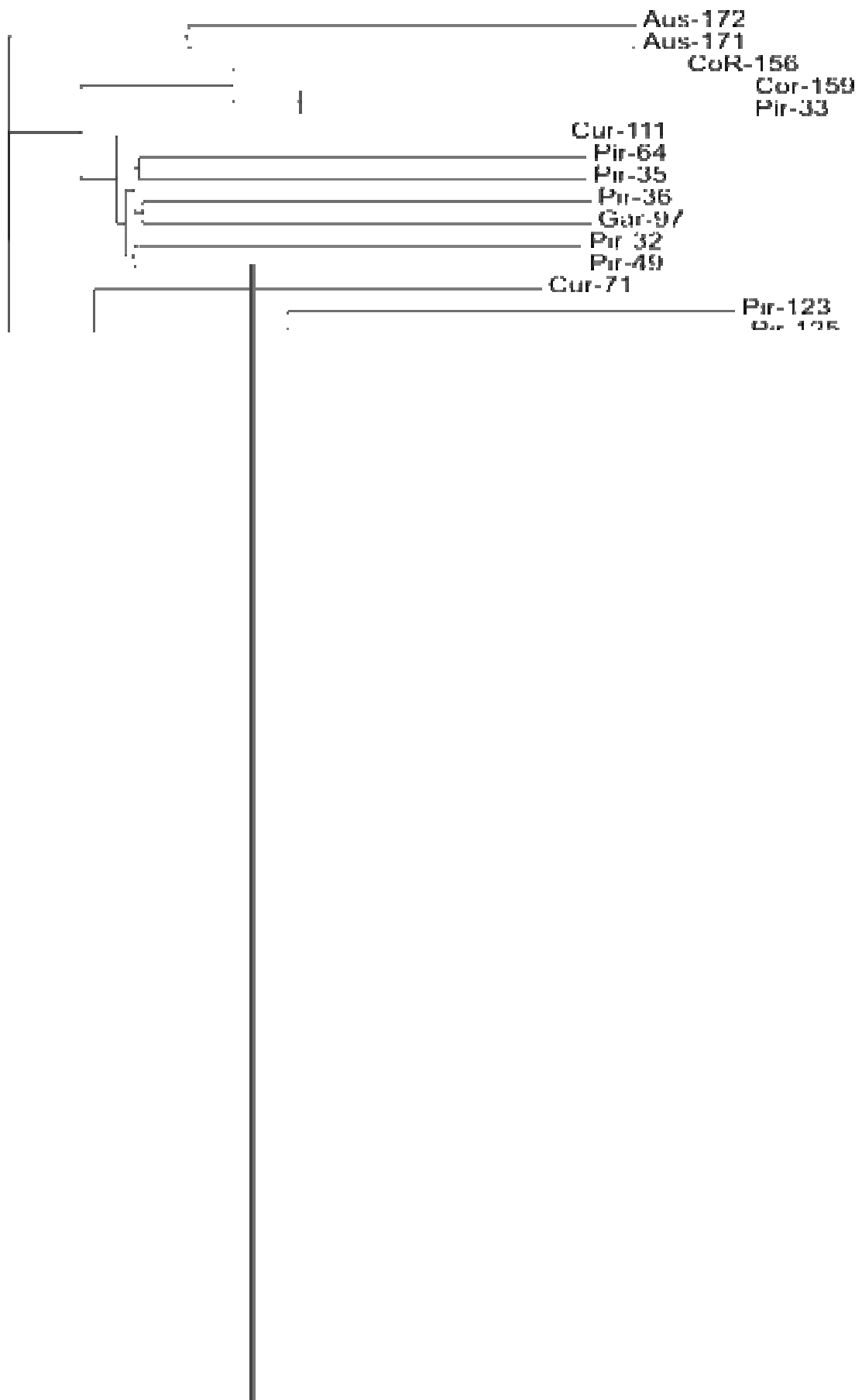
A similaridade genética baseada nas seqüências de nucleotídeos destas amostras variou de 82,36 a 100% e com base nas seqüências de aminoácidos variou de 80,35% a 100%.

O agrupamento das amostras baseada na seqüência de aminoácidos concorda com o da seqüência de nucleotídeos, estando o dendrograma demonstrado na Figura 23.

Deve-se atentar ao fato de que os valores de similaridade podem ser alterados de acordo com os parâmetros utilizados para a avaliação dos dados.

Estudos com o vírus mosaico do cravo (*Carnation mosaic virus* - CarMV) (Cañizares et al., 2001) e vírus do mosaico da alfafa (*Alfafa mosaic virus* - AMV) (PARRELLA et al., 2000), demonstraram que as variações no gene da capa protéica permitem a classificação dos isolados em subgrupos distintos relacionados com sua localização geográfica. Diferentemente, o trabalho de Rubio et al. (2001a) constatou que para o "*Cucumber yellow stunt disease virus* - CYSDV" não existe correlação entre a distância genética entre os isolados, a origem geográfica e os hospedeiros dos quais os isolados são obtidos.

Esperar-se-ia para o OFV um comportamento similar a outros vírus de orquídeas, uma vez que o grande intercâmbio dessas plantas influencia na disseminação de doenças. Entretanto, para CyMV e o ORSV, os principais vírus de orquídeas, as co-variações encontradas entre os isolados não permitem a separação dos isolados estudados em grupos definitivos, mesmo com a presença de variações randômicas nos genes da capa protéica do CyMV (AJJIKUTTIRA, 2002).



4.8 Seqüenciamento dos “amplicons”

As 11 amostras seqüenciadas são as demonstradas no gel de SSCP representado na Figura 19. Para o seqüenciamento foram utilizados 8 clones da cada amostra, de forma a possibilitar que haplótipos não predominantes fossem encontrados e analisados juntamente com os prevalentes. A Tabela 2 demonstra a distância genética e quantidade de amostras encontrada por haplótipo.

Tabela 2 – Número de amostras e distância genética dentro dos haplótipos

Haplótipos	n° de amostras	Distâncias genéticas
1	31	0,0061
2	3	0,012
3	7	0,0045
4	1	0,0034
5	4	0,0023
6	2	0,0114

Para cada amostra seqüenciada foram encontradas uma seqüência consenso e seus polimorfismos. Este fato confirma a constatação de que um único isolado viral não consiste de uma única seqüência de RNA, mas sim de uma série de seqüências variantes em torno de uma consenso, denominada “quasispecies” (EIGEN; SCHUSTER, 1977; EIGEN, 1996). Estas amostras foram então alinhadas e comparadas (Apêndice A) para a montagem do dendrograma (Figura 22) e tabela de similaridade (Anexo 2). O alinhamento destas amostras está demonstrado utilizando também seqüências provenientes do GenBank de amostras australianas, alemãs, sul-africanas e brasileiras denominadas 003Australia, XAustralia, 047Germany, 591Australia, 053South Africa, YBrazil, 005Brazil, 023Germany e ZGermany (Apêndice A).

A similaridade entre as regiões seqüenciadas dentro de cada grupo, independente da diversidade geográfica, é notável; fato que pode refletir o extenso movimento internacional de orquídeas. As diferenças entre os isolados do OFV poderiam ser classificadas como diferentes espécies virais, embora não existam diferenças biológicas entre elas. Por comparações com o banco de dados de seqüências genéticas, a região seqüenciada é significativamente similar a rhabdovirus de plantas, e dentro destes, com mais similaridade com os nucleorhabdovirus do que com os cytorhabdovirus.

As amostras foram agrupadas coerentemente levando-se em consideração as origens geográficas. Em geral a seqüência consenso e os polimorfismos de uma mesma amostra ficaram agrupadas em uma mesma clade. O agrupamento baseado nos gêneros das orquídeas infectadas não aconteceu. Esta informação de que o OFV infecta naturalmente vários gêneros de orquídeas, mas todos dentro da mesma família e possui uma variabilidade genética baixa concorda com a teoria de Roossinck (1997), de que o amplo espectro de hospedeiros é reflexo de uma variabilidade alta. Isso significaria que um vírus com uma ampla gama de hospedeiros naturais teria maior variabilidade genética que outro vírus com menor gama de hospedeiros. Como exemplo, pode-se citar o vírus do mosaico do pepino "*Cucumber mosaic virus - CMV*", que possui uma ampla gama de hospedeiros naturais e uma grande freqüência de mutação (PALUKAITIS et al., 1992); já os tobamovirus possuem uma gama de hospedeiros naturais mais restrita e uma variação genética insignificante (FRAILE et al., 1995).

Dentro dos isolados de OFV, os isolados com maior distância genética em comparação com os demais compreende as amostras 023 e ZGermany (fato já observado por Blanchfield et al., 2001), utilizados como grupo externo para o enraizamento da árvore. Todos os outros isolados são muito próximos, sendo que existem clades exclusivas de amostras australianas e costarriquenhas. Essa baixa variabilidade genética pode se dar pelo fato de que embora se acredite que vírus de RNA tenham alto potencial para diversidade genética pelo fato de aumentar rapidamente sua população gerando vários erros (DOMINGO; HOLLAND, 1994), isso pode não gerar necessariamente variação genética, uma vez que existem episódios como seleção natural e efeito "gargalo", que podem reduzir esta variação (ROOSSINCK, 1997).

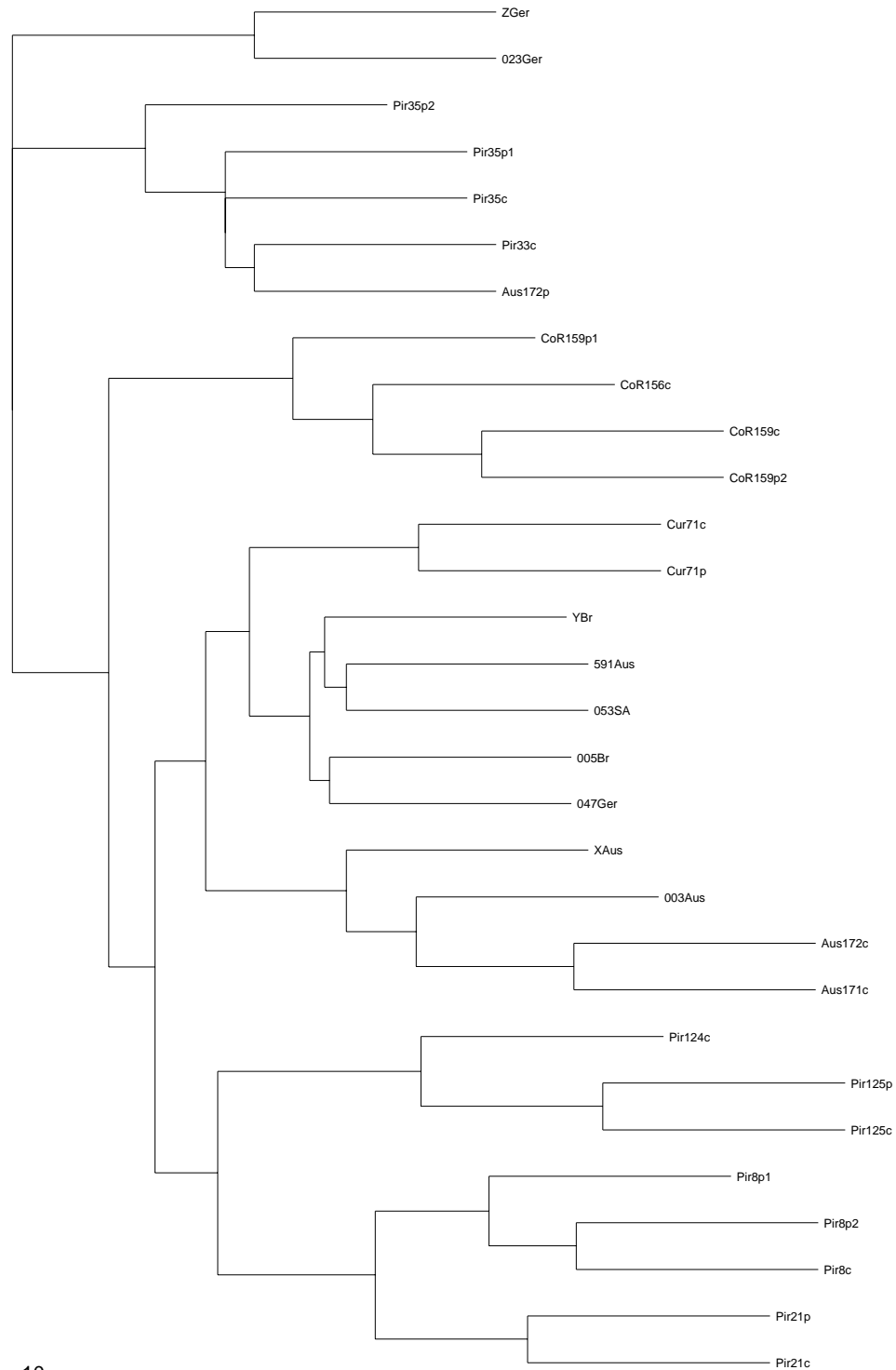
O OFV é o único dos VTBs de distribuição universal, explicável pelo intenso intercâmbio de material pelos orquidófilos e comércio de ornamentais. Isto teria disseminado o vírus e o vetor *B. californicus*. Por outro lado, os dados atualmente disponíveis indicam que os VTBs têm sido encontrados apenas no continente americano. Assim, há uma boa probabilidade de o OFV ser também originário deste continente. Embora seja difícil de rastrear quando se iniciaram as introduções e intercâmbios de orquídeas, talvez as divergências genéticas das amostras provenientes da Alemanha e Austrália tenham resultado de seleção, ao longo do tempo, para as condições e vetores locais.

Em comparação com os dados obtidos na análise de SSCP, os padrões de agrupamento são coerentes. Embora os dendrogramas sejam formados de modos distintos, a separação das

amostras acontece de forma similar. Este fato demonstra que esta técnica pode ser utilizada para comparações entre isolados de diferentes regiões também de vírus de lesão local. Os nucleotídeos foram ainda transformados em aminoácidos (Apêndice B) para se verificar se as mudanças de nucleotídeos acarretariam em mudanças na funcionalidade do gene. As análises demonstraram que isso ocorre com índices de similaridade próximos aos que ocorrem com os nucleotídeos. As tabelas de similaridade de nucleotídeos e aminoácidos estão demonstradas nos Apêndices C e D.

047Germany
 YBrazil
 591Australia
 005Brazil
 OTc0l1 j0.564U1.7(raz)-63.8(i)-31.6(l)6m573 0 2G1 Je43

Figura 22 – Dendrograma construído pelo método UPGMA, com 100 repetições, baseada na sequência de nucleotídeos de fragmentos do gene da capa protéica de isolados de OFV, provenientes de regiões geográficas distintas. O bootstrap está demonstrado abaixo de cada nó. As letras após o número do isolado representam: c-sequência consenso; p-sequência polimórfica. A barra indica distância genética entre os isolados



10

Figura 23 - Dendrograma construído pelo método UPGMA, com 100 repetições, baseada na sequência de aminoácidos de fragmentos do gene da capa protéica de isolados de OFV, provenientes de regiões geográficas distintas. O bootstrap está demonstrado abaixo de cada nó. As letras após o número do isolado representam: c-sequência consenso; p-sequência polimórfica. A barra indica distância genética entre os isolados

5 CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver métodos de diagnose mais eficientes que os disponíveis na literatura. Tanto os “primers” quanto as sondas desenvolvidas atendem bem à sua finalidade, embora como método de diagnose o RT-PCR seja mais eficiente para esta enfermidade do que a hibridização por sondas não radioativas.

Os vírus que causam o OFV-C e o OFV-N parecem ser distintos, por apresentarem diferenças na morfologia das partículas e por seu local de maturação na célula por microscopia eletrônica, e pela ausência de similaridade na seqüência do gene que codifica a capa protéica viral observada através de RT-PCR e hibridização.

Existem diferentes haplótipos de OFV-N tanto entre populações de locais distintos quanto dentro de uma única população proveniente do mesmo isolado, comprovando o fato de que um único isolado deste vírus pode consistir em um conjunto de haplótipos.

A técnica de SSCP é confiável quando utilizada como avaliação primária da variabilidade genética para vírus causadores de lesões locais, desde que os amplicons a serem analisados sejam purificados a partir do gel de agarose e que sejam consideradas apenas as bandas principais do gel de poliacrilamida. No entanto, para um estudo mais detalhado, recomenda-se a utilização de metodologias mais sensíveis para a detecção de variabilidade, como o sequenciamento de nucleotídeos do vírus.

Os variantes genéticos do OFV podem ser separados em grupos referentes a regiões geográficas, embora existam algumas poucas exceções. Estes variantes foram separados formando uma grande clade e uma outra menor para isolados brasileiros, uma clade das amostras provenientes da Costa Rica, onde alguns isolados brasileiros foram agrupados, uma subdivisão desta clade, com as amostras australianas e ainda uma terceira subdivisão também com isolados brasileiros.

As diferenças encontradas nas seqüências de nucleotídeos influenciam na funcionalidade do gene, fato que pode ser observado pela transformação desta seqüência em aminoácidos. Em muitos casos resultam na alteração de aminoácidos, podendo alterar a funcionalidade do gene.

O agrupamento das amostras de acordo com as seqüências de aminoácidos concorda com o agrupamento de acordo com seqüências de nucleotídeos.

REFERÊNCIAS

- AJIKUTTIRA, P.A.; LIM-HO, C.L.; WOON, M.H.; RYU, R.H.; CHANG, C.A.; LOH, C.S.; WONG, S.M. Genetic variability in the coat protein genes of two orchid viruses: *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. **Archives of Virology**, Vienna, v.147, p.1943-1954, 2002.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Molecular biology of the cell**, New York, Garland Publishing, 1994. 1294p.
- ALCÂNTARA, B.K.; KUBO, K.S.; FERREIRA, P.T.O.; KITAJIMA, E.W. Infecção Sistêmica de *Chenopodium* sp por transmissão mecânica do vírus da mancha clorótica do *Clerodendron x speciosum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2005. v.30, p. S187. Suplemento.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. **Anatomia vegetal**. Piracicaba: Departamento Editorial do Centro Acadêmico, 1995. 100p.
- ARANDA, M.A.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Genetic variability and evolution of the satellite RNA of Cucumber mosaic virus during natural epidemics. **Journal of Virology**, Washington, v.67, p.5896-5902, 1993.
- ARANDA, M.A.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F.; MALPICA, J.M. Experimental evaluation of the ribonuclease protection assay method for the assessment of genetic heterogeneity in populations of RNA viruses. **Archives of Virology**, Vienna, v.140, p. 1373-1383, 1995.
- AYLLÓN, M.A.; RUBIO, L.; MOYA, A.; GUERRI, J.; MORENO, P. The haplotype distribution of two genes of Citrus Tristeza Virus is altered after host change of aphids transmission. **Virology**, Orlando, v.255, n.1, p.32-39, 1999.
- BAKER, E.W.; TUTTLE, D.M. **The false spiders mites of Mexico (Tenuipalpidae: Acari)**. Florida: USDA Agricultural Research Service, 1987. 237 p. (Technical Bulletin, 1706).
- BEIDLER, L.L.; HILLIARD, P.R.; RILL, R.L. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. **Analytical Biochemistry**, New York, v.126. p.374-380, 1982.
- BATCHELOR, S.R. Your first orchid – diseases and insects. **American Orchid Society Bulletin**, West Palm Beach, v. 62, n.11, p.1142-1149, 1993.
- BICALHO, H.D. Orquídeas: plantas ornamentais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 1992, Maringá. **Manual de floricultura**, Maringá: s.ed., 1992. p. 212-214.

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. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 11-12, p. 713-718, 2001.

BOARI, A.J. ; KUBO, K.S. ; ALCANTARA, B.K. ; KITAJIMA, E.W. Purificação do vírus da mancha clorótica do Clerodendron. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA 29., 2006, Botucatu. **Summa Phytopathologica**, Botucatu , v. 32. p. S11, 2006. Suplemento.

BOARI, A.J.; FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; NEDER, D.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Purification and serology of the coffee ringspot virus. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 453-458, 2004.

BOARI, A.J.; FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; NEDER, D.G.; INFIESTA, L.R.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Efeito da temperatura na infecção sistêmica de *Chenopodium quinoa* pelo Coffee ringspot vírus (CoRSV). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 35., Recife, 2003. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S246-247, 2003. Suplemento.

CAÑIZARES, M.C.; MARCOS, J.F.; PALLÁS, V. Molecular variability of twenty-one geographically distinct isolates of *Carnation mottle virus* (CarMV) and phylogenetic relationships within the *Tombusviridae* family. **Archives of Virology**, New York, v.146, p. 2039-2051, 2001.

CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V. Transmissão experimental da leprose dos citros por implante de folha no ramo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.211-214, 1980.

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

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 potyvirus. **Korean Journal of Plant Pathology**, Seoul v.7, p. 118-129, 1991.

CHENAULD, K.D.; MELCHER, U. Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.39, p.496-505, 1994.

CHIGIRA, A.; MIURA, K. Detection of 'Candidatus Cardinium' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effects on the host. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.37, p.107-116, 2005.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of virus diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1/3, p.29-105, 2003a.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *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, 2003b.

CHOI, Y.G.; RANGLES, J. Microgranular cellulose improved dsRNA recovery from plant nucleic acid extracts. **Bio Techniques**, Westborough, v.23, p.610-611, 1997.

CODOÑER, F. M.; CUEVAS, J. M.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A.; PALLÁS, V.; ELENA, S. F. Molecular evolution of the plant virus family *Bromoviridae* based on RNA 3-encoded proteins. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.61, p697-705, 2005.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETTI, S.R.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, p.208-213, 1995.

COLARICCIO, A.; COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; BOCCARDO, G.; CHAGAS, C. MARTINS; AQUILIO, M. D.; ROSSETTI, V. Preliminary purification and double stranded RNA analysis of Citrus leprosis virus (CiLV) In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS 14., 1991, Orlando. **Proceedings...**, Riverside: IOCV, 1991, p. 159-163.

DeMIRANDA, J.R.; STEVENS, M.; deBRUYNE, E.; SMITH, H.G.; BIRD, C.; HULL, R. Sequence comparison and classification of beet luteovirus isolates. **Archives of virology**, Viena, v.140, p.2183-21200, 1995.

DODDS, J.A; MORRIS, T.J; JORDAN, R.L. Plant viral double-stranded RNA. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.22, p.151-168, 1984.

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, 1977; n.183. p.1-3, 1977.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J.J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: GIBBS, A.; CALISHER, C.H.; GARCÍA-ARENAL, F. **Molecular basis of virus evolution**, Cambridge, Cambridge University Press, 1994, p.161-184.

DOMINGUES, F.S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. First report of citrus leprosis on Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, p.228, 2001.

DRAKE, J.W.; HOLLAND, J.J. Mutation rates among RNA viruses. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, p.13910-13913, 1999.

- DRESSLER, R. L. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 352 p.
- EIGEN, M. On the nature of virus quasispecies. **Trends Microbiology**, Cambridge, v.4, p.216-217, 1996.
- EIGEN, M.; SCHUSTER, P. The hypercycle: A principle of natural self-organization. Pt. A: Emergence of the hypercycle. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.64, p.541-565, 1977.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v.8, p.75-185, 1998.
- FELSESTEIN, J. Phylip - Phylogeny Inference Package (version 3.2). **Cladistic**, v. 5, p. 164-166, 1989.
- FERREIRA, P.T.O. **Caracterização de vírus baciliforme causadores de sintomas localizados em *Solanum violaefolium* transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) e estudos sobre possíveis relações com o vírus da Leprose dos Citros**. 2005. 85p. Tese (Doutor em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- FERREIRA, P.T.O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W. Dados preliminares de transmissão mecânica e por ácaros de alguns vírus transmitidos por *Brevipalpus* Acari: Tenuipalpidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 36, Uberlândia, 2003. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2003. v. 28, p.S250, 2003. Suplemento.
- FRAILE, A.; ARANDA, M.A.; GARCÍA-ARENAL, F. Evolution of the tobamoviruses. In: GIBBS, A.J.; CALISHER, C.H.; GARCÍA-ARENAL, F. **Molecular basis of virus evolution**, Cambridge, Cambridge University Press, 1995, p.338-350.
- FRAILE, A.; MALPICA, J.M.; ARANDA, M.A.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; GARCÍA-ARENAL, F. Genetic diversity in Tobacco mild green mosaic tobamovirus infecting the wild plant *Nicotiana glauca*. **Virology**, New York, v.223, p.148-155, 1996.
- FREITAS, J.C. **Incidência e controle de viroses em orquídeas no Estado de São Paulo**, 1996, 94p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 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**, Brasília, v.24, p.125-130, 1999.
- FREITAS-ASTÚA, J.; MOREIRA, L.; RIVERA, C.; RODRIGUEZ, C.M. ; KITAJIMA, E. W. . First report of Orchid fleck virus in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 1402-1402, 2002b.
- FREITAS-ASTUA, J.; TARGON, M.L.P.N.; LOCALI, E.C.; REZENDE, J.A.M.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Detecção de orchid fleck vírus em orquídeas por RT-PCR e

hibridização. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 35, 2002, Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, p.S205, 2002. Suplemento.

FREITAS-ASTÚA, J. ; KITAJIMA, E.W. ; LOCALI, E.C.; ANTONIOLILUIZON, R. ; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. . Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. . In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY- CARIBBEAN DIVISION, 2005, San Jose. **Proceedings...**: Caribbean Division, 2005. p. 93-93.

GARCÍA-ARENAL, F; FRAILE, A; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p.157-186, 2001.

GARCÍA-ARENAL, F; FRAILE, A; MALPICA, J.M. Variation and evolution of plant virus populations. **International Microbiology**, Barcelona, v.6, p.225-232, 2003.

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

GIBBS, A.; MACKENZIE, A.; BLANCHFIELD, A.; CROSS, P.; WILSON, C.; KITAJIMA, E.W.; NIGHTINGALE, M.; CLEMENTS, M. Viruses of orchids in Australia: their identification, biology and control. **Australian Orchid Review**, Lewisham, v. 65, n. 3, p. 10-21, 2000.

GRIBSKOV, M.; BURGESS, R.R. Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.14, p.6745-6763, 1986.

GROGAN, D.M; CARVER, G.T; DRAKE, J.W. Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.98, p.7928-7933, 2001.

HARAMOTO, F.H. **Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipapidae)**. Hawaii: Agricultural Experimental Station, 1969. p. 1-63 (Technical Bulletin).

HELLE, W.; BOLLAND, H.R. Artificial introduction of males in a thelytokous mite species by means of X-rays. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.15, p.395-396, 1972.

HILLIS, D.M.; HUELSENBECK, J.P.; CUNNINGHAM, C.W. Application and accuracy of molecular phylogenies. **Science**, Washington, v.255, p.671-677, 1994.

HOLLAND, J.J.; DOMINGO, E.; DELATORRE, J.C.; STEINHAEUER, D.A. Mutant frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. **Journal of Virology**, Washington, v.64, p.3960-3962, 1990.

HOLLAND, J.J.; SPINDLER, K.; HORODYSKI, F.; GRABAU, E.; NICHOL, S.; VANDEPOL, S. Rapid Evolution of RNA genomes. **Science**, Washington, v.215, p.1577-1582, 1982.

- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v.9, n.9, p.868-877, 1999.
- JACKSON, A.O.; DIETZGEN, R.G.; GOODIN, M.M.; BRAGG, J.N.; DENG, M. Biology of Plant Rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.623-660, 2005.
- JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules, In: MUNRO, H. N. **Mammalian protein metabolism.**, New York: Academic Press 1969. p.21-132.
- KANO, T.; GARNSEY, S.M.; KOIZUMI, M.; PERMAR, T.A. Serological diversity of Field sources of Citrus tristeza virus (CTV) in Japan. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., 1991, Orlando. **Proceedings...**, Riverside: IOCV, 1991, p. 51-55.
- KITAJIMA, E.W. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão.** Piracicaba: ESALQ, Núcleo de Apoio à Pesquisa/ Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária, 1998. 43p.
- KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura.** 2^a. ed. Piracicaba: Núcleo de Apoio à Pesquisa/ Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária ESALQ, 1999. v. 1. 46 p.
- KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J. Manchas cloróticas em *Clerodendron x speciosum* e mancha anular em *Solanum violaeifolium* associados a efeitos citopáticos similares aos dos vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.26, p.133-134, 2000.
- KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Mancha verde e mancha clorótica de Hibiscus são causados por tipos diferentes de vírus transmitidos por *Brevipalpus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.27, p.105, 2001.
- KITAJIMA, E.W., BLUMENSCHNEIN, A.; COSTA, A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.81, p.280-284, 1974.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1-3, p.135-160, 2003a.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V. Passion Fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n.1-3, p.225-231, 2003b.
- KITAJIMA, E.W.; MÜELLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, V. Short rod-like particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v.50, p.254-258, 1972.

- KITAJIMA, E.W.; NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J. Short rhabdovirus-like particles and a caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. In: SCANDEM, 51, BERGEM, 1999. **Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences**, 1999, p.63-64.
- KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; GOMES, R.T.; FERREIRA, P.T.O. Manchas cloróticas em solano-violeta, transmissível pelo ácaro *Brevipalpus* associado a um vírus do tipo nuclear. In: 36° CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 36., 2004, Gramado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.65, 2004. Suplemento.
- KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; MACKENZIE, A.; REZENDE, J.A.M.; GIORIA, R.; GIBBS, A. Comparative cytopathology 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.
- KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in Citrus. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., 1968, Rome. **Proceedings....** Gainesville: University of Florida Press, 1968, p.332-341.
- KOENIG, R; LÜDDECKE, P; HAEBERLÉ, A.M. Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformational polymorphism of immunocapture RT-PCR products. **Journal of General Virology**, London, v.76, p.2051-2055, 1995.
- KONDO, H.; MAEDA, T.; 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.; MATSUMOTO, J.; MAEDA, N.; INOUE, N. Host range and some properties of orchid fleck virus isolated from oriental Cymbidium in Japan. **Bulletin of Researches and Institute of Bioresources**, Okayama, v.3, p. 151-161, 1995.
- KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T.; SHIRAKO, Y. The genome structure of orchid fleck virus shows it to be a unique bipartite genome virus that resembles rhabdoviruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY 7., 1998, Edinburgh. **Proceedings...Edinburgh: BSPP**, 1998. 1 CD-ROM.
- KUBO, K.S.; KITAJIMA, E.W.; GOMES, R.T.; FERREIRA, P.T.O. Manchas cloróticas em solano-violeta, transmissível pelo ácaro *Brevipalpus* associado a um vírus do tipo nuclear. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 37., 2004 Gramado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.65, 2004. Suplemento.
- KUBO, K.S.; ANTONIOLLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Otimização da diagnose molecular da mancha anular da orquídea. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 29., 2006, Botucatu. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.29, 2006a. Suplemento.

- KUBO, K.S.; ANTONIOLLI-LUIZON, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; STUART, R.M.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Estudo da variabilidade genética do Orchid fleck virus (OFV) por SSCP. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 29., 2006, Botucatu. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.29, 2006b. Suplemento.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v.5, p.150-163, 2004.
- KUNKEL, L.O. Variation in phytopathogenic viruses. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.1, p.85-100, 1947.
- KURATH, G.; PALUKAITIS, P. RNA sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of Cucumber mosaic virus. **Virology**, London, v.173, p.231-240, 1989.
- KURATH, G.; HEICK, J.A.; DODDS, J.A. RNase protection analyses show high genetic diversity among field isolates of satellite *Tobacco mosaic virus*. **Virology**, London, v.194, p.414-418, 1993.
- LAWSON, R.H.; HSU, H. Orchid. In: LOEBENSTEIN, G.; LAWSON, R.H.; BRUNT, A.A. **Virus and virus-like diseases of bulbs and flower crops**. West Sussex: John Wiley, 1995, p. 409-420.
- LEE, R.F.; CALVERT, L.A.; NAGEL, J., HUBBARD, J.D. Citrus tristeza virus: Characterization of coat proteins. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p.1221-1226, 1988.
- LESEMANN, D.E. Virus diseases of orchids and some problems with control measures. In: SOUTHEAST ASIAN SYMPOSIUM ON PLANT DISEASES IN THE TROPICS, 2., 1980. p.20-26.
- LESEMANN, D.; DORAISWAMY, S. Bullet-shaped virus like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v.83, p.27-39, 1975.
- LIN, H.; RUBIO, L.; SMYTHE, A.; JIMINEZ, M.; FALK, B.W. Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus*. **Journal of General Virology**; London, v.84, p.249-258, 2003.
- LOCALI, E.C. Seqüenciamento de regiões genômicas do vírus da leprose dos citros. 2002. 87p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2002
- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Confirmação da presença de dsRNAs associados a Citrus Leprosis Virus (CiLV) e Orchid Fleck Virus (OFV). In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 27., 2003, Araras. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.1, p.S98-100, 2003a. Suplemento.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Diagnose da leprose dos citros através de RT-PCR. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.29, p.75, 2003b.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MÜLLER, G.; NUNES, W.M.C.; NUNES, M.J.C.; THEODORO, G.F.; ANTONIOLI, R.; SOUZA, A.A.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Haplótipos do vírus da leprose dos citros identificados nos estados do sul do Brasil através de SSCP do gene da proteína de movimento e replicase. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA 37, 2004a, Gramado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.S98, 2004. Suplemento.

LOCALI, E.C. ; FREITAS-ASTÚA, J ; SOUZA, A.A ; TAKITA, M.A ; ASTÚA-MONGE, G ; ANTONIOLI-LUIZON, R ; RODRIGUES, V ; TARGON, M.L.N.; KISHI, L ; MACHADO, MA . Sequenciamento completo do genoma do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 2005, v.30, suppl., p. S191, 2005. Suplemento.

LOCALI-FABRIS, E.C. ; FREITAS-ASTÚA, J ; SOUZA, A.A ; TAKITA, M.A ; ASTÚA-MONGE, G ; ANTONIOLI-LUIZON, R ; RODRIGUES, V ; TARGON, M.L.N.; MACHADO, MA. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C). **Journal of General Virology**, London, 2006. In press.

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

MALPICA, J.M.; FRAILE, A.; MORENO, P.; OBIES, C.I.; DRAKE, J.W.; GARCÍA-ARENAL, F. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. **Genetics**, Austin, v.162, p.1505-1511, 2002.

MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA ; KITAJIMA, E. W. . Anatomia das lesões foliares e de frutos de Citrus sp. causadas pela doença leprose. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP-SIICUSP, 12., 2004, Piracicaba. Anais..., Piracicaba, 2004. cd-rom.

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

MORENO, P.; GUERRI, J.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; FUERTES-POLO, ;ALBIACH, R.; MARTINEZ, M. Variations of pathogenicity and double-strand RNA (dsRNA) patterns of Citrus Tristeza Virus isolated by host passage. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12, 1993, New Delhi,. **Proceedings...**, New Delhi: IOCV, 1993. v.12, p.8-15.

MOYA, A; RODRÍGUEZ-CEREZO, E; GARCÍA-ARENAL, F. Genetic structure of natural populations of the plant RNA virus Tobacco mild green mosaic virus. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.10, p.449-456, 1993.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, Austin, v.97, p.145-163, 1981.

NOVELLI, V.M. ; FREITAS-ASTÚA, J. ; ANTONIOLI-LUIZON, R. ; LOCALI, E.C. ; ARRIVABEM, F ;HILF, M.E ; GOTTWALD, T.R. ; MACHADO, M.A. Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 38., 2005, Brasília. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p. S183, 2005a. Suplemento.

NOVELLI, V.M., FREITAS-ASTUA, J., ASTUA-MONGE, G., CARVALHO, S.A.; LOCALI, E.C., RODRIGUES, V., ARRIVABEM, F., HILF, M.E., GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Detection of CLO (Cytophaga-like organismo) endosymbionts in adults and eggs of citrus leprosis vector *Brevipalpus phoenicis* and *B. obovatus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.31, p.65, 2005b.

PADIDAM, M.; SAWYER, S.; FAWQUET, C.M. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. **Virology**, New York, v.265, p.218-225, 1999.

PALUKAITIS, P.; ROOSINCK, M.J.; DIETZGEN, R.G.; FRANCKI, R.I.B. *Cucumber mosaic virus*. In: MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F.A.; SHATKIN, A.J. **Advances in virus research**, San Diego: Academic, 1992, v. 41, p.281-348.

PARRELLA, G.; LANAVE, C.; MARCHOUX, G. FINETTI SIALER, Di FRANCO, G.; GALLITELLY, D. Evidence for two distinct groups of alfafa mosaic virus (AMV) from France and Italy and their relationship with other AMV strains. **Archives of Virology**, Vienna, v.145, p.2659-2667, 2000.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASUMPCÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; RANÇO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.; H., OLIVEIRA; F., GIACHETTO, P.F.; FERRAZ, F.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; FRANCHISCINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated virus (CiLV). **Viral Gene**, Tel Aviv, 2006. In press.

PATHAK, V.K.; TEMIN, H.M. Broad spectrum of in vivo forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitution, frameshifts, and hypermutations. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA**, Washington, v.87, p. 6019-6023, 1990.

RODRIGUES, J.C.V. **Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros**, 2000. 168p. Tese de (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.C.V.; TARGON, M.L.N.; MACHADO, M.A. DsRNA associado a lesões de leprose dos citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Belém, 2000a. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.447-448, 2000a.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MÜELLER, G.W. Transmission of Citrus leprosis virus to mandarins by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 14., Campinas, 2000. **Proceedings...**, Campinas, 2000b, v.14, p.174-178.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.161-179, 2003.

RODRÍGUEZ-CEREZO, E.; MOYA, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Variability and evolution of the plant RNA virus *Pepper mild mottle virus*. **Journal of Virology**, Washington, v.63, p.2198-2203, 1999.

ROISTACHER, C.N.; MORENO, P. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* - A Review. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 11., 1991, Orlando. **Proceedings...** Orlando: IOCV, 1991. v.11, p.7-19.

ROOSSINCK, M.J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.191-209, 1997.

RUBIO, L.; SOONG, J.; KAO, J.; FALK, B.W. Geographic distribution and molecular variation of isolates of three whitefly-borne closteroviruses of cucurbits: *Lettuce infectious yellows virus*, *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, and *Beet pseudo-yellows virus*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.89, p.707-711, 1999.

RUBIO, L.; ABOU-JAWDAH, Y.; LIN, H.X.; FALK, B.W. Geographically distant isolates of the crinivirus Cucurbit yellow stunting disorder virus show very low genetic diversity in the coat protein gene. **Journal of General Virology**, London, v.82, p.929-933, 2001a.

RUBIO, L.; ANGELES, M.; GUERRI, J.; PAPPU, H.; NIBLETT, C.; MORENO, P. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformational polymorphism analysis of the coat protein gene. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.129, p.479-489, 1996.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDES, A.; POLEK, M.; GUERRI J.; MORENO P.; FALK, B.W. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. **Journal of Virology**, Washington, v.75, p.8054-8063, 2001b.

SAMBADE, A.; RUBIO, L.; GARNSEY, S.M.; COSTA, N.; MÜELLER, G.W.; PEYROU, M.; GUERRI, J.; MORENO, P. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct

isolates of *Citrus tristeza virus*: application to monitoring cross-protection. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.3, p.257-265, 2002.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, S. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the USA**, Washington, v.74, p.5463-5467, 1977.

SAVOV, A.; ANGELICHEVA, D.; JORDANOVA, A.; EIGEL, A.; KALAYDJIEVA, L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, n.24, p.6741-6742, 1992.

SCHIRMER, A.; LINK, D.; COGNAT, V.; MOURY, B.; BEUVE, M.; MEUNIER, A.; BRAGARD, C.; GILMER, D.; LEMAIRE, O. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. **Journal of General Virology**, London, v.86, p.2897-2911, 2005.

SHEEHAN, T. J. Orchids. In: LARSON, R.A. **Introduction to floriculture**. New York: Academic Press, 1980. chap.5, p.133-169.

SOUZA, A.A.; TARGON, M.L.P.N.; SANTOS, F.A.; MÜLLER, G.; MACHADO, M.A. Técnicas moleculares para diagnóstico e caracterização do vírus da tristeza dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.22, n.2, p.503-516, 2001.

SOUZA, A.A.; MÜELLER, G.; TARGON, M.L.P.N.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Avaliação de haplótipos do gene do capsídeo do Citrus tristeza virus em plantas pré-imunizadas de laranja 'Pêra'. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.28, p.154-159, 2002.

VALVERDE, R.A.; NAMETH, S.T.; JORDAN, R.L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnostic. **Plant Disease**, Saint Paul, v.74, n.3, p.255-258, 1990.

VANRENMORTEL, M.H.V. **Serology and immunochemistry of plant viruses**. New York: Academic Press, 1982.p.

Van VLOTEN-DOTING, L.; BOL, J.F. Variability, mutant selection, and mutant stability in plant RNA viruses. In: DOMINGO, E ; HOLLAND, J.J. ; AHLQUIST, P. **RNA genetics**, Boca Raton: CRC Press, 1988. chap.3, p.37-52.

VERGANI, A.R. **Transmission y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo**. Buenos Aires: Instituto de Sanidad Vegetal. 1945. 11p.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; GALIPIENSO, L.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. Low genetic variation between isolates of Citrus leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins. **Journal of General Virology**, London, v.83, p.2587-2591, 2002.

WEEKS, A; MAREK, F; BREEUWE, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, Washington, v.292, p.2479-2482, 2001.

WEILLER, G.F.; McCLURE, M.A.; GIBBS, A.J. Molecular phylogenetic analysis. In: GIBBS, A.; CALISHER, C.H.; GARCÍA-ARENAL, F. **Molecular basis of virus evolution**, Cambridge, Cambridge University Press, 1995, p.553-585.

WELBOURNE, W.C.; OCHOA, R.; KANE, E.C.; ERBE, E.F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, p.107-133, 2003.

YARWOOD, C.E. Host passage effects with plant viruses. **Advanced Virus Research**, San Diego, v.24, p.69-90, 1979.

ZETTLER, F.W.; KO, N.J., WISLER, G.C.; ELLIOT, M.S., WONG, S.M. Viruses in orchid and their control. **Plant Disease**, Saint Paul, v.74, p.621-626, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Alinhamento das seqüências de nucleotídeos. A similaridade entre as amostras é representada pelos pontos e as diferenças pelos nucleotídeos. Nos nomes das amostras, **c-** significa consenso e **p-** polimorfismo

Piracicaba8_c	1	TCAAGGGGTCTTGA	CCCA	GGGTTCTTTAT-AGCTCTGCAA	CAGTCAAAGT	49	
Piracicaba8_p1	1	49	
Piracicaba8_p2	1	.	.	.	G.	49	
Piracicaba21_p	1	.	.	.	G.	49	
Piracicaba21_c	1	.	.	.	G.	49	
Piracicaba33_c	1	.	G.	.	.	49	
Piracicaba35_c	1	.	G.	.	.	49	
Piracicaba35_p1	1	.	G.	.	.	49	
Piracicaba35_p2	1	.	G.	.	.	49	
Piracicaba124_c	1	.	G.	.	G.	49	
Piracicaba125_p	1	.	G.	.	G.	49	
Piracicaba125_c	1	.	G.	.	G.	49	
Curitiba71_p	1	.	G.	.	A.	49	
Curitiba71_c	1	.	G.	.	.	49	
Australia171_c	1	.	G.	A.	.	49	
Australia172_c	1	.	G.	A.	.	49	
Australia172_p	1	.	G.	.	.	49	
Costa_Rica159_p2	1	.	G.	.	.	C	49
Costa_Rica159_p1	1	C.	G.	.	.	C	49
Costa_Rica159_c	1	.	G.	.	.	C	49
Costa_Rica156_c	1	.	G.	.	.	C	49
Piracicaba8_c	50	GTG----	TCACTCTAATAG-	CCAGGATGGCCCA	CATATTGGTGAAGGGT	93	
Piracicaba8_p1	50	93	
Piracicaba8_p2	50	93	
Piracicaba21_p	50	93	
Piracicaba21_c	50	93	
Piracicaba33_c	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba35_c	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba35_p1	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba35_p2	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba124_c	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba125_p	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba125_c	50	.	.	T.	T.	93	
Curitiba71_p	50	.	.	T.	T.	93	
Curitiba71_c	50	.	.	T.	T.	93	
Australia171_c	50	.	.	T.	T.	93	
Australia172_c	50	.	.	T.	T.	93	
Australia172_p	50	.	.	T.	T.	93	
Costa_Rica159_p2	50	.	.	T.	T.	93	
Costa_Rica159_p1	50	.	G.	T.	T.	93	
Costa_Rica159_c	50	.	.	T.	T.	93	
Costa_Rica156_c	50	.	.	T.	T.	93	
Piracicaba8_c	94	GGAGCTGTAG	CCCGTCAA	TGAATACTCTGAT	CCTAGGAAG--GCAAAGTCA	141	
Piracicaba8_p1	94	141	
Piracicaba8_p2	94	141	
Piracicaba21_p	94	.	A.	.	.	141	
Piracicaba21_c	94	141	
Piracicaba33_c	94	.	T.	.	.	141	
Piracicaba35_c	94	.	T.	.	.	141	
Piracicaba35_p1	94	.	T.	.	C.	141	
Piracicaba35_p2	94	.	T.	.	.	141	
Piracicaba124_c	94	141	
Piracicaba125_p	94	.	G.	.	.	141	
Piracicaba125_c	94	.	G.	.	.	141	
Curitiba71_p	94	141	
Curitiba71_c	94	141	
Australia171_c	94	141	
Australia172_c	94	141	
Australia172_p	94	.	T.	.	.	141	
Costa_Rica159_p2	94	141	
Costa_Rica159_p1	94	141	
Costa_Rica159_c	94	141	
Costa_Rica156_c	94	.	A.	.	.	141	
Piracicaba8_c	142	TTGGA	AAACA----	AACCTGGACTT	TGCTGCGGAGGCTG--ACAAGTTT	183	
Piracicaba8_p1	142	.	.	.	C.	183	
Piracicaba8_p2	142	183	
Piracicaba21_p	142	183	
Piracicaba21_c	142	183	
Piracicaba33_c	142	183	
Piracicaba35_c	142	183	
Piracicaba35_p1	142	183	
Piracicaba35_p2	142	183	
Piracicaba124_c	142	183	
Piracicaba125_p	142	183	
Piracicaba125_c	142	183	

Curitiba71_p	142C.....	183
Curitiba71_c	142C.....	183
Australia171_c	142T.....	183
Australia172_c	142T.....	183
Australia172_p	142T.....	183
Costa_Rica159_p2	142	183
Costa_Rica159_p1	142	183
Costa_Rica159_c	142	183
Costa_Rica156_c	142	...A.....	183
Piracicaba8_c	184	GCCACAGAGTTTGTGGAGGCATACAA TGGCCTGTCCGGATCAAGCGCCAA	233
Piracicaba8_p1	184	233
Piracicaba8_p2	184	233
Piracicaba21_p	184	233
Piracicaba21_c	184	233
Piracicaba33_c	184	233
Piracicaba35_c	184	233
Piracicaba35_p1	184	233
Piracicaba35_p2	184	...G.....	233
Piracicaba124_c	184	...G.....	233
Piracicaba125_p	184	...G.....	233
Piracicaba125_c	184	...G.....	233
Curitiba71_p	184	233
Curitiba71_c	184	233
Australia171_c	184	233
Australia172_c	184	233
Australia172_p	184	233
Costa_Rica159_p2	184C.....	233
Costa_Rica159_p1	184	233
Costa_Rica159_c	184	233
Costa_Rica156_c	184	233
Piracicaba8_c	234	TGCAGGTCCTGTATC	248
Piracicaba8_p1	234	248
Piracicaba8_p2	234	248
Piracicaba21_p	234	248
Piracicaba21_c	234	248
Piracicaba33_c	234	248
Piracicaba35_c	234	248
Piracicaba35_p1	234	248
Piracicaba35_p2	234	248
Piracicaba124_c	234	248
Piracicaba125_p	234	248
Piracicaba125_c	234	248
Curitiba71_p	234	248
Curitiba71_c	234	248
Australia171_c	234	248
Australia172_c	234	248
Australia172_p	234	248
Costa_Rica159_p2	234	...G.....	248
Costa_Rica159_p1	234	...G.....	248
Costa_Rica159_c	234	...G.....	248
Costa_Rica156_c	234	...G.....	248

APÊNDICE B – Alinhamento das seqüências de proteínas. A similaridade é demonstrada por pontos e as diferenças são demonstradas por letras, representando aminoácidos

Piracicaba8_c	1	SRGLDPGFFIALQQSKCVTLIARMAHILVKGAVAVNEYSDPRKAKSLENKPLAAEADK	
Piracicaba8_p1	1	
Piracicaba8_p2	1R.....	
Piracicaba21_p	1I.....	
Piracicaba21_c	1	
Piracicaba33_c	1	
Piracicaba35_c	1	
Piracicaba35_p1	1P.....	
Piracicaba35_p2	1	
Piracicaba124_c	1	
Piracicaba125_p	1	
Piracicaba125_c	1	
Curitiba71_p	1E.....	
Curitiba71_c	1	
Australia171_c	1R.....	
Australia172_c	1	
Australia172_p	1	
Costa_Rical59_p2	1R.....	
Costa_Rical59_p1	1	P.....R.....	
Costa_Rical59_c	1R.....	
Costa_Rical56_c	1R.....T.....K.....	
023Germany	1	
ZGermany	1	
003Australia	1	
XAustralia	1	
047Germany	1	
591Australia	1	
YBrazil	1	
005Brazil	1	
053South_Africa	1	
Piracicaba8_c	61	FATEFVEAYNGLSGSSANAGPV	82
Piracicaba8_p1	61	82
Piracicaba8_p2	61	82
Piracicaba21_p	61	82
Piracicaba21_c	61	82
Piracicaba33_c	61	82
Piracicaba35_c	61	82
Piracicaba35_p1	61	82
Piracicaba35_p2	61	..A.....	82
Piracicaba124_c	61	82
Piracicaba125_p	61	82
Piracicaba125_c	61	82
Curitiba71_p	61	82
Curitiba71_c	61	82
Australia171_c	61	82
Australia172_c	61	82
Australia172_p	61	82
Costa_Rical59_p2	61	82
Costa_Rical59_p1	61	82
Costa_Rical59_c	61	82
Costa_Rical56_c	61	82
023Germany	61	82
ZGermany	61	82
003Australia	61	82
XAustralia	61	82
047Germany	61	82
591Australia	61	82
YBrazil	61	82
005Brazil	61	82

(continua)

Pir35c	Pir33c	Pir21p	Pir21	Pir8p2	Pir8p1	Pir8c
0.016305	0.016305	0.008108	0.004043	0.004043	0.004043	0.000000
0.020437	0.020437	0.012195	0.008108	0.008108	0.000000	0.004043
0.020437	0.020437	0.012195	0.008108	0.000000	0.008108	0.004043
0.020437	0.020437	0.004043	0.000000	0.008108	0.008108	0.004043
0.024592	0.024592	0.000000	0.004043	0.012195	0.012195	0.008108
	0.000000	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
0.020437	0.000000	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
0.024592	0.004043	0.028771	0.024592	0.024592	0.024592	0.020437
	0.004043	0.028771	0.024592	0.024592	0.024592	0.020437
0.020437	0.016305	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437	0.016305
0.024592	0.020437	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592	0.020437
	0.020437	0.020437	0.016305	0.016305	0.016305	0.012195
0.020437	0.016305	0.020437	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
0.024592	0.024592	0.032972	0.028771	0.028771	0.028771	0.024592
0.020437	0.016305	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
0.024592	0.024592	0.032972	0.028771	0.028771	0.028771	0.024592
	0.020437	0.028771	0.024592	0.024592	0.024592	0.020437
0.020437	0.020437	0.028771	0.024592	0.024592	0.024592	0.020437
0.0240020437	0.016305	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
	0.000000	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437	0.016305
0.151400	0.151400	0.166350	0.161334	0.161334	0.166350	0.156350
0.0240020437	0.151400	0.166350	0.161334	0.161334	0.166350	0.156350
	0.012195	0.020437	0.016305	0.016305	0.016305	0.012195
0.020437	0.012195	0.020437	0.016305	0.016305	0.016305	0.012195
0.0240020437	0.008108	0.016305	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108
21817.7(967(0.008108)130756.0024620437	0.008108	0.016305	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108
	0.008108	0.016305	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108
	0.008108	0.016305	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108
	0.008108	0.016305	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108

(continuação)

	Aus172c	Aus171c	CoR159p2	CoR159p1	CoR159	CoR156	Cur71p	Cur71	Pir125p	Pir125c
Pir8c	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
Pir8p1	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Pir8p2	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Pir21	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.016305	0.016305
Pir21p	0.024592	0.028771	0.028771	0.032972	0.024592	0.032972	0.024592	0.020437	0.020437	0.020437
Pir33c	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
Pir35c	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
Pir35p1	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Pir35p2	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Pir124c	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.004043	0.004043
Pir125c	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.000000	0.000000
Pir125p	0.020437	0.024592	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.000000	0.000000
Cur71	0.012195	0.016305	0.016305	0.020437	0.012195	0.020437	0.004043	0.000000	0.016305	0.016305
Cur71p	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.000000	0.004043	0.020437	0.020437
CoR156	0.024592	0.028771	0.012195	0.016305	0.008108	0.000000	0.024592	0.020437	0.028771	0.028771
CoR159	0.016305	0.020437	0.004043	0.008108	0.000000	0.008108	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
CoR159p1	0.024592	0.028771	0.012195	0.000000	0.008108	0.016305	0.024592	0.020437	0.028771	0.028771
CoR159p2	0.020437	0.024592	0.000000	0.012195	0.004043	0.012195	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Aus171c	0.004043	0.000000	0.024592	0.028771	0.020437	0.028771	0.020437	0.016305	0.024592	0.024592
Aus172c	0.000000	0.004043	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
Aus172p	0.016305	0.020437	0.020437	0.024592	0.016305	0.024592	0.016305	0.012195	0.020437	0.020437
023Ger^(*)	0.161334	0.166350	0.161334	0.166350	0.166350	0.176486	0.166350	0.161334	0.166350	0.166350
Zger^(*)	0.161334	0.166350	0.161334	0.166350	0.166350	0.176486	0.166350	0.161334	0.166350	0.166350
003Aus^(*)	0.004043	0.008108	0.016305	0.020437	0.012195	0.020437	0.012195	0.008108	0.016305	0.016305
XAus^(*)	0.004043	0.008108	0.016305	0.020437	0.012195	0.020437	0.012195	0.008108	0.016305	0.016305
47Ger^(*)	0.008108	0.012195	0.012195	0.016305	0.008108	0.016305	0.008108	0.004043	0.012195	0.012195
591Aus^(*)	0.008108	0.012195	0.012195	0.016305	0.008108	0.016305	0.008108	0.004043	0.012195	0.012195
YBr^(*)	0.008108	0.012195	0.012195	0.016305	0.008108	0.016305	0.008108	0.004043	0.012195	0.012195
005Br^(*)	0.008108	0.012195	0.012195	0.016305	0.008108	0.016305	0.008108	0.004043	0.012195	0.012195
053SA^(*)	0.008108	0.012195	0.012195	0.016305	0.008108	0.016305	0.008108	0.004043	0.012195	0.012195

	053SA ^(*)	005Br ^(*)	YBr ^(*)	591Aus ^(*)	47Ger ^(*)	XAus ^(*)	003Aus ^(*)	Zger ^(*)	023Ger ^(*)	Aus172p	(conclusão)
Pir8c	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.156350	0.156350	0.016305	0.016305
Pir8p1	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.156350	0.156350	0.020437	0.020437
Pir8p2	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.161334	0.161334	0.020437	0.020437
Pir21	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.161334	0.161334	0.020437	0.020437
Pir21p	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.020437	0.020437	0.166350	0.166350	0.024592	0.024592
Pir33c	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.151400	0.151400	0.000000	0.000000
Pir35c	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.151400	0.151400	0.000000	0.000000
Pir35p1	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.156350	0.156350	0.004043	0.004043
Pir35p2	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.156350	0.156350	0.004043	0.004043
Pir124c	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.166350	0.166350	0.016305	0.016305
Pir125c	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.166350	0.166350	0.020437	0.020437
Pir125p	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.166350	0.166350	0.020437	0.020437
Cur7i	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.008108	0.008108	0.161334	0.161334	0.012195	0.012195
Cur7ip	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.166350	0.166350	0.016305	0.016305
CoR156	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.020437	0.020437	0.176486	0.176486	0.024592	0.024592
CoR159	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.166350	0.166350	0.016305	0.016305
CoR159p1	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.016305	0.020437	0.020437	0.166350	0.166350	0.024592	0.024592
CoR159p2	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.016305	0.016305	0.161334	0.161334	0.020437	0.020437
Aus171c	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.012195	0.008108	0.008108	0.166350	0.166350	0.020437	0.020437
Aus172c	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.016305	0.016305
Aus172p	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.008108	0.012195	0.012195	0.151400	0.151400	0.000000	0.000000
023Ger ^(*)	0.161334	0.161334	0.161334	0.161334	0.161334	0.156350	0.156350	0.000000	0.000000	0.151400	0.151400
Zger ^(*)	0.161334	0.161334	0.161334	0.161334	0.161334	0.156350	0.156350	0.000000	0.000000	0.151400	0.151400
003Aus ^(*)	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.000000	0.000000	0.156350	0.156350	0.012195	0.012195
XAus ^(*)	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.004043	0.000000	0.000000	0.156350	0.156350	0.012195	0.012195
47Ger ^(*)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.008108	0.008108
591Aus ^(*)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.008108	0.008108
YBr ^(*)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.008108	0.008108
005Br ^(*)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.008108	0.008108
053SA ^(*)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.004043	0.004043	0.161334	0.161334	0.008108	0.008108

Nota – As amostras pertencem as seguintes origens geográficas: Pir-Piracicaba; Cur-Curitiba, CoR-Costa Rica; Aus-Austrália; Ger-Alemanha; SA-África do Sul.

c – seqüências consenso; p – seqüências polimórficas.

(*) Seqüências obtidas a partir do GenBank.

APÊNDICE D – Matriz de distância entre isolados baseada no modelo de Jones-Taylor-Thornton para sequência de aminoácidos

(continua)

	Pir124c	Pir35p2	Pir35p1	Pir35c	Pir33c	Pir21p	Pir21c	Pir8p2	Pir8p1	Pir8c
Pir8c	0.017555	0.022052	0.022148	0.017588	0.017588	0.008609	0.004305	0.004345	0.004324	0.000000
Pir8p1	0.022106	0.026658	0.026774	0.022148	0.022148	0.012935	0.008671	0.008753	0.000000	0.004324
Pir8p2	0.022208	0.026781	0.026898	0.022251	0.022251	0.013078	0.008715	0.000000	0.008753	0.004345
Pir21	0.013161	0.026544	0.026658	0.022052	0.022052	0.004305	0.000000	0.008715	0.008671	0.004305
Pir21p	0.017555	0.030978	0.031112	0.026472	0.026472	0.000000	0.004305	0.013078	0.012935	0.008609
Pir33c	0.017051	0.004276	0.004294	0.000000	0.000000	0.026472	0.022052	0.022251	0.022148	0.017588
Pir35c	0.017051	0.004276	0.004294	0.000000	0.000000	0.026472	0.022052	0.022251	0.022148	0.017588
Pir35p1	0.020964	0.008611	0.000000	0.004294	0.004294	0.031112	0.026658	0.026898	0.026774	0.022148
Pir35p2	0.020797	0.000000	0.008611	0.004276	0.004276	0.030978	0.026544	0.026781	0.026658	0.022052
Pir124c	0.000000	0.020797	0.020964	0.017051	0.017051	0.017555	0.013161	0.022208	0.022106	0.017555
Pir125c	0.004327	0.024142	0.024351	0.020797	0.020797	0.022011	0.017602	0.026731	0.026609	0.022011
Pir125p	0.004327	0.024142	0.024351	0.020797	0.020797	0.022011	0.017602	0.026731	0.026609	0.022011
Cur71	0.012965	0.017170	0.017287	0.013024	0.013024	0.022046	0.017631	0.017791	0.017707	0.013183
Cur71p	0.016994	0.020916	0.021084	0.017127	0.017127	0.026465	0.022046	0.022244	0.022142	0.017583
CoR156	0.023962	0.027234	0.027478	0.024249	0.024249	0.035409	0.030971	0.031245	0.031104	0.026465
CoR159	0.017036	0.020964	0.021133	0.017170	0.017170	0.026537	0.022106	0.022305	0.022202	0.017631
CoR159p1	0.024269	0.027586	0.027837	0.024564	0.024564	0.035755	0.031274	0.031554	0.031410	0.026724
CoR159p2	0.020916	0.024564	0.024780	0.021133	0.021133	0.031189	0.026724	0.026965	0.026841	0.022202
Aus171c	0.021885	0.026392	0.026506	0.021927	0.021927	0.031055	0.026611	0.026849	0.026726	0.022109
Aus172c	0.017455	0.021927	0.022021	0.017488	0.017488	0.026539	0.022109	0.022308	0.022205	0.017634
Aus172p	0.017051	0.004276	0.004294	0.000000	0.000000	0.026472	0.022052	0.022251	0.022148	0.017588
023Ger^(*)	0.187254	0.172912	0.173646	0.167430	0.167430	0.184484	0.179433	0.180803	0.174702	0.173878
Zger^(*)	0.187254	0.172912	0.173646	0.167430	0.167430	0.184484	0.179433	0.180803	0.174702	0.173878
003Aus^(*)	0.012852	0.016979	0.017098	0.012918	0.012918	0.021921	0.017530	0.017688	0.017606	0.013107
XAus^(*)	0.012852	0.016979	0.017098	0.012918	0.012918	0.021921	0.017530	0.017688	0.017606	0.013107
47Get^(*)	0.008629	0.012954	0.013024	0.008649	0.008649	0.017508	0.013126	0.013245	0.013183	0.008724
591Aus^(*)	0.008629	0.012954	0.013024	0.008649	0.008649	0.017508	0.013126	0.013245	0.013183	0.008724
YBr^(*)	0.008629	0.012954	0.013024	0.008649	0.008649	0.017508	0.013126	0.013245	0.013183	0.008724
005Br^(*)	0.008629	0.012954	0.013024	0.008649	0.008649	0.017508	0.013126	0.013245	0.013183	0.008724
053SA^(*)	0.008629	0.012954	0.013024	0.008649	0.008649	0.017508	0.013126	0.013245	0.013183	0.008724

(continuação)

	Aus172p	Aus172c	Aus171c	CoR159p2	CoR159p1	CoR159c	CoR156c	Cur71p	Cur71c	Pir125p	Pir125c
Pir8c	0.017588	0.017634	0.022109	0.022202	0.026724	0.017631	0.026485	0.017583	0.013183	0.022011	0.022011
Pir8p1	0.022148	0.022205	0.026726	0.026841	0.031410	0.022202	0.031104	0.022142	0.017707	0.026609	0.026609
Pir8p2	0.022251	0.022308	0.026849	0.026965	0.031554	0.022305	0.031245	0.022244	0.017791	0.026731	0.026731
Pir21	0.022052	0.022109	0.026611	0.026724	0.031274	0.022106	0.030971	0.022046	0.017631	0.017602	0.017602
Pir21p	0.026472	0.026539	0.031055	0.031189	0.035755	0.026537	0.035409	0.026465	0.022046	0.022011	0.022011
Pir33c	0.000000	0.017488	0.021927	0.021133	0.024564	0.017170	0.024249	0.017127	0.013024	0.020797	0.020797
Pir35c	0.000000	0.017488	0.021927	0.021133	0.024564	0.017170	0.024249	0.017127	0.013024	0.020797	0.020797
Pir35p1	0.004294	0.022021	0.026506	0.024780	0.027837	0.021133	0.027478	0.021084	0.017287	0.024351	0.024351
Pir35p2	0.004276	0.021927	0.026392	0.024564	0.027586	0.020964	0.027234	0.020916	0.017170	0.024142	0.024142
Pir124c	0.017051	0.017455	0.021885	0.020916	0.024269	0.017036	0.023962	0.016994	0.012965	0.004327	0.004327
Pir125c	0.020797	0.021885	0.026343	0.024269	0.027229	0.020748	0.026888	0.020701	0.017036	0.000000	0.000000
Pir125p	0.020797	0.021885	0.026343	0.024269	0.027229	0.020748	0.026888	0.020701	0.017036	0.000000	0.000000
Cur71	0.013024	0.013107	0.017530	0.017277	0.021086	0.013038	0.020821	0.004307	0.000000	0.017036	0.017036
Cur71p	0.017127	0.017483	0.021921	0.021037	0.024429	0.017114	0.024117	0.000000	0.004307	0.020701	0.020701
CoR156	0.024249	0.026315	0.030795	0.012973	0.017046	0.008634	0.000000	0.024117	0.020821	0.026888	0.026888
CoR159	0.017170	0.017530	0.021980	0.004348	0.008720	0.000000	0.008634	0.017114	0.013038	0.020748	0.020748
CoR159p1	0.024564	0.026571	0.031095	0.013115	0.000000	0.008720	0.017046	0.024429	0.021086	0.027229	0.027229
CoR159p2	0.021133	0.022075	0.026571	0.000000	0.013115	0.004348	0.012973	0.021037	0.017277	0.024269	0.024269
Aus171c	0.021927	0.004292	0.000000	0.026571	0.031095	0.021980	0.030795	0.021921	0.017530	0.026343	0.026343
Aus172c	0.017488	0.000000	0.004292	0.022075	0.026571	0.017530	0.026315	0.017483	0.013107	0.021885	0.021885
Aus172p	0.000000	0.017488	0.021927	0.021133	0.024564	0.017170	0.024249	0.017127	0.013024	0.020797	0.020797
023Ger^(*)	0.167430	0.181075	0.186702	0.180567	0.187644	0.186292	0.196485	0.185882	0.180803	0.187207	0.187207
Zger^(*)	0.167430	0.181075	0.186702	0.180567	0.187644	0.186292	0.196485	0.185882	0.180803	0.187207	0.187207
003Aus^(*)	0.012918	0.004332	0.008689	0.017082	0.020801	0.012927	0.020542	0.012894	0.008654	0.016840	0.016840
XAus^(*)	0.012918	0.004332	0.008689	0.017082	0.020801	0.012927	0.020542	0.012894	0.008654	0.016840	0.016840
47Ger^(*)	0.008649	0.008674	0.013051	0.013038	0.017156	0.008668	0.016953	0.008645	0.004322	0.012891	0.012891
591Aus^(*)	0.008649	0.008674	0.013051	0.013038	0.017156	0.008668	0.016953	0.008645	0.004322	0.012891	0.012891
YBr^(*)	0.008649	0.008674	0.013051	0.013038	0.017156	0.008668	0.016953	0.008645	0.004322	0.012891	0.012891
005Br^(*)	0.008649	0.008674	0.013051	0.013038	0.017156	0.008668	0.016953	0.008645	0.004322	0.012891	0.012891
053SA^(*)	0.008649	0.008674	0.013051	0.013038	0.017156	0.008668	0.016953	0.008645	0.004322	0.012891	0.012891

ANEXOS

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
-	1	SP-Ubatuba	<i>Eria sp.</i>
+	2	SP-Ubatuba	Híbrido <i>Cattleya</i>
-	3	Orquidário ESALQ	<i>Brassia chloroleuca</i>
-	4	Orquidário ESALQ	<i>Dendrobium speciosum</i>
+	5	Orquidário ESALQ	<i>Dendrobium speciosum</i>
-	6	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sp.</i>
+	7	Orquidário ESALQ	<i>Dendrobium densiflorum</i>
+	8	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium stenotis</i>
+	9	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sphacelatum</i>
-	10	Orquidário ESALQ	orquídea
-	11	Orquidário ESALQ	orquídea
-	12	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sp.</i>
-	13	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sp.</i>
-	14	Orquidário ESALQ	<i>Epidendrum sp.</i>
+	15	Orquidário ESALQ	<i>Epidendron sp.</i>
+	16	Orquidário ESALQ	<i>Pleurothallis sp.</i>
+	17	Orquidário ESALQ	<i>Octomeria sp.</i>
+	18	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia regnelii</i> x <i>M. moureliana</i>
-	19	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria picta</i>
-	20	Orquidário ESALQ	<i>Sobralia sp.</i>
+	21	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia spectabilis</i>
-	22	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia sp.</i>
+	23	Orquidário ESALQ	<i>Bulbophyllum lobii</i>
-	24	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia regnelii</i>

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
-	25	Orquidário ESALQ	<i>Xylobium sp.</i>
+	26	Orquidário ESALQ	<i>Schomburgia sp.</i>
-	27	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sphacelatum</i>
-	28	Orquidário ESALQ	<i>Laelia lobata</i>
+	29	Orquidário ESALQ	<i>Epidendrum latilabile</i>
+	30	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia moureliana</i> x <i>M. regnellii</i>
+	31	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia candida</i> x <i>M. regnellii</i>
+	32	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
+	33	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia sp.</i>
-	34	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
+	35	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia moureliana</i> x <i>M. regnellii</i>
+	36	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium trilobum</i>
-	37	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium sp.</i>
+	38	Orquidário ESALQ	<i>Epidendrum latilabile</i>
+	39	Orquidário ESALQ	<i>Tetragamestus sp.</i>
+	40	Orquidário ESALQ	<i>Dendrochilum setipes</i>
-	41	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium flexuosum</i>
+	42	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium ornithorhynchum</i>
+	43	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium ornithorhynchum</i>
+	44	Orquidário ESALQ	<i>Pleurothallis sp.</i>
+	45	Orquidário ESALQ	<i>Brassia chloroleuca</i>
-	46	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
+	47	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
+	48	Orquidário ESALQ	<i>Amblostoma sp.</i>

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
+	49	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium</i> sp.
-	50	Orquidário ESALQ	<i>Xylobium brachystachyum</i>
-	51	Orquidário ESALQ	<i>Miltonia clowensii</i> x <i>M. candidata</i>
-	52	Orquidário ESALQ	<i>Laelia tenebrosa</i>
-	53	Orquidário ESALQ	<i>Trigonidium</i> sp.
-	54	Orquidário ESALQ	<i>Tetragamestus</i> sp.
-	55	Orquidário ESALQ	<i>Gomesa crispa</i>
-	56	Orquidário ESALQ	<i>Scaphioglottis</i> sp.
-	57	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia diurna</i> <i>Cattleya harrisoniana</i> x <i>C. chocoensis</i>
-	58	Orquidário ESALQ	<i>C. loddigesii</i> alba x <i>C. mossiae</i>
-	59	Orquidário ESALQ	<i>Dendrobium nobile</i>
-	60	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium</i> sp.
-	61	Orquidário ESALQ	<i>Oncidium trilobum</i>
-	62	Orquidário ESALQ	<i>Bulbophyllum purpureorhachis</i>
+	64	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
+	65	RS - Porto Alegre	Orquídea não identificada
+	66	RS - Porto Alegre	<i>Cattleya bicolor</i>
-	67	RS - Porto Alegre	<i>Laelia</i> sp.
+	68	AM - Manaus	Orquídea não identificada
-	69	Curitiba – Orquidário 1	<i>Cymbidium</i> sp.
-	70	Curitiba – Orquidário 1	<i>Laelia purpurata</i>
+	71	Curitiba – Orquidário 2	<i>Oncidium maculatum</i>
+	72	Curitiba - Orquidário 2	<i>Bulbophyllum makoyanum</i>

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
-	73	Curitiba - Orquidário 2	<i>Miltonia</i> híbrida
+	74	Curitiba - Orquidário 2	<i>Miltonia festiva</i>
+	75	Curitiba - Orquidário 2	<i>Miltonia</i> sp.
+	76	Curitiba - Orquidário 2	<i>M. candida</i> x <i>M. spectabilis</i>
+	77	Curitiba - Orquidário 2	<i>Odontoglossum</i> cherry baby
+	78	Curitiba - Orquidário 2	<i>O. tigrinum</i> x <i>O. coronation</i>
+	79	Joinville - Orquidário 3	<i>Laelia</i> sp.
+	80	Joinville - Orquidário 3	Orquídea não identificada
+	81	Joinville - Orquidário 3	<i>Coelogyne</i> sp.
+	82	Joinville - Orquidário 3	<i>Encyclia</i> sp.
+	83	Joinville - Orquidário 3	<i>Pleurothallis</i> sp.
-	84	Joinville – coleção particular	<i>Coelogyne</i> sp.
-	85	Joinville – Orquidário 4	Orquídea não identificada
-	86	Joinville - Orquidário 4	Orquídea não identificada
+	87	Joinville - Orquidário 4	<i>Laelia purpurata</i>
+	88	Joinville - Orquidário 4	<i>Cattleya intermedia</i>
+	89	Joinville – coleção particular	Orquídea não identificada
+	90	Joinville – coleção particular	Orquídea não identificada
-	91	Florianópolis - Praia Mole	Orquídea não identificada
-	92	Florianópolis - Praia Mole	Orquídea não identificada
-	93	Florianópolis - Praia Mole	Orquídea não identificada
-	94	Garuva – Orquidário 5	<i>Coelogyne</i> sp.
+	95	Garuva - Orquidário 5	Orquídea não identificada
+	96	Garuva - Orquidário 5	Orquídea não identificada

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
+	97	Garuva - Orquidário 5	Orquídea não identificada
+	98	Garuva - Orquidário 5	Orquídea não identificada
+	99	Garuva - Orquidário 5	Orquídea não identificada
+	100	Garuva - Orquidário 5	<i>Dendrobium</i> sp.
-	101	Lavras	<i>Heoteodiria gendivides</i>
-	102	Lavras	<i>Paphiopedilum</i> sp
-	103	Lavras	<i>Cattleya</i> sp.
-	104	Lavras	<i>Epidendrum</i> sp.
-	105	MS - Campo Grande	<i>Laelia</i> sp.
+	106	MS - Campo Grande	<i>Laelia</i> sp.
-	107	AM – Manaus	<i>Laelia</i> sp.
-	108	PR - Foz do Iguaçu	Orquídea não identificada
-	109	PR - Foz do Iguaçu	Orquídea não identificada
-	110	AM – Manaus	Orquídea não identificada
+	111	PR-Curitiba	Orquídea não identificada
-	112	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	113	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	114	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	115	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	116	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	117	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	118	MG - Patos de Minas	Orquídea não identificada
-	119	Orquidário ESALQ	<i>Prostachea brassavola</i>
-	120	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
+	121	Orquidário ESALQ	<i>Phaius grandiflora</i>
-	122	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea</i> sp.
+	123	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea auriculigerum</i>
+	124	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea prismatocarpum</i>
+	125	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea</i> sp.
-	126	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea brassavola</i>
+	127	Orquidário ESALQ	<i>Prostechea</i> sp.
+	128	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria</i> sp.
-	129	Orquidário ESALQ	<i>Hormidium pseudofragrans</i>
-	130	Orquidário ESALQ	<i>H. pseudofragrans</i>
-	131	Orquidário ESALQ	<i>Prostechia inversans</i>
+	132	Orquidário ESALQ	<i>Prostechia calamari</i>
-	133	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
-	134	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria mosenii</i>
+	135	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria subulata</i>
-	136	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria acicularis herbert</i>
+	137	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria valenzuelana</i>
-	138	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria valenzuelana</i>
+	139	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria valenzuelana</i>
+	140	Orquidário ESALQ	<i>Maxillaria valenzuelana</i>
-	141	Orquidário ESALQ	<i>M. lilaceae</i>
-	142	Orquidário ESALQ	<i>M. pachyphylla</i>
-	143	Orquidário ESALQ	<i>M. picta</i>
-	144	Orquidário ESALQ	<i>M. pachyphylla</i>

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(continua)

OFV	Amostra	Local	Gênero
-	145	Orquidário ESALQ	<i>Jumellea</i> sp.
-	146	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia</i> sp.
-	147	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia</i> sp.
-	148	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
-	149	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia</i> sp.
-	150	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia</i> sp.
-	151	Orquidário ESALQ	<i>Encyclia cyperifolia</i>
-	152	Orquidário ESALQ	<i>Xylobium brachystachyum</i>
-	153	Orquidário ESALQ	Orquídea não identificada
-	154	Orquidário ESALQ	<i>Coelogyne</i> sp.
-	155	Prof. Jorge	<i>Phalaenopsis</i> sp.
+	156	Costa Rica – San Jose	<i>Trichopilia</i> sp.
-	157	Costa Rica – San Jose	<i>Trichopilia</i> sp.
-	158	Costa Rica – San Jose	<i>Cymbidium</i> sp.
+	159	Costa Rica – San Jose	<i>Cymbidium</i> sp.
+	160	SP-Atibaia	Orquídea não identificada
+	161	SP-Atibaia	Orquídea não identificada
-	162	Colômbia	Orquídea não identificada
+	163	Atibaia	<i>Cymbidium</i> sp.
-	164	Maringá	<i>Cattleya</i> sp.
-	165	Maringá	<i>Octomeria</i> sp.
-	166	Maringá	<i>Bifrenaria tetrágona</i>
-	167	Maringá	<i>Cattleya intermédia</i>
-	168	Maringá	<i>Cattleya</i> sp.

Anexo 1 – Lista das orquídeas testadas para OFV-N

(conclusão)

OFV	Amostra	Local	Gênero
-	169	Maringá	<i>Dendrobium</i> sp.
-	170	Maringá	<i>Epidendrum paniculatum</i>
+	171	Austrália - Canberra	<i>Cymbidium</i> híbrido
+	172	Austrália - Canberra	<i>Dendrobium</i> híbrido

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)