

Detecção de *Cucumber mosaic virus* em espécies de *Phalaenopsis* importadas

Géssica Mylena Santana Rêgo¹, Ricardo Moreira de Souza², Eliana Borges Rivas³, Paulo Sérgio Torres Brioso⁴

¹Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica. Centro Politécnico s/n. Jardim das Américas, CEP: 81531990 - Curitiba, PR, Brasil. ²Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, CCTA/Laboratório de Entomologia e Fitopatologia. Avenida Alberto Lamego - de 960 ao fim - lado par. Parque Califórnia, CEP:28013602 - Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. ³Instituto Biológico, Secretaria da Agricultura e Abastecimento, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Instituto Biológico. Vila Mariana, CEP:04014900 - São Paulo, SP, Brasil. ⁴Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário/UFRRJ, BR 465, Km 05, CEP:23897-970, Seropédica, RJ, Brasil.

Autor para correspondência: Géssica Mylena Santana Rêgo (gehrego@gmail.com)

Data de chegada: 07/02/2017. Aceito para publicação em: 22/09/2021

10.1590/0100-5405/182147

RESUMO

Rêgo, G.M.S.; Souza, R.M.; Rivas, E.B.; Brioso, P.S.T. Detecção de *Cucumber mosaic virus* em espécies de *Phalaenopsis* importadas. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.228-230, 2021.

No Brasil, mudas de orquídeas são importadas de vários países, como: Holanda, Taiwan e Tailândia e estão sujeitas a inspeções fitossanitárias. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fitossanitária, com relação aos vírus de mudas de orquídeas importadas e nacionais através de Teste Imunocromatográfico e de RT-PCR. Detectou-se o *Cucumber mosaic virus* em amostras de orquídeas importadas em infecção simples ou mista. Embora o

CMV não seja um vírus quarentenário brasileiro e nenhum vírus nesta categoria tenha sido detectado, as amostras examinadas evidenciaram a necessidade de fortalecer um programa nacional de indexação de vírus, evitando a introdução de vírus de outros países através de orquídeas importadas, de forma a minimizar os riscos de fontes de inóculo e introdução de potenciais novas variantes desses vírus, disseminando e prejudicando o agronegócio brasileiro.

.Palavras-chave: Orquídea; *Cucumovirus*, Teste Imunocromatográfico, Teste de RT-PCR

ABSTRACT

Rêgo, G.M.S.; Souza, R.M.; Rivas, E.B.; Brioso, P.S.T. Detection of *Cucumber mosaic virus* in imported *Phalaenopsis* species. *Summa Phytopathologica*, v.47, n.4, p.228-230, 2021.

In Brazil, orchid seedlings are imported from several countries, such as: Holland, Taiwan, Thailand, and are subject to phytosanitary inspections. This study aimed to evaluate the phytosanitary quality, considering viruses from imported and domestic orchid seedlings, through immunochromatographic test and RT-PCR. *Cucumber mosaic virus* (CMV) was detected in imported orchid samples as single or mixed infection.

Although CMV is not a Brazilian quarantine virus and no virus in this plant category was detected, the examined samples evidenced the need to strengthen a national virus-indexing program, preventing the introduction of foreign viruses via imported orchids, in order to mitigate the risks of inoculum sources and introduction of potential new variants of these viruses, which can spread and impair Brazilian agribusiness.

Keywords: Orchid, *Cucumovirus*, Immunochromatographic Test, RT-PCR Test

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, a qual é constituída por mais de 25.000 espécies. No Brasil há registros de 221 gêneros, sendo 1620 espécies endêmicas no país. Possuem diversos fins, como indicador ambiental, uso medicinal e ornamental. É mais conhecida como ornamental, fornecendo flores de alto valor comercial (11, 1).

O mercado de ornamentais no Brasil cresce, apesar de ainda se apresentar pouco descentralizado. O cenário de entrada e saída das orquídeas requisitadas é representado pelas importações, principalmente da Holanda e Tailândia, as quais correspondem juntas a mais de 95% das importações, sendo os produtos importados de maior expressão, respectivamente, as orquídeas dos gêneros *Phalaenopsis* e *Dendrobium* (10).

O comércio dessas plantas sem a vistoria fitossanitária adequada pode incorrer na disseminação de viroses entre as espécies locais. Desta forma, as orquídeas ornamentais importadas podem ser portadoras de viroses que se não detectadas, podem se tornar fonte de inóculo para espécies ornamentais nacionais.

Dentre os vírus citados em representantes da família Orchidaceae temos os vírus dos gêneros: *Alphacarmovirus*, *Carlavirus*, *Cucumovirus*, *Closterovirus*, *Dichorhavirus*, *Nepovirus*, *Orthospovirus*, *Poacevirus*, *Potexvirus*, *Platypuvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Tombusvirus* e, vírus não bem caracterizados e de gênero indeterminado (4, 6, 5, 2, 8).

Os vírus quarentenários para o Brasil são os citados nas Instruções Normativas do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) que podem incidir em espécies e/ou híbridos de orquídeas importadas. Tais vírus se distribuem em quatro espécies e/ou possíveis espécies virais [*Tomato ringspot virus* (gênero *Nepovirus*), *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (gênero *Potyvirus*), *Capsicum chlorosis virus* (gênero *Orthospovirus*), *Impatiens necrotic spot orthospovirus* (Gênero *Orthospovirus*)] (3).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de detectar e identificar molecularmente, vírus presentes em amostras da família Orchidaceae importadas. Foram analisadas 502 plantas importadas, sendo 21 plantas

de *Dendrobium nobile*, 4 plantas de *Dendrobium hybrid*, 8 plantas de *Oncidium hybrid*, 386 plantas de *Phalaenopsis amabilis* e 83 plantas de *Phalaenopsis hybrid*. As amostras de plantas importadas da família Orchidaceae, gênero *Phalaenopsis* eram assintomáticas. Com exceção de uma planta de *Phalaenopsis amabilis* que apresentava distorção foliar.

Os testes aplicados na detecção dos vírus foram: (1) Imunocromatográfico e (2) RT-PCR. Para (1), utilizou-se o Kit Agdia, seguindo o protocolo do fabricante e para (2) os kits RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Brasil) para a extração de RNA. Os primers utilizados no RT-PCR foram: CMVLODF-F (5'-TATGATAAGAAGCTTGTTTCGCGCA-3') e CMVLODF-R (5'-TTTAGCCGTAAGCTGGATGGACAACCC-3') pois estes são os primers que abrangem todas as estirpes virais conhecidas do CMV no Brasil e se relaciona a capa proteica do vírus (9). O ciclo utilizado no termociclador PTC-200 (MJ Research) foi realizado inicialmente de 45°C/30 minutos, seguido de 95°C/5 minutos, depois 35 ciclos de 95°C/30 segundos, 58°C/40 segundos, 72°C/40 segundos, com extensão final a 72°C/10 minutos; e resfriamento a 4°C/5 minutos. O amplicon foi visualizado em transiluminador de ultravioleta em gel de agarose a 1,2% contendo brometo de etídio (7).

As orquídeas importadas da Tailândia e Holanda apresentaram

infecção mista de CMV, CymMV/ ORSV em quatro amostras de *Phalaenopsis* spp., infecção mista de CMV e ORSV em uma amostra de *Phalaenopsis* spp e uma amostra com infecção simples de CMV em *Phalaenopsis*. Estes resultados foram observados nos testes imunocromatográfico e confirmados na RT-PCR através de amplicons de 491-507 pb esperados para CMV.

Alguns materiais apresentaram sintomas como o descrito por Wong (6) em orquídea, onde o CMV ocasiona folhas distorcidas, sendo esse o material examinado.

Os resultados obtidos para orquídeas importadas a partir de testes imunocromatográficos evidenciaram a ausência de vírus quarentenários e uma baixa incidência de outros vírus (em especial, o CymMV e o ORSV); sendo pela primeira vez, detectado a presença de CMV em amostras importadas de orquídeas, seja em infecção simples ou mista.

Embora o CMV seja comum no território nacional, a presença do mesmo em material importado deve ser levada em consideração de forma a não vir a prejudicar o agronegócio com possíveis estirpes virais exóticas. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de se fortalecer um programa nacional de indexação de vírus em mudas de orquídeas, de forma a impedir o aumento de fontes de inóculo, mesmo que não sejam quarentenários no Brasil, pois pode vir a comprometer o agronegócio.

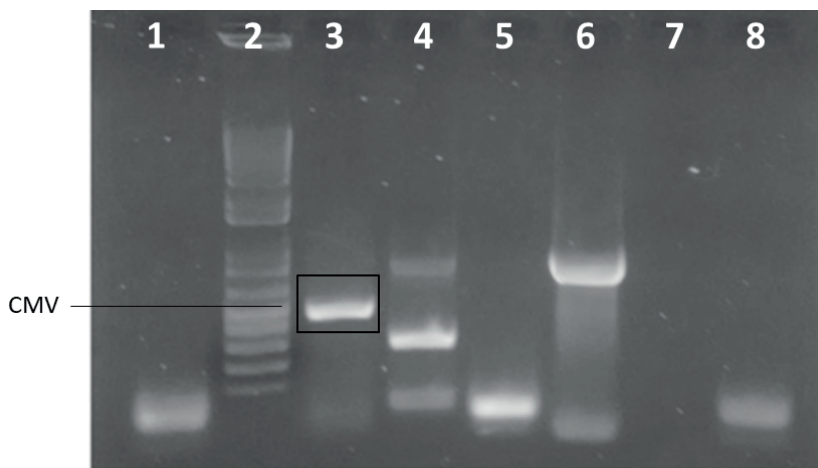


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% com brometo de etídio – amplificação de RNA por RT-PCR com primers específicos para o CMV (Amplicon de 491-507 pb). 1,5. Controle negativo; 2. Marcador de massa molecular (100 pb DNA Ladder, Thermo Fisher) ; 3. CMV (491-507 pb); 4. CymMV (844-849 pb); 6. ORSV (845 – 847 pb); 7. Controle do ambiente durante a extração do RNA; 8. *Phalaenopsis amabilis* sadia.



Figura 2. Sintoma de distorção foliar em *Phalaenopsis amabilis* de Taiwan e Teste Imunocromatográfico acusando a presença de CMV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Barberena, F.F.V.A.; Fraga, C.N.; Pessoa, E.M.; Forster, W.; Menini Neto, L.; Furtado, S.G.; Nardy, C.; Azevedo, C.O.; Guimarães, L.R.S. Orchidaceae. In: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 15 nov. 2015.
2. Baker, C.A.; Webster, C.G.; Adkins, S. *Spiranthes Mosaic Virus 3* and *Bidens Mottle Virus*, two potyviruses detected in *Phlox divaricate*. Gainesville: Florida Department of Agriculture and Consumer Services. Division of Plant Industry, 2014. (Plant Pathology Circular, 414).
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 39, de 1 de outubro de 2018. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, ed.190, p.11-14, 2 out. 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43460217/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-39-de-1-de-outubro-de-2018-43460055>. Acesso em: 20 maio 2021
4. Kim, M.; Jeong, R.; Kwak, H.; Lee, S.; Kim, J.; Kim, K.; Cha, B.; Choi, H. First Report of Cucumber mosaic virus Isolated from Wild *Vigna angularis* var. *nipponensis* in Korea. **The Plant Pathology Journal**, Gangnamgu, v.30, n.2, p.200-207, 2014.
5. Kondo, H.; Maeda, T.; Gara, I. W.; Chiba, S.; Maruyama, K.; Tamada, T.; Suzuki, N. Complete genome sequence of *Habenaria mosaci* virus, a new potyvirus infecting a terrestrial orchid (*Habenaria radiata*) in Japan. **Arch. Virol.**, v.159, p.163-166, 2014.
6. Wong, S. M. Orchid Viruses – A compendium. In: Kull, T.; Arditti, J. **Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII**. Califórnia: Kluwer Academic Publishers, 2002. p.505-546.
7. Leone, J.A.B.; Souza, J.F.; Santos, A.F.A.; Brioso, P.S.T. Viróides em citros no Estado do Rio de Janeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.46, n.2, p.121-128, 2020.
8. Moreira, S.R.; Eiras, M.; Chaves, A.L.R.; Galletti, S.R.; Colariccio, A. Caracterização de uma nova estirpe do Tomato mosaic virus isolada de tomateiro no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.6, p.602-607, 2003.
9. Sharman, M.; Thomas, J. E.; Dietzgen, R. G. Development of a multiplex immunocapture PCR with colourimetric detection for viruses of banana. **Journal of Virological Methods**, v.89, p. 75-88, 2000.
10. Suzuki, R. M. Breve análise sobre o comércio exterior de orquídeas no Brasil. In: Reunião Anual do Instituto de Botânica, n. 21, 2014, São Paulo. Interação Ciência e Sociedade. São Paulo: Instituto de Botânica, 2014. ISSN 2238-5088.
11. Zettler, F.W.; Ko, N.J.; Wisler, C.G.; Wong, S.M. Viruses of orchids and their control. **Plant Disease**, Sherman Court, v.74, n.9, p.621-626, 1990.