

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

DISSERTAÇÃO

Vírus em Rosa do Deserto

Douglas Reis Rodrigues Proque

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA

Vírus em Rosa do Deserto

DOUGLAS REIS RODRIGUES PROQUE

Sob a orientação do Professor
Paulo Sergio Torres Briosso

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre** em Ciências, no
Curso de Pós-Graduação em
Fitossanidade e Biotecnologia
Aplicada, Área de Concentração

Seropédica - RJ
Dezembro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P962v

Proque, Douglas Reis Rodrigues, 1991-
Vírus em Rosa do Deserto / Douglas Reis Rodrigues
Proque. - Seropédica - RJ, 2024.
60 f.: il.

Orientador: Paulo Sergio Torres Briosi.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em
Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2024.

1. *Adenium obesum*. 2. *Cucumber mosaic virus*. 3.
Planta ornamental. 4. Teste imunocromatográfico. 5.
Teste de RT-PCR. I. Briosi, Paulo Sergio Torres, 1956
, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de pós-graduação em Fitossanidade e
Biotecnologia Aplicada III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA APLICADA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

DOUGLAS REIS RODRIGUES PROQUE

Dissertação/Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Mestre em Ciências), no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de Concentração em Fitossanidade.

DISSERTAÇÃO (TESE) APROVADA EM 20/12/2024



Prof. Dr. Paulo Sergio Torres Briosco – UFRRJ
(ORIENTADOR)

Documento assinado digitalmente
gov.br MONICA LAU DA SILVA MARQUES
Data: 28/01/2025 15:07:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr^a. Mônica Lau da Silva Marques – IFGoiano

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO SOUTO DE ALMEIDA
Data: 27/01/2025 15:01:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fábio Souto de Almeida – UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Neuza e Francisco, e a minha irmã Carine e meu cunhado Adilson, por sempre me apoiar nas decisões da vida. Sempre com muito amor e respeito. Obrigado, vocês são minha fonte de inspiração e sem dúvidas, o meu porto seguro. Dedico também, aos meus avós Sebastião Rodrigues e Perciliana Luciano Rodrigues, Maria Lemes Proque e José Proque, a trajetória de vocês sempre será fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Orientador Paulo Sergio Torres Briosco por sua orientação, pela amizade e profissionalismo no decorrer dos anos e também, pelos ensinamentos adquiridos até o presente momento e pelos aprendizados que virão. Agradeço também aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.) – UFRRJ. Nathalia, Thais, Savana, Etiene, Patrícia e Ivanete, obrigado pelas conversas e momentos únicos. Agradeço também a Luciana, obrigado pelo ensino sobre Rosa do Deserto e por sempre estar disposta a ajudar em todo momento.

Também não posso deixar de agradecer a todos meus amigos que sempre estiveram comigo nessa trajetória, mesmo que distantes. Sem vocês, a vida seria sem graça. Obrigado por cada momento. Em especial, gostaria de agradecer a Danielle, Diego Eduarda, Ana Claudia, Andressa, Keven, Paulo Afonso, Renato, Vileimar e Gabriel, durante esse período seja a distância ou pessoalmente, vocês sempre tiveram presente nos momentos de crises e risadas e sou muito grato a esses momentos. Aos demais amigos, não citarei aqui, mas saibam que vocês são essenciais nessa trajetória, obrigado por acreditarem em mim.

Gostaria de dedicar também a uma pessoa muito especial, Eugênia, eterna “Gênio da lua”. Infelizmente, no ano de 2024 essa pessoa de alma pura nos deixou, mas sua trajetória permitiu a todos que a conheceram, a importância de seguir sorrindo e de sempre seguir em frente, você foi e sempre será inspiração.

Agradeço também à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, juntamente ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada – PPGFBA pela oportunidade de realização dessa etapa acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado a todos que fizeram parte dessa trajetória até o momento.

RESUMO

PROQUE, Douglas Reis Rodrigues. **Vírus em Rosa do Deserto.** 2024. 60p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

A rosa do deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.] é uma planta ornamental que vem ganhando espaço no cenário de plantas ornamentais em diversos países, dentre eles o Brasil. Visto o destaque que a Rosa do Deserto apresenta no cenário econômico da floricultura, este trabalho tem como objetivo detectar e identificar a presença de vírus associado ao cultivo da cultura em questão. Para a realização deste trabalho foram analisadas 303 amostras de plantas de Rosa do Deserto, a partir de cultivo comercial na cidade de Seropédica, localizada no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.)/UFRRJ, no qual foram realizados testes biológico, sorológico e molecular para detectar e identificar a presença de vírus. Foi possível identificar o *Cucumber mosaic virus* (CMV) em 75 amostras das 303 amostras testadas. O isolado do CMV obtido foi transmitido por enxertia mas não por semente de *A. obesum*. O Teste Imunocromatográfico e o Teste RT-PCR foram os mais indicados para a detecção e identificação do vírus em amostras de *A. obesum*. Os resultados obtidos permitem a adoção de estratégia de controle deste vírus em plantas de *A. obesum* a partir de sementes de plantas infectadas com o vírus, possibilitando um aumento da produtividade desta planta ornamental no cenário mundial.

Palavras- chave: *Adenium obesum*, *Cucumber mosaic virus*, Planta Ornamental, Teste Imunocromatográfico, Teste de RT-PCR

ABSTRACT

PROQUE, Douglas Reis Rodrigues. **Virus in Desert Rose.** 2024. 60p. Dissertation (Masters in Plant Health and Applied Biotechnology). Institute of Biological and Health Sciences, University Federal Rural of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

The Desert Rose [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.] is an ornamental plant that has been gaining ground in the ornamental plant scene in several countries, including Brazil. Given the prominence that the desert rose presents in the economic scenario of floriculture, this work aims to detect and identify the presence of viruses associated with the cultivation of the crop in question. To carry out this work, 303 samples of Desert Rose plants were analyzed, from commercial cultivation in the city of Seropédica, located in the state of Rio de Janeiro. The samples were sent to the Official Phytosanitary Diagnostic Laboratory (L.O.D.F.)/ UFRRJ, where biological, serological and molecular tests were carried out to detect and identify the presence of viruses. It was possible to identify the *Cucumber mosaic virus* (CMV) in 75 samples of the 303 samples tested. The CMV isolate obtained was transmitted by grafting but not by seed of *A. obesum*. The Immunochromatographic Test and the RT-PCR Test were the most suitable for detecting and identifying the virus in *A. obesum* samples. The results obtained allow the adoption of a strategy to control this virus in *A. obesum* plants using seeds from plants infected with the virus, enabling an increase in the productivity of this ornamental plant on a global scale.

Keywords: *Adenium obesum*, *Cucumber mosaic virus*, Ornamental Plant, Immunochromatographic Test, RT-PCR Test

Figuras

- Figura 1: Realização da coleta presencial na casa da produtora. localizada em Seropédica, estado do Rio de Janeiro. (A) Diversas variedades de Rosa do Deserto cultivadas pela produtora; (B) Rosa do Deserto plantada em vaso para comercialização; (C) Folha de Rosa do Deserto com sintoma de mosaico. Fonte: Próprio autor..... 19
- Figura 2: Realização da inoculação mecânica nas instalações do laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário. (A) tampão; (B) extrato *Comelina* positivo; (C) Caudéx; (D) *Comelina* positivo Folha; (E) Flor; (F) raiz; e (G) folha. Fonte: Próprio autor. 21
- Figura 3: Sintomas de mosico apresentado após a inoculação mecânica. (A) extrato da flor da rosa do deserto; e (B) extrato *commelina nudiflora* L. Fonte: Próprio autor 25
- Figura 4: Pulgão utilizado no teste de transmissão por vetor (A) Visualização em microscópio do *Aphis gossypii*; (B) Afídeo encontrado nas flores de rosa do deserto... 27
- Figura 5: Bandejas com mudas de rosa do deserto, sendo: (A) Mudas a partir de semente de rosa do deserto; e (B) teste Imunocromatográfico 28
- Figura 6: realização do teste imunocromatográfico: (A) *Commelina nudiflora* testada positiva para CMV; *Commelina nudiflora* testada negativa para CMV. 29
- Figura 7: Teste Imunocromatográfico realizado em diferentes matrizes e com resultado positivo para CMV: (A) raiz; (B) folha; (C) Caudex; e (D) flor. Fonte: próprio autor.. 32
- Figura 8: Resultado obtido através do teste molecular. Fonte: Próprio autor. 33

Tabelas

Tabela 1: Resultados obtidos através do teste Imunocromatográfico de diversas matrizes de rosa do deserto 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivo geral.....	2
2.2 Objetivos específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Plantas Ornamentais.....	3
3.1.1 Mercado das Plantas Ornamentais	4
3.2 Rosa do Deserto [<i>Adenium obesum</i> (Forssk.) Roem. & Schult.].....	5
3.2.1 Origem, Distribuição Geográfica e Uso da Rosa do Deserto.....	6
3.2.2 Variedades das Espécies no Brasil.....	7
3.2.3 Formas de Propagação	9
3.3 Doenças em plantas ornamentais.....	9
3.4 Pragas.....	10
3.4.1 Ácaros	11
3.4.2 Pulgões ou afídeos	11
3.4.3 Tripes	12
3.4.4 Mosca Branca ou aleirodídeos.....	12
3.5 Vírus.....	12
3.5.1 <i>Cucumber mosaic vírus</i> (CMV) (= <i>Cucumovirus CMV</i>)	14
3.5.2 <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) (= <i>Orthotospovirus tomatomaculæ</i>)	15
3.6 Técnicas de diagnóstico de vírus	15
3.6.1 Teste Biológico (Gama parcial de hospedeiro).....	16
3.6.2 Teste Sorológico.....	16
3.6.3 Testes moleculares.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Coleta do material	18
4.2 Local de análises das amostras.....	20
4.3 Transmissão Mecânica.....	20
4.4 Enxertia, Votor e Transmissão por Semente.....	21
4.5 Teste Imunocromatográfico.....	22
4.6 Teste Molecular	23
4.6.1 Extração de RNA.....	23
4.6.2 Confecção dos Primers	23

4.6.3	Teste de RT-PCR.....	24
4.6.4	Eletroforese	24
4.7	Protótipo de kit Diagnóstico.....	24
4.8	Estratégia de Controle.....	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Testes Biológico	25
5.1.1	Transmissão Mecânica,.....	25
5.1.2	Enxertia,.....	26
5.1.3	Vetor.....	26
5.1.4	Transmissão por semente	27
5.2	Teste Imunocromatográfico.....	28
5.3	Teste RT-PCR	32
5.3.1	Teste molecular.....	32
5.3.2	Kit Diagnóstico	33
5.4	Estratégia de Controle.....	34
6.	CONCLUSÃO.....	34
7.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	35
7.	ANEXO	41

1. INTRODUÇÃO

A construção da agricultura convencional se baseia em torno de dois objetivos: realizar a maximização da produção e, consequentemente, a obtenção de maiores lucros (MICHEREFF & BARROS, 2001). Diante do objetivo da agricultura convencional, Botelho *et al.* (2015) relatam que o mercado de plantas ornamentais brasileiro tem apresentado grande relevância no agronegócio, influenciando na atividade econômica e social com promoção de renda e emprego, tornando-se umas das principais atividades entre micro e pequenos produtores em todo o país. Segundo Brainer (2019) as importações e exportações de flores e plantas ornamentais tem apresentado um aumento significativo ao longo dos anos, tal comportamento denota crescente demanda nas atividades que envolvem material vegetal, destinados ao setor de floricultura.

No território brasileiro, a Rosa do Deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.] se popularizou no decorrer dos últimos 20 anos, devido a não necessidade de áreas grandes para realizar o seu cultivo, tornando-se uma atividade rentável quando sua produção é destinada para fins paisagísticos em ambientes internos, podendo ser cultivada em vasos, fazendo com que a mesma se apresente como promissora no mercado de flores do agronegócio brasileiro ocasionando maior destaque na área de floricultura (JUNQUEIRA & PEETZ, 2016).

As doenças das plantas surgem a partir de interações dinâmicas entre o hospedeiro e o patógeno (com ou sem vetor), em estreita relação com o ambiente. Essas interações influenciam-se mutuamente, levando a alterações fisiológicas, histológicas e morfológicas nas plantas. De maneira simplificada, as doenças se manifestam quando há a presença de hospedeiros suscetíveis, patógenos virulentos e condições ambientais favoráveis (complexo causal). Além disso, o patógeno pode estar associado a um vetor ou não (AMORIN *et al.*, 1994).

Segundo Duarte (2001), a ocorrência de doenças virais pode causar grandes perdas às culturas, tendo em vista a complexidade dos métodos de controle, já que até o presente momento não existem substâncias de ação efetiva contra partículas virais em plantas. Dessa maneira, medidas indiretas são aplicadas como estratégia de controle, podendo ser utilizadas plantas resistentes, erradicação das plantas infectadas e do vetor, entre outras. O mesmo autor apresenta que com o crescimento significativo do cultivo de plantas ornamentais e a inserção de novas espécies e variedades, existe a possibilidade de que vírus antes relatados apenas em outras espécies como plantas para fins alimentícios ou de importância florestal, sejam detectados nas plantas destinadas para decoração. Por isso é de extrema importância a correta identificação do fitopatógeno relacionado a essas plantas.

A inserção da Rosa do Deserto no território nacional proporcionou uma nova fonte de renda para os produtores de plantas ornamentais e com o crescimento de sua produção surge a preocupação em relação as doenças e pragas presentes na espécie que podem gerar danos econômicos. Em outros países já foram relatados a presença de vírus que comprometem o desenvolvimento da planta e diminui a produção destinada ao comércio. Tais relatos permitem que sejam construídas dúvidas sobre a presença dos vírus nas plantas produzidas no Brasil, visto que as informações fitossanitárias sobre esta espécie são escassas na literatura brasileira (DA SILVA ROCHA,2021).

Sendo assim, torna-se indispensável realizar pesquisas sobre a planta em questão e adotar metodologias laboratoriais para que seja realizado a correta identificação dos vírus associados a *Adenium obesum* que podem vir a causar danos na produção e/ou servir de fonte de inóculo para outras espécies hospedeiras, assim como, a criação de insumos que permitam um diagnóstico com maior precisão e rapidez e, consequentemente, permitem que sejam adotadas medidas preventivas para reduzir a disseminação de agentes virulíferos na área plantada, assim como a obtenção e divulgação de informações fitossanitárias sobre o cultivo de Rosa do Deserto que sejam pertinentes aos produtores e consumidores brasileiros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Detectar e identificar a presença de vírus em Rosa do Deserto que possam afetar a produção, relatar sua ocorrência nas plantas e propor estratégia de controle para o vírus identificado, no estado do Rio de Janeiro.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar o(s) vírus associado(s) a virose em Rosa de Deserto e seus possíveis hospedeiros;
- Identificar o(s) vírus associado(s) a virose em Rosa de Deserto e sua transmissão;
- Desenvolver protótipos de kits diagnóstico para o(s) vírus associado(s) a virose em Rosa de Deserto;
- Levantamento parcial a nível nacional do(s) vírus associado(s) a virose em Rosa de Deserto;

- Identificar possíveis fontes de resistência ao(s) vírus associado(s) a virose em Rosa de Deserto;
- Estabelecer possível estratégia de controle para o vírus em Rosa de Deserto.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Ornamentais

As plantas ornamentais são aquelas que se destacam pela diferenciação no florescimento, aspecto ou na pigmentação da folha ou pela fisionomia da planta. Podendo muitas vezes, serem colocadas em recipientes que se destinam para a ornamentação de um ambiente, permitindo que seja mantida uma relação mínima entre o homem e a natureza (LORENZI & SOUZA, 2001; COSTA & COLESANI, 2011).

O uso dessas plantas está vinculado ao crescimento da urbanização nas cidades. Como resultado, a presença de elementos naturais no cotidiano das pessoas se tornou essencial, cumprindo diversas funções ecológicas, sociais e recreativas. Ademais, essas plantas ajudam a melhorar a saúde da população e do meio ambiente, atuando no controle do microclima, na redução da poluição do ar e do som, e até mesmo na qualidade dos ventos (COSTA & COLESANI, 2011).

Os fatores climáticos presentes no território brasileiro são favoráveis para o desenvolvimento do cultivo comercial de plantas ornamentais, sendo esses baseados na temperatura, umidade relativa, dentre outros fatores bióticos. Tais condições propiciam a diversificação de espécies vegetais, tornando vasto as opções de plantas com características fisionômicas que agradam e ganham a atenção de produtores, paisagistas e demais profissionais atuantes na floricultura, tornando-se uma atividade econômica relevante e lucrativa para a agricultura moderna (PITTA, 2008). No entanto, as plantas cultivadas para comercialização, seja no setor agrícola, ornamental e/ou florestal, estão sujeitas a doenças ocasionadas por agentes fitopatogênicos como as bactérias, espiroplasmas, fitoplasmas, fungos, plasmódioforídeos, protozoários, quitrídeos, nematóides, straminipilas, víróides, vírus associado ou não a vetor (ácaros, insetos, nematóides, plasmódioforídeos, quitrídeos) e aos fatores ambientais, desempenhando papel de relevância no cenário do agronegócio, bem como da agricultura familiar (BRIOSO & POZZER, 2013).

3.1.1 Mercado das Plantas Ornamentais

A literatura aponta que a produção e comercialização de flores e plantas no Brasil se inicia a partir do ano de 1940, com a chegada dos imigrantes europeus, de origem italiana e portuguesa, onde o que se era produzido tinha como destino decorações de festas de luxo da alta sociedade paulista juntamente com eventos comemorativos (TSUBOI & TSURUSHIMA, 2009). Durante muitos anos, a floricultura era vista como uma atividade artesanal, em que não se fazia necessário estudos ou investimentos em tecnologia, já que não era uma atividade que possuía representação no cenário agrícola e econômico. No Brasil, tal mercado foi impulsionado no início na década de 1950, tendo seu fortalecimento da região sudeste, com o crescimento da produção no Rio de Janeiro, voltada ao abastecimento do mercado local, a partir dos anos 1980 (AKI & PEROSA, 2002). Depois dessa época, a produção de plantas ornamentais tornou-se uma atividade econômica relevante, tornando-se um dos ramos mais lucrativos da agricultura moderna (PITTA, 2008).

O setor de flores e plantas ornamentais no Brasil tem se desenvolvido ao longo do tempo, com uma contribuição significativa dos imigrantes, especialmente dos japoneses e holandeses. A atuação dos holandeses, em particular, no estado de São Paulo, foi crucial para a expansão da produção, que se organizou progressivamente em nível nacional. Como resultado, a presença dessas flores é notável na cidade de Holambra, que se destaca como um importante centro de distribuição nos principais mercados varejistas e atacadistas do país (REIS & MARAFON, 2020).

As plantas ornamentais apresentam valor estético e paisagístico, e diversos fatores estão relacionados com o seu cultivo, envolvendo o cuidado, o bem-estar e o desenvolvimento de conhecimentos que envolve a planta. A comercialização de plantas para fins paisagísticos e decorativos está em expansão no Brasil e sua conservação vem sendo realçada, assim como para outras espécies de interesse econômico (DE ALMEIDA *et al.*, 2024)

A adoção de projetos de paisagismos em ambientes coletivos ou a realização de práticas de jardinagem caseira são fatores que também contribuíram para o crescimento econômico no mercado em questão, através do consumo de flores de corte, plantas em vaso, folhagens e demais formas de cultivo de espécies que permite ao homem estar em contato com a natureza, visto a recente percepção da necessidade e importância de tal ato. Dessa forma, os produtores de plantas ornamentais tiveram que ampliar a sua produção, expandir seu conhecimento e buscar maneiras de conseguir novas espécies para suprir a demanda do mercado consumidor, que tem buscado plantas exóticas (DA SILVA ROCHA, 2021).

A busca por novas espécies de plantas ornamentais, seja exótica ou não, é o que abastece e mantém o mercado ocupado por floricultores, paisagistas, produtores e colecionadores. Entre as diversas plantas destinadas a esse comércio a Rosa do Deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.], apresenta variedade nas cores de suas flores e no formato do caule, características essas que chamam atenção do consumidor em todo o mundo. No Brasil, o cenário comercial da espécie *Adenium obesum* é recente, no entanto, a planta foi apresentada aos brasileiros há duas décadas e, desde então, sua beleza ornamental vem sendo reconhecida (COLOMBO *et al.*, 2018).

A utilização de espécies exóticas tem sido essencial para o comércio de plantas ornamentais no território brasileiro (CAMILLO & TOMBOLATO, 2016). Segundo McBRIDE e colaboradores (2014) as plantas do gênero *Adenium* são consideradas exóticas por apresentarem formas arquitetônicas diversificadas, assim como seu aspecto de crescimento e cores de flores, fazendo com que a espécie ganhe espaço no mercado de flores e aumentando a diversificação no setor. No entanto, no ano de 2020 de acordo com a Instrução Normativa MAPA nº 64, de 02 de dezembro do ano mencionado, a espécie *Adenium obesum* foi introduzida na lista de referência de espécies vegetais domesticadas ou cultivadas ornamentais em território brasileiro (MAPA, 2020).

3.2 Rosa do Deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.]

As plantas do gênero *Adenium* se apresentam com formas arquitetônicas diversificadas, assim como seu aspecto de crescimento e a variação de cores de flores que pode ocorrer, resultando em uma grande diversificação para o comércio (McBRIDE *et al.*, 2014).

A *Adenium obesum*, comumente chamada de Rosa do Deserto, é uma Angiosperma pertencente à família botânica Apocynaceae e sua distribuição geográfica ocorre em regiões subtropicais, podendo ser encontrada algumas em regiões temperadas (SENNBLAD & BREMER, 2002). Segundo COLOMBO *et al.* (2015), a família Apocynaceae é composta por plantas diversificadas e que apresentam inúmeras utilizações, sendo mais destacadas as espécies frutíferas, como a mangaba *Hancornia speciosa* Gomes, espécies madeireiras, como as perobas *Aspidosperma* spp., e as ornamentais tropicais, como as *Catharanthus* spp., *Beaumontia* spp., entre outras.

A espécie *Adenium obesum* é classificada como uma planta xerófita, suculenta, arbustiva e ramificada, possui altura entre 0,4 e 4,0 m, súber de coloração diversa, de verde acinzentado a tons leves de cinza e marrom (PLAIZIER, 1980). Suas folhagens são de coloração verde escuro, podendo ter um aspecto brilhoso e suas flores possuem formação tubular sendo comum e predominante a coloração branca, porém pode ocorrer variação e apresentar tonalidades cor de rosa de acordo com a espécie e forma de propagação adotada (ROMAHN, 2012).

A Rosa do Deserto possui caule engrossado na base, como modificação para guardar água e nutrientes em locais áridos. Floricultores relatam que o engrossamento da base do caule pode ser moldado e alcançar altos valores de mercado, porém essa característica não se manifesta quando a planta é propagada por meio vegetativo, somente se forem utilizadas sementes. Por isso, é fundamental saber os fatores que podem interferir no processo fisiológico de germinação dessas plantas para que se tenha melhor aproveitamento e rendimento no seu cultivo (SANTOS *et al.*, 2015). Sendo assim, além de sua forma física diferenciada, pode ser cultivada em vasos, não necessitando de grande área de produção, assim como não necessita de um sistema de irrigação, visto que a anatomia do seu caule conta com um reservatório que armazena água e nutrientes por períodos de estiagem ou seca prolongada, essa vantagem permite boas condições de exploração e excelentes perspectivas de crescimento de cultivo e comercialização, já que sua floração ocorre no período de um ano e apresenta flores de cores variadas (MCLAUGHLIN e GAROFALO, 2002).

A Rosa do Deserto além de possuir característica ornamental, possui grande potencial antioxidante (ALSEINI, 2014), antimicrobiano (HOSSAIN, *et al.*, 2014; AKHTAR *et al.*, 2016) e, também, a partir do seu extrato pode ser usada para o controle de caramujos (BAKRY *et al.*, 2011). Alguns estudos revelam que existe ação inibitória em células cancerígenas (ARAI *et al.*, 2011). Nos últimos anos, foi perceptível o aumento quanto à comercialização de flores e folhagens de corte, flores envasadas e mudas de plantas com finalidade ornamental para utilização em projetos paisagísticos. Apesar da elevação da produção da Rosa do Deserto, existem poucas informações através de pesquisas científicas abrangendo tratos culturais, que afetam o crescimento e florescimento (McBRIDE *et al.*, 2014b), e fitopatógenos associados a *Adenium obesum*.

3.2.1 Origem, Distribuição Geográfica e Uso da Rosa do Deserto

Adenium obesum. é uma planta oriunda da África tropical e da Arábia, mas foi introduzida e naturalizada em diferentes partes do mundo, incluindo o sudeste asiático (Oyen, 2008 apud Talukdar, 2012). Esse mesmo autor relata que em alguns países africanos tropicais as rosas do deserto estão se extinguindo devido à destruição do seu habitat e a grande procura pela planta. Bhattacharjee (2006) apud Talukdar (2012) mencionou que na Índia, o interesse pela planta cultivada em vaso apresentava aumento, devido a sua popularidade paisagística e uso para decoração de interiores. A origem precisa da espécie é relatada sendo do sul do Saara, englobando Senegal, até o Sudão e Quênia, apresentando grande diversidade na Arábia Saudita, Omã e Iemen e no decorrer de seu processo de domesticação passou a ser relatada na Malásia, no Paquistão, na Índia, nas Filipinas, na Tailândia e na Indonésia, e posteriormente, na América e demais continentes (AKHTAR; HOSSAIN; SADI, 2017).

O potencial e reconhecimento da Rosa do Deserto como planta ornamental ocorreu após o processo de domesticação. Inicialmente, em seu local de origem o gênero *Adenium* eram utilizadas como planta medicinal. A partir dela eram produzidos medicamentos para as doenças de pele, o controle de piolhos, tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, controle de cáries, feridas e infecções nasais; vermicidas, como o antiplasmodial, anti-tripanosomal, anti-leishmania; dores musculares, de cabeça e de ouvido (HOSSAIN, 2018).

O conhecimento disponível na literatura sobre a distribuição geográfica, a caracterização dos habitats e os aspectos fenológicos das espécies de *Adenium* ainda é bastante limitado. Aprofundar essas informações é fundamental para um melhor entendimento da biologia dessas espécies, especialmente em relação ao seu potencial adaptativo frente a diferentes condições ambientais. Um conhecimento mais preciso pode guiar a busca por novos genótipos que se adaptem a variadas situações ambientais e impulsionar os avanços nas práticas culturais. Além disso, é crucial ressaltar a relevância de estudos experimentais que explorem diferentes condições de cultivo, incluindo tanto os aspectos fenológicos quanto o crescimento dessas plantas (DA SILVA ROCHA, 2021)

3.2.2 Variedades das Espécies no Brasil

O gênero *Adenium* abrange um conjunto de espécies com características notáveis que ainda são pouco exploradas por floricultores, colecionadores e entusiastas de plantas ornamentais. As variações observadas nesse gênero evidenciam seu grande potencial,

ressaltando a importância do conhecimento sobre a variabilidade e a diversidade genética para o aprimoramento das espécies, especialmente do *A. obesum*, uma das mais conhecidas. Entre as diversas espécies de *Adenium*, algumas se destacam como gigantes, alcançando alturas superiores a quatro metros, como é o caso de *Adenium socotranum* e *Adenium somalense*. Em contrapartida, existem também espécies anãs, como *Adenium oleifolium* e *Adenium crispum*, que não ultrapassam 0,5 metro de altura (DA SILVA ROCHA, 2021)

Adenium obesum é a espécie que demonstra a maior variação morfológica, especialmente em relação ao tamanho das flores, além de apresentar diferenças na forma e no indumento das folhas. Essa diversidade fenotípica é notável e contribui para a popularidade da planta entre colecionadores e entusiastas de jardinagem (MCLAUGHLIN; GAROFALO, 2002)

No Brasil, a variedade de cultivares de Rosa do Deserto disponíveis para os consumidores é bastante limitada. Até o momento, apenas cinco cultivares estão em processo de registro no Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), que são: HSW B401, HSW D106, HSW RS401, HSWRX210 e HSW V404. O desenvolvimento de novas cultivares é um processo que demanda tempo e investimentos significativos, resultando em altos custos de produção e exigindo uma equipe técnica qualificada e infraestrutura especializada. Por essa razão, o registro e a proteção das novas cultivares são etapas cruciais que não devem ser subestimadas por empresas e melhoristas. Porém, existem poucos programas de melhoramento dedicados à espécie Rosa do Deserto no Brasil (DA SILVA ROCHA, 2021)

As plantas destinadas ao comércio brasileiro são oriundas de empresas do setor de flores e plantas ornamentais, em sua maioria composta por pequenos e médios empreendedores, que realizam atividades de hibridação, avaliação, seleção e clonagem de materiais superiores, disponibilizando-os para comercialização sem qualquer registro ou proteção, ou seja, as variedades comercializadas da espécie *Adenium obesum*, não são registradas (DA SILVA ROCHA, 2021)

Alguns floricultores afirmam que o mercado já conta com mais de 500 padrões de cores diferentes. As antocianinas, uma classe de flavonoides, são as responsáveis pelas cores das pétalas, variando entre rosa, alaranjado, amarelo, vermelho, roxo, azul e pretas (nira) (KATSUMOTO *et al.*, 2007). Essas cores estão presentes nas flores da Rosa do Deserto, que também exibem variações, como áreas esbranquiçadas, amareladas ou avermelhadas, em diferentes intensidades. A diversidade de cores é atribuída a fatores genéticos, mas os fatores ambientais onde as plantas são cultivadas também desempenham um papel crucial na expressão dessas características (DA SILVA ROCHA, 2021).

3.2.3 Formas de Propagação

A Rosa do Deserto pode se propagar de duas maneiras: por meio da reprodução sexuada, utilizando sementes, ou pela reprodução assexuada, através de estaquia e enxertia. Embora a propagação por sementes seja importante para programas de melhoramento da espécie, a polinização enfrenta desafios, pois as flores masculinas e femininas apresentam problemas de esterilidade, resultando em uma baixa produção de sementes (DA SILVA ROCHA, 2021).

O método de estaquia tem se revelado eficaz para os produtores; no entanto, a dilatação da base do caule ocorre abaixo da superfície do solo, o que não é atraente para o mercado ornamental, uma vez que a estética da base dilatada não fica visivelmente exposta. Por outro lado, a enxertia é vista como uma opção viável e desejável, especialmente para variedades híbridas, embora exija um nível maior de habilidade por parte do viveirista (MC LAUGHLIN & GAROFALO, 2002; KANCHANAPOOM *et al.*, 2010).

A propagação *in vitro* representa uma alternativa viável para a Rosa do Deserto e seus híbridos. O cultivo *in vitro*, através da manipulação de explantes, condições de cultivo, meios de cultura e reguladores de crescimento, possibilita a produção em larga escala de mudas destinadas ao mercado ornamental. Contudo, o cultivo *in vitro* da Rosa do Deserto ainda está em fase de pesquisa, com o objetivo de estabelecer protocolos eficazes para o seu cultivo (KANCHANAPOOM *et al.*, 2010; COLOMBO *et al.*, 2018).

3.3 Doenças em plantas ornamentais

A fitopatologia é a ciência dedicada ao estudo das doenças em plantas e suas causas. Seu principal objetivo é investigar as enfermidades que afetam os vegetais, analisando a interação entre a espécie vegetal (hospedeiro) e os fitopatógenos, que incluem uma variedade de organismos como bactérias, espiroplasmas, fitoplasmas, fungos, plasmódioforídeos, protozoários, quitrídeos, nematóides, estraminipilas, viróides e vírus. Esses agentes podem atuar isoladamente ou em conjunto com vetores como ácaros, insetos, plasmódioforídeos, quitrídeos e nematóides, além de serem influenciados por fatores ambientais (BRIOSO, 2012; BRIOSO & POZZER, 2012; BRIOSO & POZZER, 2013).

As doenças de plantas representam toda modificação no seu processo fisiológico ou das suas estruturas, de acordo com as características de uma determinada doença. Não é apropriado “acusar” um dado organismo como a causa concreta de uma doença, visto que o organismo

ocasiona o desenvolvimento da doença sob a influência de outros fatores. A utilização do termo organismo causal é apropriada, pois entende-se que o mesmo é parte do complexo causal (RAVA & SARTORATO, 1994).

As plantas ornamentais, assim como qualquer ser vivo, estão sujeitas a adquirir doenças a partir dos agentes causais, chamados de “patógenos”. Esses podem ser agrupados em bióticos que são compostos pelos fitopatógenos, e abióticos que compreende fatores ambientais e antrópicos (temperatura, excesso ou pouca umidade do solo, luz, oxigênio, poluição do ar, deficiência nutricional, toxicidade de minerais e pesticidas e práticas culturais impróprias), formando assim uma condição limitante para a cultura (BELLE, 2008; FIGUEIREDO, 2008).

As doenças em plantas ornamentais, geralmente são causadas por agentes infecciosos de natureza parasitária, resultando em alterações fisiológicas e na transmissão de um tecido doente para um tecido sadio (AMORIM, 1994). Em regiões tropicais de temperatura elevadas e presença de umidade, o cultivo de plantas ornamentais com sua densidade de plantio, proporciona um ambiente favorável para o surgimento de doenças, que por sua vez limitam a produção e qualidade das plantas (BAIA *et al.*, 2011).

Quando se trata de doenças em plantas ornamentais existe uma particularidade em relação a intensidade e lesão ocasionada pela doença, por se tratar de plantas cujo cultivo possui suas próprias características e existência de grande número de espécies vegetais, assim como a diversidade de condições ambientais que as plantas demandam. As doenças causam danos financeiros, podendo ser de forma direta, ocasionando queda na produção, interferindo na sua qualidade, assim como sua beleza física. Porém, se um diagnóstico é dado de forma correta, o tratamento possibilita um estudo das peculiaridades das doenças pela interação planta – patógeno-ambiente, reduzindo os riscos de perda na produção (PITTA, 1990).

Os insetos podem ter um impacto significativo nas plantas ornamentais, principalmente através da transmissão de doenças que afetam seu vigor e aparência e em casos severos, essas infecções podem levar à morte da planta. O aparelho bucal dos insetos pode ser classificado como sugador ou mastigador, e ambos permitem a entrada de fitopatógenos nas plantas, principalmente a entrada de microrganismos virulíferos (JOYCES & TAKEMATSU, 2010).

3.4 Pragas

Os ácaros e insetos fitófagos são classificados como pragas quando suas populações alcançam níveis que podem causar danos significativos do ponto de vista econômico. Esses

ataques podem afetar diversas partes das plantas, resultando em redução do valor comercial, diminuição da produção e, em casos extremos, até a morte das plantas (IMENES, 2002).

3.4.1 Ácaros

Ácaros são classificados como artrópodes extremamente pequenos e que normalmente se alojam na parte inferior das folhas das plantas. Eles se distinguem dos insetos por serem tetrápodes, ou seja, possuem quatro pares de pernas. No entanto, em sua fase juvenil, apresentam três pares de pernas. Mesmo apresentando a segmentação do corpo (cefalotórax e abdômen), são muito próximos das aranhas. Os ácaros possuem dois fragmentos, sendo o idiossoma, que é o corpo e o gnatossoma que representa o aparato bucal, que é formado por um par de quelíceras acima da abertura oral e subcapítulo, composto pela união das coxas do palpo, que dão origem ao tubo de alimentação. Os ácaros fitófagos utilizam as quelíceras como estiletes para cortar as folhas (FLECHTMANN, 1975).

As folhas da Rosa do Deserto ao serem atacadas por ácaros, costumam apresentar lesões cloróticas em ambos os lados (GALLO *et al*, 2002) e, também, apresentam sinais de folhas retorcidas, chamados de encarquilhamento, com pontuações esbranquiçadas. Entre os principais grupos destacam-se os ácaros da Leprose (*Brevipalpus phoenicis*), ácaros-vermelhos (*Tetranychus ludeni*), ácaros-brancos (*Polyphagotarsonemus latus*) (PICANÇO, 2013).

3.4.2 Pulgões ou afídeos

Os pulgões são insetos diminutos, com tamanhos que variam de 1,0 a 6,0 mm de comprimento. Possuem um corpo macio e podem apresentar uma coloração diversificada, incluindo verde, marrom, preto, amarelo e avermelhado. (IMENES, 2002; FARINHA, 2006). Esses organismos são identificados por possuírem dois apêndices abdominais laterais, conhecidos como sifúnculos, cuja função ainda não é bem definida. Além disso, possuem um apêndice central chamado codícola, que serve para a eliminação de um líquido açucarado. Eles também apresentam um par de antenas filiformes. As formas aladas contam com dois pares de asas membranosas, sendo o par anterior maior que o posterior. Esses seres costumam ser encontrados em colônias, especialmente nas áreas de crescimento das plantas, como brotações e folhas novas (IMENES, 2002).

Os pulgões se alimentam da seiva das plantas, o que resulta em sintomas como amarelecimento, enrugamento, deformação e definhamento, podendo até levar à morte da planta devido ao seu enfraquecimento. Durante a alimentação, esses insetos excretam um

líquido açucarado que se deposita nas folhas, criando um ambiente propício para o crescimento de fungos que causam a doença denominada de Fumagina. Essa fungos reduzem a área disponível para a fotossíntese e a respiração da planta. Além disso, o líquido açucarado oriundo dos pulgões atrai formigas doceiras, que começam a conviver com os pulgões, oferecendo proteção contra seus predadores naturais. Por meio das picadas de prova e de alimentação, os pulgões podem transmitir vírus (IMENES, 2002; FARINHA, 2006).

3.4.3 Tripes

Os tripes possuem a cabeça com formato quadrangular e um par de antenas filiformes, apresentam dois pares de asas estreitas e franjadas na fase adulta, na qual os permite ser caracterizado. Encontram-se em colônias na face inferior das folhas, em ramos e nichos de flores e frutos e seu tamanho varia de 0,5 a 13,0 mm de comprimento, sendo assim são extremamente pequenos. A coloração é variável, sendo claros em sua fase jovem e no decorrer de sua fase adulta vão escurecendo. Os tripes sugam a seiva e com isso as partes vegetais afetadas sofrem descoloração e apresentam manchas com pontuações necrosadas no local das picadas. O ataque severo resulta em lesões nas áreas afetadas que se assemelham a queimaduras, apresentando um brilho prateado. Na parte inferior das folhas, é comum observar pequenas pontuações aquosas escuras, originadas dos excrementos do inseto. Além disso, esses insetos podem transmitir fitopatógenos, especialmente vírus, por meio de suas picadas durante a alimentação (IMENES, 2002).

3.4.4 Mosca Branca ou aleirodídeos

Os aleirodídeos são insetos pequenos, medindo cerca de 1,0 mm de comprimento. Na fase adulta, apresentam dois pares de asas membranosas cobertas por uma poeira branca, o que lhes confere o nome popular de “mosca branca” ou “piolho farinhento”. Seus ovos possuem um pedúnculo e as formas jovens são ápteras e fixas, frequentemente sendo confundidas com coccídeos. Esses insetos se instalaram na parte inferior das folhas, formando grandes colônias envoltas em filamentos cerosos. Eles se alimentam da seiva das plantas, o que pode levar ao definhamento e até à morte das mesmas. Além disso, os aleirodídeos podem transmitir viroses e favorecer o desenvolvimento de fumagina (IMENES, 2002).

3.5 Vírus

De acordo com Agrios (2005), os vírus são compostos por nucleoproteínas que conferem a eles a capacidade de causar doenças. Essas entidades patogênicas apresentam características notáveis, como seu tamanho reduzido, que só permite sua visualização por meio de microscópios eletrônicos. Além disso, a sua multiplicação ocorre exclusivamente em células vivas da planta hospedeira. Estima-se que aproximadamente 90% dos vírus que infectam plantas tenham RNA como seu material genético. Entre os gêneros mais importantes que infectam hortaliças, são citados os cucumovírus (família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*), os potyvírus (família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), os tospovírus (família *Tospoviridae*, gênero *Orthotospovirus*), os geminivírus (família *Geminiviridae*, principalmente o gênero *Begomovirus*) e os tobamovírus (família *Virgaviridae*, gênero *Tobamovirus*), quando se leva em consideração a importância econômica das culturas que são afetadas e os prejuízos que podem causar. Dos vírus citados acima, somente os geminivírus possuem DNA como material genético. Os tobamovírus são disseminados através das plantas por meio dos tratos culturais, e os demais, por insetos. Assim, os cucumovírus e potyvírus são transmitidos por afídeos (pulgões); os tospovírus e geminivírus são transmitidos por tripes e mosca branca, respectivamente (LIMA, 2013).

Os vírus são caracterizados por serem parasitas intracelulares obrigatórios, os mesmos não são capazes de gerar energia para realização dos processos biológicos, que são necessários para o desenvolvimento de um organismo. Sua transmissão na natureza é realizada por diversas maneiras, podendo ser realizada através de fermentos, por vetores ou outras formas que possibilitem que a parede celular sofra alguma danificação para que se possa atingir o citoplasma, isso quando se trata de vírus que infectam plantas (RIVAS, 2008; RIVAS *et al.*, 2021).

Os sintomas externos presentes nas plantas tendem a ser sistêmicos, existindo mais de um tipo. A planta pode apresentar lesões cloróticas ou necróticas, sua folha e nervura podem sofrer espessamentos, apresentando também clorose, mosaico ou nanismo. No entanto, apenas os sintomas apresentados nem sempre são suficientes para a identificação correta e segura da doença (KIMATI *et al.*, 2005).

A diagnose correta e precisa é resultado da identificação do agente causal, assim como o conhecimento da distribuição na área que ocorre o plantio, tais informações são de extrema importância para que se possa definir e estabelecer medidas eficazes de controle. Tendo isso em mente, diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para que ocorra a detecção e identificação dos vírus em plantas, sendo utilizado de testes biológicos, físico-químicos,

sorológicos e moleculares para a diagnose de doenças virais (LIMA, 2013). Uma pesquisa na literatura, revela a presença de *Tomato spotted wilt virus* em Rosa do Deserto na Flórida (ADKINS & BAKER, 2005) e no mesmo local, existe relatos da presença do *Cucumber mosaic virus* na mesma espécie (BAKER *et al.*, 2003).

3.5.1 *Cucumber mosaic vírus* (CMV) (= *Cucumovirus CMV*)

O *Cucumber mosaic virus*, conhecido como vírus do mosaico do pepino, ocasiona doenças como mosaico ou clorose infecciosa da bananeira, sendo um vírus cosmopolita ocorrendo em todo o território brasileiro (MEISSNER FILHO; BRIOSO, 2000). Uma de suas primeiras aparições foi em pepino, onde Doolittle em 1916, que constatou sua presença no mesmo e em outras cucurbitáceas. Após sua descoberta, o vírus tem ocorrido no mundo inteiro, infectando mais de 1.200 espécies em mais de 100 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas (ZITTER; MURPHY, 2009).

O CMV pertence à família *Bromoviridae*, sendo composta por seis gêneros, o *Alfamovirus* (1 espécie), *Anulavirus* (3 espécies), *Bromovirus* (7 espécies), *Cucumovirus* (4 espécies), *Ilarvirus* (32 espécies), e *Oleavirus* (1 espécie) sendo o CMV pertencente ao gênero *Cucumovirus* (BUJARSKI *et al.*, 2012; ICTV, 2023).

O CMV possui partículas isométricas com diâmetro variando de 28 a 30 nm e apresenta um capsídeo composto por 180 subunidades protéicas com massa molecular de 24 kDa (PALUKAITIS *et al.*, 1992). Palukaitis *et al.* (1992) apresenta que: “seu genoma contém três RNAs de fita simples, senso positivo, designados de RNA 1, RNA 2 e RNA 3, que são encapsidados em partículas individuais, além de um quarto segmento subgenômico. O RNA 1 contém 3357 nucleotídeos e codifica a proteína 1a de 111 kDa (ORF 1a), que é necessária para a replicação do genoma do vírus. O RNA 2, com 3050 nucleotídeos, codifica a proteína 2a de 97 kDa (ORF 2a), que está envolvida na replicação do vírus, e a proteína 2b de 15 kDa (ORF 2b), que está relacionada com a supressão do mecanismo de silenciamento gênico do hospedeiro, sendo responsável pela disseminação sistêmica e pela virulência do vírus. O RNA 3 codifica a proteína 3a, proteína de movimento (MP) com 30 kDa, requerida para o movimento do vírus de célula a célula e à longa distância, e a proteína da capa proteica de 24,5 kDa, a qual é traduzida a partir do RNA 4 subgenômico com 1034 nucleotídeos. Este RNA 4 é sintetizado a partir do RNA 3”.

Segundo Aranda *et al.* (1993), alguns de seus isolados podem apresentar um RNA pequeno, sendo chamado de RNA satélite (satRNA), ou RNA5, de 335 a 390 nucleotídeos,

geralmente presente no subgrupo II, dependendo do vírus para a sua replicação e encapsidação. Este RNA não codifica proteínas, mas pode acarretar na alteração dos sintomas induzidos pelo vírus (KAPER & WATERWORTH, 1977) e a presença do mesmo, geralmente acentua os sintomas causados pelo CMV por afetar seu nível de replicação (PALUKAITIS *et al.*, 1992).

Além de ser conhecido por infectar bananeira, o CMV age também em plantas ornamentais e olerícolas, incluindo alface, tomateiro, pimentão, abóbora, melão, e inúmeras outras espécies (KITAJIMA, E.W. 2020). Por isso a importância em relação a danos de produção nos setores ornamentais causados pelo vírus.

3.5.2 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (= *Orthotospovirus tomatomaculæ*)

O *Tomato spotted wilt virus* pertence à família *Tospoviridae*, do gênero *Orthotospovirus*, apresenta partículas esféricas ou pleomórficas com diâmetro entre 80 e 110 nm. Seu genoma é formado por três segmentos de RNA denominados S ("small"), M ("medium") e L ("large"). O S RNA possui duas fases abertas de leitura - ORFs (*ambisense*) que codificam uma proteína não estrutural (gene *NSs*) e a proteína do nucleocapsídeo (gene *N*). O M RNA também possui duas ORFs (*ambisense*) que codificam a proteína de movimento (*NSm*) e um precursor das glicoproteínas (*G1/G2*), e o L RNA apresenta uma única ORF (senso negativo) que codifica a polimerase viral (gene *L*) (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

As plantas infectadas por TSWV apresentam sintomas variados, sendo este de acordo com a espécie de planta hospedeira e cultivar, com a idade da planta, o momento da infecção e com as condições edafoclimáticas. Os sintomas da doença podem ser vistos nos caules, folhas, frutos e/ou pétalas das plantas infectadas, no entanto, os sintomas mais frequentes são encontrados nas folhas, onde as mesmas apresentam manchas cor-de-bronze, marmoreados e mosaicos, manchas e pontuações cloróticas e necróticas, arabescos e anéis necróticos e/ou cloróticos. Já nos frutos são mais observados anéis necróticos e/ou cloróticos e deformações. As plantas infectadas normalmente apresentam tamanho reduzido (RAMALHETE, 2007).

Conhecido como vírus do bronzeado do tomateiro, o *Tomato spotted wilt virus* afeta culturas hortícolas e, também, ornamentais tanto em produção em estufas como em ar livre (PEREIRA & CORTEZ, 1994).

3.6 Técnicas de diagnóstico de vírus

Existem inúmeras técnicas desenvolvidas para a detecção de vírus, que podem variar em complexidade. Algumas abordagens são simples, como o uso de plantas indicadoras, enquanto outras são mais precisas, incluindo métodos sorológicos e moleculares (ALMEIDA, 2009).

Segundo Daniel (1999), para a implementação das técnicas, é essencial que haja uma alta repetitividade e sensibilidade na distinção do vírus alvo em relação a outros fitopatógenos potenciais, a fim de evitar resultados falso positivos. Além disso, as técnicas devem ser rápidas, de fácil manuseio e apresentar um custo acessível.

3.6.1 Teste Biológico (Gama parcial de hospedeiro)

O método biológico envolve a transmissão do vírus por meio de enxertia ou inoculação mecânica. Esse processo pode ser aplicado a dois grupos de plantas hospedeiras: o primeiro consiste em plantas lenhosas, que incluem diferentes cultivares de copa ou porta-enxerto, sensíveis a certas viroses. O segundo grupo é formado por plantas herbáceas, conhecidas como plantas indicadoras. A escolha dessas plantas é feita conforme a doença que se deseja identificar (FAJARDO & NICKEL, 2015).

Com a técnica biológica é possível a identificação do vírus, mas não determina especificamente a espécie viral que causa os sintomas. A maior limitação deste método é o espaço e tempo requerido e para e manter e observar as plantas até que o diagnóstico final seja realizado (NICKEL & FAJARDO, 2009).

Utilizando as plantas herbáceas, a inoculação é realizada mecanicamente. O método consiste na utilização das folhas infectadas com vírus, as mesmas são maceradas em solução tampão e o extrato é friccionado na superfície das folhas da planta indicadora, anteriormente triturada com agentes abrasivos, que por sua vez causam pequenos ferimentos no limbo foliar das plantas, facilitando a entrada das partículas virais no tecido vegetal. Após realizado esse processo, as plantas devem ser mantidas em casa de vegetação e observadas, no período de cinco a vinte dias. Dado esse tempo, as plantas indicadoras apresentarão sintomas, caso o vírus tenha realmente sido transmitido (FAJARDO & NICKEL, 2015).

3.6.2 Teste Sorológico

O Teste Imunocromatográfico é um teste sorológico, conhecido como ensaio de fita, *dipstick* ou ensaio de fluxo lateral, é utilizado na detecção de diferentes patógenos e substâncias como hormônios e pesticidas (ROCHA, 2012). O teste em questão é vantajoso devido à sua

rapidez, e praticidade, podendo ser utilizado em campo e por pessoas não treinadas, visto a facilidade de aplicação e leitura dos resultados (PEAK *et al.*, 2000; CHIAO *et al.*, 2004).

Composto por dois anticorpos com ligação distinta a epitopos presentes em uma molécula analisada, um dos anticorpos é o de detecção, ele é marcado com um gerador de sinal (esfera de látex ou ouro coloidal) e outro de captura. O anticorpo de detecção é desidratado em uma membrana, de modo que seja dissolvido em contato com meio aquoso, contendo a molécula a ser detectada. Após vinte minutos, aproximadamente, o sinal de cor gerado pela reação poderá ser quantificado e/ou qualificado (PEAK *et al.*, 2000).

O teste sorológico em questão, consiste na reação enzimática do antissoro e antígeno. O material infectado com vírus ao estabelecer contato com a enzima, desencadeia a reação e pode ocorrer aparecimento de cor na fita, o que significa resultado positivo para presença de vírus (RÊGO, 2017).

3.6.3 Testes moleculares

As técnicas moleculares tornaram-se de extrema importância para diagnosticar a presença de vírus nas plantas, devido a sua precisão e eficácia. O teste em questão se distingue dos testes sorológicos pela molécula identificada, uma vez que se baseia na identificação do material genético dos vírus, tornando possível identificá-lo, mesmo quando estão em estágio de latência e em concentrações reduzidas (TOMAZETTI, 2016).

A maioria dos vírus que afetam as plantas, possuem o RNA fita simples como material genético, por essa razão é necessário executar a transcriptase reversa, para que se possa produzir cDNA (ZHU *et al.*, 2010). Por esse motivo as técnicas de RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) e qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), se demonstram precisas e eficazes no monitoramento e diagnose de vírus (HAJIZADEH, *et al.*, 2012; LÓPEZ-FABUEL *et al.*, 2013).

Lima e Fajardo (2012) relatam que “a RT-PCR se baseia na amplificação e detecção do material genético dos vírus de RNA e a PCR na amplificação e detecção do material genético dos vírus de DNA, em amostras vegetais infectadas. Para a detecção, é necessário que pelo menos uma parte da sequência de nucleotídeos do genoma viral seja conhecida, pois isso permite a criação dos iniciadores, ou primers, utilizados na reação. O processo envolve as enzimas transcriptase reversa e *Taq* DNA polimerase, sendo automatizado por meio de um termociclador programado para realizar a transcrição reversa do RNA em DNA complementar e, em seguida, executar múltiplos ciclos da PCR, que visam à produção de um grande número

de cópias do fragmento alvo deste DNA. Assim, a amplificação seletiva de um segmento do genoma viral é realizada a partir do RNA viral utilizado como molde. Os produtos resultantes da reação são visualizados através de eletroforese em gel de agarose. O brometo de etídeo, um corante amplamente utilizado, se intercala na molécula de DNA e altera o comprimento de onda emitido sob luz ultravioleta, permitindo a visualização na forma de uma banda.

Dentre os métodos moleculares, ou seja, aqueles baseados na detecção do ácido nucleico, a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é o mais utilizado. A principal vantagem desse método é a sua elevada sensibilidade. Mesmo quando a amostra vegetal apresenta quantidades reduzidas do patógeno, a amplificação por PCR permite sua detecção. Caso não seja observado nenhum DNA de dimensão desejado no gel de agarose, a amostra vegetal pode não estar infectada ou a concentração do vírus se encontra abaixo do limiar de detecção para esse método ou os primers utilizados não possuem homologia com a sequência viral suficiente (LIMA & FAJARDO, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material

A coleta do material foi realizada no decorrer dos anos de 2022, 2023 e até o mês novembro de 2024. Inicialmente foram coletadas no ano de 2023 algumas plantas em vasos que apresentavam sintomas e plantas sem presença de sintomas. Essas amostras foram cedidas pela produtora de Rosa do Deserto que reside na cidade de Seropédica, localizada no Rio de Janeiro, situado em 22°47'43.44"S e 43°38'45.276"W. Sua produção é realizada no quintal de sua casa e a espécie cultivada no local é *Adenium obesum* e as plantas são comercializadas através de sua pequena empresa, chamada L & E Rosas do Deserto. Todas as plantas são cultivadas em vasos, cujo tamanho varia de acordo com o tamanho da planta, algumas ao ar livre e outras em estufa envolto por sombrite 50% para isolamento solar. Posteriormente, a produtora mencionada passou a realizar o envio de amostras para o Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário, sendo essas compostas por folha, flores, talos e raiz.

Foram analisadas o total de 303 amostras, escolhidas pela própria produtora, sendo que algumas das plantas escolhidas apresentavam sintomas de mosaico nas folhas e outras não apresentavam (Figura 1).

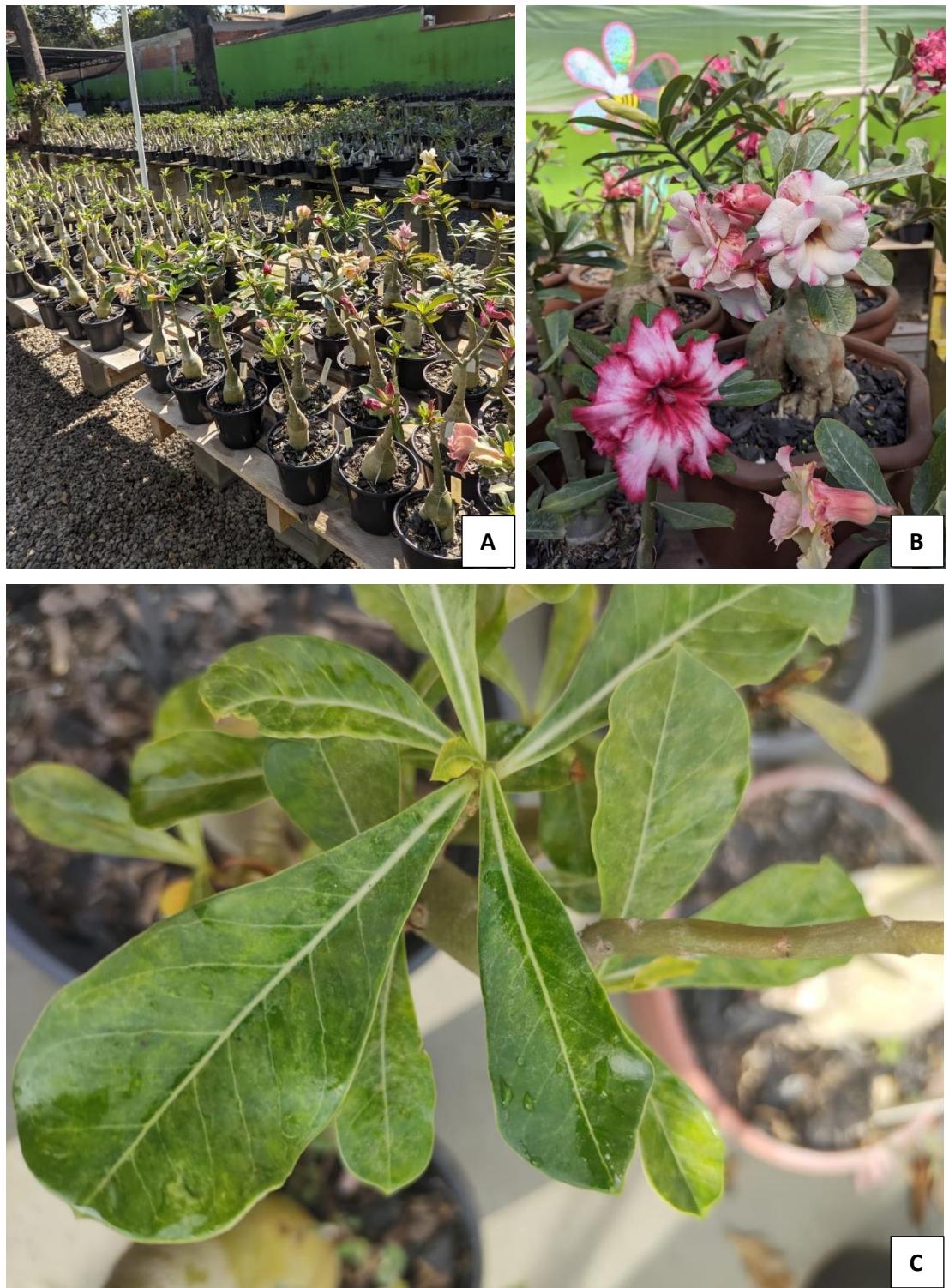


Figura 1: Realização da coleta presencial na casa da produtora, localizada em Seropédica, estado do Rio de Janeiro. (A) Diversas variedades de Rosa do Deserto cultivadas pela produtora; (B) Rosa do Deserto plantada em vaso para comercialização; (C) Folha de Rosa do Deserto com sintoma de mosaico. Fonte: Próprio autor

4.2 Local de análises das amostras

As análises foram realizadas no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.), localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. Situa-se a 22° 45' S e 43° 43' W, no km 07 da BR 465 (conhecida como antiga Rio-São Paulo). O laboratório em questão é credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para diagnóstico fitossanitário em produtos de origem vegetal.

Os testes biológicos foram efetuados na casa de vegetação designada pelo L.O.D.F., localizado no mesmo endereço mencionado acima e os demais testes foram realizados dentro das instalações do L.O.D.F.

4.3 Transmissão Mecânica

Para a inoculação mecânica foi utilizado como fonte de vírus folhas com sintoma de mosaico de *A. obesum* e como planta indicadora foi utilizada plantas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta, com seis dias após a germinação. O inóculo foi preparado com 0,1g das folhas das mesmas maceradas em almofariz e pistilo, previamente limpos e autoclavados, contendo 0,1g de celite e 9 mL de tampão de fosfato de sódio 0,01M; pH 7,6 + 0,1% de sulfito de sódio. As folhas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta foram friccionadas somente com o inóculo e lavadas com água corrente, sendo mantidas em casa de vegetação por 15 dias para que pudessem ser observados o aparecimento de sintomas. O procedimento descrito foi efetuado em três períodos distintos.

No laboratório foi separada uma amostra de *Commelina nudiflora* testada positiva para o CMV e outra negativa (Figura 2 A e 2F). Visto que os sintomas apresentados nas folhas das rosas do deserto eram parecidos com os da *Commelina nudiflora*, a planta em questão foi utilizada como controle positivo. Foram utilizados extratos feitos a partir da flor, folha, caudéx e raiz da Rosa do Deserto no teste em questão (Figura 2 B, C, D, F).

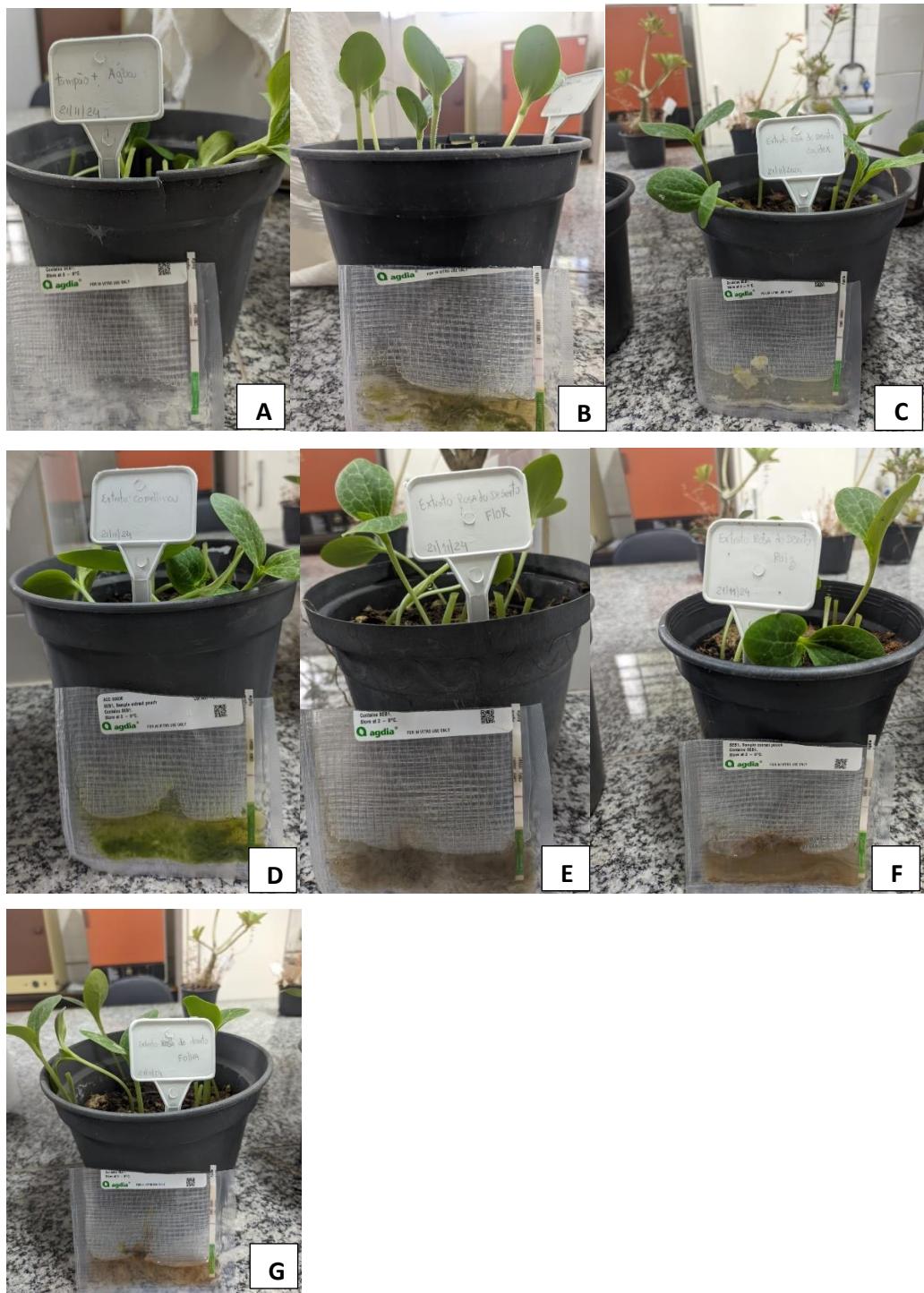


Figura 2: Realização da inoculação mecânica nas instalações do laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário. (A) tampão; (B) extrato Comelina positivo; (C) Caudéx; (D) Comelina positivo Folha; (E) Flor; (F) raiz; e (G) folha. Fonte: Próprio autor.

4.4 Enxertia, Vetor e Transmissão por Semente

A transmissão através de enxertia consistiu na utilização de estacas de Rosa do Deserto infectadas onde, as mesmas foram enxertadas em espécie de Rosa de Deserto sadia. Foi utilizado o método de enxertia por garfagem. Este método envolve a introdução de um

segmento de ramo (garfo) de uma planta desejada em um porta-enxerto, facilitando a fusão entre as duas partes para criar uma nova planta.

O teste de transmissão por inseto vetor foi realizado através de afídeos coletados em Rosa do Deserto. Os pulgões foram retirados das flores de Rosas do Deserto com o auxílio de um pincel. Após coletados os mesmos foram inseridos em plantas sadias para realização da picada de prova e, consequentemente, limpar seu aparelho bucal. Após esse processo foram capturados, colocados em placa de petri, na qual foi induzido a um ambiente escuro no período de 30 minutos. Após esse tempo foi inserido folhas de Rosa do Deserto que apresentavam sintomas de mosaico na placa petri para que os pulgões se alimentassem por aproximadamente 30 minutos. Na sequência, os pulgões foram transferidos, com o auxílio de pincel, para plantas de *Nicotiana tabacum* L. e foram sendo observadas durante sete dias.

Para analisar a transmissão por sementes, foram coletadas 100 sementes de rosa do deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.] testada positiva para o CMV e 100 sementes de rosa do deserto [*Adenium obesum* (Forssk.) Roem. & Schult.] testada negativa. As sementes foram plantadas em bandeja plástica com substrato e mantidas em casa de vegetação, para que não ter ocorrência de possíveis vetores. Após 15 dias, as 200 plantas recém germinadas foram submetidas a Teste Imunocromatográfico.

4.5 Teste Imunocromatográfico

Para o teste foi utilizado o *kit ImmunoStrip® Tests* (Agdia Inc.) para o *Cucumber mosaic virus* (CMV) o mesmo foi retirado da geladeira onde é armazenado (sob a faixa de temperatura de 5°C - 10°C) e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Com o auxílio de uma tesoura desinfestada com álcool 70% foram cortadas e pesadas 0,15g de amostra vegetal proveniente da Rosa do Deserto e depositadas sobre papel alumínio.

A bolsa plástica existente no *kit ImmunoStrip® Tests* (Agdia Inc.), foi marcada de acordo com o número da amostra e em seguida utilizando uma pinça, também desinfestada com álcool 70%, a amostra vegetal foi colocada dentro da bolsa. Na sequência a bolsa foi tampada para que a solução tampão não saísse e com o auxílio de um pistilo a amostra inserida na solução foi macerada e após esse processo foi colocada a tira imunocromatográfico na lateral da bolsa plástica, onde foi submersa no extrato tamponado da amostra até 0,5 cm. Depois de aproximadamente 20 minutos obteve-se o resultado.

4.6 Teste Molecular

4.6.1 Extração de RNA

A extração de RNA das amostras coletadas foi realizada de acordo com o protocolo do kit *RNeasy Plant Mini kit* (QIAGEN Brasil) utilizado no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário (L.O.D.F.). Utilizou-se para o procedimento 0,1g de partes do tecido, como nervuras e limbo de folhas jovens de Rosa do Deserto, caudéx, raiz, flores e pólen. Os tecidos foram triturados separadamente em almofariz com auxílio de pistilo (previamente tratado com solução de DEPC e autoclavado), em presença de nitrogênio líquido. Após, foi acrescentado nas amostras 450 µL de tampão RLT, sendo então transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL. As amostras foram submetidas a agitação vigorosa em Vortex Mixer (FisherVortexGenie2) durante 30 segundos, sendo os lisados transferidos para a coluna lilás (QIAshredder) do kit. As colunas foram centrifugadas a 16100 x g (13179 rpm) por dois minutos. A coluna foi descartada e a solução resultante foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionado 0,5% de etanol 95% gelado, misturado pela inversão do tubo. Com auxílio de micropipeta, 650 µL da solução foi transferida para a coluna rosa (Mini Spin Column), colocada no tubo de polipropileno de 2 mL e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) durante 15 segundos. O filtrado resultante foi descartado e o tubo reutilizado com a coluna rosa, na qual foi adicionado no mesmo 700 µL de tampão RW1 e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) por 15 segundos; posteriormente, o filtrado foi descartado e na mesma coluna rosa, foi acrescentado 500 µL de tampão RPE e, centrifugado a 8000 x g (10000 rpm) por 15 segundos. Descartou-se o filtrado e 500 µL de tampão RPE foi novamente adicionado a coluna rosa e centrifugado a 8000 x g (10000 rpm) por dois minutos. Em seguida, à coluna rosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL e adicionado 50 µL de água (destilada, deionizada, tratada com solução de DEPC e autoclavada) na coluna e centrifugada a 8000 x g (10000 rpm) por um minuto. Por fim, a coluna foi então descartada e o tubo contendo o filtrado (RNA total extraído) foi identificado e mantido no freezer a temperatura de -25°C até posterior uso no teste de RT-PCR.

4.6.2 Confecção dos Primers

As sequências dos oligonucleotídeos sintéticos ("primers") foram as descritas para o *Cucumber mosaic virus* assinalados na literatura oriunda da capa protéica do vírus. Os primers elaborados foram sintetizados pela empresa Thermo Fischer.

4.6.3 Teste de RT-PCR

Foi adotada a metodologia descrita no procedimento POP-72.RT-PCR, desenvolvido pelo Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da UFRRJ. Este procedimento consiste em retirar, com o auxílio de uma micropipeta P20, 4 μ l do RNA extraído de um tubo de polipropileno identificado pelo número da amostra. Em seguida, utilizam-se os produtos do Kit SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, conforme as instruções do fabricante. É importante garantir que os primers específicos e as condições de amplificação no termociclador estejam adequados para a praga alvo. Após a amplificação da amostra de RNA no termociclador, procede-se a eletroforese em gel de agarose a 1,2% contendo brometo de etídio.

4.6.4 Eletroforese

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TAE 1X com a presença de brometo de etídio (10 mg/ ml), sendo aplicado 18 μ L do produto do RT-PCR nas canaletas do gel e deixadas por 25 minutos em corrente elétrica de aproximadamente 88 volts. Os fragmentos amplificados (*Amplicon*) separados por eletroforese foram visualizados através do transiluminador de luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas compatíveis com a altura esperada, foram consideradas positivas.

4.7 Protótipo de kit Diagnóstico

Com os dados obtidos através dos Testes Imunocromatográficos e de RT-PCR foi elaborado um protótipo de *kit* de diagnóstico sorológico e/ou molecular, respectivamente, que incluem manual informativo, tira imunocromatográfica específica, primers específicos, condições e material de amplificação, amostra controle.

4.8 Estratégia de Controle

Baseado nos dados obtidos foi elaborado uma possível estratégia de controle para o vírus detectado em Rosa de Deserto. As estratégias foram elaboradas a partir do complexo causal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes Biológico

5.1.1 Transmissão Mecânica,

O teste realizado por meio de inoculação mecânica apresentou resultados negativos para algumas partes da Rosa do Deserto utilizada. As folhas de *Cucurbita pepo* cv. Caserta que foram inoculadas com extrato proveniente da folha, caudex e raiz não apresentaram nenhum sintoma referente a presença de vírus, após sete dias. Para uma confirmação, as amostras passaram mais oito dias em observação na casa de vegetação, totalizando 15 dias e não foram constatadas alterações nos materiais. Apenas a *Cucurbita pepo* cv. Caserta inoculada com o extrato da trapueraba (*Commelina nudiflora* L.) (Controle Positivo) e com o extrato da flor da Rosa do Deserto, apresentaram resultado positivo (Figura3).



Figura 3: Sintomas de mosico apresentado após a inoculação mecânica. (A) extrato da flor da rosa do deserto; e (B) extrato *commelina nudiflora* L. Fonte: Próprio autor

Após a inoculação, foi realizado o Teste Imunocromatográfico com os extratos e somente o extrato utilizando a flor da Rosa do Deserto e da *Commelina nudiflora* L., apresentaram resultado positivo para o *Cucumber mosaic virus* (CMV).

Existe uma série de estudos que apresentam diversas informações referentes à presença de substâncias químicas tóxicas com potencial para uso farmacêutico e de uso antiviral nas rosas do deserto (FARAH *et al.* 2016). Diante disso, é possível que essas substâncias possam influenciar o impedimento da transmissão do CMV de folha, caudex ou raiz, realizada

mecanicamente, gerando os resultados negativos, ou seja, tal resultado pode ser atribuído pela presença das substâncias inibidoras encontradas na Rosa do Deserto.

O resultado apresentado permite observar que as tentativas de inoculação mecânica foram ineficazes ao utilizar como indicadora *Cucurbita pepo* cv. Caserta., mesmo ela sendo uma planta indicadora comum para a presença do CMV. Reforçando assim, que a possível causa dos resultados negativos obtidos por esse método, pode realmente ser pela presença de substâncias inibidoras presente na Rosa de Deserto. Segundo Brioso (1986) algumas plantas possuem substâncias inibidoras para o teste de inoculação mecânica.

5.1.2 Enxertia,

O teste de enxertia foi realizado com o auxílio da produtora e, após a realização da enxertia, a planta foi submetida ao Teste Imunocromatográfico, revelando a presença do vírus.

5.1.3 Vetor

O teste utilizando o pulgão *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Homoptera : Aphididae) (Figura 4), apresentou resultado negativo para a presença de CMV. O pulgão em questão não permaneceu na planta indicadora. Sendo assim, mesmo que tenha sido realizado a picada de prova o vírus não foi transmitido. A fonte de inoculo para a realização desse teste foi uma folha de Rosa de Deserto testada positiva e os pulgões foram transferidos para planta de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), considerada uma planta indicadora para o CMV.

O teste em questão foi realizado apenas com as folhas e, possivelmente, substâncias inibidoras impeçam que os pulgões adquiram o vírus na picada de prova e o transmitam. Outra questão pode ser que o inseto utilizado como vetor do isolado do CMV em Rosa do Deserto, não seja eficiente na transmissão do CMV tendo como fonte de inóculo folhas de Rosa do Deserto. De acordo com Brioso (1986) no qual foi utilizado diversos isolados do *Cucumber mosaic virus* em diversas plantas, inclusive na dedal-de-dama (*Allamanda cathartica* L.) que pertence a mesma família da *Adenium obesum*, onde foi possível observar que houve variação nos resultados ao ser testado algumas espécies de afídeos vetores do CMV.



Figura 4: Pulgão utilizado no teste de transmissão por vetor (A) Visualização em microscópio do *Aphis gossypii*; (B) Afídeo encontrado nas flores de rosa do deserto

5.1.4 Transmissão por semente

Todas as amostras apresentaram resultado negativo, conforme figura 5. Foram selecionadas 15 plantas provenientes de sementes, tanto das plantas negativas como, das testadas positivas para o CMV, para o teste molecular e ambas apresentaram resultados negativos.

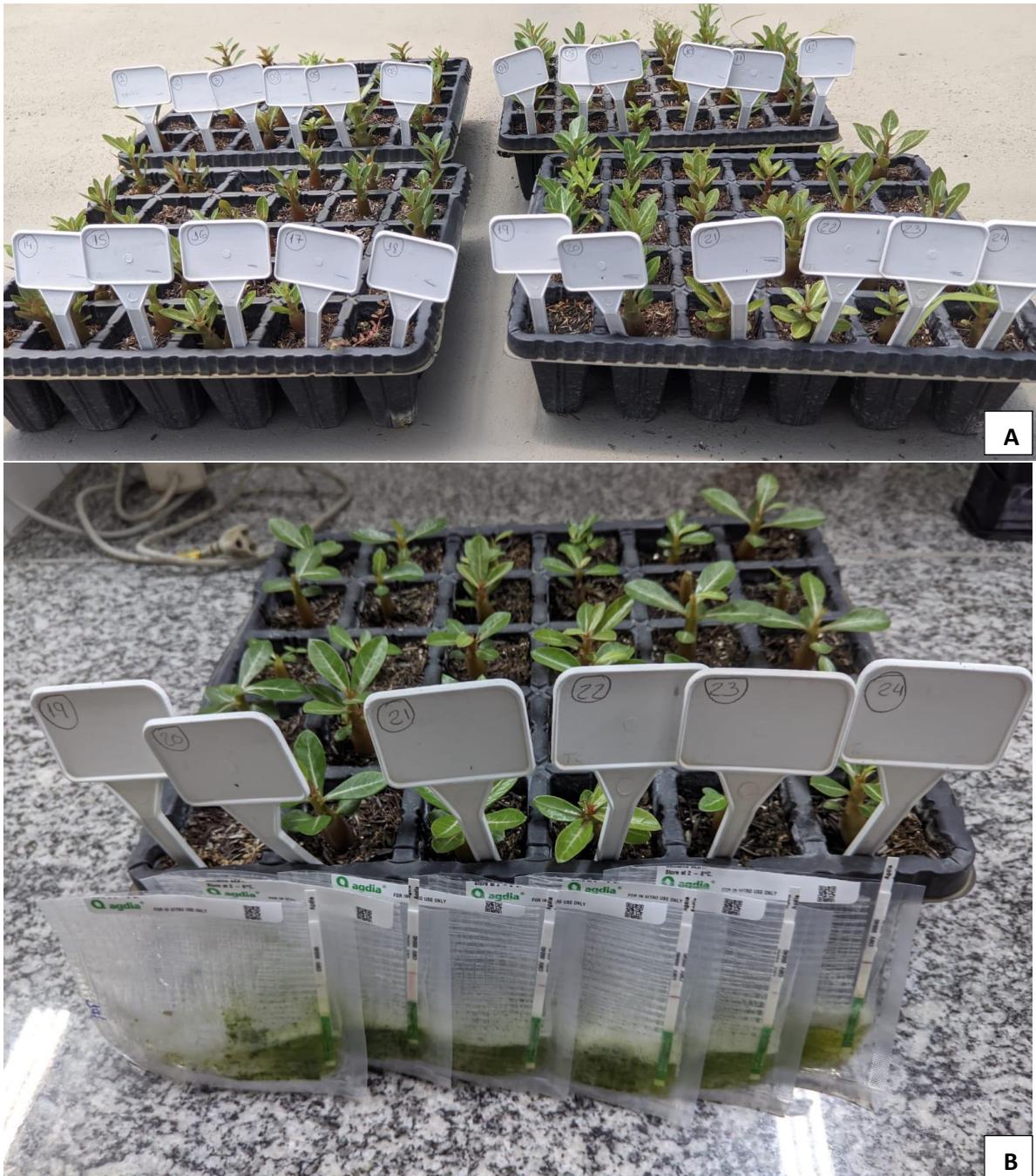


Figura 5: Bandejas com mudas de rosa do deserto, sendo: (A) Mudas a partir de semente de rosa do deserto; e (B) teste Imunocromatográfico

5.2 Teste Imunocromatográfico

Utilizando o Teste Imunocromatográfico foi possível observar que das 303 amostras de Rosa do Deserto analisadas, 75 apresentaram resultados positivos e 228, apresentaram resultados negativos. Também foram testadas duas amostras de *Commelina nudiflora*, sendo uma controle negativo e uma positiva para o CMV (Figura 6).



Figura 6: realização do teste imunocromatográfico: (A) *Commelina nudiflora* testada positiva para CMV; *Commelina nudiflora* testada negativa para CMV.

As variedades que apresentaram resultado positivo para o CMV foram: BMA, Florent Ev 189, Chocolate, Variegada Branca Dobrada, Viúva Negra, Golden Temple, Rihanna, Matriz Produção Amarela, Variegada Rosa Dobrada, Variegada Lolita, Grace, Chantily, NR 12, Swazicum, Magical Princess, Black Belle, Variegata Bia, Rubi Elf, Malan, Variegada Pandora, Matriz F-01, Swallow, Black Mistery, ACR 10, Bridal Buque, Akira, Encantus, JA 55, BRD 23, Juliete, Variegada Branca com Vermelho Dobrada, LM 580, Maria, Marilia, Rubi Elf, Sindy, Arabicum 1, Red Cliff x Red Cliff, BRD8 x Blue boy, LM 873, Fabiana x Infinity, Mister Okomura, Felix x romantic, Chibi Maruko, Viúva Negra, Yang Ning, Polaris, Maria, Magnifica, Iolanda, Pluma Buque, ACR 1, Genésia, Pluma Buquê, Encantus, ACR 32, Amarela, Arretada, Variegada Cris, Polaris, LM44, LM 185, Viúva Negra, Variegada Labareda, Variegada Rosa Riscada, Mustang, Chernobyl, AP. Rosa, 3, Rubi Elf, 4, Purple Blue, MKMK Black e Saammummee.

As variedades que apresentaram resultado negativos para o CMV foram: He Feng, Thinting of You, Margaret Star, Infinit, Miss Donut, Fall In Love, Ferrari, Star Cluster, Pansy

Paris, Peony, Renda, Dancing Queen, Julius Cesar, Golden Bliss, Red Velvet, Nusa, Lancaster, Carnation, Wealthy, Pessanha, LG 29, ACR-03, LM 424, Miss Vietnam, Arya, Jesy, Matriz Roxa, Florent, EV 184 Mileid, Sansão, Washington, LM 741, Jupiter, Musella, RC 503, Isabelle, Matriz F-02, Beauty, Caroline, LBG- 1, Indigo Glase, Crista BRO, Ravi, Single Purple flower, TW4, Purple Swallow, Gema de ovo, Tweety, Meet the love, ACR 10, Bridal Buque, Yujião, Double Blueboy, Joana, Yoko, Bridal Buque, Lotus Cloud, JA-74, LM 758, ACR 13, Filó, Golden Temple, M9, Ciclope, Kamilla, LM 550, Romantic Edige, Ghost, Thalita, RA52 X Sansão, Isis, Viuvinha, BRO 102, Rihanna, Black Coffe, Grace, Capitu, ARM 82, NR 12, Infinit x Cherry-BP, LM 596, Fall in love x LM 758, Ametista Bicolor x LM 596, BRD x Matriz roxa. Pendente, Santa Claus x Branca ACR 03 x Carnation, Canario, ACR 03 x EV 58, FM 22 x Margaret Star, Arabicum 2, FM 22 x canário, Cherry, EV 58, Matriz 1 x Renda, M9 x Renda, Encantus, Juliete, Black lady, Variada floral, Palminha Buque, BRD 100, Mustang, LM 442, Mister Okomura, Marília, BRD 46, Viúva Negra, LM 992, Céu Estrelado, LK 574, Canário, Luna, Viúva Negra, LK 306,..Miracle, Cristata Vermelha Singela, Filó, LK 265, ACR 43, Pérola Bouquet, Capixaba, ACR 44, Chibi Maruko, ACR 50, Pequi, Maracujá, Francesinha, Vampira, Black Chrry, Matriz Produção 1, Respect, Pomerana, Dakota, Miss Vietnam, Spartuacus, Monique, ACR 58 Variegada, Paraibana, Magnifica, Golden Cicada, Francesinha, JÁ-19, BRD99, Emília, Aurora, Red velvet, Matriz Cristata, Porcha, Estrela purpura, NR 12, LM 550, Variegada LK 371, Lola, Juliane, LM 937, Manhattan, Scarlet, ACR 65, JÁ 55,, Swallow, YE 1, Akira, Lucy Pink, Oprah, Pitaya, Safira Rosa, Lk 103, Variegada Viuva Negra, RA 55, LK 341, Washington, Black Vulgan, Fall in Love, Miss Vietnam, Variegada ACR-80, Amarelinda, Camponesa, Bridal Buquê, Genesia, Céu Estrelado, Suprema, Dália, LM 233, Variegada Ali, Magical Princes, LM 741, Polar, Mister Okomura, ACR 85, Carnation, Pamela, Puple Medai, BRD 07, Babalu, Julieta, Grape Amarillis, ACR 100, ACR 23, Pluma Buquê, LK 523, Pink Pony (HU-9), Céu estrelado Singela, Manarola, LK266, Variegata Rosa Riscada, Variegata Marisya, Encantus, Variegata Rafa, Zaia, Florentina, Duquesa, Variegata Chernobil, ACR 83, Estrela Negra, Magnifica, RA 04, ETNA, Variegata AP Rosa, Isabelle, Arabicum Black Skin, Julieta, LM 768, M10, ACR 82 e BRD Buquê.

As variedades apresentadas acima, são denominadas a partir de cruzamento realizados pelos produtores, sendo assim não são de fato variedades registradas. Segundo relato da produtora, visto que a quantidade de produtores de rosa do deserto tem aumentado no território

brasileiro, muitas dessas variedades podem ser a mesma, porém com denominação diferente, uma vez que não existe o controle nacional.

Segundo Da Silva Rocha (2021) as empresas do setor de flores e plantas ornamentais, assim como os pequenos e médios produtores, realizam atividades de hibridação, avaliação, seleção e clonagem de materiais superiores. Após esses processos, disponibilizam esses produtos para a comercialização sem qualquer tipo de registro ou proteção legal e no Brasil, existem poucos programas de melhoramento voltados para a espécie *Adenium obesum*, sendo até o momento, cinco cultivares estão em processo de registro no Sistema Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC): HSW B401, HSW D106, HSW RS401, HSW RX210 e HSW V404.

Os resultados descritos anteriormente, foram das amostras enviadas para o laboratório pela produtora, sendo de diferentes matrizes, que são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos através do teste Imunocromatográfico de diversas matrizes de rosa do deserto.

Matriz	Positivo CMV	Negativo CMV	Quantidade
Folha	67	206	273
Caudex	1	0	1
Folha e broto	0	5	5
Folha e flor	5	7	12
Broto/talo	0	7	7
Flor	1	2	3
Planta Inteira	1	1	1
TOTAL	75	228	303

Foram separadas as duas amostras de Rosa do Deserto testada positiva e negativa para CMV, no qual foram analisadas as matrizes flor, folha, caudex e raiz. Esse teste apresentou resultado positivo para a presença do CMV, sendo assim, é possível identificar a presença do vírus em toda parte da planta com o teste em questão (Figura 7).

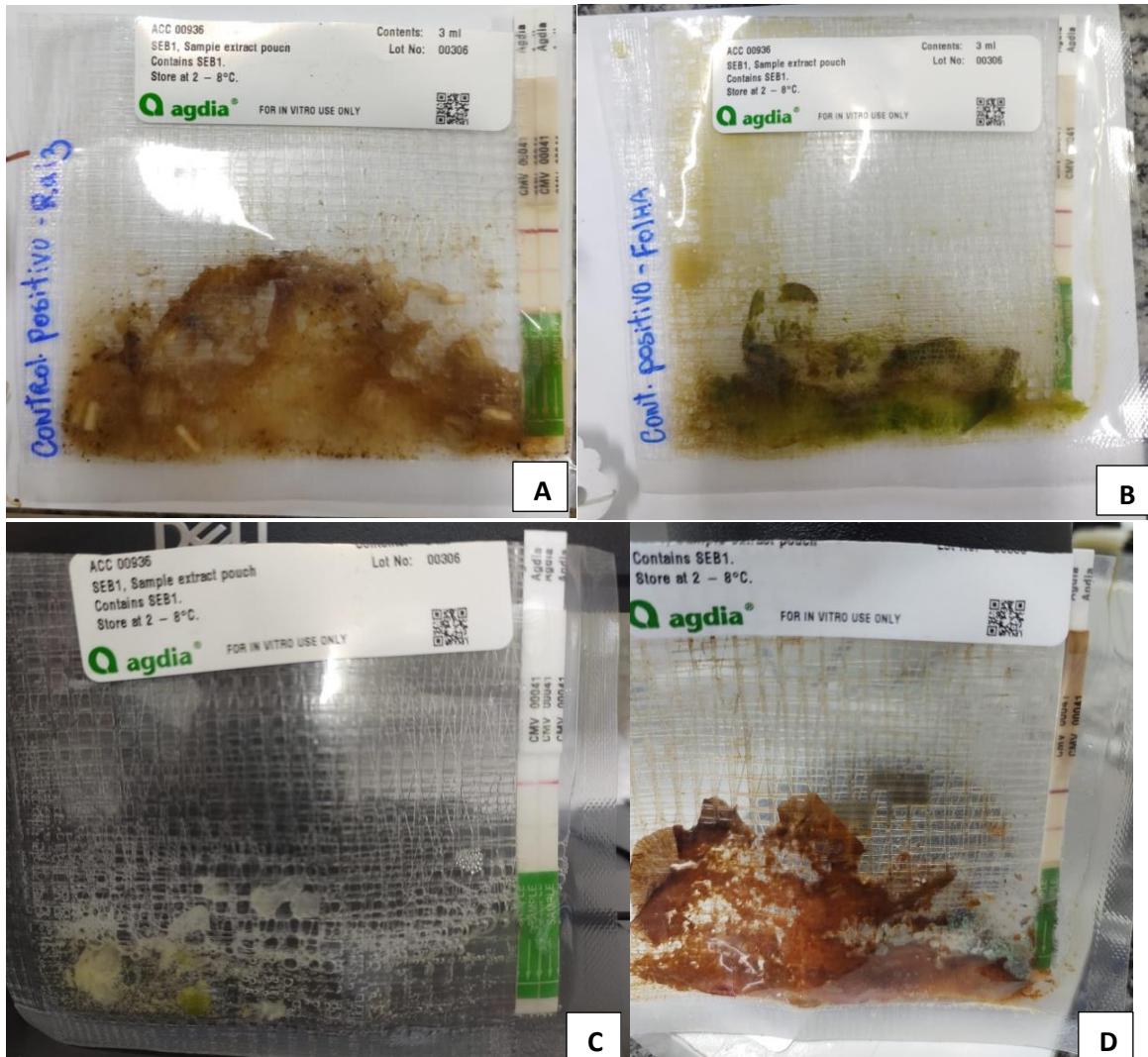


Figura 7: Teste Imunocromatográfico realizado em diferentes matrizes e com resultado positivo para CMV: (A) raiz; (B) folha; (C) Caudex; e (D) flor. Fonte: próprio autor

Segundo Baker *et al.* (2003), o *Cucumber mosaic virus*, foi identificado em plantas sintomáticas por teste sorológico para a presença de proteína capsidial do CMV com um teste *ImmunoStrip* disponível comercialmente pela Agdia, Elkhart, IN, representando o primeiro relato de infecção por CMV em Rosa do Deserto no Estado da Flórida - Estados Unidos da América.

Com o resultado relatado do trabalho anteriormente citado, nota-se que o teste sorológico é eficaz, tornando possível uma detecção rápida e segura da presença do CMV.

5.3 Teste RT-PCR

5.3.1 Teste molecular

Os resultados são apresentados na figura 8, onde: Canaleta 1 foi inserido o DNA amplificado do CMV com primers específicos para o CMV em *Comelina nudiflora* infectada, apresentando resultado positivo. Na canaleta 2 o marcador de massa molecular (1 kb plus DNA Ladder, Thermo Fisher). Nas canaletas 4 e 5, são respectivamente o DNA amplificado da folha e flor da Rosa do Deserto, onde apresentaram resultado positivo para a presença de CMV e, nas canaletas 3, 6 e 7 onde foi inserido o DNA amplificado da folha de Rosa do Deserto sadia, onde apresentou ausência do CMV.



Figura 8: Resultado obtido através do teste molecular. Fonte: Próprio autor.

A massa molecular obtida pelo *Amplicon* para a presença do CMV está de acordo com o assinalado para este vírus na literatura mundial.

5.3.2 Kit Diagnóstico

Após a realização dos devidos teste sorológico e molecular para a detecção do vírus CMV, foi desenvolvido um protótipo de kit diagnóstico (vide Anexo), no qual permite a pronta identificação do CMV para fins de diagnóstico fitossanitário e de certificação de mudas quanto a presença do CMV.

5.4 Estratégia de Controle

Como estratégia de controle para o cultivo de plantas de Rosa de Deserto sugerimos:

- Eliminar as plantas de Rosa de Deserto infectadas com o CMV após a coleta de suas sementes;
- Utilização de mudas oriundas de plantas de Rosa de Deserto devidamente certificadas através do uso do Kit Diagnóstico desenvolvido neste trabalho para a presença ou não do CMV;
- Utilizar sementes de plantas de Rosa de Deserto infectada ou não com o CMV para a produção de plantas sadias. Pois, independente da presença de vírus ou não, as sementes permanecem com ausência de CMV.

6. CONCLUSÃO

O método de inoculação mecânica revelou-se ineficaz na detecção do *Cucumber mosaic virus* a partir de folhas de Rosa do Deserto, possivelmente devido às suas propriedades inibidoras.

O teste realizado com as sementes demonstrou ser eficaz como método de controle, uma vez que as plantas originadas dessas sementes apresentaram resultados negativos para a presença do *Cucumber mosaic virus*.

O teste imunocromatográfico e molecular, por sua vez, comprovou a presença do *Cucumber mosaic virus*, comprovando a eficiência e rapidez do teste.

Os resultados obtidos neste trabalho identificam pela primeira vez a presença do *Cucumber mosaic virus* no Brasil, em plantas de rosa do deserto

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADKINS, S.; BAKER, C. A. *Tomato spotted wilt virus* identified in desert rose in Florida. **Plant disease**, v. 89, n. 5, p. 526-526, 2005.

AGRIOS, N.G. **Plant Pathology**, 952 pp, 2005.

AKI, A.; PEROSA, J.M.Y.P. Aspectos da produção e consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 8, n.1/2; p.13-23; 2002.

ALMEIDA, J. E. M. de. **Estabelecimento e adaptação de métodos para detecção de vírus em sementes de pimentão, tomate, alface e feijão**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2009.

AMORIM, L., REZENDE, JAM, BERGAMIN FILHO A. eds. **Manual de Fitopatologia**. Volume 1-Princípios e Conceitos. 3^a Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 1994.

ASHFAQ, MUHAMMAD *et al.* Natural occurrence and host range studies of cucumber mosaic virus (CMV) infecting ornamental species in the Rawalpindi-Islamabad area of Pakistan. **Philipp. Agric. Scient**, v. 100, p. 55-61, 2017.

BAIA, D. B., CARVALHO, A. C., COSTA, C. A., AGUIAR, R. O., SILVA, I. L. S. S. Uso de extratos vegetais aquoso in vitro sobre sclerotium rolfsii no controle de mancha foliar em antúrio (*Anthurium andeanum*). Anais do 9º Seminário Anual de Iniciação Científica, 19 a 21 de outubro de 2011.

BAKER, C. A.; ACHOR, D.; ADKINS, S. *Cucumber mosaic virus* diagnosed in desert rose in Florida. **Plant disease**, v. 87, n. 8, p. 1007-1007, 2003.

BARROS, G.B.; NOGUEIRA, M.S.R.; OLIVEIRA, C.R.R.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V.Q.; VEIGA, C.F.M.; BRIOSO, P.S.T.; EIRAS, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao *Cowpea severe mosaic virus* e ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.39, p.130-136, 2013.

BELLÉ, S.. Irrigação de plantas ornamentais. **Plantas Ornamentais: aspectos para a produção.** 2^a Ed. Passo Fundo: Editora da UPF, p. 101-106, 2008.

BRIOSO, P.S.T. Cancro em *Calycophyllum spruceanum* no estado do Rio de Janeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, p.97-97, 2012.

BRIOSO, P.S.T.; POZZER, L. *Badnavirus* - Histórico, Importância, Detecção e Estratégia de Controle. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.20, p.64-124, 2012.

BRIOSO, P.S.T.; POZZER, L. Vírus e Viróides Quarentenários para o Brasil - Revisão, Diagnose e Perspectivas Futuras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.21. 2013.

BRIOSO, PST. **Caracterização biológica, físico-química e sorológico de isolados do vírus do mosaico do pepino (cucumber mosaic virus) no Brasil.** 1986. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. UnB, Brasília-DF. 121p.

CAMILLO, J.; TOMBOLATO, A. F. C. Espécies Ornamentais Nativas da Região Centro-Oeste. In: VIEIRA, R. F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – região Centro-Oeste.** Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade – Brasília, DF: MMA, 2016. p. 889-1088

CHIAO, D. J. SHYU, R.H; HU, C.S; CHIANG, H. Y; TANG, S.S. Colloidal gold -based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, v. 809, n. 1, p. 37-41, 2004.

COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; CHAVES, A. (2013). Capítulo 7 Vírus: Patógenos Limitantes à Cultura da Bananeira no Brasil.

COLOMBO, R. C.; CRUZ, M. A.; CARVALHO, D. U.; HOSHINO, R. T.; ALVES, G. A. C.; FARIA, R. T. *Adenium obesum* as a new potted flower: growth management: growth management. **Ornamental Horticulture**, v. 24, n.3, p.197-205, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v24i3.1226>.

COSTA, R. G. S.; COLESANTI, M. M. A contribuição da percepção ambiental nos estudos das áreas verdes. *RA 'E GA - O Espaço Geográfico em Análise*, v. 22, n. 22, p. 238–251, 2011.

DA SILVA ROCHA, F., FERNANDES, M. D. F. G., PEREIRA, J. M., & Silva, J. F. (2021). Manejo de doenças e pragas em Rosa do Deserto. NIETSCHE, Silvia; ALMEIDA, Elka Fabiana Aparecida; MENDES, Rosane Borges (Orgs.). Cultivo e Manejo da Rosa do Deserto. São José dos Pinhais, SP: Editora Brazilian Journals, 2021.

DANIELS, J. Utilização de técnicas sorológicas para a detecção de vírus em batata-doce. Brasília: EMBRAPA/CPACT, 1999. (Comunicado Técnico,46).

DE ALMEIDA, D. P., FERREYRA RAMOS, S. L., Lopes, R., Meneses, C. H. S. G., & Lopes, M. T. G. (2024). Conservação e cultivo de plantas ornamentais em quintais do Amazonas.

DUARTE, L. M. L. DOENÇAS EXÓTICAS E SEUS IMPACTOS: VÍRUS.- 2001

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas. **Embrapa Uva e Vinho-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2015.

FARAH, M. A.; ALI, M.A.; CHEN, S. M.; LI, Y.; HEMAID, M. A.; TARBOUSH, F. M. A.; ANAZI, K. M. A.; LEE, J. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 158-169, 2016.

FIGUEIREDO, M. B. Plantas Ornamentais: Doenças e Pragas vol. I. **Fitopatologia: Noções gerais e histórico**. Capítulo I. 2008 319p.

FILHO, A. B.; KIMATI, HIROSHI.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia** volume: Princípios e Conceitos. 3º edição. Ceres LTDA. São Paulo-SP. 1995.

HAJIZADEH, M.; NAVARRO, B.; BASHIR, N. S.; TORCHETTI, E. M.; SERIO, F. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. **Journal of Virological Methods**, v. 179, p. 62-69, 2012.

HOFFMANN, J. J.; COLE, J. R. Phytochemical investigation of *Adenium obesum* Forskal (Apocynaceae): isolation and identification of cytotoxic agents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 9, p. 1336-1338, 1977.

IBRAFLOR. Mercado de flores prevê crescimento médio de 9% no Brasil e faturamento de R\$ 7 bi, em 2017. 4 Nov. 2017. Disponível em:

<<http://www.ibraflor.com/site/2017/11/04/mercado-de-flores-vera-longuini/>>. Acesso em: 16 jul 2020.

IBRAFLOR. O Mercado de Flores no Brasil. 2019. Disponível em:

<https://docs.wixstatic.com/ugd/875639_f02d8909d93a4f249b8465f7fc0929b4.pdf> Acesso em: 13 jun. 2020.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. As campanhas de marketing na floricultura brasileira. Jornal Entreposto, jornal entreposto, fev. 23, 2016.

KANCHANAPOOM, K.; SUNHEEM, S.; KANCHANAPOOM, K. *In vitro* propagation of *Adenium obesum* (Forssk.) Roem. and Schult. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 209-213, 2010.

KATSUMOTO, Y.; FUKUCHI-MIZUTANI M.; FUKUI Y.; BRUGLIERA F.; HOLTON T. A.; KARAN M.; NAKAMURA N.; YONEKURA-SAKAKIBARA K.; TOGAMI J.; PIGEAIRE A.; TAO G. Q.; NEHRA N. S.; LU C. Y.; DYSON B. K.; TSUDA S.; ASHIKARI T.; KUSUMI T.; MASON J. G.; TANAKA, Y. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant Cell Physiology**, v.48, n.11, p. 1589-1600, 2007.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. ed. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4^a Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2005

KITAJIMA, E.W. **An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018)**. Biota Neotropica 20(2): e20190932. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2019-0932>. 2020.

KIYOHARA, H.; ICHINO, C.; KAWAMURA, Y.; NAGAI, T; SATO, N; YAMADA, H.; SALAMA, M. M.; ABDEL-SATTAR, E. In vitro anti-influenza virus activity of a cardiotonic glycoside from *Adenium obesum* (Forssk.). **Phytomedicine**, v. 19, n. 2, p. 111-114, 2012.

LIMA, M. F.. Vírus que infectam plantas. In: III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças, 2013, Brasília, DF. Anais da III Jornada Científica da Embrapa Hortaliças. Brasília-DF: Embrapa Hortaliças, 2013.

LIMA, M. F.; FAJARDO, T. V. M. Doenças causadas por vírus. In: LIMA, M. F.; MOREIRA, F. R. B. (Ed.). Uva de Mesa: Fitossanidade. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 43-58. (Frutas do Brasil, 14).

LÓPEZ-FABUEL, I.; WETZEL, T.; BERTOLINI, E.; BASSLER, A.; VIDAL, E.; TORRES, L. B.; YUSTE, A.; OLMOS, A. Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 188, p. 21-24, 2013.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. Plantas ornamentais no Brasil - arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3 ed. **Nova Odessa: Plantarum**, 2001. 1120p

MAPA. Lista de Ornamentais: Instrução Normativa MAPA nº 64, de 02 de dezembro de 2020. Disponível em >. Acesso em 06/06/2022

MAY, K. Home tests to monitor fertility. Am. J. **Obstet. Gynecol.**, v. 165, n. 6, p. 2000-2002, 1991.

McLAUGHLIN, J.; GAROFALO, J. **The Desert Rose; Adenium obesum**: nursery production. Homestead: Miami-Dade, 2002

NICKEL, O.; FAJARDO, T. V. M. Obtenção de material propagativo livre de vírus e diagnóstico de vírus em macieiras e pereiras. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2009. 55 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 69).

PAUL, D.; BISWAS, K.; SINHA, S. N. Biological activities of Adenium obesum (Forssk.) Roem. & Schult.: a concise review. **Malaya Journal of Biosciences**, v. 2, n. 4, p. 214-221, 2015.

PEAK, S. H.; LEE, S. H.; CHO, J. H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

PITTA, G. B. P.; CARDOSO, R. M. G.; CARDOSO, E. J. B. N. Doenças das plantas ornamentais. São Paulo: **Instituto Brasileiro do Livro Científico**, 1990. 186p.

PITTA, G. P. B. Plantas Ornamentais: Doenças e Pragas vol. I. **Instituto Biológico**, 319p. 2008

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Conceitos Básicos Sobre Doenças de Plantas. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Org.). Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. 1ed. GOIANIA: EMBRAPA-CNPAP, 1994, v. 1, p. 7-16.

RÊGO, G. M. S. **Amostragem e detecção de vírus em espécies de Bromeliaceae e de Orchidaceae**. 2017. 103f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Campos dos Goytacases, Rio de Janeiro. 2017.

ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de *Shiga* (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**. 178 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANTOS, M. M.; COSTA, R. B.; CUNHA, P. P. S.; ALEXANDER. Tecnologias para produção de mudas de Rosa do Deserto. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 3, p. 79-82, 2015.

SENNBLAD, B.; BREMER, B. Classification of Apocynaceae s.l. according to a new approach combining Linnaean and phylogenetic taxonomy. **Systematic Biology Journal**, v.51, n. 3, p. 389-409, 2002.

SILVA, L. C.; PAIVA, P. D. O.; SANTOS, A. C. Flower and ornamental plants wholesale markets in Brazil. **Revista Ornamental Horticulture**, v. 21, n. 1, p. 53-62, 2015. Disponível em:< <https://ornamentalhorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/viewFile/776/557> > Acesso em: 19/06/2020.

TALUKDAR, T. Development of nacl-tolerant line in an endangered ornamental, *Adenium multiflorum* Kklotzsch through in vitro selection. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.3, n. 10, p. 812-821, 2012.

TIJJANI, A.; SALLAU, M. S.; SUNUS, I. Synergistic activity of methanolic extract of *Adenium obesum* (Apocynaceae) stem-bark and oxytetracycline against some clinical bacterial isolates. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p. 79-82, 2011.

TOMAZETTI, T. C. **Técnicas moleculares e sorológicas na detecção de vírus fitopatogênicos em tecidos de Videira (*Vitis* spp.)**. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.

TSUBOI, N.; TSURUSHIMA, H. **Introdução à história da indústria de flores e plantas ornamentais no Brasil.** São Paulo: Comissão Editorial da História da Indústria de Flores no Brasil, 2009.

VAN RIJSWICK, C. **World Floriculture Map 2016:** Equator Countries Gathering Speed.

Rabobank Relatory. nov.2016. Disponível em:

<[https://research.rabobank.com/far/en/sectors/regional-food](https://research.rabobank.com/far/en/sectors/regional-food-agri/world_floriculture_map_2016.html)

agri/world_floriculture_map_2016.html.> Acesso em: 13 jun. 2020.

ZHU, Y. J.; LIM, S. T. S.; SCHENCK, S.; ARGINAS, A.; KOMOR, E. RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR detection of *Sugarcane yellow leaf virus* (SCYLV) in symptomatic and asymptomatic plants of Hawaiian sugarcane cultivars and the correlation of SCYLV titre to yield. **European Journal of Plant Pathology**, v. 125, p. 263-273, 2010.

7. ANEXO

KIT RDmolVirus

Uso pretendido

O **Kit RDmolVirus** produzido para fins de diagnóstico de *Cucumber mosaic virus* (CMV) em variedades e/ou híbridos de *Adenium obesum* (Rosa do Deserto) no Brasil foi desenvolvido visando a rápida identificação molecular destes vírus a fim de impedir sua disseminação no país.

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

Armazenamento

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

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

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

Precauções

- Limpar a bancada de laboratório com Álcool Etílico a 70% antes do uso.
- Usar sempre luvas de látex descartáveis
- Se estiver usando um Termociclador sem tampa aquecida, use uma camada de óleo mineral esterilizado para evitar a evaporação da amostra.
- É muito importante usar materiais e soluções livres de *RNase* durante o procedimento.

KIT RDmolVirus

- O ***Kit RDmolVirus*** foi otimizado com os materiais, equipamentos e reagentes descritos abaixo, portanto, recomenda-se utilizar, principalmente, os mesmos itens para obter êxito nos resultados.

Reagentes

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

Materiais e Equipamentos

- Agitador Magnético (Vortex)
- Almofariz e Pistilo
- Autoclave
- Balança Analítica
- Caixa de Isopor
- Caneta *Pillot*
- Capela de Exaustão
- Cuba de Eletroforese
- Deionizador de Água

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

Procedimento Detalhado

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

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

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

KIT RDmolVirus

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

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

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

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

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

8 - Se necessário repetir o passo 9 com o volume excedente aos 650 μ l, utilizando a Micropipeta (P200)

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

10 - Reusar o tubo de polipropileno com a coluna rosa

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

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

KIT RDmolVirus

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

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

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

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

PRIMERS – F (<i>Forward, Upstream, Sense</i>), R (<i>Reverse, Downstream, Antisense</i>)	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO	TAMANHO DO AMPLICON (pb – pares de base nucleotídica)	REFERÊNCIA
Forward - CMVLODF-F - 5'- TATGATAAGAAGCTTGTTCGCGCA-3'; Reverse - CMVLODF-R - 5'- TTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAAACCC-3'	SINTESE DE cDNA E PRÉ-DESNATURAÇÃO: 45°C/ 30 minutos, 94°C/ 2 minutos*; AMPLIFICAÇÃO (Desnaturação, Anelamento, Extensão): 35 ciclos de 94°C/ 30 segundos, 58°C/ 40 segundos, 72°C/ 40 segundos; EXTENSÃO FINAL: 72°C/ 5 minutos; 4°C/ 5 minutos - 2 h 30 min.	491 – 507 pb	Journal Virological Methods 89:75-88. 2000

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

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

RESULTADOS

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

Limitações

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

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

KIT RDmolVirus

- A contaminação por DNA de extratos de RNA pode causar falsos positivos ou reações de bandas múltiplas.