



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Priscilla Carvalho Farias

Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpinifolia*.

Brasília DF - 2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - TCC

Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpinifolia*.

Estudante: Priscilla Carvalho Farias 08/38659

Linha de pesquisa: Vírus em espécies florestais

Orientador: Rita de Cássia Pereira Carvalho

Co-orientadora: Rosana de Carvalho Cristo Martins

Trabalho Final apresentado ao Departamento de Engenharia Florestal da Universidade de Brasília, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro Florestal.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA FLORESTAL

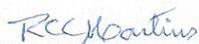
Priscilla Carvalho Farias

Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus* e estudos de caracterização de vírus em *Mimosa caesalpinifolia*.

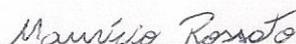
Trabalho Final apresentado como parte obrigatória para obtenção do grau de Engenheiro Florestal

Menção: SS

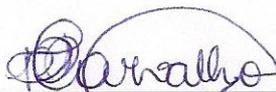
Aprovada por:



Profa. Doutora Rosana de Carvalho
Cristo Martins
Departamento de Eng. Florestal
(UnB - Comissão avaliadora)



Doutorando Mauricio Rossato
(UnB - Comissão avaliadora)



Doutora Rita de Cassia Pereira Carvalho
Departamento de Fitopatologia
(UnB - Orientador)

Brasília, DF, 28 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me permitiu realizar este trabalho.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, me aconselharam, me ouviram, me aguentaram e me ajudaram com os experimentos, com o raciocínio ou simplesmente me compreendendo. Este trabalho não existiria sem eles. Obrigada!

Ao meu irmão que sempre me ajudou e apoiou quando precisei com palavras otimistas.

À minha prima Nayara, quase irmã, por estar sempre presente na minha vida e por me escutar sempre e me entender nesses 5 anos e meio.

Ao André, ao Érico e à Carol do laboratório de Fitopatologia que me ajudaram muito na realização do trabalho, com seus conhecimentos e ajudas concretas.

À minha orientadora e amiga Rita de Cássia que sempre acreditou em mim e dispôs do seu tempo para me ensinar, sempre com atenção.

À todos os meus amigos mais próximos de curso que estiveram sempre presentes nesta formação, nas aulas, nos trabalhos, nas menções, nas alegrias e nos dramas.

Aos funcionários da Estação Experimental de Biologia da UnB, que me auxiliaram na realização e manutenção dos experimentos.

A todos os professores do departamento de Engenharia Florestal e do Instituto de Biologia que foram responsáveis pela minha formação.

Ao Silomar da NOVACAP que cedeu mudas para o projeto.

À pesquisadora Mirtes que me ajudou com os antissoros e com os inóculos.

RESUMO

A biodiversidade do Cerrado Brasileiro é muito grande e espécies florestais originárias deste Bioma tem grande potencial econômico. Tais espécies, entretanto, podem ser reservatórios de vírus fitopatogênicos, responsáveis por grandes perdas em diversas culturas de interesse agrônomo. Desta forma, novas informações encontradas em plantas deste Bioma, referentes à interação entre patógenos e hospedeiras, são de grande importância, principalmente para o conhecimento de novas hospedeiras de vírus de plantas, informação esta, bastante escassa na literatura. Além disso, essas plantas apresentam potencial para uso em programas de melhoramento genético via transgenia, visando a resistência a fitopatógenos. Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação do tipo de resposta e o potencial de algumas espécies florestais como hospedeiras de espécies de gêneros de vírus economicamente importantes. Espécies de *Potyvirus* (*Potato virus Y* - PVY) e de *Tospovirus* (*Groundnut ringspot virus* - GRSV; e *Tomato spotted wilt virus* - TSWV) foram inoculadas mecanicamente via extrato vegetal tamponado. Os ensaios foram realizados em três épocas diferentes usando 22 espécies florestais do Cerrado. No primeiro e terceiro ensaio foram utilizadas mudas provenientes de sementeiras de 9 espécies distintas com duas repetições para cada espécie. No segundo, quarto, quinto e sexto ensaios, mudas provenientes da FAL (Fazenda Água Limpa), e Viveiro IV da NOVACAP de mais 13 espécies foram utilizadas, sendo cada espécie com três repetições. Foram inoculadas nos ensaios 2 amostras de cada espécie. Como controles negativos, foram usadas amostras das mesmas espécies, sem inoculação. Os ensaios foram avaliados a cada 10 dias. A detecção dos vírus foi feita através de sintomas e de anticorpos policlonais por meio de Dot-Blot. Conforme análise, as amostras em laboratório, *Chorisia speciosa*, *Ingas laurina*, *Lafoensia pacari* e *Schinus terebinthifolius* mostraram-se positivas para GRSV; *Chorisia speciosa*, *Hymenaea stignocarpa*, *Kielmeyera coreacea* e *Lafoensia pacari* mostraram-se positivas para TSWV; e *Eriotheca pubescens* e *Ingas laurina* para PVY. Sendo *Ingas laurina*, *Kielmeyera coreacea*, e *Lafoensia pacari* assintomáticas e *Enterolobium gummiferum*, *Pterogyne nitens*, *Solanum lycocarpum* e *Tabebuia avellanedae* apenas sintomáticas para GRSV, GRSV, TSWV e PVY, respectivamente. Ao final desse trabalho foram obtidas 11 espécies florestais como potenciais hospedeiras dos vírus citados. São elas: *Chorisia speciosa*, *Enterolobium gummiferum*, *Eriotheca pubescens*, *Hymenaea stignocarpa*, *Ingas laurina*, *Kielmeyera coreacea*, *Pterogyne nitens*, *Lafoensia pacari*, *Schinus terebinthifolius*, *Solanum lycocarpum* e *Tabebuia avellanedae*. Verificou-se com isso que plantas nativas do Cerrado e espécies florestais de interesse econômico apresentam grande potencial como reservatório de vírus, o que pode influenciar na distribuição e manutenção de isolados virais de importância agrônoma, que possa, futuramente, também se tornar importantes no meio de produção florestal. Por outro lado, foi possível detectar *Begomovirus* na espécie *Mimosa caesalpinifolia*, sendo que os estudos de caracterização do vírus estão sendo conduzidos, apresentando-se um trabalho com grande potencial para estudos posteriores, principalmente levando-se em conta a ausência de estudos de caracterização viral em espécies florestais.

Palavras-chave:

Cerrado, *Potyvirus*, *Tospovirus*, *Begomovirus*, ELISA, inoculação mecânica.

ABSTRACT

The biodiversity of the Brazilian Cerrado is very large and forest species originating in this biome has great economic potential. These species, however, can be reservoirs of pathogenic viruses, responsible for major losses in many crops of agronomic interest. Thus, new information found in plants of this biome, referring to the interaction between pathogens and hosts, are of great importance, especially for knowledge of new host plant viruses, this information, rather scarce in the literature. Furthermore, these plants have potential for use in breeding programs via transgenesis, aiming resistance to plant pathogens. This study aimed to evaluate the type of response and the potential for some forest species as hosts of species of economically important virus genera. *Potyvirus* species (*Potato virus Y*-PVY) and *Tospovirus* (*Groundnut ringspot virus* - GRSV, and *Tomato spotted wilt virus* - TSWV) were mechanically inoculated via plant extract buffered. The tests were conducted at three different times using 22 tree species of the Cerrado. In the first and third tests were used seedlings from seed of 9 different species with two replicates for each species. In the second, fourth, fifth and sixth trials, seedlings from the FAL (Fazenda Água Limpa), and IV Viveiro NOVACAP another 13 species were used, each species with three replications. Were inoculated on two samples of each test species. As negative controls, we used samples from the same species, without inoculation. The tests were evaluated every 10 days. Virus detection was performed by symptoms and polyclonal antibodies by Dot-Blot. According to analysis, the samples in the laboratory, *Chorisia speciosa*, *Ingas laurina*, *Lafoensia pacari* and *Schinus terebinthifolius* were positive for GRSV; *Chorisia speciosa*, *Hymenaea stignocarpa*, *Kielmeyera coreacea* and *Lafoensia pacari* were positive for TSWV, and *Eriotheca pubescens* and *Ingas laurina* to PVY. Being *Ingas laurina*, *Kielmeyera coreacea* and *Lafoensia pacari* asymptomatic and *Enterolobium gummiferum*, *Pterogyne nitens*, *Solanum lycocarpum* and *Tabebuia avellanedae* only for symptomatic GRSV, GRSV, TSWV and PVY, respectively. At the end of this work were obtained 11 forest species as potential hosts of the viruses mentioned. They are: *Chorisia speciosa*, *Enterolobium gummiferum*, *Eriotheca pubescens*, *Hymenaea stignocarpa*, *Ingas laurina*, *Kielmeyera coreacea*, *Pterogyne nitens*, *Lafoensia pacari*, *Schinus terebinthifolius*, *Solanum lycocarpum* and *Tabebuia avellanedae*. It is with this that the Cerrado native plants and forest species of economic interest have great potential as a reservoir of virus, which may influence the distribution and maintenance of viral isolates of agronomic importance, which may in future also become important in the middle forest production. Moreover, it was possible to detect the species *Begomovirus* in *Mimosa caesalpiniiifolia*, and the virus characterization studies are being conducted, presenting a job with great potential for further studies, mainly me taking account of the absence of studies characterizing viral in forest species.

Keywords:

Cerrado, Potyvirus, Tospovirus, Begomovirus, ELISA, mechanical inoculation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Importância econômica das espécies florestais do Cerrado.....	19
2.2. Vírus de plantas.....	19
2.3. Gêneros <i>Potyvirus</i> , <i>Tospovirus</i> e <i>Begomovirus</i>	21
2.4. Detecções e estudos realizados com vírus em espécies florestais.....	22
3. CAPÍTULO 1. Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros <i>Potyvirus</i> e <i>Tospovirus</i>	24
3.1. INTRODUÇÃO.....	25
3.2. OBJETIVOS.....	25
3.2.1. Geral.....	25
3.2.2. Específico.....	25
3.3. HIPÓTESE.....	25
3.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.4.1. Área do estudo.....	26
3.4.2. Espécies virais utilizadas.....	26
3.4.3. Inoculações mecânicas.....	26
3.4.4. Detecção por sorologia.....	31
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
3.5.1. Sintomas observados.....	31
3.5.1.1. Sintomas observados nos controles positivos.....	31
3.5.1.2. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV (<i>Groundnut ringspot virus</i>).....	33
3.5.1.3. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com TSWV (<i>Tomato spotted wilt virus</i>).....	36
3.5.1.4. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com PVY (<i>Potato virus Y</i>).....	37
3.5.2. Sorologia.....	37
3.5.2.1. Sorologia e análise de membrana para TSWV.....	39
3.5.2.2. Sorologia e análise de membrana para GRSV.....	40

3.5.2.3. Sorologia e análise de membrana para PVY.....	42
3.5.2. Discussão.....	43
3.6. CONCLUSÕES.....	48
4. CAPÍTULO 2. Estudos preliminares de caracterização de um vírus encontrado em <i>Mimosa caesalpinioidea</i>	49
4.1. INTRODUÇÃO.....	51
4.2. OBJETIVOS.....	50
4.2.1. Geral.....	50
4.2.2. Específico.....	50
4.3. HIPÓTESE.....	51
4.4 METODOLOGIA.....	51
4.4.1. Origem da amostra.....	51
4.4.2. Ensaios de caracterização viral.....	51
4.4.2.1. Biológicos.....	51
4.4.2.2. Moleculares.....	52
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.5.1. Inoculação mecânica.....	52
4.5.2. Análise molecular.....	53
4.5.3. Discussão.....	55
4.6. CONCLUSÕES.....	56
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
6. ANEXO 1.....	64
7. ANEXO 2.....	71

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com com GRSV (<i>Groundnut ringspot virus</i>), e TSWV (<i>Tomato spotted wilt virus</i>) e PVY (<i>Potato virus Y</i>).....	20
Figura 2. Listagem das espécies florestais utilizadas no trabalho.....	27
Figura 3 Listagem das espécies florestais utilizadas no trabalho.....	28
Figura 4. Ilustrações de controles positivos para GRSV, TSWV e PVY.....	32
Figura 5. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV (<i>Groundnut ringspot virus</i>).....	34
Figura 6. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV.....	35
Figura 7. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV).....	36
Figura 8. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com PVY (<i>Potato vírus Y</i>).....	37
Figura 9. Membrana de sorologia feita para o ensaio 2 com plantas inoculadas com TSWV (<i>Tomato spotted wilt vírus</i>).....	40
Figura 10. Membranas de sorologia feita para o ensaio 4 com plantas inoculadas com vírus GRSV (<i>Groundnut ringspot vírus</i>).....	41
Figura 11 Membrana de sorologia feita para o ensaio 6 com plantas inoculadas com o vírus GRSV (<i>Groundnut ringspot vírus</i>).	42
Figura 12. . Membrana de sorologia feita para o ensaio 5 com plantas inoculadas com o vírus PVY (<i>Potato vírus Y</i>).....	43
Figura 13. Membrana de sorologia feita para o ensaio 5 com plantas inoculadas com o vírus PVY (<i>Potato vírus Y</i>).....	43
Figura 14. . Ilustração de amostras sintomáticas e negativas para sorologia.....	45
Figura 15. Amostras positivas para sintomas e sorologia.....	47

CAPÍTULO 2

Figura 1. Gel de DNA presente em amostras duplicadas de <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	51
Figura 2. Gel de RCA do DNA da amostra de <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	53
Figura 3. Gel de RCA do DNA da amostra de <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	54
Figura 4. Resultado de PCR para o par de primers PAL-PAR para Begomovirus.....	54
Figura 5. Gel de purificação de DNA.....	55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Vírus relatados em florestas (Nienhaus & Castello, 1989; com adaptações).....**15**
- Tabela 2.** Espécies florestais utilizadas e espécies virais inoculadas ao longo dos ensaios realizados durante o período de Janeiro de 2011 a Janeiro de 2012.....**28**
- Tabela 3.** Cronograma dos ensaios realizados, bem como as espécies utilizadas, o número de amostras, a proveniência das mudas e dos antissoros utilizados.....**29**
- Tabela 4.** Resultados obtidos via Dot-Blot ELISA em amostras testadas com antissoros para detecção de *Tomato spotted wilt vírus* (TSWV); *Groundnut ringspot vírus* (GRSV) e *Potato vírus Y* (PVY).**38**
- Tabela 5.** Espécies retiradas da Tabela 2 que apresentaram resultado positivo para TSWV, GRSV e PVY, bem como suas famílias, citadas para comparação.....**39**
- Tabela 6.** Tabela de comparações entre as amostras positivas na sorologia e os sintomas observados.....**48**

1. INTRODUÇÃO

Constituindo o segundo maior bioma da América do Sul com mais de 2 milhões de Km², o Cerrado abrange os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Tocantins, bem como partes de outros Estados brasileiros (Ribeiro & Walter, 1998). O Bioma Cerrado constitui a maior savana tropical do mundo em termos de diversidade de espécies vegetais, que pode estar associada a grande diversidade de outros micro-organismos, como bactérias, nematoides e vírus, ainda pouco estudados. De acordo com Hawksworth (1991, 2001), considerando-se a grande diversidade presente nos trópicos, para cada espécie de planta vascular associam-se de seis a oito fungos.

Considera-se, ainda no Cerrado cerca de 44% de suas espécies de plantas lenhosas como endêmicas (Klink & Machado, 2005). Este Bioma ocupa 12% da flora brasileira (Ribeiro & Walter, 1998) e possui diversidade estimada em cerca de 10000 espécies de angiospermas, 1000 pteridófitas, 2000 briófitas e 2000 algas, totalizando em torno de 15000 espécies de plantas, sendo 4400 endêmicas (IBAMA, 2011).

Um grande número de espécies do Cerrado destaca-se pelo potencial de uso econômico visto que muitas delas podem vir a ser domesticadas e cultivadas como fruteiras ou medicinais. As espécies florestais constituem também grandes ganhos na economia com sua exploração, aumentando a geração de emprego e melhorando a qualidade de vida da população (Ferreira e Galvão, 2000). A atividade florestal no Brasil tem importância econômica e social. Através de espécies florestais podem-se obter produtos comerciáveis como papel, celulose, madeira e fibras, óleos essenciais e resinas (Tzfira *et al.*, 1998; Mora & Garcia, 2000; Carpanezzi, 2000).

O melhoramento genético em espécies florestais é mais satisfatório quando há a introdução controlada de genes exógenos nessas espécies, através de técnicas biotecnológicas, e garante ganhos expressivos na qualidade final dos produtos, pois há maior homogeneidade e direcionamento das propriedades da matéria-prima, bem como resistência a determinadas doenças (Sartoretto *et al.*, 2008), como “damping-off”, podridões de raiz e doenças da copa (Krugner, 1977).

A produção de espécies florestais requer controle e cuidados. Os principais problemas no cultivo de espécies florestais em ambientes tropicais são as formigas cortadeiras e os lepidópteros desfolhadores (Zanúncio *et al.*, 1992; 1993; Della Lucia, 1996), bem como os coleópteros (Gray, 1972). Há ainda doenças causadas por fungos, nematoides, bactérias e vírus; este último, em fitopatologia, induz sintomas na planta infectada, que, por definição é a

reação da planta ao agente nocivo (Bergamin Filho *et al.*, 1995) e é responsável por perdas significativas na área de produção agrônômica. Tais infecções comprometem a produtividade se não forem estudados, analisados e controlados (Ferreira, 1989).

De acordo com Nienhaus & Castello (1989), no norte da Europa e na América do Norte, os estudos sobre vírus em espécies florestais encontram-se mais avançados, sendo que vários relatos já foram feitos em espécies presentes na Alemanha, Finlândia e Rússia (**Tabela 1**). A grande maioria destas espécies listadas é conhecida por causarem doenças em importantes culturas de importância agrônômica, no entanto, no Brasil e no bioma Cerrado estes estudos ainda são escassos. Este quadro se repete na Ásia, África e no hemisfério sul, onde, até o momento pouco se conhece sobre a distribuição de vírus em florestas.

Tabela 1. Vírus relatados em florestas (Nienhaus & Castello, 1989; com adaptações).

Espécie Florestal	Vírus	Referência
<i>Abies alba</i>	Partículas icosaédricas/hastes rígidas	Frenzel (1987)
<i>Acer</i> spp	<i>Arabid mosaic virus</i>	Thomas (1970)
	<i>Maple leaf perforation virus</i>	Subikova (1973); Blattny (1965)
	<i>Maple mosaic virus</i>	Szirmai (1972)
<i>Acer negundo</i>	<i>Maple mosaic virus</i>	Szirmai (1972)
<i>Acer rubrum</i>	<i>Peach rosette virus</i>	Kenknight (1960)
<i>Acer saccharum</i>	<i>Tobamovirus</i>	Lana <i>et al.</i> (1980)
<i>Aesculus</i> spp	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	Schmelzer & Schmidt (1967); Sweet & Barbara (1979)
<i>Betula</i> spp	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Cooper (1979)
<i>Betula verrucosa</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>	Cooper & Massalski (1984)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Cooper & Atkinson (1975); Hamacher (1986); Hachamer <i>et al.</i> (1987)
	<i>Prune dwarf virus</i>	Cooper & Massalski (1984)
<i>Betula pubescens</i>	Partículas	Cooper (1979)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Cooper & Atkinson (1975)
<i>Betula pendula</i>	<i>Cherry leafroll virus</i>	Schimanski <i>et al.</i> (1980); Schmelzer (1972)
<i>Betula nigra</i>	<i>Prunus necrotic ringspot</i>	Cooper & Massalski (1984)
	<i>Prune dwarf virus</i>	Cooper & Massalski (1984)
<i>Betula alleghaniensis</i>	<i>Apple mosaic virus</i>	Gotlieb (1975); Gotlieb & Berbee (1973); Hardcastle & Gotlieb (1980)
	Vírus latente	Gotlieb (1974)
<i>Betula papyrifera</i>	<i>Apple mosaic virus</i>	Gotlieb (1974); Gotlieb & Berbee (1973)
	<i>Prune dwarf virus</i>	Cooper & Massalski (1984)
<i>Castanea sativa</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Horváth <i>et al.</i> (1975)
<i>Cercis</i> sp	Partículas	Kim & Martin (1978)
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	<i>Aarabis mosaic virus</i>	Harrison (1960)
<i>Corynocarpus laevigatus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Ashby (1977)
<i>Cupressus arizonica</i>	<i>Tobacco ringpot virus</i>	Fulton (1969)
<i>Eucalyptus citridodora</i>	Partículas/hastes rígidas	Sastry <i>et al.</i> (1971)
<i>Eucalyptus macrorhyncha</i>	Partículas icosaédricas	Brzostowski & Grace (1974)
<i>Fagus sylvatica</i>	<i>Tomato blackring virus</i>	Schmelzer <i>et al.</i> (1966)
	<i>Potex/Potyvirus</i>	Nienhaus <i>et al.</i> (1985)
	<i>Potato virus X</i>	Winter & Nienhaus (1989)
	<i>Potex virus</i>	Winter & Nienhaus (1989)
	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Winter & Nienhaus (1989)

	<i>Cherry leafroll virus</i>	Barnett (1971); Winter & Nienhaus (1989)
	<i>Brome mosaic virus</i>	Barnett (1971); Winter & Nienhaus (1989)
	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Buttner & Nienhaus (1989)
<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Casalicchio (1965)
	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	Cooper (1975); Cooper & Sweet (1976)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Nienhaus & Hamacher (1989)
	Partículas	Ciferri et al (1961)
<i>Fraxinus americana</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Castello et al (1984); Ferris et al (1989); Lana & Agrios (1974)
	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	Cooper & Sweet (1976)
	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Castello et al (1984); Ferris et al (1989); Hibben (1966); Hibben & Hagar (1975)
	<i>Tomato ringspot virus</i>	Ferris et al (1987); Ferris et al (1989); Hibben & Reese (1983); Hibben et al (1988)
<i>Fraxinus holotricha</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Amico et al (1985); Castello et al (1983)
	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Amico et al (1985);
<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Ferris et al (1987); Ferris et al (1989);
	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Ferris et al (1987); Ferris et al (1989);
	<i>Tomato ringspot virus</i>	Ferris et al (1987); Ferris et al (1989);
<i>Juglans sp</i>	<i>Cherry leafroll virus</i>	Cooper (1980); Massalski & Cooper (1984); Mircetich & Rowhani (1984); Mircetich et al (1980); Rowhani et al (1985)
	<i>Walnut ringspot virus</i>	Savino et al (1976)
	<i>Walnut yellow mosaic virus</i>	Savino et al (1976)
<i>Larix decidua</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Buttner & Nienhaus (1989)
<i>Picea abies</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Buttner & Nienhaus (1989)
	<i>Potyvirus</i>	Nienhaus (1985)
	Partículas icosaédricas/hastes rígidas	Cech et al (1961); Frenzel (1987); Biddle & Tinsley (1968)
	Partículas/hastes rígidas e flexíveis	Gugerli et al (1986)
<i>Picea sitchensis</i>	<i>Tomato blackring virus</i>	Harrison (1960)
	Partículas/hastes rígidas	Biddle & Tinsley (1968)

<i>Pinus monticola</i>	<i>Partículas/hastes rígidas</i>	Biddle & Tinsley (1968)
<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Scots pine mosaic virus</i>	Schmelzer et al (1966)
	<i>Partículas/hastes rígidas</i>	Biddle & Tinsley (1968)
	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Buttner & Nienhaus (1989)
	<i>Apple mosaic virus</i>	Sweet (1980); Sweet & Barbara (1979)
<i>Paulownia</i> sp	<i>Partículas/hastes rígidas</i>	Hung et al (1981)
		Biddle & Tinsley (1971); Boccardo et al (1973); Brzak & Blatny (1962); Luisoni et al (1976); Schmelzer (1966)
<i>Populus</i> spp	<i>Poplar mosaic virus</i>	Navratil (1981)
	<i>Rhabdovirus</i>	Martin et al (1982)
	<i>Potyvirus</i>	Cooper & Sweet (1976)
	<i>Tomato blackring virus</i>	Cooper & Sweet (1976)
	<i>Tobacco rattle virus</i>	Cooper & Sweet (1976)
	<i>Arabis mosaic virus</i>	Cooper & Sweet (1976)
	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Castello & Berbee (1978); Hibben et al (1979)
<i>Prunus avium</i>	<i>Prunus necrotic ringspot</i>	Fulton (1970)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Schimanski & Funk (1968)
	<i>Petunia asteroid mosaic virus</i>	Gruntzig et al (1989)
<i>Prunus padus</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	Schimanski et al (1975)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Schimanski et al (1975)
<i>Prunus serotina</i>	<i>Prune dwarf virus</i>	Schimanski et al (1976)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Schimanski & Funk (1968)
<i>Prunus pensylvanica</i>	<i>Prunus necrotic ringspot virus</i>	Cation (1952); Fulton (1970)
	<i>Prune dwarf virus</i>	Megahed & Moore (1967); Megahed & Moore (1969)
		Nienhaus & Yarwood (1972); Yarwood (1971); Yarwood & Hecht-Poinar (1973)
<i>Quercus</i> spp	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Schmelzer et al (1966)
	<i>Partículas/hastes rígidas</i>	Schmelzer et al (1966)
<i>Quercus robur</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Nienhaus (1975)
	<i>Potex/Potyvirus</i>	Nienhaus (1985)
	<i>Tobacco necrosis virus</i>	Buttner & Nienhaus (1989)
	<i>Partículas icosaédricas</i>	Nienhaus (1985)
<i>Quercus petraea</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Nienhaus (1975)
	<i>Potex/Potyvirus</i>	Nienhaus (1985)
	<i>Partículas icosaédricas</i>	Nienhaus (1985)
<i>Quercus cerris</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Horváth et al (1975)
		Kim & Fulton (1973); Barnett (1971)
<i>Quercus marilandica</i>	<i>Partículas/ hastes flexíveis</i>	Kim & Fulton (1973)
<i>Quercus velutina</i>	<i>Partículas/hastes flexíveis</i>	Kim & Fulton (1973)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Kovachevsky (1968)

	<i>Robinia true mosaic virus</i>	Schmelzer (1966); Schmelzer (1971)
	<i>Tomato blackring virus</i>	Milinko & Schmelzer (1961); Schmelzer (1963)
	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	Schmelzer (1968)
	Partículas icosaédricas	Fulton & Kim (1973)
<i>Sorbus aucuparia</i>	<i>Apple mosaic virus</i>	Schmelzer (1977)
	<i>Apple chlorotic leafspot virus</i>	Sweet (1980)
	<i>Stem pitting virus</i>	Sweet (1980)
		Jones (1974); Jones & Mayo (1973); Schmelzer (1969); Schmelzer et al (1966)
<i>Ulmus spp</i>	<i>Elm mottle virus</i>	
	<i>Arabis mosaic virus</i>	McNamara (1980)
	<i>Potyvirus</i>	Schmelzer et al (1966)
	<i>Cherry leafroll virus</i>	Ford et al (1972); Fulton & Fulton (1970); Jones (1973)
	<i>Tobacco ringspot virus</i>	Shiel & Castello (1985)
		Varney & Moore (1952); Varney & Moore (1965)
	<i>Tomato ringspot virus</i>	

Vírus são importantes patógenos de plantas. Característicos pela natureza obrigatória do seu parasitismo, estes organismos podem causar sérias doenças em plantas. Neste contexto, os gêneros *Tospovirus* e *Potyvirus*, ambos compostos de RNA e transmitidos de uma planta a outra via vetores e por inoculação mecânica, constituem importantes gêneros de vírus, que tem potencial de dizimar culturas inteiras de espécies economicamente importantes, apresentando grande gama de hospedeiras, distribuídas nas principais regiões produtoras do país e do mundo (Ávila *et al.* 2004; Dianese *et al.*, 2008; Inoue-Nagata *et al.*, 2002). Segundo Riechman *et al.* (1992), espécies de *Potyvirus* são muito importantes e infectam grande gama de hospedeiras, já o gênero *Tospovirus* faz parte da família *Bunyaviridae*, e é o único desta família que infecta plantas. Outro gênero importante para a agricultura é o *Begomovirus*, que contém 196 espécies relatadas (ICTV, 2011) e apresentam genoma composto por DNA de fita simples encapsidado separadamente em duas partículas, transmitidos de forma natural pelo vetor *Bemisia tabaci*, também conhecido como mosca-branca.

Neste contexto, o potencial deste trabalho para a obtenção de novas informações referentes à interação entre patógenos e hospedeiras é imenso, tendo em vista a escassez de estudos relativos a esse tema (Lin *et al.*, 1979; Junqueira *et al.*, 1987).

Espera-se que ao final do projeto, informações sejam geradas sobre o papel de espécies florestais, pertencentes a 14 famílias botânicas como potenciais hospedeiras de espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus*,

bem como realizar estudos preliminares de caracterização de um vírus encontrado em *Mimosa caesalpinifolia*, que auxiliarão em conhecimentos da diversidade de vírus associados a espécies florestais. Estes dados servirão de base para um projeto mais amplo, com potencial para fornecer novas fontes de resistência; contribuindo com a área de melhoramento genético; e novos dados relativos à interação entre espécies florestais e fitovírus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica das espécies florestais do Cerrado

O Cerrado limita-se como bioma desde a Caatinga, até a Mata Atlântica e a Floresta Amazônica, tendo em sua essência vegetação xeromorfa, possuindo de campo limpo a cerradão, matas de galeria e florestas estacionais (Méio *et al.*, 2003). Apesar de ser o segundo maior bioma brasileiro e ocupar cerca de 22% do território nacional, aproximadamente 37% da área total, o Cerrado perdeu a cobertura original devido aos desmatamentos ocorridos com a expansão da agricultura, da atividade florestal e da pecuária no Brasil (Oliveira *et al.*, 1998). O agronegócio destaca-se como agente indutor da economia nacional, juntamente com o desenvolvimento tecnológico do setor e a capacitação empresarial. Vale (2004) destaca que o consumo de recursos naturais e matéria-prima têm crescido significativamente com o avanço do processo de urbanização, da fronteira agrícola e da indústria.

O Cerrado, devido às suas condições edafoclimáticas e fisiográficas, tornou-se destaque no processo de reflorestamento e indústria florestal no Brasil, devido a isto, as florestas plantadas estão se tornando mais importantes ante a exploração das florestas nativas (Oliveira *et al.*, 1998), porém, a baixa fertilidade natural do solo e o déficit hídrico são fatores limitantes para a produtividade nas áreas de Cerrado. Para aumentar a produtividade e reduzir custos, adotam-se práticas silviculturais como adubação, espaçamentos mais adequados, melhoramento genético e plantios de enriquecimento em consórcio com outras atividades (Oliveira *et al.*, 1998). Além da madeira, outros produtos fazem parte da produção decorrente das florestas, como energia; chapas de fibras; papel e celulose; dormentes; moirões; estacas e madeira para construção civil; painéis de partículas; lâminas, compensados e madeira serrada (Galvão, 2000).

2. 2. Vírus de plantas

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, microscópicos, contendo apenas um tipo de ácido nucleico (RNA ou DNA) envoltos por uma capa proteica e algumas vezes lipoproteica. Os vírus induzem alterações no metabolismo e em vários processos fisiológicos das plantas. Do ponto de vista

econômico, plantas infectadas sistemicamente por vírus podem tornar-se inviáveis, devido à diminuição do crescimento, dentre outros sintomas. Os principais sintomas observados são deformações foliares e desvios de cor do tipo mosaicos, mosqueados, cloroses e amarelecimento (**Figuras 1 e 2**). A detecção viral requer uma análise detalhada dos sintomas, bem como da observação em laboratório de partículas virais (Kitajima *et al.*, 1997) acompanhado de técnicas sorológicas e moleculares.

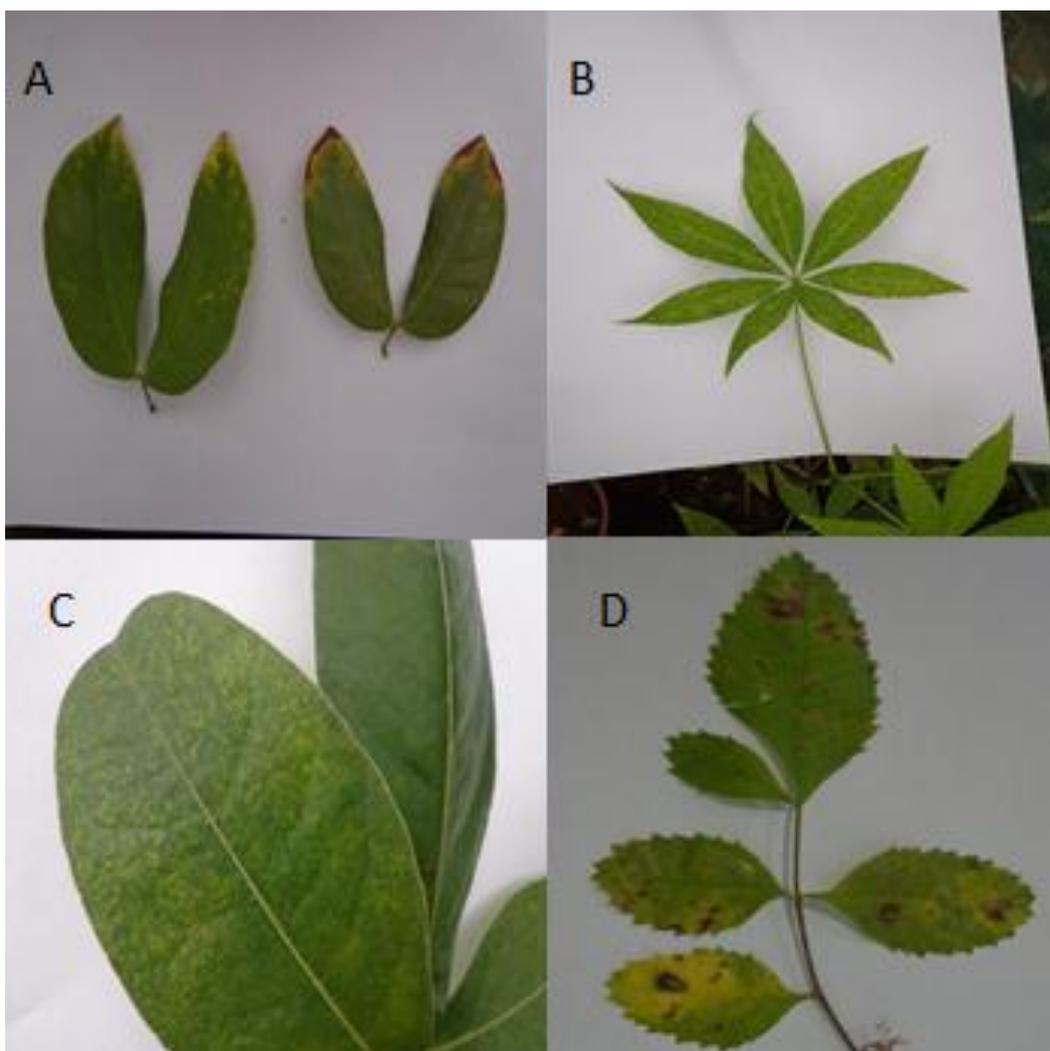


Figura 1. A-D. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV (*Groundnut ringspot virus*), e TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) e PVY (*Potato virus Y*). **A** - *Hymenaea stigonocarpa* inoculada com TSWV, com amarelecimento e necrose nas extremidades, observado 40 dias após a inoculação. **B** - *Ceiba speciosa* inoculada com GRSV, com sintomas de amarelecimento entre as nervuras, observada 3 meses após a inoculação. **C** - *Eriotheca pubescens* inoculada com GRSV, com mosqueado e pontos cloróticos, observada 30 dias após a inoculação. **D** - *Schinus terebinthifolius* inoculada com GRSV, com pontos necróticos e clorose, observada com 30 dias de inoculação.

Segundo Vicente (1979), sintomas induzidos por vírus na planta são expressões das modificações estruturais, bioquímicas e fisiológicas sofridas

pelas células; onde ocorre redução da respiração, de substâncias reguladoras de crescimento, da fotossíntese, da síntese de proteínas e aminoácidos e dos compostos fenólicos. Essas alterações são observadas nos ramos, nas folhas, flores e frutos. A expressão dos sintomas depende da constituição genotípica da hospedeira e do vírus e por fatores ambientais (Agrios, 1988).

Os vírus induzem sintomas com anomalias no crescimento e irregularidades na multiplicação e na diferenciação de células. Estas modificações ocasionam distorções nos órgãos da planta, como albinismo, clorose, nanismo, mosaico, estiolamento, roseta, bronzeamento, enação, epistasia e encarquilhamento (Bergamin Filho *et al.*, 1995).

Segundo Bergamin Filho *et al.* (1995), diferentes sintomas induzidos por um vírus numa mesma planta, ou em hospedeiras diversas contribuem para identificação de um vírus. Um vírus pode ser especialista em determinadas espécies ou variedades de uma mesma espécie. Tal especialidade, associada ao tipo de sintoma produzido pode ser útil para caracterização de fitovírus, entretanto vale lembrar que para a diagnose correta é necessário que outros testes sejam realizados.

A determinação da gama de hospedeiros e os sintomas exibidos por plantas infectadas são parte da caracterização biológica que contribui para a distinção de espécies e estirpes de gêneros de vírus. De acordo com Hou *et al.*, (2000), fenótipos exibidos pelas plantas quando infectadas com vírus resultam de interações entre produtos de genes virais e genes da hospedeira, podendo a adaptação e especificidade a determinadas espécies envolver proteínas virais ou elementos reguladores presentes no DNA do vírus.

Atualmente os métodos conhecidos como sorológicos (principalmente as modalidades de Elisa Direta e Indireta) e moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase e Hibridização de Ácidos Nucleicos) são muitos utilizados em laboratórios de virologia para diagnose de vírus de plantas.

2. 3. Gêneros *Potyvirus*, *Tospovirus* e *Begomovirus*.

Atualmente são reconhecidas e aprovadas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) 8 espécies de *Tospovirus* e 146 de *Potyvirus*. Hull (2002) e Riechman *et al.* (1992) destacam o gênero *Potyvirus*, que constitui 20% de todas as espécies virais que infectam plantas, que somam mais de 2 000 espécies (Berger *et al.*, 2005).

O gênero *Potyvirus* (família *Potyviridae*) apresenta partículas alongadas e flexuosas, genoma com aproximadamente 10 Kb e RNA fita simples sentido positivo. As espécies neste gênero são transmitidas através de afídeos (também conhecidos como pulgões) (Hull, 2002). A relação estabelecida entre vírus e inseto vetor é do tipo não circulativa, onde o vírus é adquirido e transmitido rapidamente de uma planta para outra. Nestes casos o

uso de inseticidas para controle do vetor não apresenta resultados eficientes, visto que muitas vezes, estes produtos estimulam as picadas feitas pelo inseto e o mesmo acaba picando mais plantas antes de morrer (Nagai, 1993).

Plantas infectadas por espécies de *Potyvirus* apresentam inclusões cilíndricas citoplasmáticas do tipo cata-ventos e que podem ser bastante úteis na diagnose quando o material é observado em microscopia de transmissão.

O gênero *Potyvirus* está representado por 146 espécies (ICTV, 2011) sendo o *Potato virus Y* (PVY) uma das espécies mais importantes, capaz de infectar solanáceas de importância econômica, incluindo a batata, o tomate e o pimentão, sendo responsável por elevado dano para a agricultura.

Espécies classificadas no gênero *Tospovirus* pertencem à família *Bunyaviridae*. O genoma é composto por três RNAs de fita simples e a morfologia da partícula viral é considerada complexa (de Ávila, 1993; Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Snippe *et al.*, 2007). A classificação do gênero *Tospovirus* baseia-se na morfologia do vírion na organização do genoma e nas características de transmissão por tripes (de Ávila *et al.*, 1993; Resende, 1995; Roselló *et al.*, 1999). Na natureza as espécies de *Tospovirus* são transmitidas por espécies de tripes (*Frankliniella* spp e *Trips* spp) (Nagata *et al.*, 1999). O gênero infecta mais de 1000 espécies de plantas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, pertencentes em mais de 82 famílias botânicas, como tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e várias espécies de plantas ornamentais (Fauquet *et al.*, 2005). Os sintomas induzidos podem ser lesões locais, clorose e necrose, bem como paralização do crescimento, arroxamento ou bronzeamento das folhas, manchas em anéis concêntricos, mosqueado e necrose intensa (Dianese, 2009).

O gênero *Begomovirus* pertence à família *Geminiviridae*. A classificação dos gêneros na família é feita com base na gama de hospedeiros, no tipo de vetor, na organização do genoma e no relacionamento filogenético (Fauquet & Stanley, 2005 e Fauquet *et al.*, 2008). Espécies de *Begomovirus* apresentam DNA circular de fita simples encapsidados em partículas geminadas de morfologia icosaédrica. Os *Begomovirus* são compostos por 192 espécies, com DNA circular de fita simples (ssDNA) com um ou dois componentes de DNA, sendo chamados de monopartidos ou bipartidos (Hull, 2002; ICTV, 2011). No Brasil, até o presente momento são relatados em tomateiro apenas espécies de *Begomovirus* bipartidos, enquanto em batata doce, são relatados *Begomovirus* monopartidos.

2.4. Detecções e estudos realizados com vírus em espécies florestais

Alguns trabalhos de detecção viral têm sido realizados para obter informações da presença dos vírus na hospedeira através dos sintomas e testes sorológicos e ou moleculares, como os ensaios realizados por Nienhaus *et al.* (1990), e identificação de *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV) e *Brome mosaic virus* (BMV) em diferentes espécies florestais,

como *Betula pendula*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Quercus robur* e *Salix burjatica*.

A presença do vírus na hospedeira foi confirmada com análises de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando primers específicos e sorologia em laboratório, como a ocorrência do vírus *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) em *Sorbus aucuparia* (Mielke & Mühlbach, 2007; Mielke *et al.*, 2008; Arndt *et al.*, 2009; Kallinen *et al.*, 2008). Foi confirmada a incidência de *Cherry leaf roll virus* (CLRV) em *Arabidopsis thaliana*, com ensaios de transmissão por enxertia e sementes e confirmação com análises de laboratório (Rumbou *et al.*, 2009).

De acordo com a observação de sintomas e análise em laboratório, o vírus *Cassia yellow blotch virus* (CYBV), que infecta *Cassia pleurocarpa* na Austrália foi devidamente descrito e sequenciado (Dale *et al.*, 1984). Veliceasa *et al.* (2006) detectaram *Cryptovirus* em espécies assintomáticas de pinheiro na Alemanha e na Hungria.

CAPÍTULO 1 - Avaliação da resposta de espécies florestais do Cerrado a espécies virais dos gêneros *Potyvirus* e *Tospovirus*.

3.1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é um rico e importante Bioma Brasileiro. Sua biodiversidade apesar de muito grande em termos de fauna e flora, ainda tem sido pouco estudada. Estudos recentes conduzidos na Universidade de Brasília (UnB) mostram dados que extrapolam a estimativa de Hawksworth, visto que dependendo da espécie hospedeira até 25 fungos por espécie podem ser encontrados (Dianese *et al.*, 1997; Chaves 1998; Dornelo-Silva, 1999; Castro, 2009; Santos, 2011). Dianese (2000) considera também de 70.000 a 100.000 espécies de fungos no bioma Cerrado. Neste contexto, estudos realizados por Santos (2011) e Souza (2011) na Universidade de Brasília têm contribuído na descrição e identificação da micobiota do Cerrado, contribuindo para o conhecimento da diversidade desses organismos no bioma. Porém, estudos para outros microrganismos como bactérias, vírus e nematoides são escassos. Esta situação permanece a mesma quando se analisa outros importantes Biomas do país.

Para América do Norte e Europa estudos revelam a presença de vírus em diversas espécies florestais. Desta forma, informações referentes a vírus presentes neste Bioma são de grande importância, destacando-se novos conhecimentos de hospedeiras de vírus de plantas.

3. 2. OBJETIVOS

3. 2.1. Geral

Avaliar o tipo de resposta de espécies florestais do Cerrado a importantes espécies virais de vírus e o potencial dessas espécies como hospedeiras de tais vírus, obter informações úteis para o melhoramento genético.

3.2.2. Específicos

- Avaliar a resposta de 22 espécies florestais frente a espécies de *Tospovirus* (*Tomato spotted wilt virus* - TSWV e *Groundnut ringspot virus* - GRSV) e *Potyvirus* (*Potato virus Y* - PVY) mediante expressão de sintomas.
- Determinar em laboratório a acumulação viral de *Tospovirus* (TSWV e GRSV) e *Potyvirus* (PVY) em 22 espécies florestais.

3.3. HIPÓTESE

Há no Cerrado Brasileiro, espécies florestais que podem funcionar como potenciais hospedeiras de vírus fitopatogênicos, como TSWV (*Tomato spotted wilt virus*), GRSV (*Groundnut ringspot virus*), e PVY (*Potato virus Y*), bem como espécies resistentes, ainda não analisadas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Área de estudo

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação na Estação Experimental de Biologia da UnB (EEB-UnB). Foram conduzidos 6 ensaios com mudas de espécies florestais ilustradas nas **Figuras 2 e 3** e listadas nas **Tabelas 2 e 3** obtidas com o auxílio do viveiro da NOVACAP e do viveiro da FAL (Fazenda Água Limpa) que cederam as mudas para o experimento. As mudas apresentaram idades entre 7 e 20 dias. As sementes utilizadas no primeiro ensaio foram gentilmente cedidas por Flávio e Milton Lima (Urutaí).

3.4.2 Espécies virais utilizadas

Neste trabalho foram utilizadas as espécies virais GRSV (*Groundnut ringspot virus*), e TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) mantidas em plantas de *Datura stramonium* e PVY (*Potato virus Y*), mantido em *Capsicum annum*. As espécies virais foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Dr. Mirtes Lima (Embrapa Hortaliças).

3.4.3 Inoculações mecânicas

Foram conduzidas inoculações mecânicas a partir da preparação feita com folhas sintomáticas das plantas suscetíveis em um tampão fosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) 0,01 M e sulfito de sódio (Na_2SO_3) 1% (P/V) em água destilada, pH 7,0 (Yarwood, 1969; Boiteux & de Ávila, 1994; Dianese 2009). O extrato foi obtido a partir da maceração das folhas em almofariz. Ao extrato adicionou-se carbureto de silício (“Carborundum”) ou Celite; e friccionou-se a solução nas superfícies abaxial e adaxial das folhas com auxílio de cotonetes. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água corrente a fim de evitar a sua queima. Para reduzir o nível de escape, seguiu-se a repetição da inoculação 10 dias depois para confirmação de resultados. A análise consistiu em comparações de sintomas com controles positivos e ausência em controles negativos.

As espécies florestais utilizadas e seus nomes populares, bem como as espécies de vírus inoculadas estão listados na **Tabela 2**.

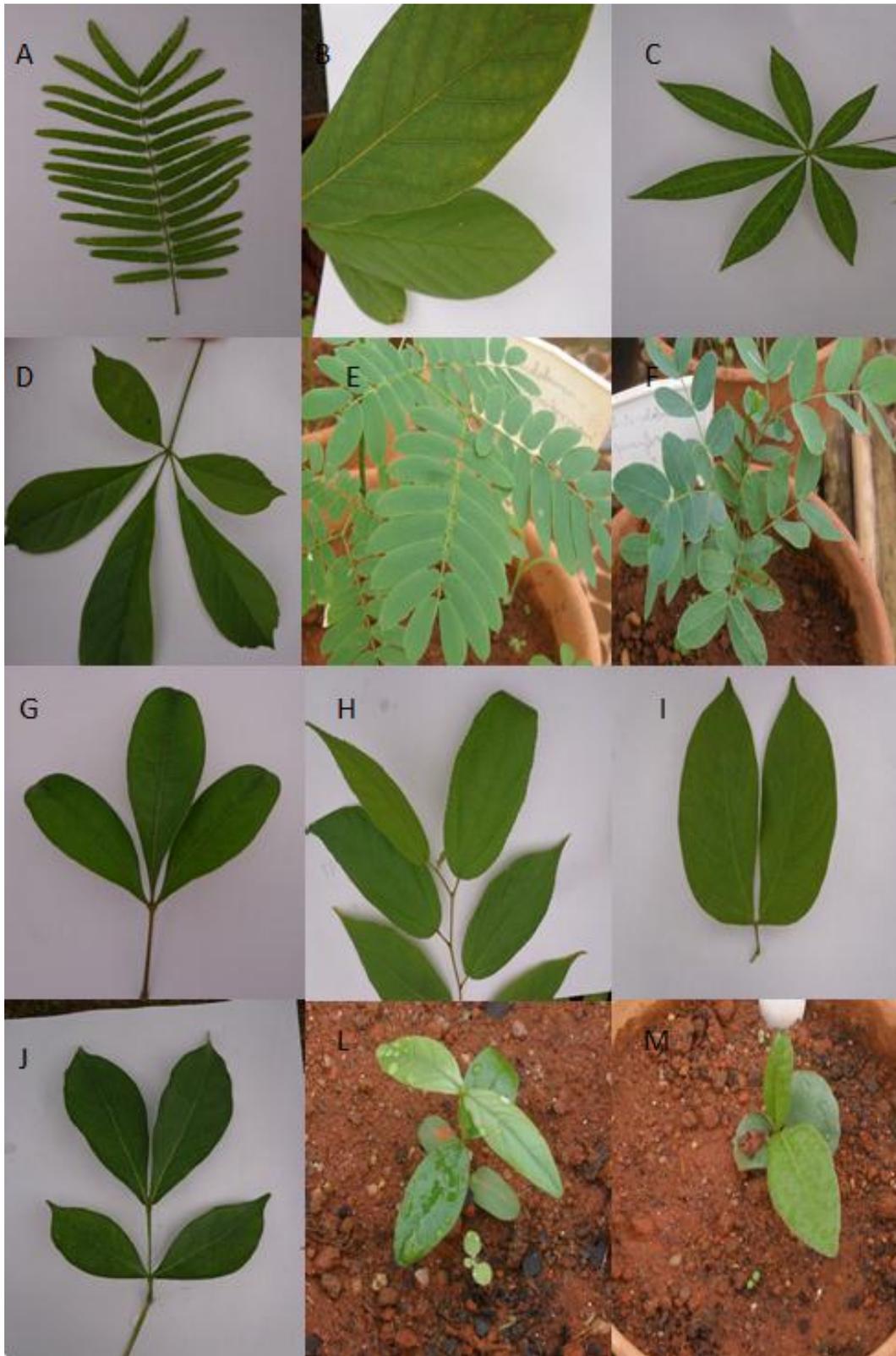


Figura 2. A-M. Listagem das espécies florestais utilizadas no trabalho. **A** - *Anadenanthera falcata* (Angico). **B** - *Annona crassiflora* (Araticum). **C** - *Ceiba speciosa* (Paineira rosa). **D** - *Cydistax antisiphilitica* (Ipê verde). **E** - *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril). **F** - *Enterolobium gummiiferum* (tamboril-do-campo). **G** - *Eriotheca pubescens* (Paineira do cerrado). **H** - *Guazuma ulmifolia* (Mutamba). **I** - *Hymenaea stigonocarpa*

(Jatobá do cerrado). **J** - *Ingas laurina* (Ingá mirim). **L** - *Kielmeyera coreacea* (Pau santo). **M** - *Lafoensia pacari* (Pacari).

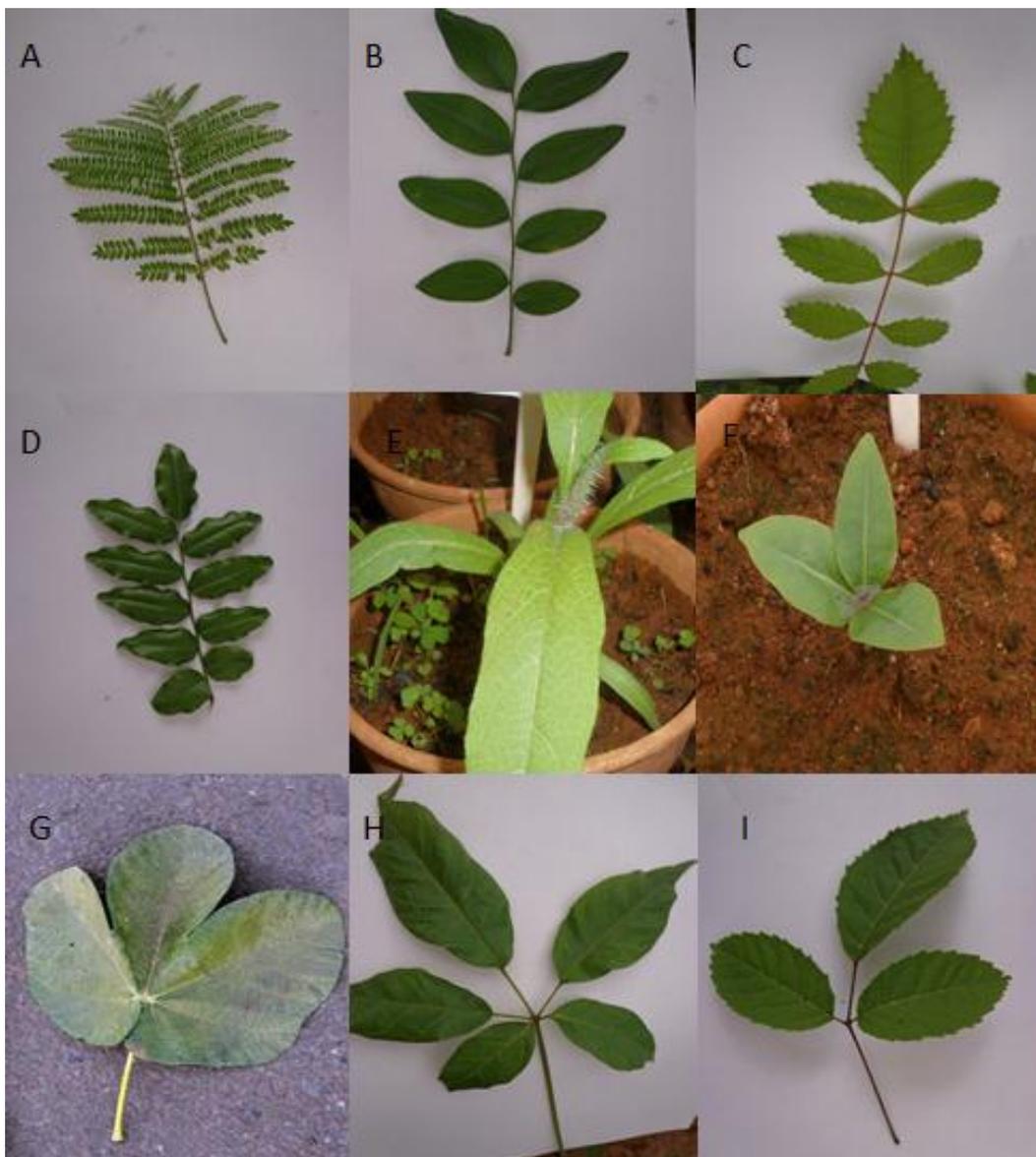


Figura 3. A-I. Listagem das espécies florestais utilizadas no trabalho. **A** - *Machaerium opacum* (Jacará do cerrado). **B** - *Pterogyne nitens* (Amendoim bravo). **C** - *Schinus terebinthifolius* (Aroeira vermelha). **D** - *Sedum dendroideum* (Bálsamo). **E** - *Solanum lycocarpum* (Lobeira). **F** - *Stenocalyx dysentericus* (Cagaita). **G** - *Sterculia striata* (Chichá do cerrado), fonte: <http://www.arvoresdf.com.br/especies/nativas/chica.htm>. **H** - *Tabebuia avellaneda* (Ipê roxo). **I** - *Tabebuia impetiginosa* (Ipê rosa).

Tabela 2. Espécies florestais e espécies virais inoculadas ao longo dos ensaios realizados durante o período de Janeiro de 2011 a Janeiro de 2013. Plantas de *Datura stramonium* e *Capsicum annuum* foram utilizadas como controles positivos.

Espécies Florestais	Nomes populares	Espécies virais
<i>Anadenanthera falcata</i>	Angico	GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Annona crassiflora</i>	Araticum	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Ceiba speciosa</i>	Paineira rosa	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Cybistax antisyphilitica</i>	Ipê verde	GRSV ⁽²⁾
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Tamboril	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Enterolobium gummiferum</i>	Tamboril do campo	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Eriotheca pubescens</i>	Paineira do cerrado	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Guazuma ulmifolia</i>	Mutamba	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Hymenaea stigonocarpa</i>	Jatobá do cerrado	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Ingas laurina</i>	Ingá mirim	GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Kielmeyera coreacea</i>	Pau santo	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Lafoensia pacari</i>	Pacari	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Machaerium opacum</i>	Jaracandá do cerrado	GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Pterogyne nitens</i>	Amendoim bravo	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾ ,
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira vermelha	GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Sedum dendroideum</i>	Bálsamo	GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Solanum lycocarpum</i>	Lobeira	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Stenocalyx dysentericus</i>	Cagaita	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Sterculia striata</i>	Chichá do cerrado	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾
<i>Handroanthus impetiginosa</i>	Ipê rosa	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾
<i>Handroanthus avellaneda</i>	Ipê roxo	TSWV ⁽¹⁾ , GRSV ⁽²⁾ , PVY ⁽³⁾

⁽¹⁾Tomato spotted wilt virus, ⁽²⁾Groundnut ringspot virus, ⁽³⁾Potato virus Y.

Foram realizados 6 ensaios, conforme informações da **tabela 3**.

Tabela 3. Cronograma dos ensaios realizados, bem como as espécies utilizadas, o número de amostras, a proveniência das mudas e dos antissoros utilizados.

Ensaio	Espécie florestal	Nº de amostras	Proveniência das plantas	Proveniência antissoro /inóculo
TSWV ensaio 1	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (tamboril)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE*
	<i>Enterolobium gummiferum</i> (tamboril-do-campo)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
	<i>Kielmeyera coreacea</i> (Pau santo)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
	<i>Lafoensia pacari</i> (Pacari)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
	<i>Stenocalyx dysentericus</i> (Cagaita)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
	<i>Sterculia striata</i> (Chichá do cerrado)	2	Sementeira	Embrapa Hortaliças/ Recife UFRPE
TSWV ensaio 2	<i>Annona crassiflora</i> (Araticum)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Ceiba speciosa</i> (Paineira rosa)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Mutamba)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Machaerium opacum</i> (Jacarandá do cerrado)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus avellanadae</i> (Ipê roxo)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus impetiginosa</i> (Ipê rosa)	2	FAL (Fazenda Água Limpa)	Embrapa Hortaliças
	GRSV ensaio 3	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (tamboril)	2	Sementeira
<i>Enterolobium gummiferum</i> (tamboril-do-campo)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
<i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
<i>Kielmeyera coreacea</i> (Pau santo)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
<i>Lafoensia pacari</i> (Pacari)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
<i>Stenocalyx dysentericus</i> (Cagaita)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
<i>Sterculia striata</i> (Chichá do cerrado)		2	Sementeira	Embrapa Hortaliças
GRSV ensaio 4	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Angico)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças

	<i>Ceiba speciosa</i> (Paineira rosa)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Mutamba)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Machaerium opacum</i> (Jacarandá do cerrado)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Pterogyne nitens</i> (Amendoim bravo)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Sedum dendroideum</i> (Bálsamo)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus avellanedae</i> (Ipê roxo)	2	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
PVY ensaio 5	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Angico)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Ceiba speciosa</i> (Paineira rosa)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Mutamba)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Pterogyne nitens</i> (Amendoim bravo)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Sedum dendroideum</i> (Bálsamo)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus avellanedae</i> (Ipê roxo)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus impetiginosa</i> (Ipê rosa)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
GRSV ensaio 6	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Angico)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Ceiba speciosa</i> (Paineira rosa)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Cybistax antisyphilitica</i> (Ipê verde)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Mutamba)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Machaerium opacum</i> (Jacarandá do cerrado)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Sedum dendroideum</i> (Bálsamo)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças
	<i>Handroanthus impetiginosa</i> (Ipê rosa)	3	NOVACAP	Embrapa Hortaliças

*Antissoro gentilmente cedido pela Dra Genira Andrade.

3.4.4. Detecção por sorologia

A detecção da acumulação viral foi verificada através do Dot-Blot. A sorologia foi feita de acordo com o método utilizado por Dianese *et al.* (2011). Conforme protocolo, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com tampão TBE 0,1% com sulfito de sódio na proporção de 1:100, aplicadas em membrana Hybond-C específica para proteínas. Em um recipiente próprio adicionou-se a solução de bloqueio (leite em pó desnatado com PBS TWEEN 1%) cobrindo a membrana. Após uma hora, adicionou-se o anticorpo primário (IgG), específico para cada vírus, na diluição de 1:1000. Em uma hora a membrana foi lavada de 3 a 5 vezes com tampão detergente TBE 0,1% TWEEN. A seguir adicionou-se o anticorpo secundário (anti IgG de coelho), na proporção de 1:1000, onde permaneceu na membrana por mais duas horas. A membrana foi, então, lavada novamente com a solução tampão TBE 01% TWEEN. Para o processo de revelação, utilizou-se a solução composta por NBT (Cloro Nitroazul de Tetrazólio) e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). As cores foram tendentes ao roxo onde houve presença do vírus; e ao marrom ou verde, onde houve ausência do vírus.

Os anticorpos utilizados foram cedidos pela pesquisadora Dra. Mirtes Lima (Embrapa Hortaliças) e Dra Genira Andrade.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.5.1 Sintomas observados

3.5.1.1 Sintomas observados nos controles positivos

Os controles positivos apresentaram sintomas característicos, como o esperado, representados por *Datura stramonium*, inoculada com GRSV, que apresentou necrose e por *Chenopodium amaranticolor*, inoculada com TSWV, que apresentou lesões necróticas (**Figura 4**). O controle utilizado para PVY foi o pimentão Ikeda.

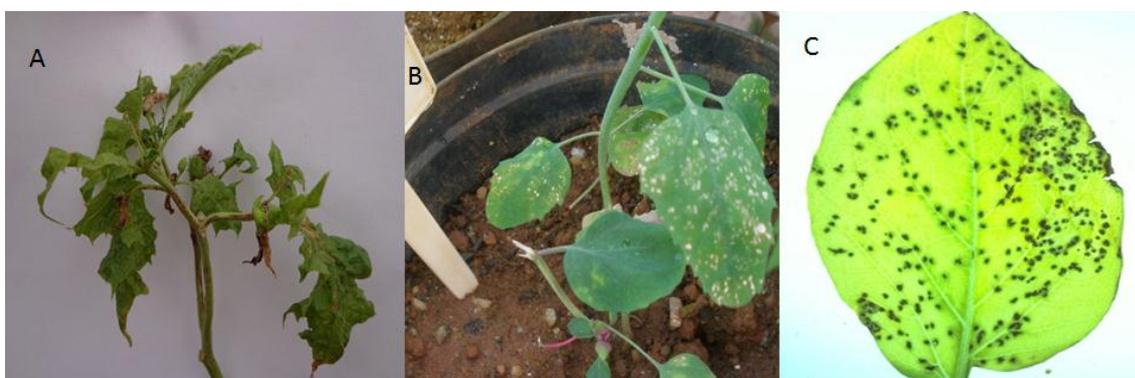


Figura 4. A-C. Ilustrações de controles positivos para GRSV, TSWV e PVY. **A** - Sintomas típicos de GRSV (*Groundnut ringspot virus*) em *Datura stramonium* com necrose generalizada. **B** - *Chenopodium amaranticolor* com lesões cloróticas 13 dias após a inoculação com *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). **C** - *Solanum tuberosum* com sintomas de infecção, retratado por pontos necróticos em toda superfície. Fonte Figura 4C: <http://www.waaesd.org/>

3.5.1.2 Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV (*Groundnut ringspot virus*).

Das 21 espécies florestais inoculadas com GRSV e listadas na **Tabelas 2 e 3**; e **Figuras 5 e 6**, cinco apresentaram sintomas aos 20 e 35 dias após a inoculação nos ensaios 1,4 e 6 (**Tabela 3**).

A espécie *E. gummiferum* apresentou sintomas de nanismo e pontos brancos em suas folhas aos 20 dias após inoculação no ensaio 1. A espécie *Eriotheca pubescens* apresentou pontos cloróticos por toda a superfície foliar com 20 dias após inoculação, no ensaio 4. A espécie *Schinus terebinthifolius* apresentou pontos necróticos por toda superfície inoculada no ensaio 4 e 6, 60 dias após inoculação. A espécie *Pterogyne nitens* apresentou, após 35 dias de inoculação no ensaio 4, pontos necróticos na superfície foliar. A espécie *Ceiba speciosa* apresentou amarelecimento na linha da nervura principal e entre ela no ensaio 6.

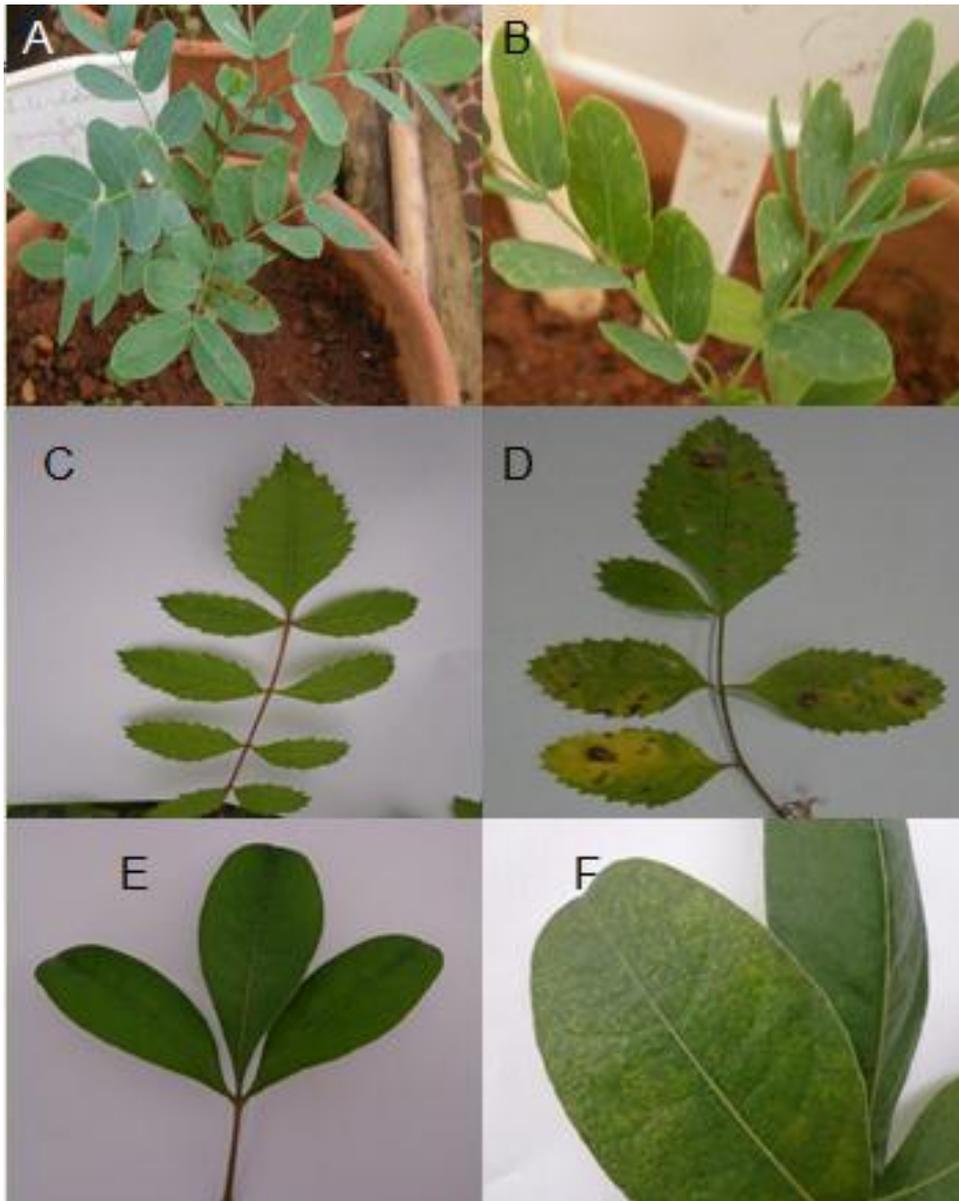


Figura 5. A-F Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV (*Groundnut ringspot virus*). **A** – Controle negativo de *Enterolobium gummiferum* sem sintomas. **B** - Sintomas de nanismo e pontos brancos em *Enterolobium gummiferum*, observados com 20 dias de inoculação no primeiro ensaio. **C** – Controle negativo de *Schinus terebinthifolius* sem sintomas. **D** - Sintomas da infecção viral com necroses e amarelecimento em *Schinus terebinthifolius*, observados 35 dias após a inoculação no sexto ensaio. **E** – Controle negativo de *Eriotheca pubescens* sem sintomas. **F** - Sintomas de pontos cloróticos em *Eriotheca pubescens*, observados 20 dias após a inoculação no quarto ensaio.

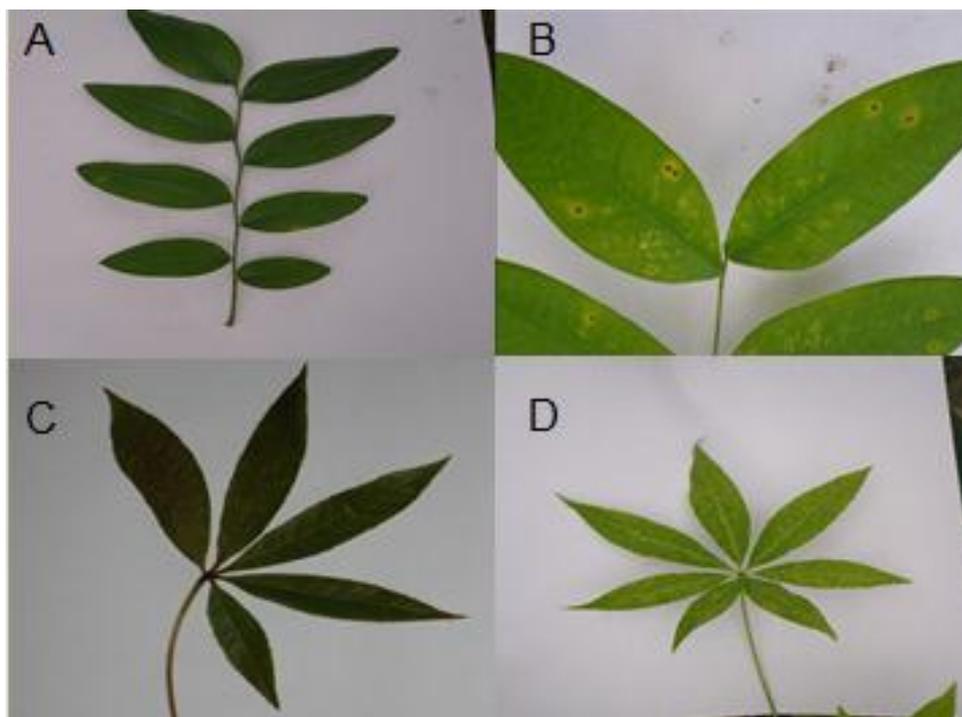


Figura 6. A-D Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com GRSV. **A** – Controle negativo de *Pterogyne nitens* sem sintomas. **B** - Sintomas de pontos necróticos *Pterogyne nitens*, inoculada com *Groundnut ringspot virus* (GRSV) observados 35 dias após a inoculação no quarto ensaio. **C** – Controle negativo de *Ceiba speciosa* sem sintomas. **D** - Sintomas da infecção viral com amarelecimento entre as nervuras em *Ceiba speciosa*, inoculada com *Groundnut ringspot virus* (GRSV), observados 35 dias após a inoculação no sexto ensaio.

3.5.1.3 Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com TSWV (*Tomato spotted wilt virus*).

Das 15 espécies inoculadas com TSWV e listadas nas **Tabelas 2 e 3**; e **Figura 7**, duas apresentaram sintomas aos 15 e 50 dias de inoculação nos ensaios 1 e 2.

As amostras de *Hymenaea stigonocarpa* apresentaram sintomas de necrose e amarelecimento nas extremidades, observados 50 dias após a inoculação no ensaio 2. *Solanum lycocarpum* apresentou sintomas de amarelecimento nas nervuras após 15 dias de inoculação no ensaio 1.

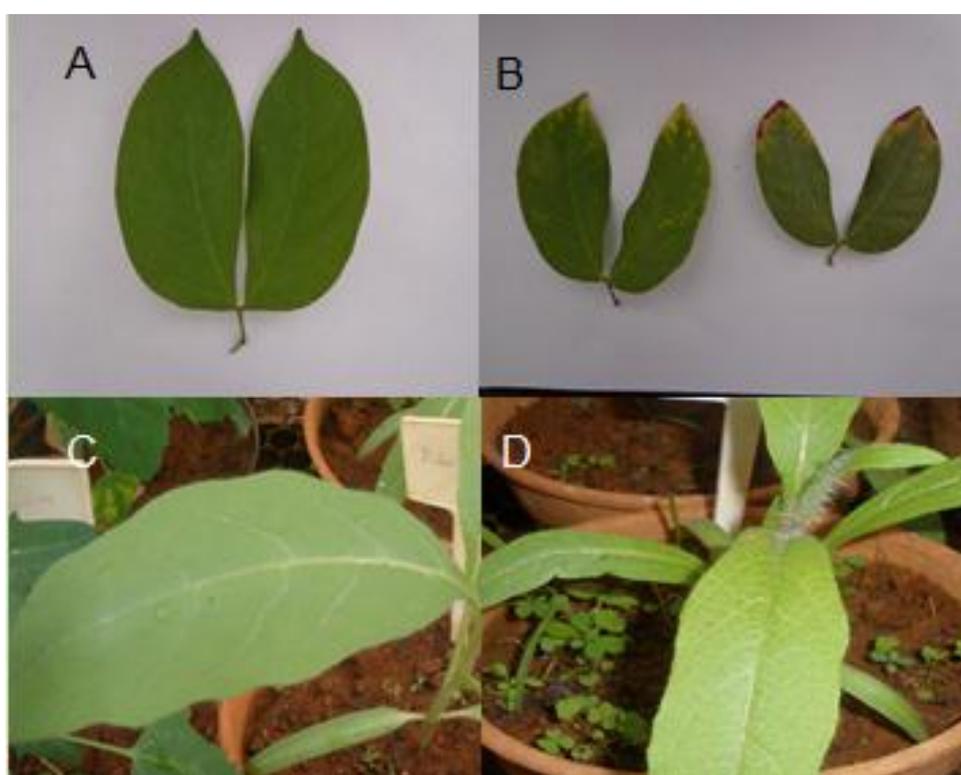


Figura 7. A-D. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). **A** – Controle negativo de *Hymenaea stigonocarpa* sem sintomas. **B** - Sintomas da infecção viral com necrose e amarelecimento nas extremidades de *Hymenaea stigonocarpa*, inoculada observados 50 dias após a inoculação no ensaio 2. **C** - Controle negativo de *Solanum lycocarpum* sem sintomas. **D** - Sintomas da infecção viral em *Solanum lycocarpum*, observados 15 dias após a inoculação no ensaio 1.

3.5.1.4 Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com PVY (*Potato virus Y*)

Das 11 espécies inoculadas com PVY e listadas nas Tabelas 2 e 3; e Figura 8; apenas uma apresentou sintomas com 35 dias após a inoculação no ensaio 5.

As amostras de *Handroanthus avellaneda* mostraram folhas com pontos necróticos; ou mortas após 35 dias de inoculação no ensaio 5 (Figura 8).

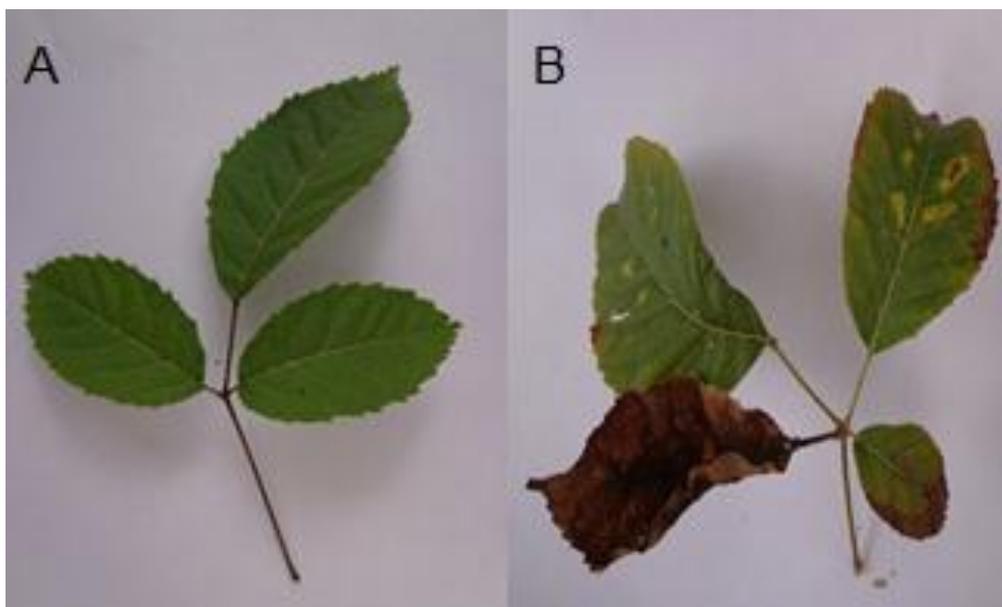


Figura 8. A-B. Sintomas observados em espécies florestais inoculadas com PVY (*Potato virus Y*). **A** – Controle negativo de *Handroanthus avellaneda* sem sintomas. **B** - Sintomas de necrose *Handroanthus avellaneda*, observados 35 dias após a inoculação no ensaio cinco.

3.5.2 Sorologia

Os testes sorológicos tem se constituído em um dos métodos mais usados na identificação dos vírus de plantas, isto se deve em grande parte ao fato da especificidade da reação entre antígeno (partícula do vírus ou sua proteína) e seu anticorpo específico. De uma maneira geral, podemos dizer que os testes sorológicos são simples e não requerem uso de aparelhos caros, além disso, algumas modalidades não requerem o uso de aparelhos e a reação sorológica é ampliada por uma reação enzimática que pode ser lida de maneira simples através de uma mudança de coloração de substrato.

A **Tabela 4** apresenta os resultados obtidos após análise via sorologia (Dot-Blot) das espécies florestais inoculadas.

TABELA 4. Resultados obtidos via Dot-Blot ELISA em amostras testadas com antissoros para detecção de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Potato virus Y* (PVY).

Amostra (Nº)	Espécies florestais	Família	Resultado TSWV	Resultado GRSV	Resultado PVY
1	<i>Anadenanthera falcata</i> (Angico)	<i>Fabaceae</i>	-	-	-
2	<i>Annona crassiflora</i> (Araticum)	<i>Annonaceae</i>	-	-	-
3	<i>Chorisia speciosa</i> (Paineira rosa)	<i>Malvaceae</i>	+	-	-
4	<i>Cybistax antisyphilitica</i> (Ipê verde)	<i>Bignoniaceae</i>	-	-	-
5	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (tamboril)	<i>Mimosoideae</i>	-	-	-
6	<i>Enterolobium gummiferum</i> (tamboril-do-campo)	<i>Leguminosae-Mimosoideae</i>	-	-	-
7	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	<i>Malvaceae</i>	-	-	+
8	<i>Guazuma ulmifolia</i> (Mutamba)	<i>Sterculiaceae</i>	-	-	-
9	<i>Hymenaeastigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)	<i>Leguminosae-Caesalpinioideae</i>	+	+	-
10	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	<i>Fabaceae</i>	-	-	+
11	<i>Kielmeyera coreacea</i> (Pau santo)	<i>Clusiaceae</i>	+	-	-
12	<i>Lafoensia pacari</i> (Pacari)	<i>Lythraceae</i>	+	+	-
13	<i>Machaerium opacum</i> (Jacarandá do cerrado)	<i>Fabaceae</i>	-	-	-
14	<i>Pterogyne nitens</i> (Amendoim bravo)	<i>Fabaceae-Caesalpinioideae</i>	-	-	-
15	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	<i>Anacardiaceae</i>	-	+	-
16	<i>Sedum dendroideum</i> (Bálsamo)	<i>Crassulaceae</i>	-	-	-
17	<i>Solanum lycocarpum</i> (Lobeira)	<i>Solanaceae</i>	-	-	-
18	<i>Stenocalyx dysentericus</i> (Cagaita)	<i>Myrtaceae</i>	-	-	-
19	<i>Sterculia striata</i> (Chichá do cerrado)	<i>Malvaceae</i>	-	-	-
20	<i>Handroanthus avellaneda</i> (Ipê roxo)	<i>Bignoniaceae</i>	-	-	-
21	<i>Handroanthus impetiginosa</i> (Ipê rosa)	<i>Bignoniaceae</i>	-	-	-

Tabela 5. Espécies retiradas da Tabela 2 que apresentaram resultado positivo para TSWV, GRSV e PVY, bem como suas famílias, citadas para comparação.

Amostra (Nº)	Espécies Florestais	Família	Resultado TSWV	Resultado GRSV	Resultado PVY
1	<i>Ceiba speciosa</i> (Paineira rosa)	<i>Malvaceae</i>	+	-	-
2	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	<i>Malvaceae</i>	-	-	+
3	<i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)	<i>Leguminosae-Caesalpinioideae</i>	+	+	-
4	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	<i>Fabaceae</i>	-	-	+
5	<i>Kielmeyera coreacea</i> (Pau santo)	<i>Clusiaceae</i>	+	-	-
6	<i>Lafoensia pacari</i> (Pacari)	<i>Lythraceae</i>	+	+	-
7	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	<i>Anacardiaceae</i>	-	+	-

Das 22 espécies estudadas, sete foram positivas nas análises sorológicas para o total de espécies inoculadas nos seis ensaios, como mostra a **Tabela 3**.

Observaram-se duas ocorrências na família *Malvaceae*, que possui vírus associados desde a década de 1930, adquirindo importância no Brasil desde então. A clorose infecciosa identificada nas malváceas foi primeiramente descrita e associada a doenças em feijão, tomate e algodão (Costa, 1954). Este vírus corresponde a uma espécie de *Begomovirus*, o que nos fornece base para estudos mais avançados.

A seguir encontram-se representadas algumas membranas com os resultados para GRSV, TSWV e PVY. As demais membranas não estão representadas neste trabalho, entretanto, seus resultados foram somados nas **Tabelas 4 e 5**.

3.5.2.1. Sorologia e análise de membrana para TSWV.

Amostras foliares de quatro espécies de plantas coletadas aos 50 dias de inoculação e usadas em dot-blot. A **Figura 9** mostra 9 amostras, sendo 4 inoculadas, 4 não inoculadas e 1 controle positivo. Os resultados mostraram-se positivos para *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá do Cerrado) e *Ceiba speciosa* (Paineira rosa), amostras 1 e 3, respectivamente.

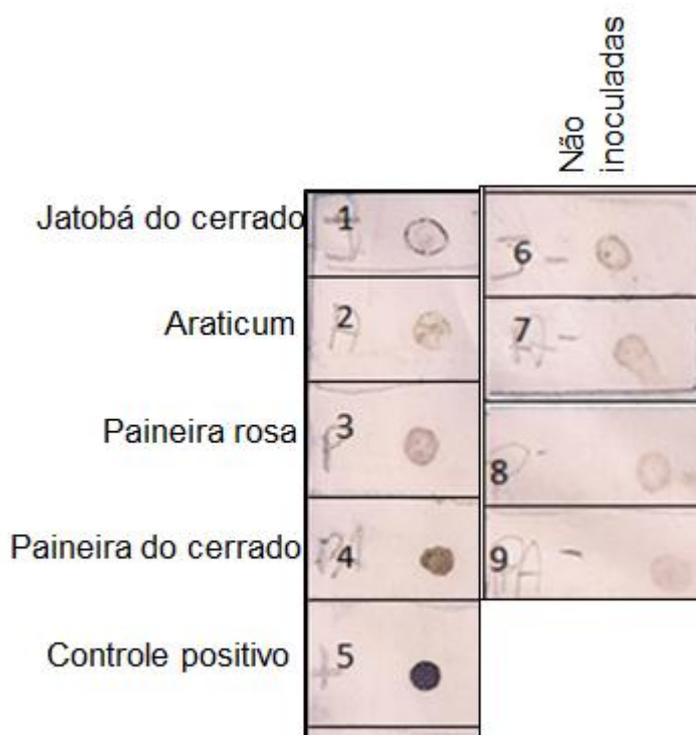


Figura 9. 1-9. Resultado de Dot-Blot para o ensaio 2 com plantas inoculadas com TSWV (*Tomato spotted wilt virus*). 1 - Jatobá do Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*); 2 - Araticum (*Annona crassiflora*); 3 - Paineira rosa (*Ceiba speciosa*); 4 - Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*); 5 - Controle positivo; 6 - Jatobá do cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) não inoculado; 7 - Araticum (*Annona crassiflora*) não inoculado; 8 - Paineira rosa (*Ceiba speciosa*) não inoculada; 9 - Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*) não inoculada.

3.5.2.2 Sorologia e análise de membrana para GRSV.

Amostras foliares de 10 espécies de plantas foram coletadas aos 60 dias de inoculação e usadas em dot-blot. A **Figura 10** mostra 23 amostras, sendo 11 inoculadas, 11 não inoculadas e 2 como controles positivos. O resultado positivo para detecção do vírus é evidente com as amostra de Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). Este resultado se repetiu em outros ensaios. As amostras demonstradas na **Figura 11** foram coletadas com 90 dias de inoculação para utilização em dot blot, totalizando 30 amostras, sendo 18 inoculadas, 9 não inoculadas e 3 controles positivos. As demais amostras positivas para GRSV, de acordo com as figuras 10 e 11 foram: *Chorisia speciosa* (Paineira rosa); *Eriotheca pubescens* (Paineira do cerrado), *Ingá laurina* (Ingá mirim), *Lafoensia pacari* (Pacari).

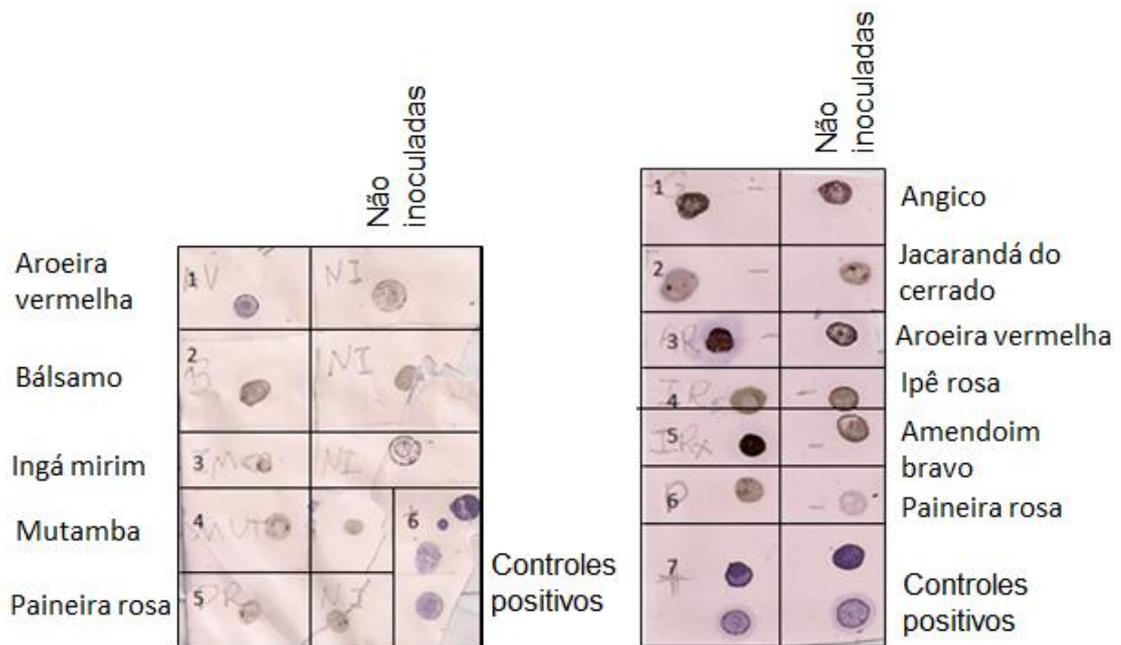


Figura 10. 1-5 1-7. Resultado para Dot-Blot feito para o ensaio 4 com plantas inoculadas com vírus GRSV (*Groundnut ringspot vírus*). 1 – Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). 2 – Bálsamo (*Sedum dendroideum*). 3 – Ingá Mirim (*Ingas laurina*). 4 – Mutamba (*Guazuma ulmifolia*). 5 – Paineira rosa (*Ceiba speciosa*). 6 – Controle positivo. NI – Amostras não inoculadas. 1 - Angico (*Anadenanthera colubrina*). 2 – Jacarandá do cerrado (*Machaerium opacum*). 3 – Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). 4 – Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosa*). 5 – Amendoim bravo (*Pterogyne nitens*). 6 – Paineira rosa (*Ceiba speciosa*). 7 – Controle positivo mantido em *Datura stramonium*.

	Amostra 1	Amostra 2	Não inoculadas
Angico	1		
Paineira do cerrado	2		
Ipê verde	3		
Bálsamo	4		
Ingá mirim	5		
Jacarandá do cerrado	6		
Paineira rosa	7		
Ipê rosa	8		
Aroeira vermelha	9		
Controles positivos	10		

Figura 11.1-10. Resultado de Dot-Blot feito para o ensaio 6 com plantas inoculadas com o vírus GRSV (*Groundnut ringspot virus*). **1** – Angico (*Anadenanthera colubrina*). **2** – Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*). **3** – Ipê verde (*Cybistax antisiphilitica*). **4** – Bálsamo (*Sedum dendroideum*). **5** – Ingá Mirim (*Ingas laurina*). **6** – Jacarandá do cerrado (*Machaerium opacum*). **7** – Paineira rosa (*Ceiba speciosa*). **8** – Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosa*). **9** – Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). **10** – Controle positivo mantido em *Datura stramonium*.

3.5.2.3 Sorologia e análise de membrana para PVY:

Amostras foliares de 10 espécies de plantas foram coletadas aos 60 dias de inoculação e usadas em dot-blot. A **Figura 12** mostra 9 amostras, sendo 4 inoculadas, 2 não inoculadas e 3 controles positivos. O resultado positivo para detecção do vírus é demonstrado nas amostras 1 e 3 de Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*). Para **Figura 13**, foram coletadas 30 amostras de 7 espécies florestais, sendo 14 amostras inoculadas, 7 não inoculadas, 3 controles negativos e 3 controles positivos. Os resultados foram positivos para *Chorisia speciosa* (Paineira rosa); *Eriotheca pubescens* (Paineira do cerrado), *Ingas laurina* (Ingá mirim) e Mutamba (*Guazuma ulmifolia*).

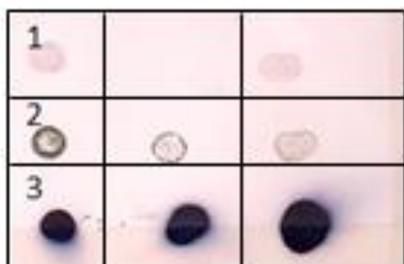


Figura 12. 1-3. Resultado de Dot-Blot feito para o ensaio 5 com plantas inoculadas com o vírus PVY (*Potato vírus Y*). **1** - Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*). **2** – Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosa*). **3** – Controle positivo mantido em pimentão Ikeda.

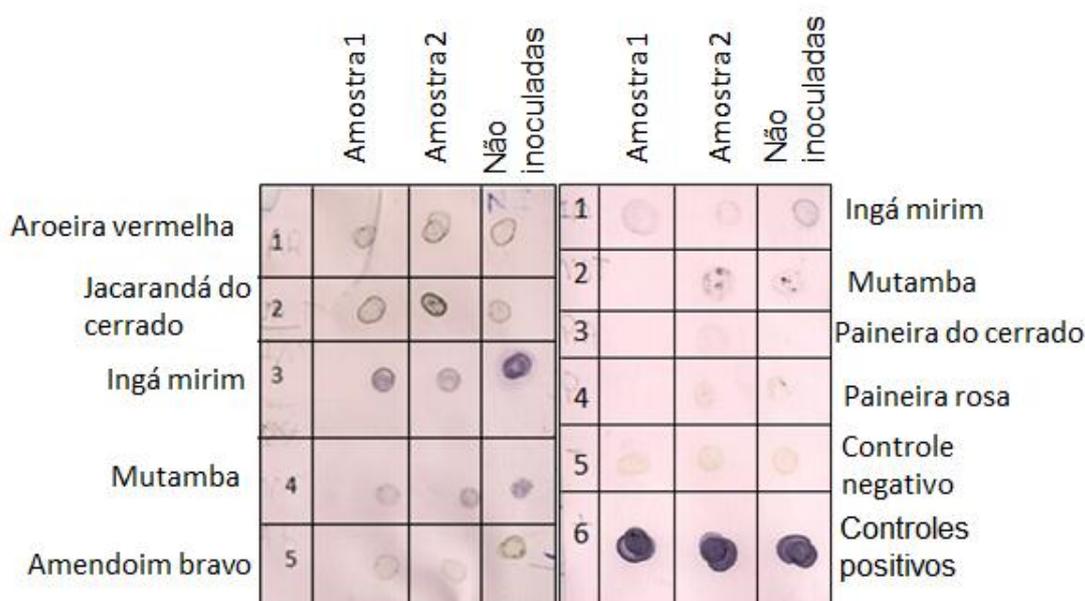


Figura 13. 1-5 1-6. Resultado de Dot-Blot feito para o ensaio 5 com plantas inoculadas com o vírus PVY (*Potato vírus Y*). **1** – Aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*). **2** – Jacarandá do Cerrado (*Machaerium opacum*). **3** – Ingá Mirim (*Ingas laurina*). **4** – Mutamba (*Guazuma ulmifolia*). **5** – Amendoim Bravo (*Pterogyne nitens*). **1** – Ingá Mirim (*Ingas laurina*). **2** – Mutamba (*Guazuma ulmifolia*). **3** – Paineira do cerrado (*Eriotheca pubescens*). **4** – Paineira rosa (*Ceiba speciosa*). **5** – Controle negativo. **6** – controle positivo mantido em pimentão Ikeda.

3.5.2 Discussão

Estudos avançados na América do Norte e Europa relataram *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) em *Sorbus aucuparia* (Mielke & Mühlbach, 2007; Mielke et al., 2008; Arndt et al., 2009; Kallinen et al., 2008); *Cherry leaf roll virus* (CLRV) em *Arabidopsis thaliana* (Rumbou et al., 2009); *Cassia yellow blotch virus* (CYBV), em *Cassia pleurocarpa* na Austrália (Dale et al., 1984); e *Cryptovirus* em espécies assintomáticas de pinheiro

(Veliceasa *et al.*, 2006). Considerando estudos no Brasil e no Cerrado, ainda escassos, analisou-se as amostras citadas e detectou-se resultados significativos.

De acordo com os resultados da **Figura 15** e **Tabela 6**, observou-se a ocorrência de amostras sintomáticas, porém com resultados negativos para sorologia, isto se deve à provável distribuição irregular do vírus nos tecidos da hospedeira associado a uma baixa concentração viral nos tecidos. Tais amostras são das espécies *Enterolobium gummiferum* (tamboril-do-campo), *Solanum lycocarpum* (Lobeira); *Pterogyne nitens* (Amendoim bravo) e *Handroanthus avellanedae* (Ipê roxo) (**Figura 15**).

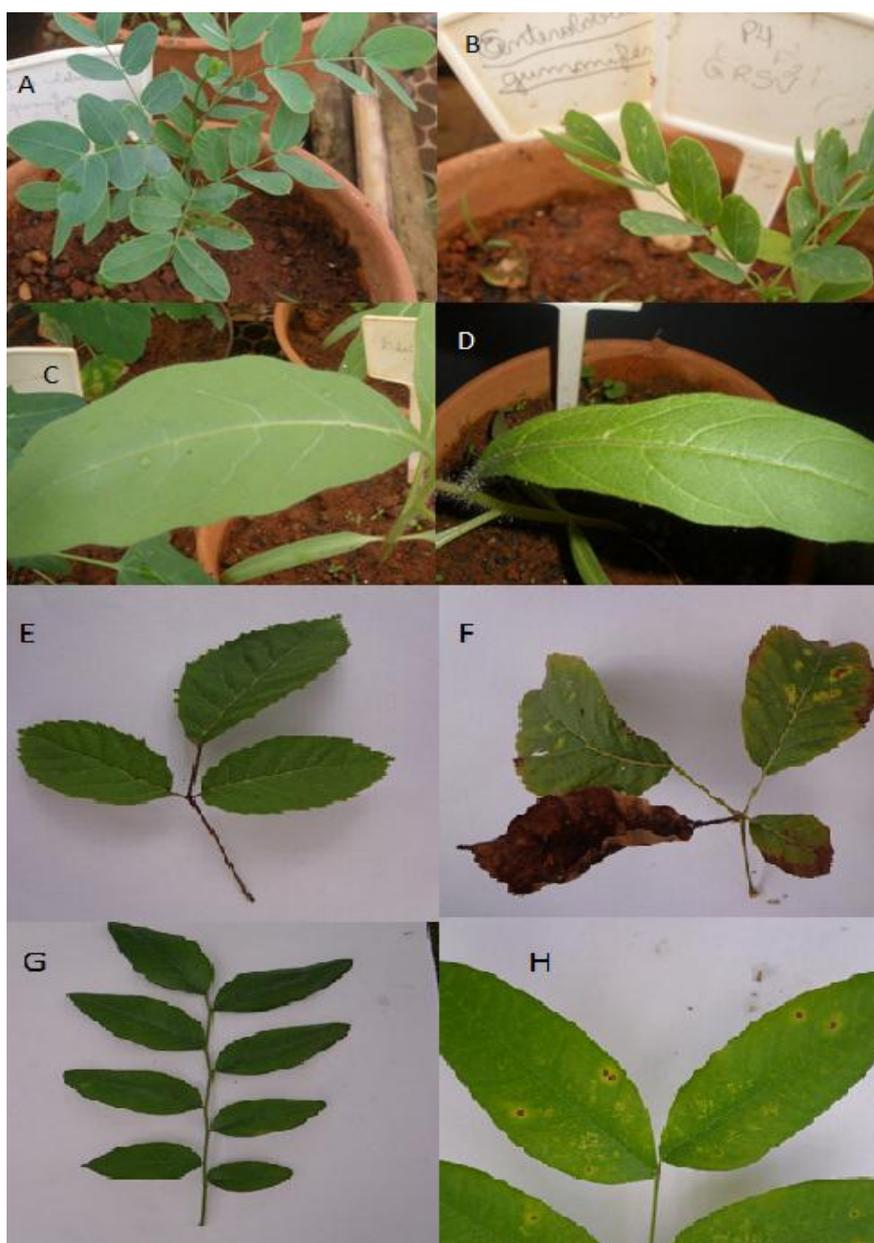


Figura 14. A-H. Ilustração de amostras sintomáticas e negativas para sorologia. **A** – Controle negativo de *Enterolobium gummiferum* sem sintomas. **B** - Sintomas de nanismo e pontos brancos em *Enterolobium gummiferum*, observados com 20 dias de inoculação no primeiro ensaio. **C** - Controle negativo de *Solanum lycocarpum* sem sintomas. **D** - Sintomas da infecção viral em *Solanum lycocarpum*, observados 15 dias após a inoculação no ensaio 1. **E** Controle negativo de *Handroanthus avellanadae* sem sintomas. **F** - Sintomas de necrose *Handroanthus avellanadae*, observados 35 dias após a inoculação no ensaio 5. **G** - Controle negativo de *Pterogyne nitens* sem sintomas. **H** - Sintomas de pontos necróticos *Pterogyne nitens*, inoculada com *Groundnut ringspot virus* (GRSV) observados 35 dias após a inoculação no quarto ensaio.

Paralelamente, observou-se a ocorrência de amostras positivas por dot-Blot, porém, mostraram-se assintomáticas, o que pode ser explicado pela baixa concentração viral na planta. Estes resultados foram observados nas espécies *Ingas laurina* (Ingá mirim), *Kielmeyera coreacea* (Pau santo) e *Lafoensia pacari* (Pacari).

As espécies *Ceiba speciosa* (Paineira rosa), *Eriotheca pubescens* (Paineira do cerrado) e *Schinus terebinthifolius* (Aroeira vermelha) mostraram-se sintomáticas e estes resultados se confirmaram com a realização da sorologia (**Figura 16**).

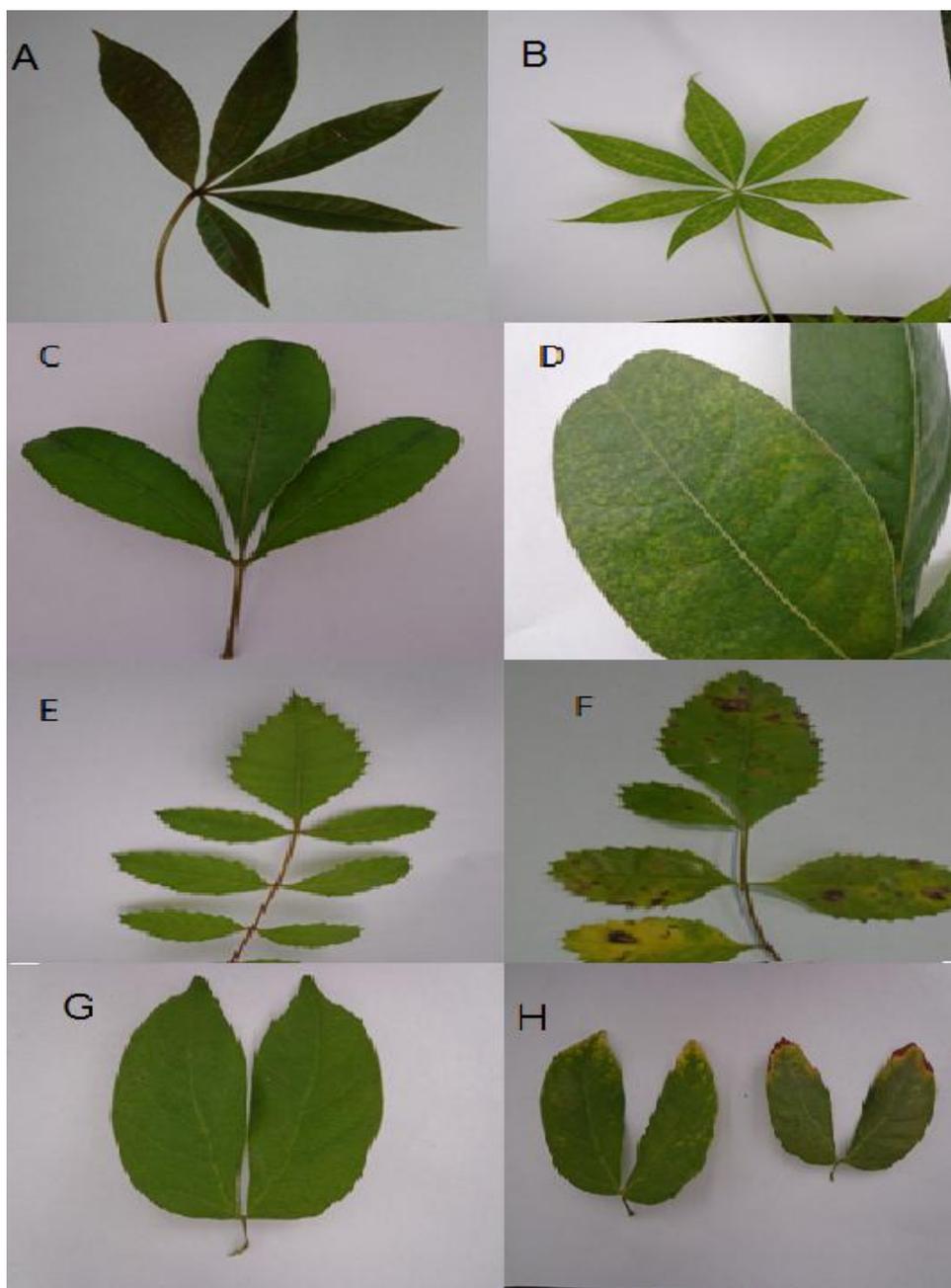


Figura 15. A-H. Amostras positivas para sintomas e sorologia. **A** – Controle negativo de *Ceiba speciosa* sem sintomas. **B** - Sintomas da infecção viral com amarelecimento entre as nervuras em *Ceiba speciosa*, inoculada com *Groundnut ringspot virus* (GRSV), observados 35 dias após a inoculação no sexto ensaio. **C** – Controle negativo de *Schinus terebinthifolius* sem sintomas. **D** - Sintomas da infecção viral com necroses e amarelecimento em *Schinus terebinthifolius*, observados 35 dias após a inoculação no sexto ensaio. **E** – Controle negativo de *Eriotheca pubescens* sem sintomas. **F** - Sintomas de pontos cloróticos em *Eriotheca pubescens*, observados 20 dias após a inoculação no quarto ensaio. **G** – Controle negativo de *Hymenaea stigonocarpa* sem sintomas. **H**- Sintomas da infecção viral com necrose e amarelecimento nas extremidades de *Hymenaea stigonocarpa*, inoculada observados 50 dias após a inoculação no ensaio dois.

Tabela 6. Tabela de comparações entre as amostras positivas na sorologia e os sintomas observados.

Amostr a (Nº)	Amostra (Identificação)	Família	Resultado TSWV	Resultado GRSV	Resultado PVY	Sintomas
1	<i>Chorisia speciosa</i> (Paineira rosa)	<i>Malvaceae</i>	+	+	-	+ (GRSV)
2	<i>Enterolobium gummiferum</i> (tamboril- do-campo)	<i>Leguminosae- Mimosoideae</i>	-	-	-	+ (GRSV)
3	<i>Eriotheca pubescens</i> (Paineira do cerrado)	<i>Malvaceae</i>	+	+	+	+ (GRSV)
4	<i>Hymenaeastigonocarpa</i> (Jatobá do cerrado)	<i>Leguminosae- Caesalpinoideae</i>	+	-	-	+ (TSWV)
5	<i>Ingas laurina</i> (Ingá mirim)	<i>Fabaceae</i>	-	+	+	-*
6	<i>Kielmeyera coreacea</i> (Pau santo)	<i>Clusiaceae</i>	+	-	-	-*
7	<i>Pterogyne nitens</i> (Amendoim bravo)	<i>Fabaceae- Caesalpinoideae</i>	-	-	-	+ (GRSV)
8	<i>Lafoensia pacari</i> (Pacari)	<i>Lythraceae</i>	+	+	-	-*
9	<i>Schinus terebinthifolius</i> (Aroeira vermelha)	<i>Anacardiaceae</i>	-	+	-	+ (GRSV)
10	<i>Solanum lycocarpum</i> (Lobeira)	<i>Solanaceae</i>	-	-	-	+ (TSWV)
11	<i>Handroanthus avellanadae</i> (Ipê roxo)	<i>Bignoniaceae</i>	-	-	-	+ (PVY)

-* Negativo para as três espécies avaliadas

3.6. CONCLUSÕES

Ao final desse capítulo foram obtidos dados para concluir que as espécies *Chorisia speciosa* (Paineira rosa), *Eriotheca pubescens* (Paineira do cerrado), *Hymenaea stigonocarpa* (Jatobá do cerrado) e *Schinus terebinthifolius* (Aroeira vermelha) apresentaram sintomas característicos dos vírus que puderam ter sua presença confirmada com o Dot Blot.

As espécies *Ingas laurina* (Ingá mirim), *Kielmeyera coreacea* (Pau santo) e *Lafoensia pacari* (Pacari) apresentaram resultados positivos para o Dot Blot, porém, foram assintomáticas.

As amostras de *Enterolobium gummiferum* (tamboril-do-campo), *Pterogyne nitens* (Amendoim bravo), *Solanum lycocarpum* (Lobeira), *Tabebuia avellanadae* (Ipê roxo), pelo contrário, apresentaram sintomas significativos, mas não foram observados resultados positivos nas análises feitas em laboratório.

CAPÍTULO 2 - Estudos preliminares de caracterização de um vírus encontrado em *Mimosa caesalpinoidea*.

4.1 INTRODUÇÃO

Mimosa caesalpinifolia, mais conhecido como sabiá, é uma espécie da família *Leguminosae*: subfamília *Mimosoideae*, nativa da Região Nordeste que é comumente cultivada do Maranhão ao Rio de Janeiro, sendo ideal para arborização, cerca viva e produção de madeira. É uma espécie que se propaga sexuadamente, tendo, no entanto, heterogeneidade no formato, coloração e tamanho das sementes. É uma espécie bastante utilizada para implantação de florestas devido à resistência à seca e seu crescimento rápido (Ribaski *et al.*, 2003), possui madeira de boa qualidade (Drumond, 1982), e ainda tem grande importância como planta ornamental, sendo bastante utilizada como cerca. Devido à isso, a espécie é destaque nas fontes de estacas para cercas no Nordeste, sendo ainda utilizada para produção de energia, lenha e carvão (Ribaski *et al.*, 2003).

Tal espécie pode ser suscetível a diversos patógenos, dentre eles os *Begomovirus*, que constituem atualmente um dos principais problemas de culturas agrícolas do mundo, responsáveis por perdas significativas em plantios de tomate (*Solanum lycopersicum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), mandioca (*Manihot esculenta*), pimentão (*Capsicum annuum*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (Faria *et al.*, 2000; Morales & Anderson, 2001). O gênero *Begomovirus* é composto por 192 espécies (ICTV, 2011), sendo o mais importante dentre os gêneros de vírus de plantas, estando na família *Geminiviridae*, com o maior número de espécies e a maior gama de hospedeiras (Polston & Anderson, 1999; Moriones & Navas-Castilho, 2000; Morales & Anderson, 2001; e Freitas-Astúa *et al.*, 2002). No Brasil, esses vírus têm sido relatados desde a década de 1930, tornando-se economicamente importantes apenas na década de 1980, devido à dificuldade de controlar o inseto vetor (*Bemisia tabaci*).

Tendo em vista os poucos estudos sobre vírus em espécies florestais, neste trabalho identificou-se uma espécie de *Begomovirus* em *Mimosa caesalpinifolia*, sendo esta espécie melhor estudada e caracterizada posteriormente.

4.2. OBJETIVOS

4.2.1. Geral

Iniciar estudos de caracterização de vírus em uma espécie florestal proveniente de Cuiabá - MT.

4.2.2. Específicos

- Conduzir estudos iniciais de caracterização de vírus presente em *Mimosa caesalpinifolia*.

4. 3. HIPÓTESES

Ocorrência de *Begomovirus* spp em *Mimosa caesalpinifolia*.

4.4 METODOLOGIA

4.4.1. Origem da amostra

Folhas com sintomas de mosaico foram coletadas em Cuiabá (**Figura 1**) para análise em laboratório.



Figura 1. A-B *Mimosa caesalpinifolia* com sintomas suspeitos da infecção por *Begomovirus*.

4.4.2. Ensaio de caracterização viral.

4.4.2.1 Biológicos

Folhas mostrando sintomas ilustrados na **Figura 1** foram usadas para inoculação mecânica em plantas na gama de hospedeiras viral mantidas em casa de vegetação na EEB. A inoculação foi realizada conforme descrito anteriormente. As espécies utilizadas foram: *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Capsicum annum*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana* e *Datura stramonium*.

4.4.2.2 Moleculares

O DNA total foi extraído da amostra sintomática (**Figura 1**) utilizando-se o método modificado de CTAB (Boiteux *et. al.*, 1999). Um segmento do DNA-A viral foi seletivamente amplificado via PCR utilizando os 'primers' degenerados: 'PAL1v1978' (5' –GCATCTGCAGGCCCAACTYGTCTTTYCCNGT- 3') e

'PARc715' (5' –GATTTTCTGAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3'), utilizados para detecção de espécies de *Begomovirus* (Rojas *et. al.*, 1993). As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 12,5µl contendo Tris-HCl 10mM (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl₂ 2,4mM, 250µl de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,8 µM de cada 'primer', uma unidade da enzima Taq polimerase e 30 ng de DNA. As amplificações foram efetuadas em termociclador (Gene AmpR PCR System 9700) programado para um ciclo de 94° C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos, cada um constituído pela seguinte sequência: 30 segundos a 94° C, 60 segundos a 52° C e 3 minutos a 72° C, seguido de extensão final de 7 minutos a 72°C e finalmente a temperatura foi reduzida para 4° C.

A Eletroforese foi feita em gel de agarose (1%), o gel corado com brometo de etídeo e fotografado indicou a presença de um único amplicom com cerca de 1100 pares de base, o que significa a presença do vírus.

Realizou-se uma RCA do DNA para aumentar a quantidade de DNA circular presente na amostra. A reação consiste na preparação do mix contendo Phi 29 Buffer – 10X, BSA -10X, dNTPs – 10mM, primer Tioprottegido – 50mM, todos com 1µL; Phi 29 DNA polimerase (1000U/µL) a 1µL, água a 4,9µL e DNA a 1µL; num total de 10 µL para condições de termociclador por 18 horas a 30° C e por 10 minutos a 65° C.

A PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) foi realizada conforme descrito anteriormente, porém uma alíquota do DNA amplificado via RCA num volume final de 50 µL. Os amplicóns obtidos foram purificados usando o GFX (anexo 1 para protocolo utilizado).

Após a purificação, alíquotas foram aplicadas em gel de agarose (**Figura 5**) para confirmação e serão submetidas ao sequenciamento.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Inoculação mecânica

Nenhum sintoma na gama de hospedeiras utilizada foi observado usando como fonte folhas de *Mimosa caesalpinifolia*.

6.5.2 Análise molecular

Conforme a **Figura 2** pode-se observar o resultado da extração de DNA realizada com repetições para a amostra de *Mimosa caesalpinifolia*.

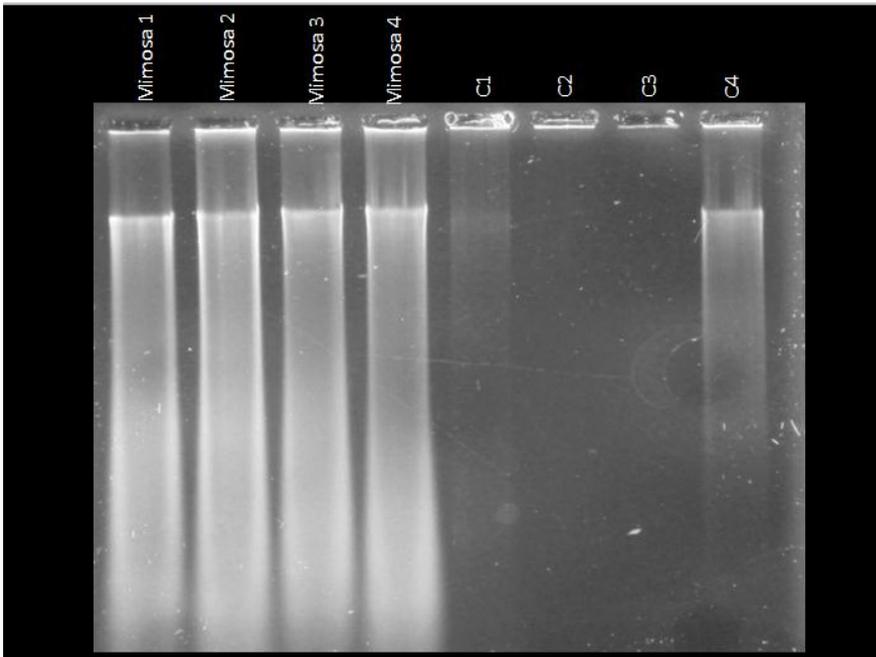


Figura 2. Análise de gel de DNA presente em amostras duplicadas de *Mimosa caesalpinifolia*. Mimosa 1, Mimosa 2, Mimosa 3, Mimosa 4, C1, C2, C3, e C4: extrações da amostra de *Mimosa caesalpinifolia*.

A **Figura 3** ilustra a RCA realizada para distintas amostras suspeitas de infecção por *Begomovirus*, estando a amostra de *Mimosa caesalpinifolia* dentre elas.

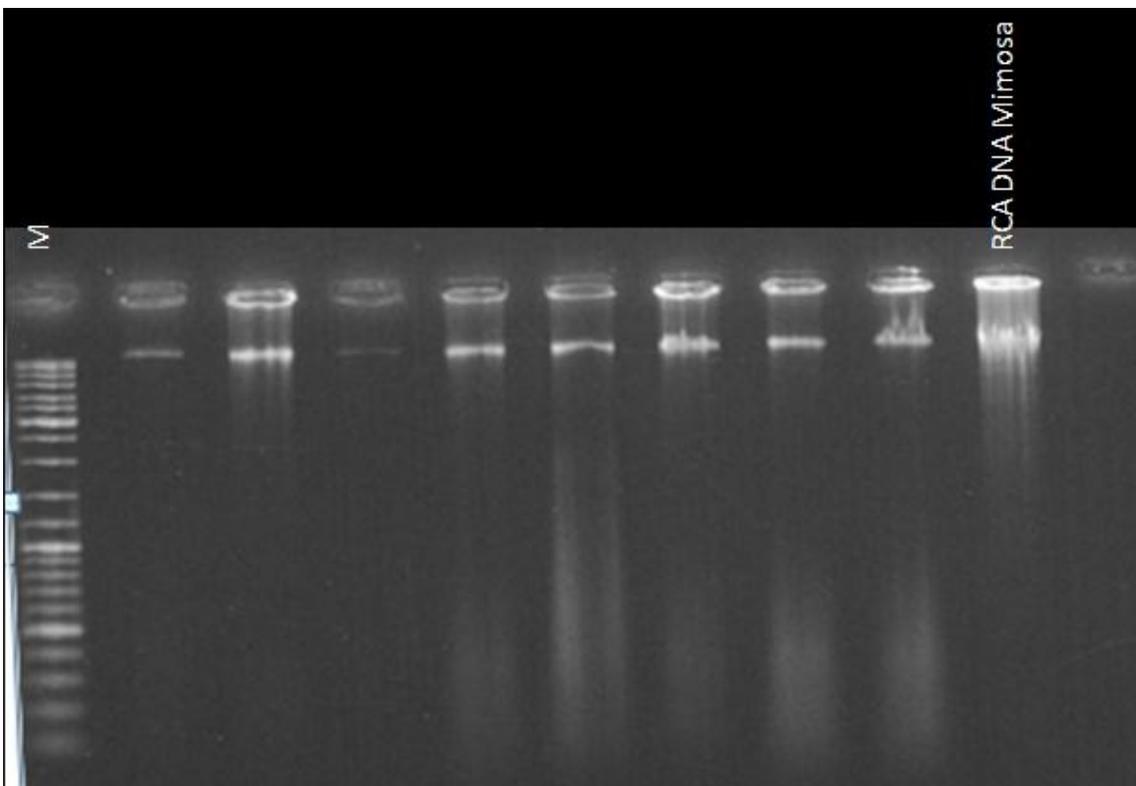


Figura 3. Gel de RCA do DNA da amostra de *Mimosa caesalpinifolia*

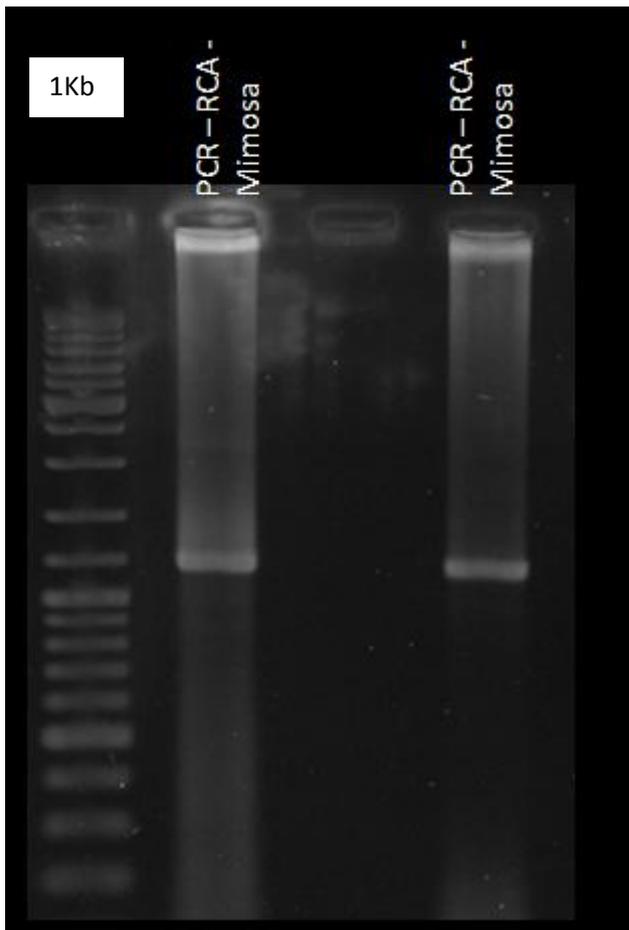


Figura 4. Resultado de PCR de RCA usando o par de primers PAL-Par para *Begomovirus*. Marcador molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. Amostras de 1 a 3-: 1: *Mimosa caesalpinifolia* 1 e 2: *Mimosa caesalpinifolia* num amplicón de 1100 pares de base.

O fragmento obtido via PCR foi purificado usando o GFX para verificar qual espécie viral está infectando *Mimosa caesalpinifolia*, de acordo com a **Figura 5**.

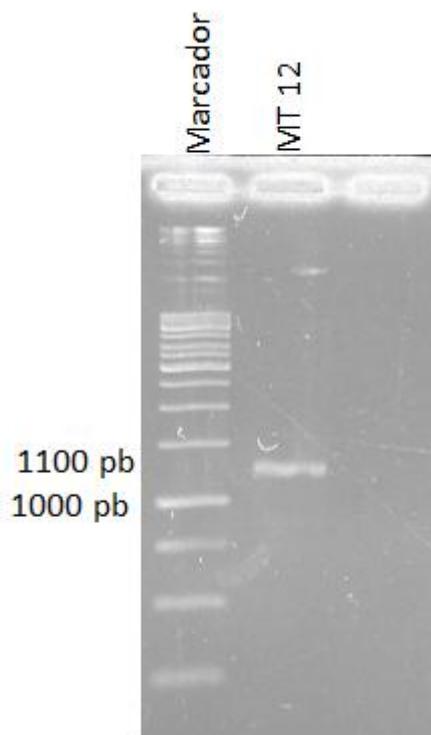


Figura 5. Gel de purificação de DNA. A amostra de *mimosa caesalpinifolia* está no segundo poço (MT12).

4.5.3. Discussão

Tendo em vista as espécies hospedeiras de *Begomovirus*, que geralmente pertencem a famílias *Malvaceae*, *Euphorbiaceae*, *Solanaceae* e *Fabaceae* (Morales & Anderson, 2011); outros trabalhos têm sido realizados mostrando a identificação de vírus em espécies florestais, como Romero *et al.* (2002), que confirmaram ser a espécie *Cassia obtusifolia* uma hospedeira de *Begomovirus* spp em Cuba. Estudos prévios nomearam um vírus encontrado em *Senna sylvestris* e *Senna macranthera* (Lin *et al.*, 1979, 1980) como *Cassia mild mosaic virus* (CasMMV). Recentemente Beserra *et al.* (2011) ao estudarem vírus de *Senna macranthera* caracterizaram uma região de *Potyvirus* e um membro de *Tymovirales*.

Neste contexto, a amostra de *Mimosa caesalpinifolia* mostrou-se hospedeira de uma espécie de vírus do gênero *Begomovirus*. De acordo com as Figuras 1, 2, 3 e 4, pode-se observar a ocorrência de um vírus ainda não identificado, mas pertencente ao gênero *Begomovirus*, observado na banda do gel de agarose na altura de 1100 pares de base, correspondente ao controle positivo.

Espécies de *Begomovirus* infectam um grande número de hospedeiras. Os sintomas típicos induzidos consistem em mosaicos foliares fortes como observado em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) infectadas com o *Bean golden mosaic virus* – BGMV e plantas de leiteiro (*Euphorbia heterophylla*) infectadas com o *Euphorbia yellow mosaic virus* – EuYMV. De acordo com Giordano *et al.* (2005), representantes de *Begomovirus* podem acarretar grandes prejuízos a suas hospedeiras

A gama de hospedeiras utilizada não apresentou sintomas característicos de *Begomovirus* após a inoculação mecânica com a espécie suspeita de hospedar o vírus. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que a grande maioria das espécies deste gênero de vírus não ser transmitido mecanicamente.

Realizou-se então a técnica de extração de DNA, seguida da técnica de RCA, utilizada para amplificar DNA circular de vírus presente em baixa concentração nos tecidos da hospedeira. Esta técnica foi utilizada por Almeida (2012), Albuquerque *et al.* (2011).

4.6. CONCLUSÕES

A análise da amostra de *Mimosa caesalpinifolia* que apresentava sintomas característicos do gênero *Begomovirus*, tal suspeita foi confirmada com a realização de extração de DNA e PCR da amostra, observando-se a banda decorrente de presença de *Begomovirus* em 1100 pares de base.

Assim sendo, espécies florestais de interesse econômico do no Cerrado Brasileiro apresentam grande potencial como reservatório de vírus, o que pode influenciar na distribuição e manutenção de isolados virais de importância para espécies agrônômicas que podem, futuramente, também se tornar importantes no meio de produção florestal. Tais resultados ainda influenciam positivamente na obtenção de espécies resistentes e um auxílio na área de melhoramento genético.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 3. ed. Academic Press, 803p. 1988.

ALBURQUERQUE, L. C.; INOUE-NAGATA, A. K.; PINHEIRO, B.; RIBEIRO, S. da G. RESENDE, R.; MOIRONES, E.; NAVAS-CASTILHO, J. **A novel monopartite begomovirus infecting sweet potato in Brazil**. Archives of Virology. V. 156, pp 1291-1294. Julho de 2011.

ALMEIDA, M. M. S. de. **Caracterização molecular de begomovirus de malváceas**. Tese de mestrado. Departamento de Fitopatologia. Universidade de Brasília. Brasília. 2012.

ARNDT, N.; VON BARGEN, S.; GRUBITS, E.; JALKANEN, R.; BUTTNER, C.; **Ocurrence of EMARAV and CLRV in tree species native to Finland**.

Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Zusammenfassungen der Arbeitskreisbeiträge, p. 78, 2009.

ÁVILA A.C. de, INOUE-NAGATA A. K., COSTA H, BOUITEUX L. S., NEVES L. O. Q., PRATES R. S., BERTINI, L. A. **Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo.** Horticultura Brasileira 22: 655-658. 2004

BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos.** São Paulo. Ceres. 1995. pp.417-453.

BERGER, P.H.; ADAMS, M.J.; BARNETT, O.W.; BRUNT, A.A.; HAMMOND, J.; HILL, J.H.; JORDAN, R.L.; KASHIWAZAKI, S.; RYBICKI, E.; SPENCE, N.; STENGER, D.C.; OHKI, S.T.; UYEDA, I.; ZAAYEN, A. van; VALKONEN, J.; VETTEN, H.J. **Family Potyviridae.** In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A (Ed.). *Virus taxonomy.* London: Academic Press, p.819-841, 2005.

BOITEUX LS, DE AVILA AC. **Inheritance of a resistance specific to *tomato spotted wilt tospovirus* in *Capsicum chinense*** PI 159236. *Euphytica* 75:139–142. 1994.

BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; SIMON, P. W. **Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot.** *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 32-38. 1999.

BUCHER, E., SIJEN, T., DE HAAN, P., GOLDBACH, R. & PRINS, M. **Negative strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions.** *Journal of Virology* 77:1329-1336, 2003.

CARPANEZZI, A. A. 2000. Benefícios indiretos da floresta, p. 19-56. In: Galvão, A. P. M. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais.** Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia; Colombo: Embrapa Florestas., Brasília, DF.

CHAVES, Z. M. **Fungos associados à *Mauritia flexuosa* (Buriti) e *Mauritiella armata* (Buritirana).** Tese de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília. 1998.

COSTA, A. S. **Identidade entre o mosaico comum do algodoeiro e a clorose infecciosa das malváceas.** *Revista Bragantia*, vol. 13, nº único, Campinas, XXIII-XXVI. 1954.

DALE, J. L.; GIBBS, A. J.; BEHNCKEN, G. M. ***Cassia Yellow Blotch Virus: A New Bromovirus from an Australian Native Legume, *Cassia pleurocarpa****. *J. gen. Virol.*, v. 65, p. 281-288, 1984.

DE ÁVILA, A. C. **Vírus do vira-cabeça do tomateiro (TSWV): organização do genoma, taxonomia, diagnose e controle.** Horticultura Brasileira 11:179-183. 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Folha de Viçosa, 1996. 262p.

DIANESE, J. C. MEDEIROS, R. B. & SANTOS, L. T. **Biodiversity of Microfungi Found on Native Plants of the Brazilian Cerrado.** In: Hyde, K. D. **Biodiversity of Tropical Microfungi.** Hong Kong University Press. 367-417. 1997.

DIANESE, J. C. **Micodiversidade associada a plantas do Cerrado.** In: **Tópicos atuais em Botânica.** Embrapa. 109-115. Brasília. 2000.

DIANESE E.C., RESENDE R.O., INOUE-NAGATA A. K. (2008) **Alta incidência de *Pepper yellow mosaic vírus* em tomateiro em região produtora no Distrito Federal.** Tropical PlantPathology 33:67-68.

DIANESE, E. C. **Estratégias para o desenvolvimento de resistência ampla e durável em *Solanum* (Secção *lycopersicon*) a *Potyvirus* e *Tospovirus*.** 2009; 156 f. Tese do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia. Universidade de Brasília.

DIANESE E.C., FONSECA MEN, INOUE-NAGATA AK, RESENDE RO, BOITEUX LS (2011) **Search in *Solanum* (section *Lycopersicon*) germplasm for sources of broad-spectrum resistance to four *Tospovirus* species.** Euphytica (online).

DORNELO-SILVA, D. **Fungos associados a plantas da família *Vochysiaceae* presentes no Cerrado.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, 1999.

DRUMOND, M. A. **Potencialidades das essências nativas do Trópico Semi Árido. Silvicultura em São Paulo,** São Paulo, v. 16-A, pt. 2, p. 766-778, 1982. Edição dos Anais do Congresso Nacional sobre Essências Nativas, Campos do Jordão. 1982.

FARIA, J. C.; BEZERRA, I. C.; ZERBINI, F. M. RIBEIRO, S. G.; LIMA, M. F. **Situação atual das geminiviroses no Brasil.** Fitopatologia Brasileira 25: 125-137. 2000.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. & BALL, L.A. (Eds.) **Virus taxonomy 8 th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier Academic Press. San Diego. 2005.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal-principais doenças florestais no Brasil.** Viçosa, MG: SIF, UFV, 1989. 570p.

FERREIRA C.A., GALVÃO, A.P. **Importância da atividade florestal no Brasil (2000)** In: Galvão, A.P.M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais**. Brasília. Embrapa Floresta, p.15-18.

GALVÃO, A. P. M. **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais**. Brasília:Embrapa/Comunicação para Transferência de Tecnologia; Colombo, PR. Embrapa Florestas, 2000.

GIORDANO, L. B.; FONSECA, M. E. N.; SILVA, IONUE-NAGATA, A. K.; BOITEUX, L. S. **Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial**. Horticultura Brasileira 23, 815-818. 2005.

GRAY, B. **Economic tropical forest entomology**. Annual Review of Entomology, V. 17, p. 313- 354, 1972.

HAWKSWORTH, D. L. **The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation**. Mycological Research 95: 64 1-655. 1991.

HAWKSWORTH, D. L. **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited**. Mycological Research 105: 1422-1432. 2001.

HOU, Y.-M., SANDERS, R., URSIN, V. M., AND GILBERTSON, R. L. **Transgenic plants expressing geminivirus movement proteins: Abnormal phenotypes and delayed infection by Tomato mottle virus in transgenic tomatoes expressing the Bean dwarf mosaic virus BV1 or BC1 proteins**. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:297-308, 2000.

HULL, R. **Matthews' Plant Virology**. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic Press. 2002.

IBAMA. **Ecosistemas Brasileiros**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm> . Acesso em fevereiro de 2013.

ICTV (2011) ICTV 2011 **Master Species List**. Disponível em http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4090.aspx

INOUE-NAGATA, A. K.; FONSECA, M. E. N.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; MONTE D.S.; DUSI A.N.; DE ÁVILA A.C.; VAN DER VLUGT R.A.A. **Pepper yellow mosaic virus, a new potyvirus in sweet pepper, *Capsicum annum***. Archives of Virology 147:849-855. 2002

JUNQUEIRA, N. T. V., GAMA M. I. C. S., KITAJIMA H. W., LESEMANN DE, LIEBEREI R. **Virose da seringueira: uma nova Enfermidade**. Manaus: EMBRAPA-CNPDS, 1987.

KALLINEN, A. K.; LINDBERG, I. L.; TUGUME, A. K.; VALKNEN, J. P. T. **Detection, Distribution and Genetic Variability of *European montan ash ringspot-associated virus***. Phytopathology, v. 99, p. 344-352, Finlândia, 2008.

KITAJIMA, E. W.; RÁCZ, M. L.; PINTO, A. A.; ALVES, S. B. **Diversidade de vírus de seres humanos, animais, plantas e insetos. In: Biodiversidade do estado de São Paulo, Brasil**; Serra Negra, São Paulo, volume 1, 118p, 1997.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. **A conservação do Cerrado Brasileiro**. Megadiversidade 1: 147-155. Belo Horizonte. 2005.

KRÜGNER, T.L. **Controle de doenças fúngicas em viveiros de *Eucalyptus* e *Pinus***. Circular técnica, IPEF, Piracicaba, (26): 1-5, 1977.

LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; CUPERTINO, F. P.; COSTA, C. L. **Properties of a possible *carlavirus* isolated from a Cerrado native plant, *Cassia sylvestris***. Plant Disease reposter 63: 501-505. 1979.

LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W. COSTA, C. L. **Association of *Cassia mild mosaic virus* with dieback of *Cassia macranthera* in central Brazil**. Plant Disease 64: 587-589. 1980.

MÉIO, B. B.; FREITAS, C. V.; JATOBÁ, L.; SILVA, M. E. F.; RIBEIRO, J. F.; HENRIQUES, R. P. B. **Influência da flora das florestas Amazônia e Atlântica na vegetação do cerrado sensu stricto**. Revista Brasileira de Botânica, v. 24, nº 4, 2003.

MIELKE N.; MÜHLBACH H.P. **A novel, multipartite, negative-strand RNA virus is associated with the ringspot disease of *European mountain ash* (*Sorbusaucuparia*L.)**. Journal of General Virology 88, 1337-1346. 2007

MIELKE N.; WEBER M.; KHAN S.; MÜHLBACH H.P. **Detection of *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV) in *Sorbusaucuparia*L. by a specific antiserum and reverse transcription-PCR**. Forest Pathology 38, 371–380. 2008.

MORA, A.L. & GARCIA, C.H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. Sociedade Brasileira de Silvicultura, São Paulo, SP. 2000.

MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. **The emergence and dissemination of whitefly-transmitter geminiviruses in Latin America**. Archives of Virology 146: 415-441. 2001

MORIONES E.; NAVAS-CASTILHO, J. **Tomato yellow leaf curl virus na emerging vírus complex causing epidemics worldwide**. Virus Research 71: 123-134. 2000

NAGAI, H. **Pimentão, pimenta-doce e pimentas.** In: Furlani, M.M.C. & Végas, G.P. **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo.** v.1. Campinas, São Paulo. Instituto Agrônomo. 1993. pp.276-294.

NAGATA, T.; MOUND, F. H.; FRANÇA, F. H.; DE ÁVILA, A. C. **Identification and rearing of four thrips species vectors of *Tospovirus* in the Federal District, Brazil.** Anais da Sociedade Brasileira de Entomologia 28: 535-539. 1999.

NIENHAUS, F. & CASTELLO, J. D. **Viruses in forest trees.** Phytopathol, v. 27, p. 165-86, 1989.

NIENHAUS, F.; BUTTNER, C.; HAMACHER, J. **Virus infection of forest trees by mechanical transmission.**Phytopathology, v. 129, p. 141-150, 1990.

OLIVEIRA, A. D.; LEITE, A. P.; BOTELHO, S. A.; SCOLFORO, J. R. S. **Avaliação econômica da vegetação de cerrado submetida a diferentes regimes de manejo e de povoamentos de eucalipto plantados em monocultivo.** Revista Cerne, v. 4, nº 1, p.034-056. 1998.

POLSTON, J. E.; ANDERSON, P. K. **Surgimiento y distribución de geminivirus transmitidos por moscas blancas en tomate en el Hemisferio Occidental.** Manejo Integrado de Plagas 53: 24-42. 1999.

RESENDE, R. O. **Diversidade de tospovirus no mundo. Informações resumidas sobre o “Internacional Symposium of *Tospoviruses* and Thrips of Floral and Vegetable Crops”.** Fitopatologia Brasileira 20: 656-657. 1995.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R. de.; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) Árvore de Múltiplo uso no Brasil.** Comunicado Técnico, Colombo, n. 14, p. 1-4, 2003.

RIBEIRO, J. F. &WALTER, B. M. T. **Fisionomias do bioma Cerrado.** In: **Cerrado: ambiente e flora.** Sano, S. M. &Almeida, S. P. (Ed.), Planaltina-DF. 1998.

RIECHMAN, J. L.; LAÍN, S.; GARCIA, J. A. **Highlights and prospects of potyvirus molecular biology.**Journal of General Virology, v. 73, p. 1-16, 1992.Madri, Espanha.

ROSELLÓ, S.; DIEZ, M. J. & NUEZ, F. **Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*.** European Journal of Plant Pathology 104: 499-509. 1999.

RUMBOU, A.; VON BARGEN, S.; BUTTNER, C.**A model system for plant-virus interaction-infectivity and seed transmission of *Cherry leaf roll virus* (CLR) in *Arabidopsis thaliana*.** Eur J. PlantPathol, v. 124, p. 527-532, 2009.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W.; CORDER, M. P. M. **Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais**. Ciência Rural, v. 38, nº 3, Santa Maria, 2008.

SNIPPE, M., BORST, W.L., GOLDBACH, R. & KORMELINK, R. **Tomato spotted wilt virus Gc and N proteins interact in vivo**. Virology 357:115-123. 2007.

SOUZA, E. S. do C. **Alguns fungos presentes em plantas nativas e exóticas do Cerrado**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília.

TAKEDA, A., SUGIYAMA, K., NAGANO, H., MORI, M., KAIDO, M., MISE, K., TSUDA, S. & OKUNO, T. **Identification of a novel RNA silencing suppressor, Nss protein of Tomato spotted wilt virus**. FEBS Letters 532:72-79. 2002.

TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. **Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests**. Trends in Biotechnology, v. 16, p. 439-446, 1998.

VALE, R. S. **Agrossilvicultura com eucalipto como alternativa para o desenvolvimento sustentável da zona da mata de Minas Gerais**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2004.

VELICEASA, D.; ENUNLU, N.; KÓS, P. B.; KOSTER, S.; BEUTHER, E.; MORGUM, B.; DESHMUKH, S. D.; LUKACS, N. **Searching for a new putative cryptic virus in Pinus silvestres L**. Virus Genes, v. 32, p. 177-186, 2006.

VICENTE, M. **Fisiologia de plantas infectadas por vírus**. Fitopatologia Brás., v.4, p.181-187, 1979.

YARWOOD, C.E. **Sulfite in plant virus inoculations**. Virology, v.39, p.74-78, 1969.

ZANÚNCIO, J. C.; FAGUNDES, M.; ZANUNCIO, T. V.; MEDEIROS, A. G. B. **Principais lepidópteros pragas primárias e secundárias de Eucalyptus grandis, na região de Guanhões, Minas Gerais, durante o período de junho de 1989 a maio de 1990**. Científica, v. 20, n. 1, p. 145-155, 1992.

ZANUNCIO, J. C.; BRAGANÇA, M. A. L.; LARANJEIRO, A. L.; FAGUNDES, M. **Coleópteros associados à eucaliptocultura nas regiões de São Mateus e Aracruz, Espírito Santo**. Revista Ceres, v. 41, n. 232, p. 584-590, 1993.

Anexo 1. Referências da Tabela 1, retirada de Nienhaus & Castello, 1989.

Amico, L. A., O'Shea, M. T., Castello, J. D., Hibben, C. R. 1985. **Transmission of tobacco mosaic and tobacco ringspot viruses from Moraine ash in New York.** Plant Dis. 69:542

Ashby, J. W. 1977. **Infection of karaka (*Corynocarpus laevigatus* JR & G. Forst.) by cucumber mosaic virus.** NZJ. Agric. Res. 20:533-34

Barnett, O. W. 1971. **Mosaic of blackjacket oak.** Plant Dis. Rep. 55:411
Biddle, P. G., Tinsley, T. W. 1968. Virus diseases of conifers in Great Britain. Nature 219:1387-88

Biddle, P. G., Tinsley, T. W. 1971. **Poplar mosaic virus in Great Britain.** New Phytol. 70:61-66

Biddle, P. G., Tinsley, T. W. 1971. **Poplar Mosaic Virus.** Commonw. Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol., Descr. Plant Viruses, No. 75. 3 pp.

Boccardo, G., Luisoni, E., Lovisolo, D. 1973. **Characterization of an Italian isolate of poplar mosaic virus.** Proc. 2nd Int. Congr. Plant Pathol., p. 928

Brack, J., Blattny, C. S. 1962. **Electron microscope investigation of poplar mosaic.** Phytopathology 52:954-55

Brzostowski, H. W., Grace, T. D. C. 1974. **Virus-like particles isolated from diseased Eucalypts.** Plant Dis. Rep. 58:92-93

Buttner, C., Nienhaus, F. 1989. **Virus contamination of soils in forest ecosystems of the Federal Republic of Germany.** Eur. J. For. Pathol. 19:47-53.

Casalicchio, G. 1965. **La punteggiatura cloro-necrotica del Fragsino maggiore.** Monti Boschi 16:39-46

Castello, J. D., Amico, L. A., O'Shea, M. T. 1984. **Detection of tobacco mosaic and tobacco ringspot viruses in white ash trees by enzyme-linked immunosorbent assay.** Plant Dis. 68:787-90

Castello, J. D., Amico, L. A., Shiel, P. 1983. **Seasonal distribution of tobacco mosaic virus in Moraine ash.** Phytopathology 73:364 (Abstr.)

Castello, J. D., Berbee, J. G. 1978. **The detection and elimination of viruses from hybrid poplar clones.** Am. Phytopathol. Soc. Phytopathol. News 12: 186 (Abstr.)

Cation, D. 1952. **Further studies on transmission of ringspot and cherry yellows viruses through seed.** Phytopathology 42:4 (Abstr.)

Cech, M., Kralik, O., Blatny, C. 1961. **Rod-shaped particles associated with virosis of spruce.** Phytopathology 51: 183-85

Ciferri, R., Corte, A., Rui, D. 1961. **Two viruses of Fraxinus: necrotic leaf curl and leaf marbling.** Riv. Patol. Veg. Ser. III 1: 241-50

Cooper, J. I. 1975. **Arabid mosaic virus, a cause of chlorotic symptoms in leaves of Fraxinus excelsior L.** Plant Pathol. 24:114-16

Cooper, J. I. 1979. **Virus Diseases of Trees and Shrubs.** Oxford: Inst. Terrestrial Ecol. 74 pp.

Cooper, J. I. 1980. **The prevalence of cherry leafroll virus in Juglans regia in the United Kingdom.** Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 15: 139-45

Cooper, J. I., Atkinson, M. A. 1975. **Cherry leaf roll virus, a cause of chlorotic symptoms in Betula spp. in the United Kingdom.** Forestry 48:193-203.

Cooper, J. I., Edwards, M. L. 1981. **The distribution of poplar mosaic virus in hybrid poplars and virus detection by ELISA.** Ann. Appl. Biol. 99:53-61

Cooper, J. I., Massalski, P. R. 1984. **Viruses and virus-like diseases affecting Betula spp.** Proc. R. Soc. Edinb. Sect. B 85:183-95

Cooper, J. I., Sweet, J. B. 1976. **The detection of viruses with nematode vectors in six woody hosts.** Forestry 49:73-78

Ferris, M. A., Castello, J. D., Sinclair, W. A. 1987. **Symptom development on white ash and green ash seedlings inoculated with viruses and a mycoplasma-like organism.** Phytopathology 77: 116 (Abstr.)

Ferris, M. A., Castello, J. D., Sinclair, W. A. 1989. **Effects of virus and MLO infection on green and white ash.** Phytopathology 79: In press

Ford, R. E., Moline, H. E., McDaniel, G. L., Mayhew, D. E., Epstein, A. H. 1972. **Discovery and characterization of elm mosaic virus in Iowa.** Phytopathology 62:987-92

Frenzel, B. 1987. **Untersuchungen zum Hormonhaushalt gesunder und kranker Nadelbaume. Final Rep. Projekt Europäisches Forschungszentrum für Massnahmen zur Luftreinhaltung.** Kernforschungszentrum Karlsruhe, KfK-PEF 41. 206 pp.

Fulton, J. P. 1969. **Transmission of tobacco ringspot virus to the roots of a conifer by a nematode.** Phytopathology 59:236

Fulton, J. P., Fulton, R. W. 1970. **A comparison of some properties of elm mosaic and tomato ringspot viruses.** Phytopathology 60: 114-15.

Fulton, J. P. , Kim, K. S. 1973 . **A virus resembling *tomato spotted wilt virus* in black locust.** Plant Dis. Rep. 57: 1 53-55

Fulton, R. W. 1970. ***Prunus necrotic ringspot virus*.** Commonw. Mycol. Inst./ Assoc. Appl. Bioi., Descr. Plant Viruses, No. 5 . 4 pp.

Gotlieb, A. R. 1974. **Isolation, characterization and transmission of *apple mosaic virus* in white birch and isolation and characterization of a latent virus in yellow birch.** PhD thesis. Univ. Wisconsin, Madison

Gotlieb, A. R. 1975. ***Apple mosaic virus* infecting yellow birch in Vermont.** Proc. Am. Phytopathol. Soc. 2:97 (Abstr.)

Gotlieb, A. R. , Berbee, J. G. 1973. **Line pattern of birch caused by *apple mosaic virus*.** Phytopathology 63 : 1 470- 77

Gruntzig, M. , Fuchs, E. , Kratkova, J. , Kegler, H. , Kleinhempel, H. , Richer, J. 1989. **Zum Erreger der virosen Zweignekrose an Süss-und Vogelkirschen (*cherry detrimental canker*) in der DDR.** Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz. In Press

Gugerli , P. , Voss, A. , Benz, G. 1986. **Elektronenmikroskopischer Nachweis von virusähnlichen Teilchen in Extrakten von Fichtennadeln.** Schweiz. Z. Forstwes. 1 37:237-44

Hamacher, J. 1986. **Viruskontamination von Forstgehölzen unter besonderer Berücksichtigung der Birke.** Mitt. Biol. Bundesanst. Land

Hamacher, J., Kreutz, G., Jacob, S. 1987. **Histologische Untersuchungen an Kirschenblattrollvirus-infizierten Birken.** Meded. Rijksfac. Landbouwwet. Gent. 52(3a) : 1 049-57

Hardcastle, T., Gotlieb, A. R. 1980. **An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *apple mosaic virus* in yellow birch.** Can. J. For. Res. 10:278- 83

Harrison, B. D. 1964. **Infection of gymnosperms with nematode transmitted viruses of flowering plants.** Virology 24:228-29

Hibben, C. R. 1966. **Transmission of a ringspot-like virus from the leaves of white ash.** Phytopathology 56:323-25

Hibben, C. R. , Bozarth, R. F. 1972. **Identification of an ash strain of *tobacco ringspot virus*.** Phytopathology 62: 1 023-29

Hibben, C. R. , Bozarth, R. F. , Reese, J. 1979. **Identification of *tobacco necrosis virus* in deteriorating clones of aspen.** For. Sci. 25:557-67

Hibben, C. R. • Hagar, S. S. 1975. **Pathogenicity of an ash isolate of *tobacco ringspot virus*.** Plant Dis. Rep. 59: 57-60

Hibben, C. R. . Reese, J. 1983. **Identification of tomato rings pot virus and mycoplasma-like organisms in stump sprouts of ash.** *Phytopathology* 73:367 (Abstr.)

Hibben, C. R. . , Reese, J. . , Castello ,J, D . 1988, **Identification of *tomato ringspot virus* in ash in New York,** *Plant Dis.* 72: 1 75 (note)

Horvath, J., Eke, I. . , Gal , T., Dezsery, M. 1 975 . **Demonstration of virus-like particles in sweet chestnut and oak with leaf deformations in Hungary.** *Z. Pflanzenk. Pflanzenschutz* 82:498-502

Hung, J. F. , Shao, P. H. . , Tung, D. c . , Pan, C . H . , Zhu, B . M . , et al. 1 98 1 **Observation o f rod-shaped virus particles in the trees infected with *Paulownia witches' -broom.*** *Ziran Zazhi (Nature Magazine)* 4:79-80

Jones, A. T. 1973. **A comparison of some properties of four strains of *cherry leaf roll virus.*** *Ann. Appl. Biol.* 74:2 1 1- 1 7 Jones. A. T. 1974. **Elm mottle virus.** *Commonwealth Mycol. Inst.IAssoc. Appl. Bioi. , Descr. Plant Viruses*, No. 1 39. 4 pp.

Jones, A. T . , Mayo. M. A. 1973. **Purification and properties of *elm mottle virus.*** *Ann. Appl. Biol.* 75:347-57

Kenknight. G. 1 960. ***Prunus injacunda* Small and *Acer rubrum* L., natural hosts of *peach rosette virus.*** *Plant Dis. Rep.* 44:220

Kim. K. S . , Fulton, J. P. 1973. **Association of viruslike particles with a ringspot disease of oak.** *Plant Dis. Rep.* 57: 1029-3 1

Kim, K. S . , Martin, E. M. 1978. **Viruslike particles associated with yellow ringspot of red bud.** *Am. Phytopathol. Soc. News* 1 2 : 1 99 (Abstr.)

Kovachevsky, J. C. 1 968. **Das Bohnengelbmosaik- Virus in Bulgarien.** *Phytopathol. Z.* 6 1 :4 1-48

Lana, A. O . , Agrios, G. N. 1974, **Properties of a strain of *tobacco mosaic virus* isolated from white ash trees.** *Phytopathology* 64: 1490-95

Lana. A. F., Thomas, O. T. , Peterson, Annu. RevJ. F. 1 980. **A virus isolated from sugar maple.** *Phytopathol. Z.* 97:214-18

Luisoni, E., Boccoardo, G . , Milne, R. G. 1 976. **Purification and some properties of an Italian isolate of *poplar mosaic virus.*** *Phytopathol. Z.* 85:65-73

Martin, R. R., Berbee, J. G . , Omeumu, J. O. 1 982. **Isolation of a potyvirus from declining clones of *Populus.*** *Phytopathology* 72: 1 1 58-62

Massalski, P. R. , Cooper, J. I. 1984. **The location of virus-like particles in the male gametophyte of birch, walnut, and cherry naturally infected with *cherry leafroll virus* and its relevance to vertical transmission of the virus.** Plant Pathol. 33:255-62

McNamara, D. G. 1980. **The spread of *arabis mosaic virus* through noncultivated vegetation.** Plant Pathol. 29:173- 76

Megahed, E. S., Moore, J. D . 1967. **Differential mechanical transmission of *Prunus* viruses from seed of various *Prunus spp.* and from different parts of the same seed.** Phytopathol. 57:82 1-22 (Abstr.)

Megahed, E. S. , Moore , J. D. 1969. **Inactivation of necrotic rings pot and prune dwarf viruses in seeds of some *Prunus spp.*** Phytopathology 59: 1758-60

Milinko, I . , Schmelzer, K. 1961 . **Zur Kenntnis der Mosaikkrankheit der *Robinia (Robinia pseudo-acacia L)*.** Phytopathol. Z. 4 1:36-41 Mircetich, S. M., Rowhani, A. 1984.

Mircetich, S. M . , Sanborn, R. R . ,Ramos, D . E. 1980. **Natural spread, graft transmission, and possible etiology of walnut blackline disease.** Phytopathology 70:962-68

Navratil, S. 1 98 1 . **A rhabdovirus associated wiith vein yellowing and vein necrosis of balsam poplar.** Phytopathology 7 1 :245 (Abstr.)

Navratil, S., Boyer, M . G. 1968. **The identification of *poplar mosaic virus* in Canada.** Can. J. Bot. 46:722-23

Navratil, S. , Boyer, M . G . 1972. **Ultrastructural changes in leaf tissue of *Populus deltoides* subsp. *angulata* Ait. infected with *poplar mosaic virus*** Can. J. For. Res. 2:308-1 2

Nienhaus, F. 1975. **Viren und virusverdachtige Erkrankungen in Eichen (*Quercus robur* und *Quercus sessiliflora*).** Z.Pflanzenkr. Pflanzenschutz 82:739-49

Nienhaus, F. 1985. **Infectious diseases in forest trees caused by viruses, mycoplasma-like organisms and primitive bacteria.** Experientia 4 1 :597-603.

Nienhaus, F. 1985. **Zur Frage der parasitiiren Verseuchung von ForstgehOlzen durch Viren und primitive Mikroorganismen.** AUg. Forstztg. 40: 1 19-24.

Nienhaus, F., Ebrahim-Nesbat, F., Fricke, M., Biittner, C., Welter, K. 1985. **Investigations on viruses from declining beech trees in Rhineland and Westfalia, Federal Republic of Germany.** Eur. J. For. Pathol. 1 5 :402-1 1

Nienhaus, F., Hamacher, J. 1989. **Virosen in Eschen.** AUg. Forstzg. In Press

Rowhani, A. , Mircetich, S . M., Shepherd, R. J., Cucuzza, J . D. 1 985. **Serological detection of cherry leafroll virus in English walnut trees.** Phytopathology 75:48-52

Sastry, K. S. M. , Thakur, R. N . , Gupta, J. A. , Pandotra, V. R. 1971 .**Three virus diseases of *Eucalyptus citridodora*.** Indian Phytopathol. 24: 1 23-26

Savino, V . , Quacquarelli, A . , Gallitelli, D . , Piazzola, P., Martelli, G. P. 1976. **Occurrence of two sap transmissible viruses in walnut,** 23-27. Mitt. Bioi. Bundesanst. Land Forstwirtschaft. BerlinDahlem 1 70:23-27

Schimanski, H. H . , Albrecht, H. J . , Kegler, H. 1980. **Sameniübertragung des Kirschenblattroll-Virus (*cherry leafroll virus*) bei der Hängebirke (*Betula pendula Roih*).** Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz 16:23 1-32

Schimanski, H. H . , Funk, T. 1968. **Untersuchungen über das Ausmass der Übertragung von KirschenringfleckenViren in den Samen von Vogelkirschen (*Prunus avium L.*).** Arch. Gartenbau 1 6: 143-50

Schimanski, H . H . , Schmelzer, K . , Albrecht, H. J. 1976. **Sameniübertragung des Kirschenblattroll-Virus bei Spätblühender Traubeneiche (*Prunus serotina Ehrh.*).** Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg . Abt. 2 1 3 1 : 1 17-19

Schimanski, H. H . , Schmelzer, K . , Kegler, H . , Albrecht, H. J . 1 975. **Wildwachsende Prunus-Arten der Untergattungen prunophora und padus als natürliche Wirtspflanzen für Kirschenringflecken-Viren.** Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2 1 30: 109—20

Schmelzer, K. 1962/1963. **Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 2. Mitteilung: Virosen an Forsythia, Lonicera, Ligustrum und Laburnum. 3 Mitteilung: Virosen an Robinia, Caryopteris, Ptelea und anderen Gattungen. 4.Mitteilung: Versuche zur Differenzierung und Identifizierung der Ringfleckenviren.**Phytopathol. Z. 46: 105-38, 235-68, 3 1 5-42

Schmelzer, K. 1966. **Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze. 5. Mitteilung: Virosen an Populus und Sambucus.** Phytopathol. Z. 55:317- 5 1

Schmelzer, K . 1967. **Zur Kenntnis des echten Robiniemosaik-Virus.** Phyttopathol. Z. 58:59-86

Schmelzer, K. 1968. **Neue Befunde über die geographische Verbreitung des Robiniemosaiks und über seine ursächlichen Viren.** Arch. Forstwes. 17:62 1-28

Schmelzer, K. 1969. **Das Ulmenscheckungs- Virus.** Phytopathol. Z. 64:39- 67

Schmelzer, K. 1 97 1 . **Robinia mosaic virus.** Commonw. Mycol. InsUAssoc. Appl. Bioi. Descr. Plant Viruses, No. 65 . 3 pp.

Schmelzer, K. 1972. **Das Kirschenblattroll- Virus (*cherry leafroll virus*) aus der Birke (*Betula pendula* Roth.)** Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 2 1 27: 10--1 2

Schmelzer, K. 1977. **Zick-, Forst-, und Wildgehölze.** In **Pflanzliche Virologie**, ed. M. Klinkowski, D. Spaar, 4:276- 405. Berlin: Akademie-Verlag
Schmelzer, K., Schmidt, H. E. 1967. **Untersuchungen an Viren der Zier- und Wildgehölze, 6. Mitteilung. Ergänzende Befunde an *Caryopteris* sowie Virosen an *Philadelphus*, *Aristolochia*, *Buddleja*, *Lycium* und *Aesculus*.** Phytopathol. Z. 62: 1 05—26

Schmelzer, K., Schmidt, H. E., Schmidt, H. B. 1966. **Viruskrankheiten und virusverdächtige Erscheinungen an Forstgehölzen.** Arch. Forstwes. 1 5 : 107-20.

Shiel, P. J. , Castello, J. D. 1985 . **Detection of tobacco mosaic and tobacco ringspot viruses in herbaceous and woody plants near virus-infected white ash trees in central New York.** Plant Dis. 69:791- 95

Subikova, V. 1973 . **The mechanical transmission of Euonymus mosaic virus, maple leaf perforation by leaf extract or leaf nucleic acid to herbaceous plants.** Bioi. Plant. 1 5 : 166-70

Sutakova, G. 1984. **Distribution of virus-, mycoplasma-, and rickettsia-like organisms in tissues of *Drepanosiphum acerinum* (*homoptera*, *Aphididae*).** Acta Entomol. Bohemoslov. 8 1 :241—45

Sweet, J. B. 1980. **Fruit tree infections of woody exotic and indigenous plants in Britain.** Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 1 5:23 1-38

Sweet, J. B. , Barbara, D. J. 1979. **A yellow mosaic disease of horse chestnut (*Aesculus spp.*) caused by *apple mosaic virus*.** Ann. Appl. Bioi. 92:335- 4 1.

Szirmai, J. 1972. **An Acer virus disease of maple trees planted in avenues.** Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung. 7 : 1 97- 207

Thomas, P.R. 1970. **Host status of some plants for *Xiphinema diversicaudatum* (Micol). and their susceptibility to viruses transmitted by this species.** Ann. Appl. Bioi. 65: 1 69-78

Varney, E. H. , Moore , J. D. 1952. **Strain of tomato rings pot virus from American elm.** Phytopathology 42:476- 77 (Abstr.)

Varney, E. H. , Moore , J. D. 1965. **Mechanical transmission of a virus from mosaic-infected elm to herbaceous plants.** Phytopathology 55:22 (Abstr.)

Winter, S. 1986. **Virus detection in beech *Fagus sylvatica* L. associated with forest decline.** Proc. Workshop Epidemiol. Plant Virus Diseases, pp. x-17. Orlando, FL : Int. Soc. Plant Pathol.

Winter, S., Nienhaus, F. 1989. **Identification of viruses from European beech (*Fagus sylvatica* L.) of declining forests in Northrhine-Westfalia (FRG)** Eur. J. For. Pathol. In press

Yarwood, C. E. 1971. **Erysiphaceae transmit virus to *Chenopodium*.** Plant Dis. Rep. 55:342-44

Yarwood, C. E., Hecht-Poinar, E. 1973. **Viruses from rusts and mildews.** Phytopathology 63 : 111-115.

Anexo 2. Protocolo de purificação de DNA de gel de agarose de TAE e TBE

GFX

➤ Captação da amostra:

- 1- Pesar um tubo de 1,5 ml
- 2- Cortar a banda de interesse e colocar no tubo
- 3- Pesar o tubo contendo a banda
- 4- Calcular o peso do gel de agarose
- 5- Adicionar 10 µl de Capture buffer tipo 3 para cada 10 mg de gel
- 6- Misturar por inversão
- 7- Incubar a 60 °C até a agarose dissolver completamente (aprox. 10'/ inverter de 3 em 3 minutos)

➤ Ligação da amostra:

- 1- Adicionar 600 µl de Capture buffer tipo 3 na coluna GFX Microspin contida no tubo coletor
- 2- Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto
- 3- Centrifugar a 16.000g por 30 segundos
- 4- Descartar o filtrado
- 5- Colocar a coluna de volta no mesmo tubo coletor e,
- 6- Repetir o passo de Ligação da amostra até que toda a amostra seja filtrada

➤ Lavagem e secagem:

- 1- Adicionar 500 µl de Wash buffer tipo 1
- 2- Centrifugar a 16.000g por 30 segundos
- 3- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo de 1,5 ml limpo

➤ Eluição:

- 1- Adicionar 10-50 µl de Elution buffer tipo 4 OU tipo 6
- 2- Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto
- 3- Centrifugar a 16.000g por 1 minuto
- 4- Estocar a -20 °C