

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

**LIMPEZA CLONAL DE VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot
esculenta* Crantz) E PRODUÇÃO DE ANTISSORO PARA O VÍRUS DO
MOSAICO COMUM DA MANDIOCA**

**MARINGÁ-
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

**LIMPEZA CLONAL DE VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot
esculenta* Crantz) E PRODUÇÃO DE ANTISSORO PARA O VÍRUS DO
MOSAICO COMUM DA MANDIOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

**MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
FEVEREIRO – 2010**

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI

**LIMPEZA CLONAL DE VARIEDADES DE MANDIOCA (*Manihot
esculenta* Crantz) E PRODUÇÃO DE ANTISSORO PARA O VÍRUS DO
MOSAICO COMUM DA MANDIOCA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em:

Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira

Prof. Dr. Mário Takahashi

Prof. Dr. Eliezer Rodrigues de Souto
(Orientador)

Aos meus pais
que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por sempre iluminar o meu caminho e por permitir mais esta conquista em minha vida.

Aos meus pais Maria Antônia Rosin Carnelossi e Nercio João Carnelossi, pelo amor, pela compreensão e pelo incentivo.

A toda minha família que, mesmo distante, tanto me apoiou e incentivou, principalmente, ao meu primo João Henrique, pelo carinho e pela amizade.

Ao professor Dr. Eliezer Rodrigues de Souto, pela orientação, pela disponibilidade, pela dedicação e pela leitura crítica, e ao prof^o Dr. Arildo José Braz de Oliveira, pela amizade e pelo auxílio em todas as fases deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual, pela formação profissional e pela oportunidade oferecida.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

Ao Dr. Álvaro Manuel Rodrigues Almeida, pesquisador da EMBRAPA-Soja, por ter concedido o uso do laboratório de virologia da EMBRAPA-Soja para a realização de uma parte do trabalho, ao técnico Benato, pela disponibilidade e pela ajuda, e ao meu eterno amigo Antônio Augusto, pela ajuda e pela disponibilidade na realização dos experimentos.

Aos Dr. Eduardo C. de Andrade e Paulo Ernesto Meissner Filho, pesquisador da EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, por ceder o antissoros para o CsCMV e manivas de mandioca infectadas com o vírus.

Aos financiadores do projeto, FINEP (Fianciadora de Estudos e Projetos), Sebrae (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), e aos produtores de mandioca da região de Paranaíba.

À minha grande amiga Lílíam, pelas aulas de inglês e pelas correções ortográficas realizadas neste trabalho, além de toda a atenção, carinho, companheirismo e paciência que me foi concedida.

À estagiária de Agronomia, Taise, minha grande amiga e companheira, pela ajuda e pelo tempo dedicado à realização deste trabalho. E aos meus amigos queridos Cassiele, Jaqueline e Marcelo, pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos alegres que passamos juntos e por agüentar minhas crises de ansiedade. Aos colegas conquistados ao longo do curso de mestrado, principalmente, à Noemi, ao Daniel, ao Marco Aurélio, à Tatiane, à Francielli, à Gabriela, ao Ricardo, ao Mauro, à Érica, ao Rafael e à Dalany, que foram muito importantes na minha trajetória. E também as minhas eternas amigas de Curitiba, Lesirre, Daniele e Silvana.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira (Departamento de Farmácia - PCF - UEM) e Dr. Mario Takahashi (pesquisador do IAPAR-PR), pelo desvelo com que aceitaram o convite, pelo apoio e pelas contribuições essenciais para o enriquecimento do trabalho.

BIOGRAFIA

PATRÍCIA ROSIN CARNELOSSI, nascida em São Paulo (SP), aos 16 dias do mês de maio de 1983, é filha de Maria Antônia Rosin Carnellosi e Nercio João Carnellosi.

Em fevereiro de 2007, graduou-se no curso de Agronomia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Em março de 2008, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração de Proteção de Plantas, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), no Estado do Paraná.

Não é o quanto você faz, mas quanto
amor você coloca ao fazer. Não é quanto
você doa, mas quanto amor coloca ao
doar
(Madre Tereza de Calcutá).

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	3
1.2 Objetivos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Cultura da mandioca	4
2.1.1 Características da cultura	5
2.1.2 Viroses na cultura da mandioca	8
2.2 Métodos empregados na limpeza clonal	13
2.2.1 Cultura de tecidos	13
2.2.1.1 Mecanismos de erradicação de vírus por cultura de meristemas ...	17
2.2.1.2 Aplicação da cultura de meristemas na eliminação de vírus ...	18
2.2.2 A termoterapia	19
2.2.2.1 Mecanismos envolvidos na erradicação de vírus por alta <i>temperatura</i>	20
2.2.2.2 Aplicações da termoterapia na eliminação de vírus	21
2.2.3 Combinação termoterapia versus cultura de tecidos	22
2.2.4 Quimioterapia – uso de um antiviral	23
2.3 A detecção de vírus de plantas	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Origem dos materiais propagativos de mandioca	28
3.2 Transmissão mecânica experimental e propagação do vírus	29
3.3 Detecção do CsCMV através do teste de sorológico ELISA-indireto ...	30
3.4 Detecção do CsCMV através de RT-PCR	31

3.4.1 Extração do RNA total	32
3.4.2 Reação de transcrição-reversa (RT-PCR)	32
3.4.3 Reação de PCR (Polymerase chain reaction)	33
3.5 Purificação do CsCMV	34
3.5.1 Produção do antissoro	35
3.5.1.1 <i>Imunização do coelho</i>	35
3.5.1.2 <i>Coleta do sangue/sangrias</i>	36
3.5.1.3 <i>Obtenção do antissoro</i>	36
3.6 Determinação da massa molecular da proteína capsidial do CsCMV ...	37
3.7 Testes de dupla difusão em Agar	38
3.8 Purificação da imunoglobulina G (IgG)	39
3.9 Limpeza clonal de variedades de mandioca cultivadas no noroeste do Paraná	40
3.9.1 Termoterapia	40
3.9.2 Cultura de meristemas	41
3.9.3 Quimioterapia – uso de um antiviral	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Transmissão mecânica experimental do CsCMV	47
4.2 Teste Sorológico (ELISA-indireto)	48
4.2.1 Resultados dos testes de ELISA-indireto com antissoro cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical	48
4.2.2 Resultados dos testes ELISA-indireto com o antissoro para o CsCMV, produzido neste trabalho	51
4.3 Detecção do CsCMV através de RT-PCR	52
4.4 Purificação do vírus (CsCMV).....	54
4.4.1 Produção de antissoro	57
4.5 Massa molecular da proteína capsidial	58
4.6 Teste de difusão dupla em ágar	58
4.7 Purificação da IgG	60
4.8 Limpeza clonal	60
4.8.1 Termoterapia e cultura de meristemas	60

4.8.1.1 <i>Avaliação dos meristemas apicais da variedade Olho Junto ...</i>	67
4.8.2 Quimioterapia – uso de um antiviral	69
4.8.3 Plantas aclimatadas e número de plantas livres de vírus	72
5. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Datas e dosagens das imunizações no coelho	35
Tabela 2	Data das coletas de sangue e volume obtido em mL	36
Tabela 3	Meio de cultura MS (Murashige e Skoog) utilizado nas fases de estabelecimento e multiplicação/enraizamento para o cultivo de meristemas apicais <i>in vitro</i> de variedades de mandioca, seguindo a metodologia empregada pelo Circular Técnico n° 88 (EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical) com modificações	42
Tabela 4	Número de meristemas apicais extraídos, de explantes mortos e contaminados por fungos e bactérias e de plântulas desenvolvidas <i>in vitro</i> das variedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) Olho Junto, Fécula Branca, Baianinha, IAC 90, IAC 13, IAC 14 e do material "Pasquini"	62
Tabela 5	Avaliação do número de meristemas sobreviventes; do número de explantes mortos; do número de meristemas com folhas, raízes e calos; do comprimento (cm) da parte aérea dos explantes do 1° ao 70° dia após a extração dos meristemas da variedade de mandioca Olho Junto, com intervalos de 10 dias para cada avaliação	67
Tabela 6	Porcentagem de explantes desenvolvidos <i>in vitro</i> e a porcentagem de explantes contaminados por fungos e bactérias do 10° ao 70° dia após a extração dos meristemas da variedade de mandioca Olho Junto, com intervalos de 10 dias para cada avaliação	68
Tabela 7	Número de explantes de mandioca das variedades Olho Junto, Baianinha e do material "Pasquini" regenerados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 5 mg/L e 8 mg/L de ribavirina	71
Tabela 8	Número de plantas de mandioca das variedades Olho Junto, IAC 12 e do material "Pasquini" aclimatadas em casa de vegetação, apresentando sintomas de CsCMV e livres deste vírus através do teste ELISA-indireto	73
Tabela 9	Deteção do CsCMV por ELISA-indireto nas variedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) Olho Junto, IAC 19, IAC 12, Fécula Branca, Baianinha e do material "Pasquini" obtidas por cultura de meristemas associada à termoterapia	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização genômica do CsCMV baseada na sequência de nucleotídeo do RNA viral clonado. As ORFs 1, 2, 3, 4, e 5 estão representadas por caixas. O tamanho das proteínas estão descritos tanto acima como abaixo das caixas (CALVERT et al., 1996)	11
Figura 2	Folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) apresentando os sintomas de mosaico causado pelo CsCMV	12
Figura 3	Manivas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) plantadas verticalmente em vasos para obtenção de folhas para uso nos ensaios sorológicos ELISA-indireto	28
Figura 4	Placa do teste ELISA-indireto após adição do substrato p-fosfato de nitrofenil, diluída em tampão substrato (dietanolamina e NaN ₃), mostrando os orifícios com coloração amarela e indicando reação antígeno x anticorpo (teste positivo) para o CsCMV, em material coletado nas áreas de produção de Paranavaí-PR	31
Figura 5	Corte das manivas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) com auxílio de uma serra manual (A); extremidade da maniva de mandioca sendo emergida em parafina líquida (B)	40
Figura 6	Manivas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) em câmara de crescimento/germinação (BOD) com fotoperíodo controlado (A); manivas com brotos prontos para extração de seus meristemas apicais (B)	41
Figura 7	Plântulas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) (A); plântula retirada do meio de cultura pronta para ser aclimatada (B)	45
Figura 8	Plântulas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) em início de aclimação em copos descartáveis contendo substrato comercial Plantimax [®] , com copo de cobertura, em casa de vegetação	45
Figura 9	Plântulas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>), em copos descartáveis contendo substrato comercial Plantimax [®] , sistema radicular ramificado e abundante, em casa de vegetação (A); Plântula de mandioca pronta para ser transplantada em vaso (B)	45

Figura 10	Plântulas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) transplantada para vaso com solo + substrato comercial Plantimax [®] em casa de vegetação	46
Figura 11	Planta de <i>Nicotina benthamiana</i> inoculada com CsCMV, apresentando os sintomas de uma leve clorose foliar e pequenas deformações foliares	47
Figura 12	Planta de <i>Chenopodium amaranticolor</i> inoculada com CsCMV, apresentando sintomas de lesões locais cloróticas (LLC) na folha (A); folha e com sintoma de LLC (B)	48
Figura 13	Valores de absorbância para o teste ELISA-indireto das variedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>): IAC14, IAC13, IAC90, Olho Junto, Fécula Branca e "Pasquini" (variedade não definida), em quatro diluições, com antissoro para o CsCMV (cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical)	49
Figura 14	Valores de absorbância para o teste ELISA-indireto das variedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>): Baianinha, BG-21 (material infectado com CsCMV provenientes de Cruz das Almas-BA) e plantas <i>Nicotiana benthamiana</i> (folhas novas e senescentes) em quatro diluições	50
Figura 15	Resultados dos testes ELISA-indireto com o antissoro para o CsCMV produzido neste trabalho, na diluição de 1/10.000, em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) "Pasquini" e 'Baianinha'-BA, diluídas a 1/300	52
Figura 16	Eletroforese de gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo e com os produtos da amplificação da reação de RT-PCR da planta <i>Nicotina benthamiana</i> inoculada com o CsCMV, mostrando a amplificação de fragmento de 760 pb (A e B). (M) Marcador DNA Ladder de 100 pb	53
Figura 17	Eletroforese de gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo, com os produtos da amplificação da reação de RT-PCR a partir de mandioca 'Baianinha' infectada com CsCMV. (A) amplificação do fragmento de 760 pb. (M) Marcador DNA Ladder de 100 pb	53
Figura 18	Bandas virais (seta) obtidas após gradiente de sacarose de uma preparação de Cassava common mosaic virus (CsCMV)	54
Figura 19	Curva de absorção de nucleoproteínas da primeira preparação purificada de CsCMV, diluída a 1/10, com leitura em espectrofotômetro	55

Figura 20	Curva de absorção de nucleoproteínas da segunda preparação purificada de CsCMV, diluída a 1/10, com leitura em espectrofotômetro	55
Figura 21	Peso molecular da proteína capsidial de CsCMV em eletroforese de gel de poliacrilamida-SDS 15%, corado com Coomassie blue; M, marcador de peso molecular na faixa de 10 a 160 kDa (BenchMark tm Protein Ladder, Invitrogen [®]); 1P – purificado viral 1; 2P – purificado viral 2	58
Figura 22	Teste da dupla difusão em ágar com antissoro para Cassava common mosaic virus apresentando as faixas/bandas de precipitação formadas. AS – antissoro (As) contra CsCMV; B – extrato das folhas de <i>N. benthamiana</i> sadia (Ag); BI – extrato das folhas de <i>N. benthamiana</i> (Ag) inoculada com CsCMV; MI - extrato das folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) (Ag) inoculadas com CsCMV; P – vírus CsCMV purificado (Ag)	59
Figura 23	Valores de absorbância para o teste ELISA-indireto em amostras de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>), utilizando antissoro contra CsCMV e IgG purificada da solução viral de CsCMV, diluídos a 1.000	60
Figura 24	Porcentagem de explantes sobreviventes, mortos e contaminados das variedades de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) Olho Junto (OJ), Fécula Branca (FB), Baianinha (BA), IAC 90, IAC 13 e IAC 14 e do material "Pasquini" (PA), as quais foram desenvolvidas in vitro através da técnica da termoterapia associada à cultura de meristemas	63
Figura 25	Explantes das variedades Baianinha, IAC 90, IAC 14, IAC 13 e Fécula Branca em meio de cultura MS (Murashige e Skoog)	65
Figura 26	Plântulas de mandioca das variedades IAC 12, Olho Junto e do material "Pasquini" em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) prontas para serem aclimatadas	66
Figura 27	Explates de mandioca da variedade Baianinha deformados, com coloração marrom - amarelado em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 10, 15 e 30 mg/L de ribavirina	70
Figura 28	Explantes de mandioca das variedades – da esquerda para a direita – Olho Junto (OJ), Baianinha (BA) e do material "Pasquini" (PA) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 5 e 8 mg/L de ribavirina, respectivamente	71

Figura 29	Plantas de mandioca da variedade IAC 12 obtidas através das técnicas da termoterapia combinada com a cultura de meristemas em casa de vegetação, livres de CsCMV	72
Figura 30	Plântulas de mandioca do material "Pasquini" (variedade não definida) com sintomas causados pelo CsCMV	74

RESUMO

CARNELOSSI, Patrícia Rosin, MS, Universidade Estadual de Maringá, fevereiro de 2010. **Limpeza clonal de variedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e produção de antissoro para o vírus do mosaico comum da mandioca.** Professor Orientador: Eliezer Rodrigues de Souto.

A mandioca tem a maior parte de sua produção destinada à alimentação humana por meio do consumo de suas raízes. Por ser propagada vegetativamente, ela está sujeita à disseminação de doenças sistêmicas através de gerações sucessivas, como aquelas causadas por vírus. O vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV) é o mais disseminado nas áreas produtivas de todo o mundo. O presente trabalho teve como objetivo testar um protocolo de limpeza clonal de mandioca para obtenção de plantas livres do CsCMV, realizar a indexação dos materiais propagativos de variedades cultivadas na região Noroeste do Paraná (Olho Junto, Fécula Branca, Baianinha, IAC 90, IAC 12, IAC 13 e IAC 14) e do material “Pasquini”(variedade não definida), e produzir um antissoro específico para o CsCMV. Testes de ELISA-indireto realizados revelaram a infecção natural do CsCMV em todas as variedades de mandioca analisadas. O protocolo utilizado foi eficiente na micropropagação das variedades Olho Junto, IAC-12 e “Pasquini”, resultando em plântulas saudáveis prontas para aclimação, demonstrando assim, a necessidade de adaptação do método para as demais variedades. Constatou-se que, das 64 plântulas de mandioca desenvolvidas *in vitro* e provenientes da termoterapia associada à cultura de meristemas (independentemente da variedade), 31 se mostraram livres do CsCMV através da indexação pelos testes ELISA realizados. A adição do antiviral Ribavirina ao meio de cultivo MS nas concentrações de 5 a 40 mg/L não se mostrou eficiente nas condições testadas, causando efeitos fitotóxicos e a morte das plântulas das 3 variedades testadas. A purificação do CsCMV foi conseguida, obtendo-se um antissoro altamente específico e com alto

título (1:10.000). As purificações das imunoglobulinas G (IgG) específicas para o CsCMV foram, igualmente, bem sucedidas e se mostraram mais sensíveis à detecção do vírus do que o antissoro bruto, quando utilizadas nos ensaios ELISA realizados. A massa molecular da proteína capsidial do CsCMV purificado foi determinada, ficando próximo de 20 KDa e dentro do esperado para *Potexvirus*. Reações de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *Potexvirus* resultaram na amplificação de fragmentos de aproximadamente 760 pb, os quais, possivelmente, representem a amplificação parcial do gene codificador da replicase viral.

Palavras-chave: CsCMV, cultura de meristemas, termoterapia, sorologia, teste de ELISA-indireto.

ABSTRACT

CARNELOSSI, Patrícia Rosin, MS, State University of Maringá, February 2010. **Clonal cleaning of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties and antiserum production against *Cassava common mosaic virus*.** Adviser: Dr. Eliezer Rodrigues de Souto.

Part of the production of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is directed towards human feeding through consumption of its roots. Due to its vegetative propagation, it is subject to the dissemination of systemic diseases as those caused by viruses after successive generations. CsCMV is the most disseminated in the cassava producing areas of the world. In this work, a clonal cleaning protocol was evaluated in order to obtain cleaned plants free from CsCMV of the varieties of cassava (Olho Junto, Fécula Branca, IAC 90, IAC 12, IAC 13, IAC 14 e Baianinha) and the material “Pasquini” (non-defined variety) cultivated in the Northwest region of Parana State. A specific antiserum for CsCMV was produced and Indirect ELISA tests revealed the natural infection of CsCMV in all the cassava varieties tested. The micropropagation protocol was efficient for Olho Junto and IAC-12 varieties and also for “Pasquini”, resulting in healthy plantlets, which were ready for acclimatization. For the other varieties it is necessary to adapt this method. The results showed that 31 out of 64 cassava plantlets developed *in vitro* proceeding from thermotherapy associated with meristem tip culture (independently from the variety) were free from CsCMV after indexation tests through ELISA. The addition of Ribavirin to the MS culture medium at the concentrations of 5 - 40 mg/L was not efficient for the conditions tested, causing fitotoxic effects and death of the 3 varieties tested. The CsCMV purification was efficient and a highly specific antiserum with a high titre (1:10.000) was raised. When used in ELISA tests, the prepared purifications of specific G immunoglobulins (IgG) for CsCMV were equally successful and showed to be more sensitive to virus detection than the pure antiserum. The

molecular mass of the purified CsCMV coat protein was determined, which was close to 20 KDa and within the expected value for *Potexvirus*. RT-PCR reactions using specific *primers* for *Potexvirus* resulted in the amplification of fragments (around 760 bp), which possibly represent the partial amplification of the viral replicase coding gene.

Keywords: CsCMV, meristem culture, thermotherapy, serology, indirect-ELISA tests.

1. INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), uma das espécies cultivadas do gênero *Manihot*, é uma planta que tem a maior parte de sua produção destinada à alimentação humana, através do consumo de suas raízes. Para um grande número de países é o alimento predominante na dieta diária, como fonte de carboidrato. Além disso, também é empregada na nutrição animal, sob forma de farelos obtidos da parte aérea, e na indústria, na qual pode ser utilizada como matéria prima na produção de amido (McMAHON; WHITE; SAYRE, 1995).

De acordo com Rodrigues et al. (2008), a mandioca é uma cultura propagada vegetativamente através do plantio de pequenos segmentos do caule, conhecidos como manivas ou estacas. Estudos revelam que a utilização de manivas de boa qualidade exerce influência direta no aumento da produtividade, a qual pode atingir 30% na produção de raiz sem a recorrência de outras práticas culturais ou aplicação de insumos.

Como ressalta Quak (1977 apud GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), em grande parte das espécies propagadas vegetativamente, como a mandioca, há uma grande probabilidade de infecção por um ou mais vírus, sendo os latentes aqueles que apresentam a maior dificuldade em serem detectados através dos seus sintomas visuais. Em plantios sucessivos e/ou clonagens, esses patógenos são transmitidos e acumulados nas plantas, reduzindo o vigor e a produtividade das culturas infectadas.

Ao considerar o fato de que as viroses causadoras de doenças em mandioca podem inviabilizar economicamente as atividades relacionadas com a produção de matéria-prima e também reduzir drasticamente a qualidade do produto, especialmente quanto aos teores de amido nas raízes, cuja redução pode variar de 10 a 80%, faz-se necessário diagnosticá-las para que se evitem ataques severos que podem provocar uma redução em torno de 70% na produtividade ou até mesmo perdas totais em genótipo suscetível (ALVES; SILVA, 2003).

Uma grande diversidade de vírus pode ser detectada na cultura da mandioca, porém, no Brasil, há relatos da ocorrência de três vírus, o vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV), o vírus mosaico das nervuras (*Cassava vein mosaic virus*, CsVMV) e o vírus do couro de sapo da mandioca (*Cassava frogskin disease*, CFSD). Supõe-se que o CsCMV seja o vírus mais freqüente e importante em todas as regiões produtoras, principalmente nas Regiões Sul e Sudeste. Estes vírus causam infecção que prejudicam as variedades cultivadas e interferem em sua fotossíntese, comprometendo o crescimento das raízes e influenciando negativamente na produtividade da cultura (COSTA; KITAJIMA, 1972).

Para Morel e Martin (1952 apud GUERRA; NODARI, 2006), diante da dificuldade de erradicação do vírus em plantas infectadas a técnica de cultura de tecidos com meristemas ou ápices caulinares (meristema apical com primórdios foliares) vem sendo amplamente utilizada para a eliminação de vírus, obtendo material de multiplicação com alta qualidade fitossanitária, gerando assim, um grande impacto na produção agrícola vegetal. Esta técnica pode ser aplicada em diversas espécies vegetais e para várias finalidades, como o estudo do efeito de fitorreguladores na iniciação foliar e no florescimento, a propagação vegetativa para obtenção de plantas livres de patógenos, a multiplicação clonal rápida e o desenvolvimento de cultivares melhoradas (tolerância às doenças, aos herbicidas, à salinidade, à seca, entre outros)

Segundo Mabanza et al. (1995), a cultura de meristemas é primordial para o aumento da produtividade em regiões que estão infectadas por vírus e bactérias, o que torna possível a obtenção de uma grande quantidade de mudas em um curto espaço de tempo. Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a cultura de meristemas se destaca, uma vez que é capaz de prevenir a disseminação de doenças propagadas vegetativamente de uma geração a outra. Quando combinada com a termoterapia, esta técnica tem demonstrado bons resultados na eliminação de patógenos virais de uma ampla gama de espécies hospedeiras (KARTHA; GAMBORG, 1975), proporcionando o aumento da porcentagem de plantas livres de doenças (CONCI; NOME, 1991).

Apesar do método da cultura de tecido possibilitar a obtenção de plantas saudáveis, ele não é totalmente eficaz na eliminação do vírus. Dessa forma, é indispensável o emprego de um teste complementar de indexação para identificar as plantas matrizes realmente saudáveis (PALAZZO et al., 2006).

1.1 Justificativa

A cultura da mandioca apresenta, há anos, o mesmo nível de produtividade, uma vez que não se observa interesse da parte da iniciativa privada em investir no aumento da tecnologia. Essa falta de incentivo tecnológico e os problemas ocasionados por doenças, pragas, manejo inadequado dos solos, baixa fertilidade, cultivares pouco produtivas e com baixos teores de amido nas raízes, entre outros, têm causado prejuízos ao setor e diminuição na área plantada. Além disso, o recente aparecimento de viroses na mandioca, os quais eram mais esporádicos, estão se agravando devido à propagação vegetativa desta espécie (SOARES et al., 2009).

Este trabalho visa adequar protocolos de limpeza clonal de mandioca para as principais variedades cultivadas no Paraná, e produzir um antissoro específico para o vírus mais disseminado na cultura, o CsCMV. Este antissoro será indispensável nos trabalhos de indexação viral do material de propagação obtido.

1.2 Objetivos

- Adequar o protocolo para limpeza clonal de mudas de mandioca das variedades cultivadas na Região Noroeste do Paraná (Olho Junto, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13, IAC 14, IAC12 e Baianinha), e o material “Pasquini”.

- Indexar o material propagativo para o CsCMV através do teste sorológico ELISA-indireto.

- Produzir um antissoro específico para o CsCMV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura da mandioca

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2009), no ano de 2008, a produção mundial de raízes tuberosas de mandioca foi em torno de 238 milhões de toneladas, correspondente ao resultado de um crescimento de 3% ao ano nas últimas três décadas. Considerada como o quarto cultivo mais importante do Mundo, a mandioca é um alimento básico para quase 1 bilhão de pessoas em 105 países.

Atualmente, o Brasil está entre os maiores produtores mundiais, com uma produção estimada em cerca de 30 milhões de toneladas. As exportações de fécula e amido de mandioca *in natura* no ano de 2005 chegaram a representar US\$ 4,7 milhões em receita para o país, equivalendo a 11,5 mil toneladas, e, nesta mesma época, as exportações de dextrina e outros amidos e féculas modificados representaram receita de US\$ 19,7 milhões (ABAM, 2009).

É importante destacar que os Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul formam um complexo agroindustrial que produz e processa cerca de 5 milhões de toneladas de raízes tuberosas de mandioca destinadas a produção de farinha e amido (IBGE, 2008). Quase toda a produção de farinha paranaense é designada aos Estados Nordestinos, São Paulo e Rio de Janeiro. Quanto à fécula, cujo destino é semelhante ao da farinha, cerca de 30% da produção são transformados em produtos modificados e 5% são exportados (SEAB, 2009).

Dentre os estados que formam esse complexo industrial, o maior e mais moderno do país está situado no Estado do Paraná, o qual possui uma posição de destaque no setor de produção de raiz de mandioca e seus derivados. Nesse estado, principalmente nas regiões de Paranavaí, com cerca de 34% da produção, Cianorte, Campo Mourão e Umuarama, cultivam-se os seguintes clones de mandioca: Fibra, Olho Junto, Espeto, Fécula Branca, Mico, IAC 13 e IAC 14

(TAKAHASHI; GONÇALO, 2001). Além disso, vale destacar que essas regiões detêm 69,5% da área ocupada com a cultura em todo o estado. Conforme dados da SEAB/PR (2009), a cadeia produtiva da mandioca neste estado ocupa o 3º lugar na produção nacional de raízes de mandioca e emprega mais de 38.000 pessoas, movimentando recursos da ordem de R\$ 300 milhões ao ano. No Paraná, 41 indústrias de fécula de mandioca e 120 farinheiras podem ser encontradas, cuja maior concentração se dá na região de Paranaíba.

2.1.1 Características da cultura

A mandioca é, de acordo com Aguiar (2003), uma cultura tropical de origem brasileira, provavelmente proveniente das regiões Nordeste e Central, cultivada há mais de quinhentos anos pelos indígenas como fonte de alimento. Quando os portugueses aportaram no Brasil, observaram sua rusticidade, produtividade e versatilidade, e a levaram para outras colônias, expandindo-a pelo mundo. Na África e Ásia, a mandioca se tornou a base de sustentação das populações carentes (em torno de 600 milhões de pessoas) e a terceira maior fonte de calorias entre os trópicos (FAO, 2005).

Como destaca Aguiar (2003), devido sua origem tipicamente brasileira, a mandioca é cultivada desde pequenas áreas, como roçados e fundos de quintal, para consumo familiar, até grandes extensões de terra para fins industriais, onde as colheitas podem ser realizadas com um ou dois ciclos. Isso só é possível porque, a mandioca apresenta uma boa adaptação em uma ampla diversidade de ambientes, tolerância a distintos fatores bióticos e abióticos e com versatilidade de uso (CEBALLOS, 2002).

A cultura se desenvolve vigorosamente em locais onde não ocorrem geadas e onde não haja temperaturas inferiores a 20°C, o que leva os agricultores de regiões frias a evitar tal plantio. Como aponta El- Sharkawy et al. (1989), a taxa fotossintética de plantas de mandioca se mantém estável entre 20 e 25°C e alcança o máximo de atividade na faixa de 35°C, índice que pode ser reduzido de acordo com a variação de temperatura.

Quanto à alimentação, a planta de mandioca pode ser igualmente consumida por homens e animais, já que suas raízes tuberosas, ricas em carboidratos, correspondem à porção de maior valor econômico da planta (CEBALLOS, 2002). Na nutrição animal, pode ser fornecida sob a forma de farelos e, na indústria, como matéria-prima na extração de amido, na produção de farinha, além de ser utilizada, em pequena quantidade, para o consumo *in natura* (McMAHON; WHITE; SAYRE, 1995).

Com relação à classificação botânica, a mandioca pertence à classe das dicotiledôneas, à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot* e é descrita como um arbusto lenhoso perene com altura média de um a cinco metros. Dentre as noventa e oito espécies que constituem este gênero, somente a *M. esculenta* tem propriedades comerciais para a produção de raízes tuberosas comestíveis (CEBALLOS, 2002).

A mandioca é uma cultura propagada vegetativamente através do plantio de pequenos segmentos do caule, ditas manivas ou estacas. Neste tipo de propagação, as características morfológicas e agronômicas originais da planta são mantidas, o que é uma grande vantagem, embora haja alguns fatores que limitam a sua multiplicação. O primeiro fator se refere à baixa taxa de multiplicação gerada pelas manivas, uma vez que plantas vigorosas deveriam produzir em média 10 manivas de 20 cm, porém, a média de uma planta adulta é de somente 5 manivas de 20 cm com boa qualidade (MATTOS et al., 2000). Já o segundo fator limitante se refere à redução da qualidade das manivas ao longo de plantios sucessivos devido ao acúmulo de pragas e doenças que são transmitidas a cada geração, o que reflete no decréscimo de produtividade das lavouras. Isso significa que as manivas de mandioca são excelentes veículos de disseminação de pragas e doenças causadas por vírus, bactérias e podridões radiculares dentre e entre regiões. Em plantios sucessivos e/ou clonagens, esses patógenos são transmitidos e acumulados nas plantas, reduzindo o vigor e a produtividade das culturas infectadas, o que torna praticamente impossível seu controle químico (TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998).

Clones de materiais propagados vegetativamente, como a mandioca, que estão infectados por vírus podem apresentar sérias complicações. Isso porque, uma vez ocorrida a infecção, o vírus será, automaticamente, transmitido ao propágulo vegetativo (bulbos, tubérculo, manivas, entre outros) para a maior parte ou, até mesmo, para toda sua descendência. Existem, por exemplo, muitas variedades propagadas vegetativamente que são cultivadas há anos ou, até mesmo, décadas, as quais podem estar infectadas por inúmeros vírus. No passado, a susceptibilidade de clones completos para a infecção por vírus levava, freqüentemente, à sua extinção comercial. Entretanto, atualmente, faz-se uso de variedades resistentes, controle de insetos vetores de vírus limpeza clonal, entre outros (WALKEY, 1985).

Ao plantar manivas com potencial de produção reduzido, o que ocorre em função do envelhecimento fisiológico ocasionado pela multiplicação constante e de infecções causadas por várias doenças, principalmente as sistêmicas, pode-se obter uma produtividade afetada em níveis de até 100%. Assim, embora o uso de manivas selecionadas seja essencial para o aumento do rendimento agrícola, os produtores não dão a devida importância para este fato.

Como qualquer outra cultura, a mandioca é afetada por patógenos, os quais, dependendo da região e da suscetibilidade da cultivar, podem causar perdas consideráveis. Dentre as doenças que afetam a cultura no Brasil estão a podridão radicular (*Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Sclerotium rolfsii*, e outros), o superalongamento (*Sphaceloma manihoticola*), as viroses (vírus do mosaico comum da mandioca (CsCMV); vírus mosaico das nervuras (CsVMV) e o vírus do couro de sapo da mandioca (CFSD)), o superbrotamento (fitoplasma), a antracnose (*Colletotrichum gloesporioides* f. sp. *manihotis*), a ferrugem (*Uromyces* spp.), as manchas foliares, como a mancha parda (*Cercosporidium henningsii*) e a mancha branca (*Phaeoramularia manihotis*), a queima das folhas (*Cercopsora vicosae*) e a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*). Vale ressaltar que esta última tem sido objeto de diversos estudos e avaliada em programas de melhoramento (CEBALLOS et al., 2004).

2.1.2 Viroses na cultura da mandioca

Na cultura da mandioca, podem ser detectados diversos vírus, alguns deles são de grande importância econômica, devido aos danos causados, enquanto outros apenas infectam a mandioca de forma latente. Aquelas que apresentam importância econômica significativa de distribuição regional são: *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *Cassava brown streak virus* (CBSaV) na África; *Cassava green mottle virus* (CGMV) nas ilhas do Pacífico; *Cassava virus X* (CsVX) e *Cassava colombian virus* na Colômbia (CCV); *Cassava caribbean mosaic virus* (CCMV) na América Central; e *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) na Índia (COSTA; KITAJIMA, 1972). Já no Brasil há relatos da ocorrência de três vírus, o vírus do mosaico comum da mandioca (CsCMV), o vírus mosaico das nervuras (CsVMV), e o vírus do couro de sapo da mandioca (CFSD). Segundo Costa e Kitajima (1972), estes vírus prejudicam a fotossíntese das plantas, comprometendo o crescimento das raízes e interferindo, dessa forma, na produtividade da cultura.

Segundo Thresh et al. (1994 apud CALVERT; THRESH, 2002), as viroses que infectam a cultura da mandioca na África, Ásia, Ilhas do Pacífico e Américas do Sul e Central estão abaixo citadas, com seus respectivos nomes científicos, siglas, famílias e gêneros. Vale destacar que os vírus com nomes em itálico são espécies reconhecidas e aqueles que possuem um asterisco (*) apresentam distribuição localizada, embora sem importância econômica para aquela região.

a) África:

African cassava mosaic virus - ACMV (*Geminiviridae: Begomovirus*);

East African cassava mosaic virus (*Geminiviridae: Begomovirus*);

South African cassava mosaic virus (*Geminiviridae: Begomovirus*);

Cassava brown streak virus - CBSaV (*Potyviridae: Ipomovirus*);

*Cassava Ivorian Bacilliform virus** - CsIBV;

Cassava Kumi viruses A and B*;

Cassava “Q” virus*;

*Cassava common mosaic virus** - CsCMV (*Flexiviridae; Potexvirus*).

b) América do Sul e Central:

Cassava common mosaic vírus - CsCMV (*Flexiviridae; Potexvirus*);

Cassava virus X - CsVX (*Flexiviridae; Potexvirus*);

Cassava vein mosaic vírus - CsVMV (*Caulimoviridae; Cavemovirus*);

*Cassava Colombian symptomless vírus** - CCSpV (*Flexiviridae; Potexvirus*);

*Cassava American latent vírus** - CsAIV (*Comoviridae; Nepovirus*);

Cassava frogskin “vírus” - CsFV.

c) Ásia e Pacífico:

*Cassava common mosaic vírus** - CsCMV (*Flexiviridae; Potexvirus*);

Indian cassava mosaic vírus - ICMV (*Geminiviridae; Begomovirus*);

Sri Lankan cassava mosaic vírus - SLCMV (*Geminiviridae; Begomovirus*);

*Cassava green mottle vírus** - CGMV (*Comoviridae; Nepovirus*).

Conforme Fukuda (1993), manifestações severas das doenças causadas por vírus em variedades suscetíveis podem causar perdas na produção que variam de 10 a 20%, o que prejudica a qualidade do produto em virtude da redução de 10 a 50% nos teores de amido. Entretanto, Costa e Kitajima (1972) afirmam que as perdas na colheita induzidas por infecções virais podem ser de 30% ou mais, necessitando, assim, de uma seleção de estacas saudáveis para propagação e da eliminação das plantas e manivas infectadas.

- **Vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic vírus* - CsCMV)**

No Brasil, os primeiros relatos do vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic vírus* - CsCMV) ocorreram na região Sul, embora ele tenha sido descrito pela primeira vez no estado de São Paulo por Costa em 1940 (VELAME; FILHO, 2001). Após esta primeira identificação, o vírus foi

verificado também em outros países da América do Sul, África e Ásia e, atualmente, tem sido observado freqüentemente nos mandiocais da Colômbia, Peru, Indonésia e África (CALVERT; THRESH, 2002). Provavelmente, esta é a virose mais importante e freqüente em todas as regiões produtoras brasileiras, principalmente no Sul e Sudeste, causando infecções que prejudicam economicamente as variedades cultivadas (FUKUDA, 1993).

O CsCMV é conhecido por infectar sistemicamente a mandioca e pode infectar, pelo menos, 6 espécies de dicotiledôneas (*Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Euphorbiaceae*, *Malvaceae* e *Solanaceae*). Em condições experimentais de susceptibilidade para infecção por vírus, as seguintes espécies também foram encontradas como hospedeiras: *Cassia occidentalis*, *Chenopodium album*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Cnidoscolus acotifolius*, *Datura stramonium*, *Euphorbia heterophylla*, *Gomphrena globosa*, *Gossypium hirsutum*, *Manihot esculenta*, *Nicotiana benthamiana*, *Ricinus communis* (KITAJIMA et al., 1965).

- **Propriedades do gênero *Potexvirus* e do CsCMV**

O *Cassava common mosaic virus* (CsCMV) pertence à família *Flexiviridae* e ao gênero *Potexvirus*, que tem pelo menos 30 membros possíveis e definitivos, além de possuir o vírus X da batata como membro tipo (KITAJIMA, 1965).

De acordo com Kitajima (1965), o CsCMV possui um capsídeo não envelopado de partículas alongadas e semi-flexuosas com dimensão de 15 x 495 nm e com uma única capa protéica de peso molecular relativo de 26 000 daltons (Da), sendo que cada partícula é constituída de uma molécula de RNA de senso positivo e de fita simples (+ssRNA) de $2.1-2.3 \times 10^6$, a qual, por sua vez, corresponde a aproximadamente 6% do peso da partícula (NOLT; PINEDA; VELASCO, 1992).

No gênero *Potexvirus* foram encontradas 5 fases abertas de leitura (*open reading frame*, a ORF, que é a porção do genoma de um organismo que contém

uma sequência de bases que pode codificar uma proteína), sendo que a ORF 1 codifica uma proteína responsável pela replicação do RNA. As ORFs 2-4 sutilmente se justapõem uma na outra e são conhecidas como os “blocos triplo de genes” (*triple gene block*, TGB), estando envolvidos no movimento viral célula-célula juntamente com a proteína capsidial. Já a ORF 5 é da região terminal 3’ e codifica a capa proteica (CP) (Figura 1). Acredita-se que o RNA genômico dos potexvirus seja funcionalmente monocistrônico e que somente a proteína de ORF 1 possa ser traduzida diretamente do gRNA (ABOUHAIDAR; HUIMIN XU; HEFFERON 1998).

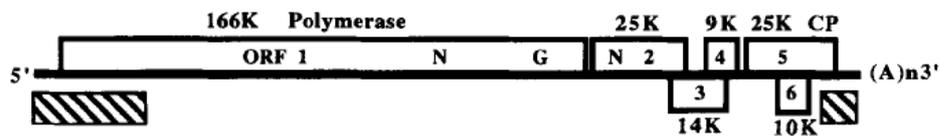


Figura 1 – Organização genômica do CsCMV baseada na sequência de nucleotídeo do RNA viral clonado. As ORFs 1, 2, 3, 4, e 5 estão representadas por caixas. O tamanho das proteínas está descrito tanto acima quanto abaixo das caixas (CALVERT et al., 1996).

Encontram-se na mandioca e na hospedeira herbácea *N. benthamiana* as inclusões nucleares típicas do *Potexvirus*, as quais podem ocorrer no citoplasma de todos os tecidos das folhas de mandioca infectados, com exceção para os “traqueídeos” e tubos crivados. Tais inclusões consistem em massas fibrosas que contêm partículas filamentosas de comprimento indeterminado (10-15 nm de diâmetro), são variáveis em tamanho (geralmente, alongadas de até 15-20 µm de comprimento e 3-5 µm de largura), dispõem-se relativamente em paralelo, embora sua distribuição não seja definida, e são mais frequentes em áreas de folhas amarelas. As principais mudanças ocorridas nos componentes celulares não foram associadas à infecção do vírus, exceto a acumulação anormal do amido nos cloroplastos (KITAJIMA; COSTA, 1966).

- **Sintomas causados pelo CsCMV**

Os sintomas causados pelo CsCMV aparecem nas folhas jovens ou de meia idade na forma de áreas verde-claro entremeadas com áreas verde-escuro normais (mosaico) (Figura 2). A infecção pode causar o aparecimento de plantas nanicas com possíveis deformações nos bordos das folhas, especialmente nas folhas novas (MASSOLA; BEDENDO, 1998). Em alguns casos, observa-se que, quando as folhas vão se desenvolvendo, os sintomas desaparecem por completo, especialmente quando as condições ambientais se tornam adversas para o desenvolvimento da doença (CALVERT; THRESH, 2002). Isso significa que os sintomas são mais severos durante períodos relativamente frios, nos quais as plantas afetadas podem ficar atrofiadas, ter seu desenvolvimento interrompido e provocar perdas na produção de até 60% (COSTA; KITAJIMA, 1972).



Figura 2 – Folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) apresentando os sintomas de mosaico causado pelo CsCMV.

- **Disseminação do CsCMV**

A disseminação do CsCMV ocorre por meio de práticas culturais como procedimentos de poda, transmissão mecânica por machados e outros implementos usados para preparar as estacas e, principalmente, através do plantio

de materiais de propagação infectados. Embora este modo de transmissão seja ineficiente, ele é o único conhecido para propagação planta-a-planta. Assim, torna-se necessário a obtenção de manivas a partir de material isento de vírus para não comprometer o cultivo e a produção da mandioca (COLARICCIO et al., 2009). Não há insetos vetores conhecidos para a disseminação desse vírus, bem como não há relatos de transmissão por sementes (COSTA; KITAJIMA, 1972).

- **Controle do CsCMV**

Ao considerar que a disseminação do mosaico comum da mandioca (CsCMV) só se dá por meio de material de plantio infectado e por instrumentos contaminados, os métodos de controle recomendados baseiam-se na utilização de material de plantio originário de culturas saudias e na desinfecção, em intervalos regulares, de facões ou outras ferramentas usadas no preparo de manivas (LORENZI; DIAS, 1993).

A eliminação de plantas que apresentam os sintomas de CsCMV proporciona um controle adequado e a melhor época para esse procedimento é quando os sintomas aparecem nas primeiras folhas. No entanto, caso as plantas não sejam eliminadas nesta época, elas devem ser marcadas e suas estacas queimadas logo após a colheita das raízes tuberosas. Os cuidados na seleção do material de plantio também podem erradicar ou reduzir a doença a um nível de significância econômica secundária (CALVERT; THRESH, 2002). E segundo Soares et al. (2009), o cultivo de material resistente ou tolerante ao vírus do mosaico comum da mandioca evita a manifestação da doença e por consequência perdas acentuadas na produção.

Assim, devido à dificuldade de erradicação dos vírus, a técnica de cultura de tecidos com meristemas ou ápices, combinada ou não com a termoterapia e ou com a utilização de antivirais são ferramentas que podem ser empregadas para realizar a limpeza clonal produzindo plantas livres de vírus.

2.2 Métodos empregados na limpeza clonal

2.2.1 Cultura de tecidos

Dentre as diversas técnicas utilizadas na biotecnologia, a cultura de tecidos de plantas está desempenhando um importante papel para o setor agrícola produtivo, gerando protocolos que promovem o surgimento de plantas mais uniformes, produtivas e livres de toda a classe de patógenos (BARRUETO CID et al., 2007).

A cultura de tecidos é uma técnica na qual pequenos fragmentos de tecido vegetal vivo (folha, raiz, caule, meristema), chamado explante, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado, com o objetivo de obter uma nova planta idêntica a original, ou seja, realizar uma clonagem vegetal, mantendo o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES et al., 2000). Ela se baseia na teoria da totipotência, na qual os seres vivos têm a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à matriz doadora, a partir de células únicas (ALVES et al., 2008).

A técnica da cultura de tecidos teve seus primeiros estudos por volta de 1902 no século XX, através dos estudos do botânico G. Haberlandt, o qual, em seus experimentos, isolou células e, com alterações em sua nutrição e condições ambientais, refez todas as etapas de crescimento, desenvolvimento e diferenciação, assim como ocorre em uma planta intacta na natureza (FILHO; KITAJIMA, 1995).

Esta técnica é uma das ferramentas utilizadas para desenvolver pesquisas ligadas à fisiologia da planta, à bioquímica, à genética, entre outras, além de desenvolver protocolos de micropropagação de plantas elites, de grande importância econômica para o agronegócio, visando à produção de alimentos, fibras e energia (ex.cana/álcool) (SINCLAIR; GARDNER, 1998). De acordo com Ferreira, Caldas e Pereira (1998) ela também pode ser empregada para a multiplicação de espécies de difícil propagação (como algumas espécies nativas

do Cerrado) e para a limpeza clonal de culturas (como o abacaxi, o morango, o citrus, a batata, a mandioca e outros), produzindo mudas livres de vírus. Logo, atualmente, a cultura de meristemas sendo utilizada para a propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma e transformação (TORRES; TEIXEIRA; POZZER, 1998).

Segundo Walkey (1985), a maior parte dos meios de cultura utilizados para a realização da técnica de cultura de tecidos no momento é baseado no meio Murashige e Skoog's (1962), o qual tem sido utilizado de forma bem sucedida para cultivar uma ampla gama de espécies de plantas. O meio de cultura é constituído por sais minerais (micro e macronutrientes), por nitrogênio reduzido, por uma fonte de carbono, por vitaminas e por fitorreguladores de crescimento, necessários para manter a divisão celular e a proliferação dos explantes. A combinação adequada entre esses componentes, associada às demais condições de cultivo, como a luz (intensidade, qualidade e fotoperíodo) e a temperatura, são essenciais para obter o sucesso dessa técnica (ANDRADE, 2002).

Os fitorreguladores de crescimento são de extrema importância para o cultivo de meristemas ou de ápices caulinares. Entre as citocininas, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem proporcionado os melhores resultados, induzindo a formação de grandes números de brotos e alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação. As auxinas e giberelinas são utilizadas com menor frequência e em menores concentrações do que as citocininas. O ácido 3-indolacético (AIA) é a auxina mais recomendada para o cultivo de meristemas, enquanto que o ácido giberélico (GA3) (giberelina) favorece o alongamento da parte aérea e também é capaz de reduzir a percentagem de explantes necrosados (ALBUQUERQUE et al., 2000).

De acordo com Sant'Ana, Freire, Dias (2001), plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em um ou mais caracteres e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes, fenômeno este denominado de variação somaclonal. Diversos fatores, de natureza bastante distintas, podem induzir essa variação, entre eles estão, a composição química do meio de cultura e suas

condições físicas (sólida ou líquida) que podem afetar o comportamento dos organismos desenvolvidos nestes meios, os fitoreguladores de crescimento, que podem provocando um crescimento desordenado das estruturas celulares, com conseqüente surgimento de células com anomalias. A porcentagem de variação somaclonal aumenta com o número de subcultivos e, portanto, deve ser limitado o número de subcultivos para obtenção de mudas de alta qualidade genética (SANTOS; RODRIGUES, 2004). Segundo Mabanza et al. (1995), o vigor das plantas de mandioca livres de doenças tem sido preservado por mais de quatro ciclos da cultura, sem a ocorrência de variações somaclonais indesejáveis para a variedade, que podem levar a modificações no genótipo destas.

A utilização da cultura de tecidos para erradicar vírus de plantas teve início em 1934 com White quando ele observou que os subcultivos de segmentos de raízes de plantas infectadas por vírus levavam à sua eliminação e que a gema apical de crescimento também se encontrava livre de vírus (GUERRA; NODARI, 2006). Na década de 40, Morel e Martin Lo, ao cultivarem meristemas apicais de plantas infectadas, obtiveram sucesso na erradicação de vírus em plantas de Dálias e de Batata (WALKEY, 1985).

Murashige e seus colaboradores foram os primeiros a utilizar a técnica da cultura de tecidos em suspensão, a partir de protoplastos, para estudar as viroses. Este sistema proporciona a sincronização da multiplicação viral para estudar a produção de ácidos nucléicos virais e proteínas. Isso fez com que esta técnica se tornasse uma ferramenta muito utilizada nos estudos da biologia de vírus.

A limpeza de plantas infectadas por vírus pode ser realizada através de duas das diversas técnicas da cultura de tecidos – o cultivo de meristemas apicais de plantas e a posterior micropropagação. De acordo com Souza et al. (1995), estas técnicas são essenciais para elevar a produtividade em regiões infectadas por viroses e bacterioses e prevenir a disseminação de pragas e doenças de uma geração para outra, disponibilizando uma grande quantidade de mudas sadias em um curto espaço de tempo e assegurando estabilidade genética.

Um fator muito importante para a obtenção de tecidos livres de vírus está relacionado ao tamanho do explante meristemático retirado, podendo variar entre

0,1 a 1mm, ou seja, quanto menor o explante retirado, maior a chance de se obter sucesso na limpeza clonal, porém, maior é a dificuldade de sua regeneração (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em geral, explantes constituídos pelo meristema apical, terminal ou axilar, com um ou dois primórdios foliares e ápices caulinares (meristema apical com um ou dois pares de folhas e de tamanho que pode variar de 0,3 a 20 mm), são os recomendados (GUERRA; NODARI, 2006).

2.2.1.1 Mecanismos de erradicação de vírus por cultura de meristemas

Diversos estudos estão sendo desenvolvidos para buscar as respostas que explicam como a técnica da cultura de meristemas pode produzir plantas livre de vírus. Segundo Guerra e Nodari (2006), a concentração viral nas plantas infectadas não é uniforme, sendo maior nos tecidos maduros e menor nos tecidos meristemáticos. Na primavera, com o crescimento intenso das plantas, os meristemas ficam rapidamente alongados e a concentração viral é reduzida.

Grattapaglia e Machado (1990) acreditam que, na cultura de meristemas, a maior atividade de síntese protéica no tecido meristemático desfavorece a multiplicação do patógeno e a incipiente ligação vascular do meristema com o restante dos tecidos, proporcionando, assim, uma menor distribuição das partículas do patógeno. Albuquerque et al. (2000) enfatiza também que as células meristemáticas, por ainda serem indiferenciadas, apresentam grande capacidade de se regenerar em quaisquer tipos de células de uma planta, desde que devidamente estimuladas.

Algumas hipóteses para explicar a baixa concentração ou a ausência de vírus nos tecidos meristemáticos são descritas por Guerra e Nodari (2006). Fatores como a ausência de tecido vascular (xilema e floema) na região do meristema apical, a presença nesta região de pequenas dimensões das conexões plasmodesmáticas que dificultam a passagem do vírus de célula a célula, bem como o ritmo ativo de divisões celulares também podem explicar isto. Porém, a hipótese mais aceita se refere ao efeito da desorganização celular, no qual a interrupção da organização normal dos tecidos meristemáticos pode ocasionar

uma inibição da multiplicação do vírus pela não disponibilidade de enzimas-chaves. Isto foi confirmado em trabalhos realizados com calos, nos quais foram encontradas baixas concentrações virais em calos friáveis de tabaco quando comparado com calos compactados e com maiores níveis de organização (GUERRA; NODARI, 2006).

Assim, a inexistência de vírus nos meristemas apicais pode ser atribuída aos seguintes aspectos: como o domo apical se localiza a certa distância das terminações vasculares, as partículas virais precisam passar de célula a célula até chegar nele. Neste local, quando as células meristemáticas estão em divisão ativa, o RNA do vírus não consegue penetrar no genoma destas células, pois podem existir sistemas químicos de inativação. Além disso, as altas concentrações de auxina nos meristemas caulinares também poderiam ser responsáveis pela ausência de vírus e, devido ao crescimento contínuo das células meristemáticas com divisão celular intensa, a competição por metabolitos aumenta, desfavorecendo a multiplicação do vírus (GUERRA; NODARI, 2006).

2.2.1.2 Aplicação da cultura de meristemas na eliminação de vírus

Como apontam Duval, Caldas e Resende (1998), várias viroses têm sido eliminadas, com grande sucesso, de plantas propagadas vegetativamente através da técnica da cultura de meristemas apicais. Essa técnica, além de produzir plantas isentas de vírus, também proporciona às plantas propagadas assexualmente um crescimento mais vigoroso do que as plantas obtidas através da seleção visual no campo (GUO; LIU, 1994).

Na cultura da mandioca, diversos pesquisadores utilizaram a técnica da cultura de meristemas com a finalidade de erradicar viroses de materiais que são utilizados para a propagação vegetativa. Dentre eles, Adejare e Coutts (1981) utilizaram tal técnica em clones de mandioca Indianos e Nigerianos para a erradicação do vírus do mosaico Africano da mandioca (*African cassava mosaic virus*, ACMV) e do vírus mosaico Indiano da mandioca (*Indian cassava mosaic virus*, ICMV), obtendo respectivamente 80 e 60% de clones livres de vírus.

Kartha e Gamborg (1975) também utilizaram esta mesma técnica que foi, igualmente, eficiente em eliminar o vírus do mosaico da mandioca. Além dos já citados, Palazzo et al. (2006), obteve com a técnica 16,6 a 50% de plantas livres do vírus do mosaico comum da mandioca (*Cassava common mosaic virus*, CsCMV) nas variedades Fibra, IAC 13, IAC 90 e Olho Junto, com exceção da variedade Ouro Vale que não apresentou plantas isentas desse vírus.

Para diversas culturas, o cultivo *in vitro* de meristemas apicais também tem sido empregado de modo bem sucedido. Torres, Teixeira e Moita (1996), ao avaliarem a eficiência de recuperação de plantas de batata-doce livres de vírus, utilizando explantes constituídos do meristema apical com um primórdio foliar, obtiveram uma porcentagem de explantes sobreviventes variável entre 40% a 80% de plantas livres de vírus para as variedades testadas (Brazlândia Roxa, Princesa, Jewel, White Star e genótipo 156). Assim, foram obtidos materiais de alta qualidade sanitária, resultando em uma maior produtividade em relação às plantas infectadas. Já para a cultura do alho, Yuri et al. (2004) também obteve plantas livres de vírus.

Apesar da técnica da cultura de meristemas possibilitar a obtenção de clones sadios, não é totalmente eficaz na eliminação do vírus, sendo indispensável o emprego de um teste complementar de indexação para identificar as plantas matrizes sadias, pois as plantas propagadas *in vitro*, mesmo sem sintomas visíveis, podem estar infectadas por vírus (PALAZZO et al., 2006).

2.2.2 A termoterapia

A termoterapia é uma maneira efetiva e ecológica de erradicar patógenos de material propagativo e consiste na exposição da planta ou parte dela a uma temperatura elevada por um período determinado e, posteriormente, no cultivo de ápice caulinar ou meristema, aumentando, assim, as chances de se obter explantes livres de vírus. Altas temperaturas podem reduzir a movimentação das partículas virais, inativar ou inibir a multiplicação do vírus (KASSANIS, 1957).

O tratamento térmico se dá a partir da utilização da planta infectada, ou de seu órgão, a qual cresce sob ar quente em uma cabine ou câmara de temperatura controlada a 30 ou 40°C por períodos de seis a doze semanas, variando de espécie para espécie. Alguns estudos mostram que períodos de tratamento pré-condicionados em temperaturas entre 27 e 35°C antes do tratamento térmico propriamente dito (30 ou 40°C) podem aumentar a capacidade de sobrevivência da planta e que períodos de alternância diurna a temperaturas altas e baixas, como uma alternativa para o contínuo tratamento com alta temperatura podem ser vantajosos (WALKEY, 1985).

As variações de temperatura causam alterações nas plantas, principalmente, nas interações vírus-planta-hospedeira, sendo impossível generalizar o efeito da temperatura nesses diferentes sistemas (KASSANIS, 1957).

Esta técnica pode erradicar vírus de um órgão inteiro de uma planta, como em tubérculos de batata, manivas de mandioca, entre outros. Porém, não se pode deixar de considerar que é impossível erradicar vírus de uma planta sem danificá-la severamente ou até mesmo levá-la à morte. Assim, é necessário conhecer quais as temperaturas que determinados órgãos vegetais conseguem suportar sem a ocorrência de danos em seus tecidos. Para a inativação de vírus nos vegetais, folhas e brotações novas podem, por exemplo, ser expostas a temperaturas mais elevadas quando comparadas às raízes e à base do talo (WALKEY, 1985).

2.2.2.1 Mecanismos envolvidos na erradicação de vírus por alta temperatura

Dentro de uma planta infectada, a síntese e a degradação das partículas virais ocorrem em conjunto e, em elevadas temperaturas, ocorre a suspensão da síntese viral, embora sua degradação continue (WALKEY, 1985).

Várias hipóteses buscam explicar o efeito do tratamento térmico (termoterapia) sobre a inativação de vírus. Algumas delas afirmam que este tratamento inibe a multiplicação viral, enquanto outras acreditam que a

movimentação das partículas virais na planta infectada seja reduzida. Porém, hoje em dia, há um grande consenso de que a termoterapia não inativa o vírus, mas impede que ele infeccione brotações novas desenvolvidas durante o tratamento (BOARI, 2008).

Segundo Walkey (1985), quando uma planta infectada é submetida ao tratamento com temperaturas entre 30 a 40°C, a replicação das partículas virais é suspensa e as brotações novas que continuam crescendo ficarão livres do vírus que ainda está presente nas partes mais velhas da planta. Para erradicar o vírus de um órgão completo, tal como um tubérculo da batata, é necessário um período maior de tratamento com altas temperaturas, pois, nesta situação, a replicação do vírus não deve ser somente paralisada, como também deve ser proporcionado um tempo maior para que os vírus existentes degradem. O método para esta degradação é desconhecido, mas, presumivelmente, o vírus é destruído e utilizado pela célula durante seu processo metabólico normal.

As altas temperaturas, além de suspender a síntese do vírus, também inativam um fator de resistência na planta hospedeira. Se esta inativação for incompleta após o tratamento térmico e a planta ou os tecidos forem transferidos de uma temperatura restritiva para uma temperatura não restritiva na replicação do vírus, um ressurgimento rápido na concentração viral pode ser esperado devido à remoção da influência contida no fator de resistência do hospedeiro (WALKEY, 1985).

2.2.2.2 Aplicações da termoterapia na eliminação de vírus

Segundo Adejare e Coutts (1981), Chant foi o pioneiro na utilização de estacas com brotos de plantas de mandioca Nigerianas, as quais foram tratadas com termoterapia para a produção de brotos livres da doença do mosaico da mandioca (ACMV). Ele sugeriu que o tratamento com altas temperaturas pode ser usado para “curar” a mandioca do deste vírus.

Experimentos com o vírus do mosaico comum da mandioca (CsCMV) mostraram que os tratamentos com 16 a 18 dias de temperatura a 32°C ou 5 dias

de tratamento a 40°C foram necessários para a redução da concentração viral nos tecidos infectados que não foram detectados por análise da seiva. A temperatura de 32°C foi crítica para a erradicação do CsCMV, pois as temperaturas de incubação dos tecidos entre 25 a 28°C provocou uma redução na concentração viral, porém sem erradicação do vírus. Estudos que utilizaram tecidos de *N. rústica* infectada com CsCMV mostraram que o tratamento diurno de 40°C (8 horas) mais 28°C (16 horas), o de 40°C (16 horas) mais 22°C (8 horas) ou o de 36° (20 horas) mais 22°C (4 horas) foram preferíveis para a sobrevivência do hospedeiro (WALKEY, 1985).

2.2.3 Combinação termoterapia versus cultura de tecidos

Desde 1950, quando Kassanis usou primeiramente um tratamento com alta temperatura para erradicar o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll vírus*, PLRV) dos tubérculos da batata, as técnicas envolvendo termoterapia, cultura de tecido ou uma combinação de ambos foram desenvolvidas e usadas de forma bem sucedida para erradicar vírus dos tecidos de planta infectados (WALKEY, 1985).

Conforme Duval, Caldas e Resende (1998), as viroses presentes em plantas propagadas vegetativamente têm sido eliminadas com grande sucesso através do cultivo de meristemas, técnica que se torna mais eficiente quando associada à termoterapia. Boari (2008) também enfatiza que a adoção das técnicas de cultura de tecidos e da termoterapia pode, em combinação, possibilitar a obtenção de plantas sadias a partir de uma planta infectada por vírus.

Na cultura mandioca, Palazzo et al. (2006) utilizou o cultivo de meristemas associado à termoterapia para obter clones de mandioca das variedades Fécula Branca, Ouro do Vale, Espeto, IAC 12, IAC 14 e IAC 15 livres do vírus CsCMV. Os resultados obtidos mostraram que a combinação destas duas técnicas foi suficiente para a obtenção de plântulas de mandioca isentas de CsCMV, com exceção da variedade Ouro do Vale, da qual não se obteve

qualquer plântula sadia. Do total de 61 clones de mandioca, 37 permaneceram livres de CsCMV, ou seja, uma eficiência de aproximadamente 60% na eliminação do vírus.

Kartha e Gamborg (1975), ao aplicar em plantas de mandioca o tratamento térmico com subsequente cultivo de meristema apical, obtiveram clones de mandioca completamente livres do vírus do mosaico Africano da mandioca (*African Cassava Mosaic Virus*, ACMV).

2.2.4 Quimioterapia – uso de um antiviral

Diversos pesquisadores têm buscado métodos eficazes para a eliminação de diferentes vírus de plantas, principalmente aquelas propagadas vegetativamente. Dessa forma, diferentes compostos denominados antivirais (como a *acycloguanosine* (*Acicloguanosina*; *aciclovir*), a *azidothymidine* (*Azidotimidin*; *zidovudina*), o *2,4-dioxohexahydro-1, a 2,5-triazina* (*DHT*), a *ribavirina* (*Virazole*) e a *2-Tiouracila*, entre outros) estão sendo utilizados na busca por cultivares de plantas livres de vírus a partir de materiais infectados (SANJEEV et al., 2007).

No presente trabalho, fez-se o uso da ribavirina, que é um composto químico, antiviral utilizado como uma forma sintética de alfa-interferon (proteína produzida naturalmente pelo nosso organismo para incrementar nosso sistema imunológico e regular outras funções celulares) e que pertence ao grupo das drogas chamadas núcleo análogas, as quais podem ser eficazes na prevenção da multiplicação viral.

De acordo com Wikowski et al. (1975 apud Valdeira, 2001), a ribavirina (1- β -D-ribofuranosil-I, 2,4-triazole-3-carboxamida) é um ribonucleósido purínico sintético utilizado atualmente como um excelente fármaco para o tratamento de várias infecções virais e possui largo espectro de pequena toxicidade, raramente causando resistência em vírus de DNA e RNA. Pesquisadores descrevem diversas inibições de doenças viróticas humanas por ribavirina, como aquelas

causadas pelo vírus da herpes, da hepatite C, da febre hemorrágica e do West Nile. Além disso, a ribavirina também é utilizada no coquetel da AIDS.

Segundo Sidwell et al. (1972), este composto químico é análogo da guanosina, um composto antiviral de amplo espectro de ação, que interfere na rota biossintética da guanosina 5'-fosfato, interrompendo a síntese do RNA e de DNA nas células infectadas e inibindo a replicação viral nos tecidos infectados.

Acredita-se que a eficiência dos químicos antivirais como agentes inibidores da multiplicação do vírus esteja ligada à sua concentração, planta hospedeira, tipo de tecido que está sendo tratado e tipo de vírus. Porém, sua eficiência também depende do estágio de desenvolvimento do tecido em consideração (por exemplo, a ribavirina inibe a replicação do TMV nas células da folha do tabaco quando o tratamento foi começado logo após a inoculação). Os eventos bioquímicos que levam à erradicação do vírus por químicos ainda não são claramente compreendidos. A ribavirina pode ser ativa na forma *triphosphate*, a qual inibe o cap 5' dos RNAs virais (SANJEEV et al., 2007).

A eficiência da ribavirina na eliminação de vírus de plantas é muito bem documentada na literatura. Tem sido utilizada como um viricida para tentar erradicar diversos vírus de plantas como, *Cymbidium mosaic virus*, *Odontoglossum ringspot virus*, *Peanut mottle virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* e *Potato virus M, S, X e Y* (SANJEEV et al., 2007). Hansen e Lane (1985) indicam que o tratamento com ribavirina de brotos de cultura é um método simples e confiável para a eliminação do vírus da mancha clorótica da folha da macieira (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV).

Tratamentos com as concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL de ribavirina foram adicionadas a um meio de cultura MS líquido para testar a erradicação do vírus X da batata (*Potato virus X*, PVX) e do vírus S da batata (*Potato S virus*, PVS) utilizando brotos apicais. Desses tratamentos, foram obtidas 93 e 87% de plântulas de batata livres de PVX e PVS, respectivamente, na concentração de 10 µg/mL e todas as plântulas regeneradas do tratamento com 20 µg/mL estavam livres de ambas as viroses (KLEIN; LIVINGSTON, 1983).

Barbosa et al. (2007), utilizando a cultura de meristemas apicais em meio MS suplementado com ribavirina nas concentrações de 10, 15, 20, 25 e 30 mg/L, obteve de 97 a 100 % de eliminação do vírus do mosaico da cana-de-açúcar (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) nas concentrações de 20-25 mg/L respectivamente. Já nas concentrações de 10-15 mg/L, cerca de 60% de plântulas sadias foram obtidas, enquanto que em concentrações superiores a 25 mg/L, as plantas não se regeneraram.

A combinação das três técnicas (cultura de meristemas, termoterapia e quimioterapia; ribavirina) produziu 80% de plantas de amendoim da cultivar Florunner e 100% da cultivar Pronto livres do vírus do mosqueado do amendoim (PeMoV) (CHEN; SHERWOOD, 2008).

Para a cultura da banana, os tratamentos com ribavirina e ácido salicílico na concentração de 10 mg/L aumentaram a diferenciação no crescimento de meristemas propagados. Mas, obteve-se uma porcentagem reduzida de plantas livres de vírus. Por outro lado, 30 mg/L dos dois antivirais diminuíram o desenvolvimento de plântulas micropropagadas a partir de brotos e provocaram um efeito deletério na regeneração e crescimento dos brotos propagados e um aumento de 93 a 99% de plântulas livre vírus para os tratamentos com virazole e ácido salicílico respectivamente (HAZAA; EL-DOUGDOUG; EL-MAATY, 2006).

2.3 A detecção de vírus de plantas

O diagnóstico de uma doença é o primeiro passo para a definição de medidas de controle. Para algumas doenças, a causa pode ser determinada pelos sintomas, mas nem sempre isso é possível e, nesses casos, faz-se necessário recorrer a técnicas laboratoriais para atingir o diagnóstico correto (RODRIGUES, 2008).

A detecção de doenças causadas por vírus a campo é dependente do avaliador e da sua familiarização com os sintomas característicos desta virose, os quais podem ser confundidos com danos causados por ácaros, insetos (tripes e

“mosca-branca”), toxidez e deficiência de nutrientes (como zinco) (LOZANO et al., 1983). Assim, a utilização de testes diagnósticos evita erros associados à diagnose feita apenas pelos sintomas na planta e também permite indexar matrizes, promovendo a disponibilização de mudas livres de vírus. De acordo com Gallo e Crocomo (1995), a identificação correta dos vírus é importante para o estabelecimento de estratégias que visam o seu controle.

A indexação, ou seja, a avaliação da presença de viroses em uma planta, pode ser feita por meio de: observação visual dos sintomas em plantas suspeitas, um procedimento que pode levar a erros de interpretação, uma vez que os sintomas causados por viroses podem ser confundidos com os causados por outros fatores; inoculação mecânica ou enxertia das plantas indicadoras e observação dos sintomas apresentados; exame dos tecidos no microscópio ótico em busca de inclusões celulares; observação direta no microscópio eletrônico de amostras; análise de amostras por sorologia através do teste de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*); detecção de RNA de fita dupla (dsRNA); hibridização; e reação de polimerase em cadeia (*Polymerase chain reaction*, PCR) (GALLO; CROCOMO, 1995).

Os métodos sorológicos são, atualmente, as formas mais usadas na identificação e caracterização de vírus de plantas, por apresentarem maior sensibilidade na detecção das partículas virais e serem eficientes e rápidos, permitindo testar um grande número de amostras por vez (SHUKLA; WARD; BRUNT, 1994). A técnica de ELISA tem por base a reação antígeno-anticorpo associada às propriedades colorimétricas, a qual pode ser detectada em pequenas quantidades. As variações do ELISA diferem na sensibilidade e na capacidade de detectar as partículas virais sorologicamente relacionadas (KOENING; PAUL, 1982). O ELISA-indireto permite uma maior especificidade na identificação do fitovírus, possibilitando que estirpes de um mesmo vírus sejam detectadas (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Mas, para a realização destes testes, são necessários antissoros específicos para os vírus em questão. A maior limitação para o uso das técnicas sorológicas na diagnose de viroses vegetais reside na dificuldade de se dispor de

antissoros específicos para a grande quantidade de vírus que infectam os vegetais. Para as grandes culturas comerciais, de grande interesse econômico, como a cana-de-açúcar, antissoros (mono e policlonais) podem ser adquiridos comercialmente, embora sejam caros e, por vezes, apresentam baixa concentração de anticorpos. Já para culturas que não dispõem de grandes incentivos econômicos e sociais, não são produzidos antissoros para sua indexação. Desta forma, é aconselhável que os laboratórios que trabalham no campo da imunquímica preparem seus próprios antissoros e, para que esse empreendimento se torne viável, é preciso que eles se ocupem da preparação dos antígenos adequados à sua produção (CLAUSEN, 1988).

Para a produção de antissoro, é preciso realizar uma preparação viral purificada do vírus (anticorpo), que tem como objetivo eliminar todos os componentes vegetais e obter uma solução quimicamente pura do vírus, ou seja, uma solução na qual estão presentes apenas partículas virais (ZARBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Esta preparação é então, imunizada em coelhos e estes, por sua vez, produzem o antissoro contra os anticorpos. Esta purificação química é um processo complicado que exige equipamentos adequados, bem como pessoas capacitadas para manuseá-los, e envolve muitos estágios, os quais vão desde a multiplicação do vírus em casa de vegetação até diferentes tipos de tratamentos químicos e centrifugações diferenciais. Entretanto, deve-se considerar o fato de que os vírus podem ser perdidos durante o processo de purificação ou purificados em concentrações insuficientes para imunização do coelho. Mas, se forem produzidos os antissoros específicos, este método pode ser amplamente adotado para indexação de viroses em plantas (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIN, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos materiais propagativos de mandioca

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para a realização do trabalho, os materiais propagativos de mandioca (manivas) das principais variedades cultivadas na região de Paranaíba-PR (Olho Junto, Baianinha, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13, IAC 14 e “Pasquini” – variedade não definida), as quais foram coletadas em áreas de produção da região de Paranaíba-PR. Grande parte deste material se destinou à realização da limpeza clonal, com tratamento térmico inicial seguido do cultivo dos meristemas apicais. Uma pequena parte foi plantada em vasos com solo, areia e substrato Plantmax[®] na proporção 1:1:1, com 5 manivas de mandioca por vaso na vertical para otimizar espaço (Figura 3).



Figura 3 – Manivas de mandioca (*Manihot esculenta*) plantadas verticalmente em vasos para obtenção de folhas para uso nos ensaios sorológicos ELISA-indireto.

Estes vasos foram devidamente identificados e mantidos em casa de vegetação. Das brotações emitidas, foram retiradas folhas jovens, as quais foram, por sua vez, submetidas ao teste sorológico ELISA-indireto, sendo utilizado no teste um anti-soro para o CsCMV cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical. O material propagativo da variedade IAC 12 foi proveniente do Banco de Germoplasma da UEM, mantido na Fazenda Experimental de Iguatemi.

3.2 Transmissão mecânica experimental e propagação do vírus

As manivas e folhas de mandioca (BG 21) infectadas com o CsCMV foram fornecidas pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical e utilizadas como fonte de inóculo do vírus. Estas foram plantadas em vasos com solo, areia e substrato Plantimax[®], na proporção 1:1:1, e suas folhas foram utilizadas para a realização do teste de transmissão mecânica experimental.

Em casa de vegetação, plantas de *E. heterophylla*, *C. amaranticolor*, *D. stramonium* e *N. benthamiana*, relatadas como hospedeiras indicadoras de lesão local necrótica e sistêmica de vírus, foram inoculadas com o CsCMV.

O inóculo foi preparado utilizando folhas de mandioca com sintomas, as quais foram maceradas em tampão fosfato de sódio 0,02M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{SO}_3$), pH 7,0 na diluição 1:10 (p:v), com auxílio de um almofariz com pistilo para rompimento das células e liberação das partículas virais. As folhas das plantas indicadoras foram polvilhadas com carvão ativado em pó (Synth[®]) utilizado como abrasivo. Após a inoculação, as folhas foram lavadas com água para retirar o excesso de inóculo e abrasivo. As plantas inoculadas permaneceram em casa de vegetação até a manifestação dos sintomas e, após esse período, foram descartadas.

Para a propagação do vírus, plantas de *N. benthamiana*, no estágio de 3 a 5 folhas, foram inoculadas utilizando a mesma metodologia de inoculação descrita anteriormente.

3.3 Detecção do CsCMV através do teste de sorológico ELISA-indireto

Como controles positivos para os teste de ELISA foram utilizadas plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecanicamente com o CsCMV, e como controles negativos, plantas de *N. benthamiana* sadias.

Os testes foram realizados segundo a metodologia proposta por Clark e Adams (1977), mas com pequenas modificações segundo Almeida e Lima (2001). Folhas de mandioca foram maceradas em presença de tampão de cobertura (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃, 0,2 g de NaN₃, pH 9,8) na diluição 1: 10 (g/mL). Posteriormente, foi diluído em 1/20, 1/100, 1/500, 1/2500 e, então, aplicou-se 100 µL de cada amostra nos orifícios da placa, utilizando 4 repetições por amostra. A placa foi incubada a 4°C por 18 h dentro de um saco plástico com papel toalha umedecido e, após esse período, foram realizadas três lavagens sucessivas de três min. com PBS 1X-Tween (tampão PBS 10X – 80 g de NaCl, 2,0 g de KH₂PO₄, 11 g de NaHPO₄, 2,0 g de KCL, pH 7,4 – diluído para 1X, acrescido de 0,5 mL de Tween 20%). Em seguida, 100 µL do antissoro (IgG produzida em coelho), específico para o CsCMV, diluído a 1:1000 (antissoro da EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical) ou a 1:10.000 (antissoro produzido neste trabalho) PBS 1X, foi aplicado em cada pocinho. A placa foi novamente incubada, agora, a 37°C por 2 horas em câmara de germinação/crescimento (BOD) e, depois, lavada 3 vezes consecutivas. Então, 100 µL da Imunoglobulina G (anti-IgG, preparada em cabra - Sigma[®]), conjugada à enzima fosfatase alcalina diluída 1:9000 em tampão PBS 1X, foi aplicada a cada pocinho, promovendo, novamente, a incubação e lavagem. Logo após, a placa foi incubada mais uma vez a 37°C por 2 horas em câmara de germinação/crescimento (BOD) igualmente com 3 lavagens sucessivas. Decorrido esse tempo, 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (Agdia[®]), diluída em tampão substrato (97 mL de dietanolamina e 0,2 g de NaN₃, pH 9,8), foi aplicado nos orifícios (Figura 4). Por fim, a placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 min. e realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Microplate Reader – Model 3550UV/BIO-RAD[®]) com um comprimento de onda de 405 nm.

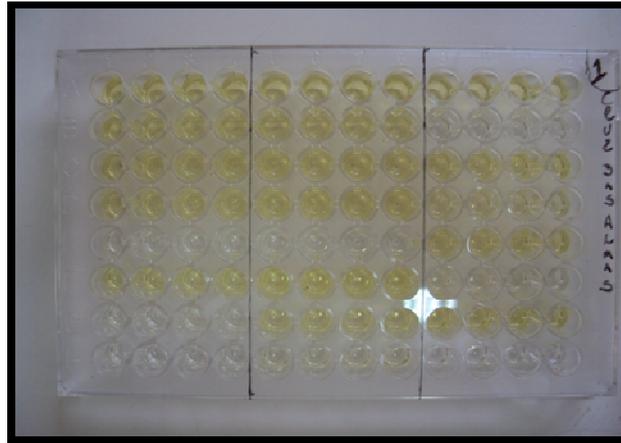


Figura 4 – Placa do teste ELISA-indireto após adição do substrato p-fosfato de nitrofenil, diluída em tampão substrato (dietanolamina e NaN_3), mostrando os orifícios com coloração amarela e indicando reação antígeno x anticorpo (teste positivo) para o CsCMV, em material coletado nas áreas de produção de Paranaíba-PR.

- **Interpretação dos resultados**

Um das dificuldades na realização do teste ELISA-indireto está no momento de decidir se os valores de absorvância obtidos são, realmente, diferentes daqueles obtidos com a amostra sadia (controle negativo). Para diagnosticar se as amostras estão infectadas ou sadias, os valores de Absorvância (405nm) superiores duas vezes a média dos controles negativos (amostras sadias) de cada placa foram considerados positivos (SUTULA et al., 1986).

3.4 Detecção do CsCMV através de RT-PCR

O método de síntese *in vitro* de um DNA complementar ao RNA viral (cDNA), conhecido como transcrição reversa (RT), seguido da amplificação deste cDNA por outra reação *in vitro* de polimerização em cadeia da enzima polimerase (PCR) deste cDNA, foi utilizado na síntese do cDNA complementar ao RNA do CsCMV, seguido de sua amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos (*primers*) específicos para *Potexvirus*. Este método serviu para confirmar a presença do CsCMV em amostras de mandioca colhidas em Paranaíba-PR.

3.4.1 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada combinando o protocolo do Kit RNeasy (Qiagen[®]) com o reagente Trizol (Invitrogen[®]) conforme os protocolos descritos pelos fabricantes. Cerca de 100 mg de tecido foliar de plantas de mandioca da variedade Baianinha colhidas no campo, e de *N. benthamiana* inoculadas com o CsCMV foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para microtubos de 2 mL com adição de 1 mL de Trizol[®]. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em vortex por 2 min. e, então, realizou-se uma centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. e transferiu-se a fase líquida superior para um novo tubo com 200 µL de clorofórmio. Uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 10 min. foi realizada e a fase aquosa superior foi transferida para outro tubo com adição de 200 µL de etanol 100%. As amostras foram adicionadas na coluna cor-de-rosa do Kit RNeasy, centrifugadas à 10.000 rpm por 20 seg. e, após, o líquido que efluiu da coluna foi descartado. Em seguida, 700 µL do reagente “RW1” do Kit RNeasy foram adicionados, centrifugando as amostras por mais 20 seg com posterior descarte do líquido que efluiu da coluna. Em seguida, foram adicionados 500 µL do reagente “RPE”, com centrifugação a 10.000 rpm por 15 seg. Novamente, o líquido efluente foi descartado e mais 500 µL do reagente “RPE” foram adicionados com centrifugação a 8.000 rpm por 2 min.. O RNA total foi recolhido da coluna cor-de-rosa em um novo tubo com adição de 45 µL de água DEPC, e centrifugando-se a 8.000 rpm por 2 min.

3.4.2 Reação de transcrição-reversa (RT-PCR)

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total extraído das plantas de mandioca Baianinha e de *N. benthamiana* inoculadas com o CsCMV. Quatro microlitros da suspensão de RNA total foram misturados a 4 µL do oligonucleotideo iniciador Hexâmeros Randômicos (pd(N)6 – Invitrogen[®]). Foram também adicionados à mistura 2,0 µL de

dNTPmix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM e 3 µL de água DEPC. A mistura foi então mantida em termociclador a 65°C por 5 min. e, posteriormente, colocada em gelo. Após isso, foram adicionados 4 µL de tampão de reação 5X RT Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de ditioneitol (DTT 0,1 M) e 1 µL de água DEPC. A mistura permaneceu a 25°C por 2 min. e, então, adicionou-se 1 µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV-Invitrogen[®]). A solução obtida foi novamente incubada em termociclador, agora, por 10 min. a 25°C, e aquecida a 42°C por 50 min., segundo o protocolo descrito por GIBBS et al. (1998).

3.4.3 Reação de PCR (*Polymerase chain reaction*)

O cDNA produzido *in vitro* foi então utilizado na reação de PCR utilizando um conjunto de oligonucleotídeo para o gênero *Potexvirus*, o potex 1 (5'- CAY CAR CAR GCX AAR GAY SA 3' - nts 4086 - 4105) e o potex 2 (5'- TCD GTR TTD GCR TCR AAD GT -3' - nts 4812 - 4831), que codificam a proteína de replicação (ORF 1). Para a reação, foram misturados 5 µL do produto da reação de transcrição reversa (cDNA), 5 µL do tampão de reação 10 X PCR-Buffer (0,5 M Tris-HCL; 0,7 M KCL; 0,1 M MgCl₂ pH 8,0), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 2 µL dos oligonucleotídeos potex 1 e potex 2, e 2 µL de dNTPs (10 mM) e 1 µL da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen[®]) completando a reação com 30 µL de água DEPC. O programa utilizado no termociclador (Techne; modelo TC-512) para os ciclos de PCR foi de 94°C por 3 min. com 35 ciclos de 94°C por 1 min., 51,5°C por 1,5 min., 72°C por 1 min. e 72°C por 10 min. segundo o protocolo proposto por GIBBS et al., (1998). O produto de PCR foi adicionado em mini gel de agarose a 1,2%, preparado em tampão TAE 1X, corado em solução de Brometo de Etídeo e visualizado e fotografado sob luz ultravioleta, após corrida de eletroforese horizontal durante 45 min. a 85 volts, utilizando como marcador molecular o DNA ladder 100 pb. (Invitrogen[®]).

3.5 Purificação do CsCMV

A purificação do CsCMV foi realizada devido à necessidade de produzir um antissoro específico para este vírus, pois não mesmo não é comercializado, para a utilização dos mesmos no ELISA-indireto, indexação dos clones de mandioca produzidos por cultura de meristemas.

Os procedimentos de purificação foram baseados na metodologia descrita por Marys Izaguirre-Mayoral (1995) conforme modificações propostas por Velame e Filho (2001). Folhas de *N. benthamiana* inoculadas com o CsCMV foram utilizadas, e 2 purificações foram realizadas. Aproximadamente 100 g de folhas de *N. benthamiana*, coletadas 30 dias após a inoculação, foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas em tampão fosfato de sódio a 0,1 M, pH 7,6 (1:2 p/v), com posterior adição de 0,1 % de ácido tioglicólico ($C_2H_4O_2S$) e 0,1 M de dietilditiocarbonato de sódio (DIECA). O homogeneizado foi filtrado em gaze e clarificado com o mesmo volume de clorofórmio com agitação de 15 min.. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 8.000 rpm/10 min. e adicionado 4 % de PEG 6000 e 0,2 M de NaCl ao sobrenadante, sendo a preparação mantida sob agitação por 45 min. a 4°C. Uma nova centrifugação foi realizada, agora a 10.000 rpm/10 min., sendo o precipitado ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de sódio a 0,01M, pH 7,6 durante uma noite, sob agitação constante em câmara fria. No outro dia, foi realizada uma centrifugação a 8.000rpm/por 5 min. e a preparação obtida foi, então, aplicada em um gradiente de sacarose (10-40 %) e centrifugada a 110.000 rpm/90 min. (rotor SW 41Ti), utilizando nas centrifugações um ultracentrifuga (Beckman Optima LE 80K[®]) do laboratório de virologia da EMBRAPA-Soja. A banda formada foi coletada e concentrada por centrifugação a 134.000 rpm/90 min. e o sedimento (precipitado) ressuspensionado em 1 mL de tampão fosfato de sódio a 0,01 M, pH 7,5. A preparação purificada foi diluída a 1:10 (v/v) em tampão fosfato de sódio 0,01M e a concentração viral determinada em espectrofotômetro de luz ultravioleta (Genesys 10UV Scanning - Thermo Eletron Corporation[®]) com um comprimento de onda na faixa de 260 a 320 nm.

3.5.1 Produção do antissoro

3.5.1.1 Imunização do coelho

Na obtenção dos anticorpos policlonais para o CsCMV, foi utilizado para a imunização, uma fêmea de coelho da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 4 meses de idade. A preparação do purificado viral foi emulsificado com o adjuvante de Freund (1:1) (Sigma[®]) e a mistura resultante foi injetada de forma intramuscular na fêmea do coelho com intervalos semanais em 4 imunizações (Tabela 1). Após 26 dias da primeira injeção, foram iniciadas as sangrias, com coletas de sangue do coelho, cuja última seção foi realizada 46 dias após a primeira, totalizando 4. Conforme procedimento descrito por Meissner Filho (1996).

Tabela 1 – Datas e dosagens das imunizações no coelho

Inoculações	Datas	Dosagem
1 ^a	30/07/2009	50 µL do purificado viral + 450 µL de H ₂ O DEPC + 500 µL e adjuvante completo de Freund.
2 ^a	05/08/2009	70 µL do purificado viral + 430 µL de H ₂ O DEPC + 500 µL de adjuvante incompleto de Freund.
3 ^a	11/08/2009	70 µL do purificado viral + 430 µL de H ₂ O DEPC + 500 µL de adjuvante incompleto de Freund.
4 ^a	19/08/2009	50 µL do purificado viral + 450 µL de H ₂ O DEPC + 500 µL de adjuvante incompleto de Freund.

O procedimento se iniciou com a imobilização do animal (em jejum por 12 horas) com posterior raspagem de seu pêlo na região da veia marginal da orelha, aplicando uma pequena quantidade de xilol e deixando agir por 30 seg. Em seguida, o xilol foi removido com lavagem, a pele foi coberta com uma fina camada de vaselina e a veia foi cortada transversalmente para a coleta do sangue.

Segundo Almeida e Lima (2001), após a injeção do Ag, ocorrem reações no sistema imunológico do coelho, com a produção dos anticorpos (Ac). Na primeira reação, ou seja, na resposta primária, normalmente ocorre uma reação

fraca, deixando o animal “alerta” para as futuras injeções com Ag, e um período latente, antes que os anticorpos apareçam no sangue, é diagnosticado. Já na segunda injeção, a resposta imune é mais rápida, a concentração dos anticorpos é maior e, subseqüentemente, ocorre um declínio destes, constituindo a segunda resposta imune.

3.5.1.2 Coleta do sangue/sangrias

Após cada imunização, coletas de sangue/sangrias foram realizadas e os anticorpos separados do sangue do coelho, procedimento realizado para todas as coletas de sangue/sangrias realizadas. O volume de sangue coletado do coelho foi variável, sendo maior na 2^a sangria e menor na 4^a, e o total obtido foi de 85 mL (Tabela 2).

Tabela 2 – Data das coletas de sangue e volume obtido em mL

Data	Coletas de sangue (Sangrias)	Volume de sangue
25/08/2009	1 ^a	15 mL
01/09/2009	2 ^a	40 mL
09/09/2009	3 ^a	20 mL
15/09/2009	4 ^a	10 mL
Total	-	85 mL

3.5.1.3 Obtenção do antissoro

Após a coleta de sangue do coelho, os glóbulos vermelhos foram removidos, coletando-se apenas o líquido de coloração amarela-palha, o soro, contendo os anticorpos (antissoro) capazes de reconhecer o CsCMV como antígeno.

Para a separação do antissoro, as amostras de sangue coletados foram deixadas à temperatura ambiente até coagularem por cerca de 1-2 horas. Posteriormente o sangue foi colocado em um funil de vidro e deixado coar para

dentro de um tubo de centrífuga (para segurar o coágulo, colocou-se uma vareta de vidro entre este e o funil) sob refrigeração a 4°C durante uma noite. Na manhã seguinte, o soro obtido foi centrifugado a 10000 rpm durante 7 min. para a remoção das células sanguíneas. O sobrenadante foi guardado (antissoro) em tubos de microcentrífuga em doses de 1 mL por tubo e armazenados em congelador (-20°C) (BALL et al., 1990). Algumas dessas doses foram destinadas para o teste de ELISA-indireto e outras para posterior purificação da IgG.

O antissoro bruto foi testado em ELISA-indireto para a avaliação de sua reatividade e especificidade. Foram utilizadas 9 diluições (1/50, 1/300, 1/600, 1/800, 1/900, 1/1.600, 1/3.200, 1/5.000 e 1/10.000) para os antissoros obtidos nas 4 imunizações com 4 repetições cada. Os extratos aquosos das plantas de *N. benthamiana* sadia e inoculada com o CsCMV foram utilizadas, sendo realizadas 7 diluições dos extratos foliares (1/20, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200). As placas utilizadas neste teste foram lidas em espectrofotômetro a 405 nm e as amostras, cujas leituras fossem, pelo menos, duas vezes superior ao valor obtido para o controle sadio, foram consideradas positivas.

3.6 Determinação da massa molecular da proteína capsidial do CsCMV

Para determinar se as proteínas obtidas na purificação viral possuem massa molecular como esperado para vírus pertencentes ao gênero *Potexvirus*, foi então preparada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% contendo SDS.

As proteínas virais dos dois purificados foram diluídas em (extraídas utilizando) 100 µL de tampão TE 1 X (Tris 1,0 M, pH 7,4, EDTA 0,5 M, pH 8,0) para 10 µL de cada preparação purificada e as suspensões formadas foram misturadas com igual volume de tampão de dissociação (Tris 0,5 M, pH 6,8, SDS 3,8%, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 19%). As amostras foram incubadas em água fervente por 5 min. para ocorrer a dissociação completa das proteínas e centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min..

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de separação continha acrilamida 12,5%, água destilada, Tris 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,05% e TEMED (3,5 µL). Quanto ao gel de empilhamento, este continha acrilamida 4%, água destilada, Tris 1,0 M, pH 6,8, SDS 0,1%, APS 0,076% e TEMED (3,5 µL). Foi utilizado o tampão de corrida 10X composto por Tris 250 mM, glicina 2,5M, pH 8,3 e SDS 1%. Em cada canaleta do gel, foram aplicados 10 µL de cada amostra de purificado viral e, em duas canaletas, 10 µL de proteínas marcadoras com peso molecular na faixa de 10 a 160 kDa (BenchMark[™] Protein Ladder, Invitrogen[®]) foram adicionadas. A eletroforese foi realizada por 20 min. a 95 volts até a linha frontal do azul de bromofenol atingir o gel separador. Em seguida, a voltagem foi aumentada para 125 volts e a corrida foi interrompida quando as amostras chegaram na base do gel. Após a corrida, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue em ácido acético 0,1%, metanol e água deionizada na proporção 1:4:5 (v/v/v) durante 20 min. em temperatura ambiente com posterior descoloração em solução de ácido acético glacial, metanol e água deionizada na proporção 1:4:5 (v/v/v). O gel com as bandas formadas foi visualizado e fotografado sob luz ultravioleta.

3.7 Testes de dupla difusão em Agar

Os testes de dupla difusão em Agar foram realizados a partir de amostras de tecidos foliares de mandioca infectadas com o CsCMV e de folhas *N. benthamiana* sadia e inoculadas com o CsCMV. As folhas foram maceradas em presença de água destilada na proporção 1:2 (p/v) e filtradas em gaze dupla, obtendo extratos aquosos, no qual foi adicionado 1,0 mL de solução de SDS a 3%.

Para este teste, foi preparado o meio gel de ágar de Gooding e Bing (apud ALMEIDA; LIMA, 2001), que contém: 0,8% de Agar (Noble agar Difco); 0,5 % de SDS (dodecil sulfato de sódio – para dissolver a capa protéica de vírus alongados); e 1,0% de azida de sódio (NaN₃ – que contribui para elevar a força

iônica do meio e inibe o desenvolvimento de microrganismos), adicionada ao meio quando este estava a uma temperatura de aproximadamente 70 a 80°C. Após sua esterilização em autoclave durante 15 min. a 121°, o meio foi distribuído, sob condições assépticas e em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações microbianas, em placas de Petri (cerca de 13 mL por placa de 70 x 10 mm), previamente autoclavadas. Com o meio solidificado, 7 alvéolos (1 central e 6 periféricos, com distâncias de aproximadamente 4-5 mm do central) foram feitos em cada placa com auxílio de um furador de rolhas.

Foram distribuídos, nos orifícios periféricos do gel de ágar, alíquotas de 100 µL dos extratos vegetais, além de 100 µL da solução purificada de CsCMV. No orifício central, 100 µL do antissoro foram adicionados. As alíquotas foram colocadas nos orifícios lentamente para evitar extravasamento.

A placa foi observada 24 horas após a adição das alíquotas e as faixas de precipitação formadas foram fotografadas utilizando uma caixa com luz difusa, em sala escura.

3.8 Purificação da imunoglobulina G (IgG)

A purificação da IgG proporciona uma maior sensibilidade ao teste de Elisa, além de aumentar o rendimento do antissoro produzido. Para isso, foram utilizados os antissoros produzidos nas 4 imunizações, com o protocolo de precipitação de IgG por sulfato de amônio, descrito abaixo.

O antissoro produzido foi diluído em 10 mL de água destilada na proporção 1:10, seguido da adição, lenta e com agitação, do mesmo volume de uma solução saturada de sulfato de amônio. Deixou-se a amostra em repouso em temperatura ambiente por 1 hora com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. O precipitado (pellet) formado foi recolhido, diluído em PBS ½ no mesmo volume da amostra inicial e dializado durante 24 horas em geladeira por 3 vezes em 500 mL de ½ × PBS a 4°C (o tubo de diálise em água com 0,01M EDTA foi fervido, antecipadamente, e lavado com água destilada). A IgG purificada foi, por fim, armazenada a -20°C em tubos eppendorf.

3.9 Limpeza clonal de variedades de mandioca cultivadas no noroeste do Paraná

A limpeza clonal, utilizando a técnica da cultura de meristemas apicais, para produção de mudas de mandioca livres do CsCMV foi baseada na metodologia proposta por Roca et al. (1991 apud SOUZA et al., 2008) na Circular Técnica nº 88, intitulada “Micropropagação da Mandioca mediante Ápices Caulinares e Segmentos Nodais”, da EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, com pequenas modificações. A metodologia para o tratamento térmico, designado como termoterapia, foi baseada em diversos autores como, Palazzo et al. (2006), Chen e Sherwood (2008), Conci e Nome (1991), Mervat, Far e Ashoub (2009), dentre outros.

3.9.1 Termoterapia

As manivas de mandioca das variedades Olho Junto, Baianinha, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13, IAC 14, algumas da IAC 12, e "Pasquini" foram cortadas em aproximadamente 20 cm de comprimento com auxílio de uma serra manual (Figura 5A) e tiveram suas extremidades vedadas com parafina líquida para evitar desidratação e entrada de microrganismos (Figura 5B).

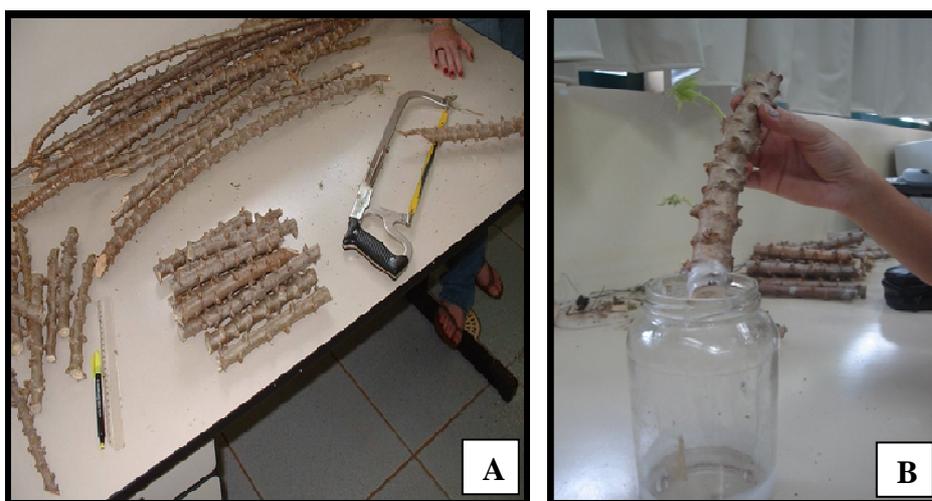


Figura 5 – Corte das manivas de mandioca (*Manihot esculenta*) com auxílio de uma serra manual (A); extremidade da maniva de mandioca sendo emergida em parafina líquida (B).

Em seguida, essas manivas foram incubadas em câmara de germinação/crescimento (BOD) por 30 dias com fotoperíodo de 16 h de luz a 38°C e 8 h de escuro a 26°C. (Figuras 6A). Das manivas brotadas, brotos foram retirados para a realização da cultura de meristemas (Figura 6B).

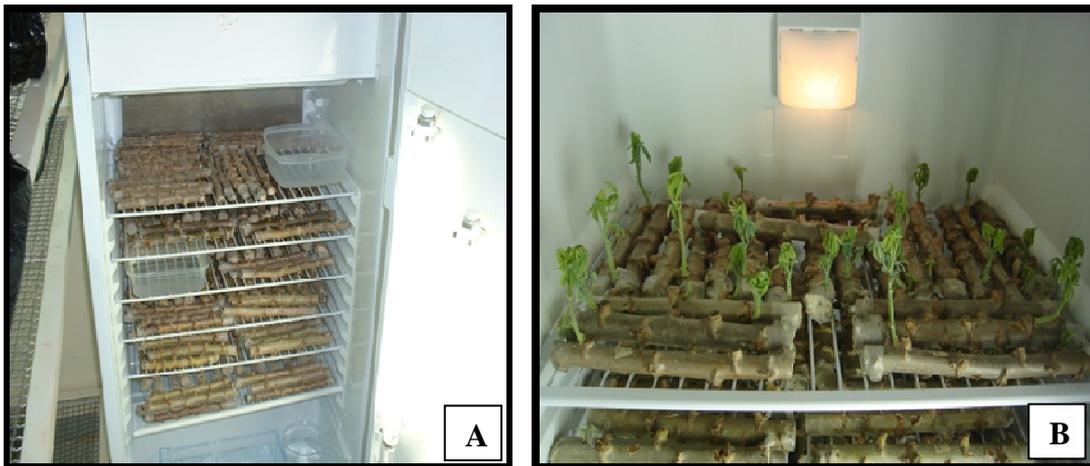


Figura 6 – Manivas de mandioca (*Manihot esculenta*) em câmara de crescimento/germinação (BOD) com fotoperíodo controlado (A); manivas com brotos prontos para extração de seus meristemas apicais (B).

Para testar se a técnica da termoterapia pode produzir plantas livres de vírus, os brotos das variedades Olho Junto, IAC 12 e "Pasquini" mais vistosos, saudáveis e bem desenvolvidos, foram adicionados em meio de cultura MS, que será descrito na subseção 3.9.2.

3.9.2 Cultura de meristemas

Os brotos retirados das manivas foram levados até a câmara de fluxo laminar, previamente limpa e sob condições assépticas, para a realização do processo de desinfestação. Estes foram colocados em uma “bolsa” feita de gaze e submergidos em soluções de detergente Tween[®] por 30 seg., álcool etílico 50% por 2 min., Tebuconazole a 25% por 5 min. e hipoclorito de Cálcio 0,25% por 10

min., seguido por três lavagens com água destilada estéril (aproximadamente durante 5 seg. cada). As brotações devidamente desinfetadas foram mantidas em béquers com uma pequena lâmina de água para evitar a desidratação. Em seguida, os meristemas apicais (tamanho 0,5 a 1 mm) foram extraídos em câmara de fluxo laminar, com auxílio de lupa óptica, pinça e bisturi previamente autoclavados, e colocados em meio de cultivo.

Os meristemas foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo macronutrientes, micronutrientes e vitaminas, com adição de 20g de sacarose e 7 g/L de Agar, cujo pH foi ajustado para 5,7-5,8 (Tabela 3). Posteriormente, o meio foi autoclavado a uma temperatura de 121°C com pressão de 1,05 kg/cm² durante 20 min..

Tabela 3 – Meio de cultura MS (Murashige e Skoog) utilizado nas fases de estabelecimento e multiplicação/enraizamento para o cultivo de meristemas apicais *in vitro* de variedades de mandioca, seguindo a metodologia empregada pelo Circular Técnico n° 88 (EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical) com modificações

Componentes	Meios de cultura (mg/L)	
	MS1 Estabelecimento	MS2 Multiplicação/Enraizamento
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	1650	1650
Nitrato de Potássio (KNO ₃)	1900	1900
Sulfato de Magnésio Anidro (MgSO ₄)	370	370
Cloreto de Cálcio Anidro (CaCl ₂)	440	440
Fosfato Monobásico de Potássio(KH ₂ PO ₄)	170	170
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,8	27,8
EDTA (Na ₂ EDTA)	37,3	37,3
Iodeto de Potássio (KI)	0,83	0,83
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	6,2	6,2
Sulfato de Manganês (MnSO ₄ .H ₂ O)	22,3	22,3
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	8,6	8,6
Molibdato Ácido de Sódio ((Na ₂ MoO ₄)2H ₂ O)	0,25	0,25
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,025	0,025
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,025	0,025
Tiamina-HCL	1	1
Inositol	100	100
ANA	0,02	0,01
BAP	0,04	0,01
GA3	0,05	0,01
Sacarose (g)	20	20
Ágar (g)	8	8

O primeiro meio de cultivo a ser utilizado foi o de estabelecimento MS1 (Tabela 3), suplementado com 1 mg/L de tiamina, 100 mg/L de inositol, 0,02 mg L/L de ANA (ácido naftaleno acético), 0,04 mg L/L de BAP (benzilaminopurina) e 0,05 mg/L de GA₃ (ácido giberélico), sendo que o último foi esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,22 UM de diâmetro (MillexTM) e adicionado ao meio após a autoclavagem do mesmo.

Os meristemas apicais foram cultivados em tubos de ensaio de diâmetro de 14 mm e altura de 100 mm, com cerca de 15 mL de meio, armazenados em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 horas de luz com uma intensidade luminosa de 1.600 lux e em seguida submetidos a 8 horas de escuro. Cobriu-se os tubos de ensaio com 3 camadas de gaze durante os primeiros 10 dias para estabelecimento do material e para a redução da luminosidade, permitindo, assim, um melhor desenvolvimento dos explantes. Após 30 dias ou após atingirem cerca de 1 cm de comprimento, os explantes foram cultivados no meio de multiplicação e enraizamento (MS2) com reduzida concentração dos hormônios ANA, BAP e GA₃, nas mesmas condições de cultura descritas anteriormente (Tabela 3).

Foram contabilizados o número de meristemas apicais extraídos, o número de explantes mortos e contaminados por fungos e bactérias, e o número de plântulas desenvolvidas *in vitro* das variedades de mandioca e do material "Pasquini".

Como a variedade Olho Junto foi a que apresentou melhor adaptabilidade, com crescimento satisfatório e um ótimo desenvolvimento *in vitro*, avaliações foram realizadas do 1° ao 70° dia após a retirada dos meristemas apicais, com intervalos de 10 dias, totalizando 8 avaliações. Os seguintes itens foram avaliados: número total de meristemas apicais sobreviventes; porcentagem de plântulas desenvolvidas; porcentagem de explantes contaminações por fungos e bactérias; número de plântulas que apresentaram folhas, raízes, calos, bem como o número de materiais mortos; comprimento da parte aérea das plântulas em centímetros. Estes são fatores importantes para testar a qualidade de um

sistema de produção de mudas através da técnica da cultura de tecidos, observando os fatores que podem limitar a regeneração das plântulas.

- **Aclimação das mudas**

Quando as plântulas de mandioca regeneradas dos meristemas apicais alcançaram um tamanho de 8 a 10 cm, elas foram retiradas do tubo de ensaio, com muito cuidado para não danificar o sistema radicular, e lavadas com água destilada para retirar restos do meio de cultura (Figuras 7A e B). Em seguida, essas mesmas plântulas foram introduzidas em copos descartáveis de plástico transparente - para visualização do sistema radicular - de 250 mL de volume, contendo substrato comercial Plantimax[®], e irrigadas com bastante água destilada, a fim de deixar o substrato umedecido o suficiente para superar o período de aclimatização sem a necessidade de ministrar água. As plantas foram cobertas com outro copo descartável de plástico branco de 200 mL de volume com uma boa vedação para manter a umidade elevada e posteriormente levadas para casa de vegetação (Figura 8). Após 20 dias, com o sistema radicular bem desenvolvido, aberturas foram gradativamente feitas na parte superior do copo de cobertura, e a primeira adubação foi realizada com 1 g/copo da mistura composta por uréia (0,14 g), superfosfato triplo (0,74 g) e sulfato de potássio (0,12 g). Depois da adubação, ainda foi mantido o copo de cobertura e as aberturas foram sendo aumentadas a cada dois dias. Em torno do décimo dia, com as plântulas apresentando um sistema radicular ramificado e abundante (Figura 9A), o copo foi definitivamente retirado (Figura 9B), e as plantas transplantadas para vasos com uma mistura de solo, substrato Plantimax[®] e areia na proporção 1:1:1 (Figura 10).

Folhas das plântulas regeneradas através da cultura de meristemas foram indexadas através do teste sorológico ELISA-indireto, para verificar se os materiais estavam livres do CsCMV (ver metodologia, item 3.3).



Figura 7 – Plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) (A); plântula retirada do meio de cultura pronta para ser aclimatada (B).



Figura 8 – Plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*) em início de aclimação em copos descartáveis contendo substrato comercial Plantimax[®], com copo de cobertura, em casa de vegetação.

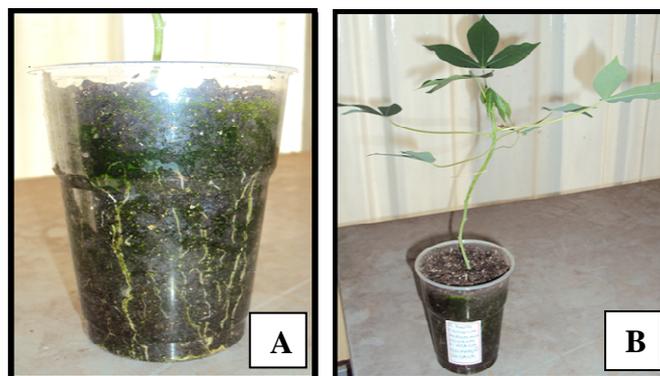


Figura 9 – Plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*), em copos descartáveis contendo substrato comercial Plantimax[®], sistema radicular ramificado e abundante, em casa de vegetação (A); Plântula de mandioca pronta para ser transplantada em vaso (B).



Figura 10 – Plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*) transplantada para vaso com solo + substrato comercial Plantimax[®] em casa de vegetação.

3.9.3 Quimioterapia – uso de um antiviral

Para testar a eficiência do composto químico antiviral ribavirina, foi necessário diluí-lo em água destilada e esterilizá-lo por filtração em membrana Millipore 0,22 μm de diâmetro (MillexTM). As concentrações de 5, 8, 10, 15, 20, 30 e 40 mg/L de Ribavirina[®] foram adicionadas ao meio de cultura MS, previamente autoclavado, e os meristemas apicais das variedades de mandioca Baianinha, Olho Junto, IAC 90 e "Pasquini" foram, por sua vez, extraídos e colocados nesse meio.

Para facilitar a regeneração de um maior número de explantes foram extraídos meristemas apicais medindo em torno de 2 mm, assegurando-se a eliminação viral com a adição de ribavirina ao meio de cultura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transmissão mecânica experimental do CsCMV

A partir do 7º dia de inoculação, as plantas de *N. benthamiana* exibiram, em suas folhas, pequenas áreas com coloração verde clara entremeada com coloração verde escura, um sintoma típico de clorose (Figura 11), e uma leve deformação foliar, enquanto que as folhas de *C. amaranticolor* apresentaram sintomas de lesões locais cloróticas (LLC) pronunciados (Figura 12A e B). Já as plantas de *E. heterophylla* e *D. stramonium* não apresentaram sintomas típicos causados por este vírus, como amarelecimento e clorose com posterior aparecimento de mosaico foliar, descritas na literatura como indicativos da presença do CsCMV. Como se trata de um teste biológico, os resultados obtidos nas inoculações mecânicas podem variar, estando sujeitos a alterações intrínsecas dos vírus, do hospedeiro e do ambiente (ZERBINI; CARVALHO; ZAMBOLIM, 2002). Com isso, plantas infectadas podem ou não expressar sintomas causados por vírus.



Figura 11 – Planta de *Nicotina benthamiana* inoculada com CsCMV, apresentando os sintomas de uma leve clorose foliar e pequenas deformações foliares.

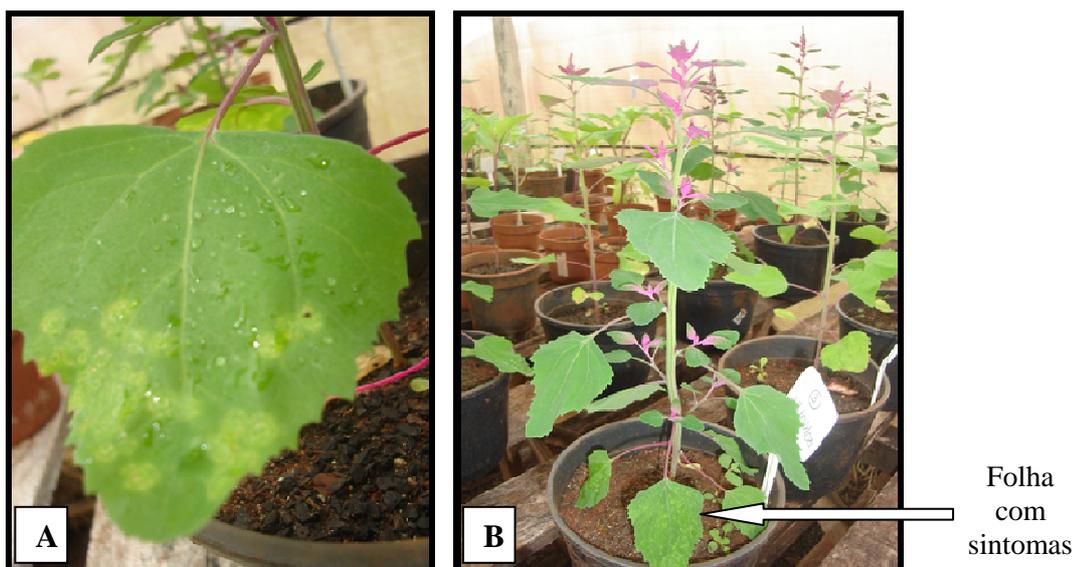


Figura 12 – Planta de *Chenopodium amaranticolor* inoculada com CsCMV, apresentando sintomas de lesões locais cloróticas (LLC) na folha (A); folha e com sintoma de LLC (B).

4.2 Teste Sorológico (ELISA-indireto)

4.2.1 Resultados dos testes de ELISA-indireto com antissoro cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical

Os resultados obtidos através do teste ELISA-indireto com o antissoro para o CsCMV e produzido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, na diluição 1/1000, mostraram que as amostras das variedades Olho Junto, Baianinha, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13 e IAC 14 estavam infectadas com o CsCMV, por apresentaram leituras com valores de absorvância a 405 nm, superiores a duas vezes o valor encontrado para o controle negativo, nas quatro diluições das amostras testadas (1/20, 1/100, 1/500 e 1/2500). Porém, apenas as amostras do material “Pasquini” apresentaram valores de absorvância abaixo daqueles encontrados para o controle negativo, o que indicaria a ausência do vírus em questão (Figura 13).

Valores de absorbância das leituras dos ensaios ELISA-indireto em variedades de mandioca (*Manihot esculenta*)

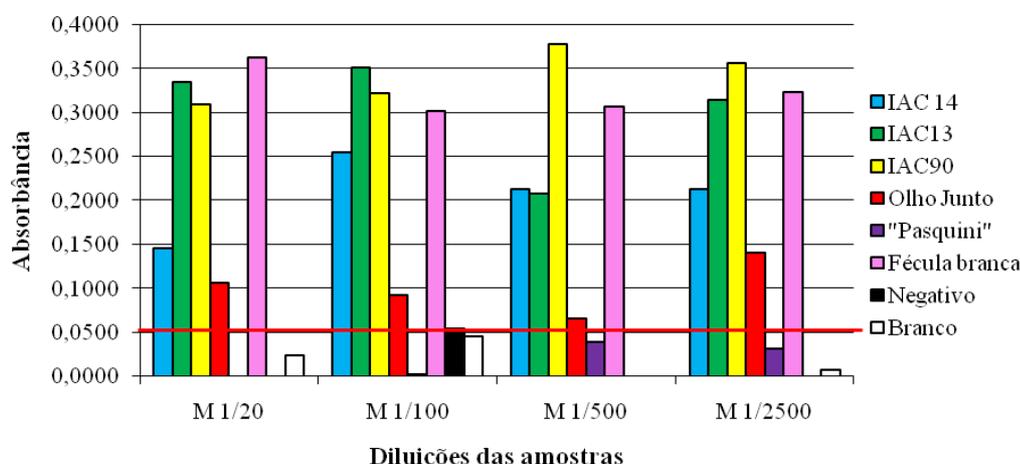


Figura 13 – Valores de absorbância para o teste ELISA-indireto das variedades de mandioca (*Manihot esculenta*): IAC14, IAC13, IAC90, Olho Junto, Fécula Branca e "Pasquini" (variedade não definida), em quatro diluições, com antissoro para o CsCMV (cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical).

Segundo Fukuda (1993), o CsCMV é o vírus mais importante e freqüente em todas as regiões produtoras brasileiras, principalmente do Sul e do Sudeste, causando infecções que prejudicam as variedades cultivadas, podendo causar impactos econômicos. Os resultados obtidos neste trabalho ratificaram este fato, ao confirmar a presença do CsCMV na grande maioria das amostras analisadas.

Dentre as 7 variedades de mandioca testadas, a Baianinha foi a que obteve os maiores valores de absorbância, os quais variaram de 0,3580 a 0,4614, caracterizando esta variedade como a mais infectada com CsCMV para as quatro diluições do antígeno utilizadas. A segunda variedade com os maiores valores de absorbância (entre 0,3101 a 0,3779) foi a IAC 90, seguida, respectivamente, pelas variedades Fécula Branca, IAC13, IAC 14 e Olho Junto (Figura 13).

Considerando o alto índice de infecção do CsCMV nas amostras analisadas de plantas coletadas no campo, e como na época de realização dos ensaios não possuíamos plantas micropropagadas de mandioca livres de vírus,

optamos então pela utilização de plantas de *N. benthamiana* como controle negativo na realização dos ensaios ELISA, e como controle positivo, plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o vírus. Também foram testadas amostras contendo folhas jovens de *N. benthamiana*, colhidas aos 15 dias após a inoculação, e folhas de plantas em período de florescimento, com mais de 30 dias após a inoculação. Este ensaio foi realizado a fim de confirmar a presença do vírus em plantas de diferentes idades, bem como comparar os valores de absorvância obtidos nos experimentos de ELISA-indireto, utilizando amostras das variedades de mandioca (Figura 14).

Valores de absorvância das leituras dos ensaios ELISA-indireto em variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) e em plantas de *Nicotiana benthamiana*

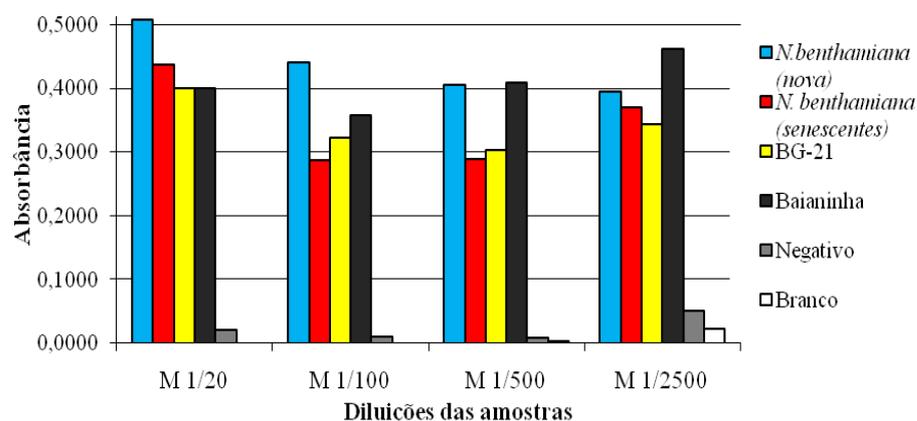


Figura 14 – Valores de absorvância para o teste ELISA-indireto das variedades de mandioca (*Manihot esculenta*): Baianinha, BG-21 (material infectado com CsCMV provenientes de Cruz das Almas-BA) e plantas *Nicotiana benthamiana* (folhas novas e senescentes) em quatro diluições.

Nas quatro diluições testadas foram encontrados valores elevados de absorvância nas amostras de plantas de *N. benthamiana*, tanto novas como velhas, confirmando a presença do CsCMV, mesmo nas plantas senescentes. Todavia, as leituras de absorvância nas amostras de folhas novas de *N. benthamiana* apresentaram os valores mais elevados em comparação com as demais amostras,

indicando maior concentração do vírus em plantas novas (Figura 14). Segundo Zerbini, Carvalho e Zambolim (2002), para a combinação vírus/hospedeira, a concentração do vírus nas folhas atinge seu máximo em torno de 10 a 20 dias após a inoculação. Antes desse período, a concentração viral é baixa, pois ainda estão se iniciando os processos de multiplicação viral, e, após 20 dias, a concentração viral decai devido ao envelhecimento fisiológico da planta. Deste modo, poderíamos correlacionar estes fatos à maior concentração do CsCMV em folhas novas de *N. benthamiana* colhidas com 15 dias após a inoculação.

A maior diluição das amostras (1/2500), foi eficiente na detecção do CsCMV nas 7 variedades de mandioca analisadas. Embora mesmo não resultando nos maiores valores de leitura de absorbância para todas as variedades, esta diluição poderá ser utilizada na indexação viral quando não houver grande quantidade de material disponível, por exemplo, na detecção do vírus em plântulas de mandioca provenientes da cultura de meristemas ainda na fase de pré-aclimatação, quando apresentam uma quantidade limitada de folhas disponível para realizar o teste.

4.2.2 Resultados dos testes ELISA-Indireto com o antissoro para o CsCMV, produzido neste trabalho

O antissoro produzido para o CsCMV foi diluído na proporção de 1/10.000 em tampão de cobertura, e utilizado nos testes de ELISA-Indireto em amostras da variedade Baianinha e nos materiais “Pasquini” diluídos a 1/300. Foram escolhidas amostras desses materiais, por representarem, o de menor concentração de vírus, “Pasquini”, e o de maior concentração, ‘Baianinha’, nos ensaios de ELISA-indireto realizados anteriormente, utilizando o antissoro cedido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical.

Os resultados obtidos (Figura 15) nos testes com as amostras dos materiais “Pasquini” revelaram valores de absorbância 10 vezes maiores do que os encontrados para o controle negativo, ou seja, nas amostras de *N. benthamiana* sadias, confirmando assim a presença do CsCMV nos materiais “Pasquini”, considerados anteriormente como sadios quando foi utilizado o antissoro fornecido pela EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical na diluição de

1/1.000. Deste modo, foi constatado que o antissoro produzido neste trabalho, por apresentar maior título (1/10.000), é mais sensível na detecção do CsCMV, e portanto é o mais indicado para ser utilizado nos trabalhos subsequentes de indexação das plantas micropropagadas de mandioca.

Valores de absorbância das leituras dos ensaios ELISA-indireto em variedades de mandioca (*Manihot esculenta*)

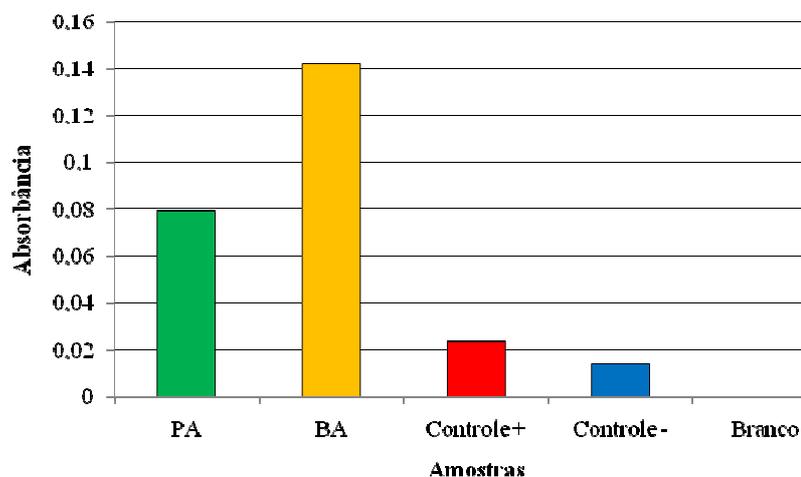


Figura 15 – Resultados dos testes ELISA-indireto com o antissoro para o CsCMV produzido neste trabalho, na diluição de 1/10.000, em amostras de mandioca (*Manihot esculenta*) "Pasquini" e 'Baianinha'-BA, diluídas a 1/300.

Para as amostras da variedade Baianinha, como esperado, foram obtidos valores elevados de leitura de absorbância.

4.3 Detecção do CsCMV através de RT-PCR

Nos ensaios de RT-PCR foram obtidas ampliações de um fragmento genômico viral de aproximadamente 760 pb (Figuras 16 e 17) que conforme Gibbs et al. (1998) correspondem à região 5'- terminal da ORF1 do gene codificador da proteína replicase dos Potexvirus. Resultado semelhante foi obtido utilizando-se este conjunto de *primers* na detecção do vírus X da batata (PVX, gênero Potexvirus), Gibbs et al. (1998).

Os produtos de amplificação obtidos das amostras de *N. benthamiana* inoculadas com o CsCMV foram semelhantes em tamanho, aos visualizados no gel de agarose, aos fragmentos do amplificados a partir das amostras de folhas de mandioca assintomáticas, evidenciando assim a presença do CsCMV, mesmo em plantas aparentemente saudáveis.

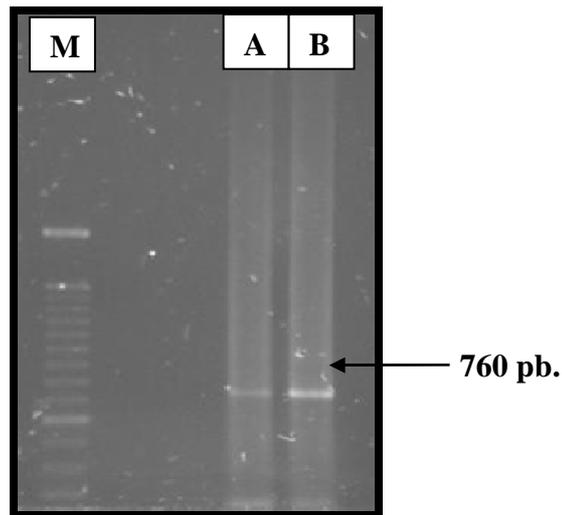


Figura 16 – Eletroforese de gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo e com os produtos da amplificação da reação de RT-PCR da planta *Nicotina benthamiana* inoculada com o CsCMV, mostrando a amplificação de fragmento de 760 pb (A e B). (M) Marcador DNA Ladder de 100 pb.

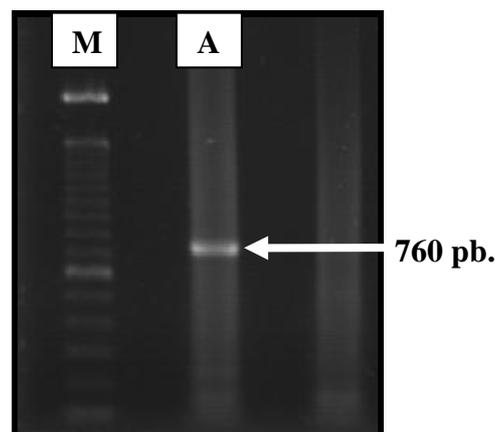


Figura 17 – Eletroforese de gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo, com os produtos da amplificação da reação de RT-PCR a partir de mandioca 'Baianinha' infectada com CsCMV. (A) amplificação do fragmento de 760 pb. (M) Marcador DNA Ladder de 100 pb.

4.4 Purificação do vírus (CsCMV)

No total, 2 purificações foram realizadas e, em ambas, foram obtidas bandas bem visíveis, de ótimo aspecto, evidenciando a presença de vírus em bom estado de pureza (Figura 18).

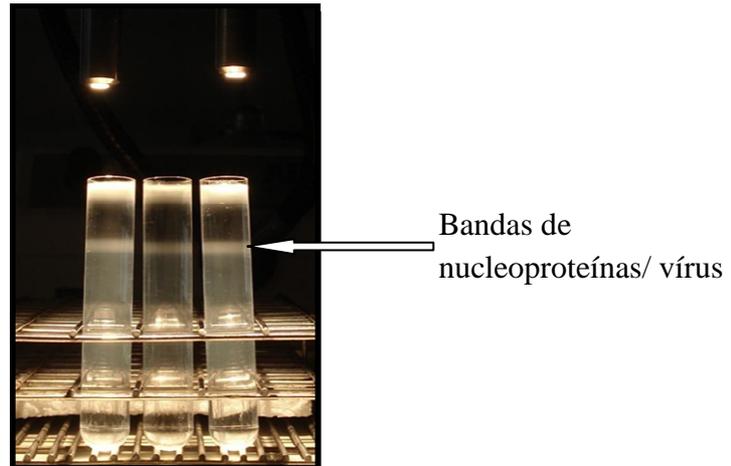


Figura 18 – Bandas virais (seta) obtidas após gradiente de sacarose de uma preparação de *Cassava common mosaic virus* (CsCMV).

A presença do vírus na solução foi comprovada pelo espectro de absorção na luz ultra-violeta no espectrofotômetro (Genesys 10UV Scanning - Thermo Eletron Corporation[®]) e os resultados encontrados representam uma absorbância característica de nucleoproteínas, com o máximo de absorbância no comprimento de onda de 260 nm para as 2 purificações (Figura 19 e 20).

As soluções foram diluídas a 1/10 e os valores de absorbância encontrados nos comprimentos de onda de 280 nm e 260 nm foram, respectivamente, de 0,834 e 1,233 para a primeira purificação, e de 0,771 e 1,041 para a segunda (Figuras 19 e 20). A razão de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) para a primeira e segunda purificações foi de 1,48 e 1,35, respectivamente, os quais se encaixam dentro das faixas relatadas para outros vírus do gênero *Potexvirus*, cujos valores estão entre 1,2-1,4 (ZETTLER et al., 1984).

Curva de absorção de nucleoproteínas da primeira purificação de CsCMV na diluição 1/10

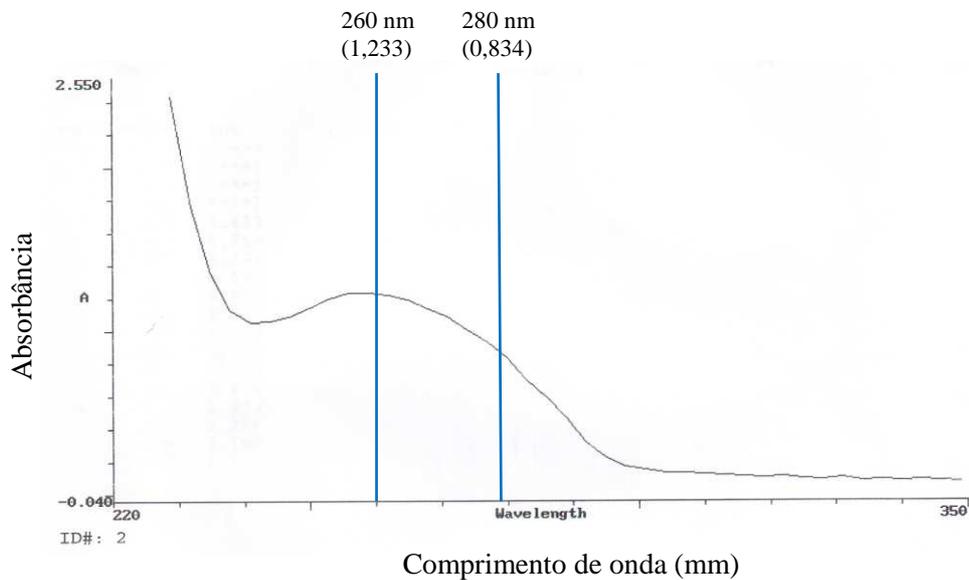


Figura 19 – Curva de absorção de nucleoproteínas da primeira preparação purificada de CsCMV, diluída a 1/10, com leitura em espectrofotômetro.

Curva de absorção de nucleoproteínas da segunda purificação de CsCMV na diluição 1/10

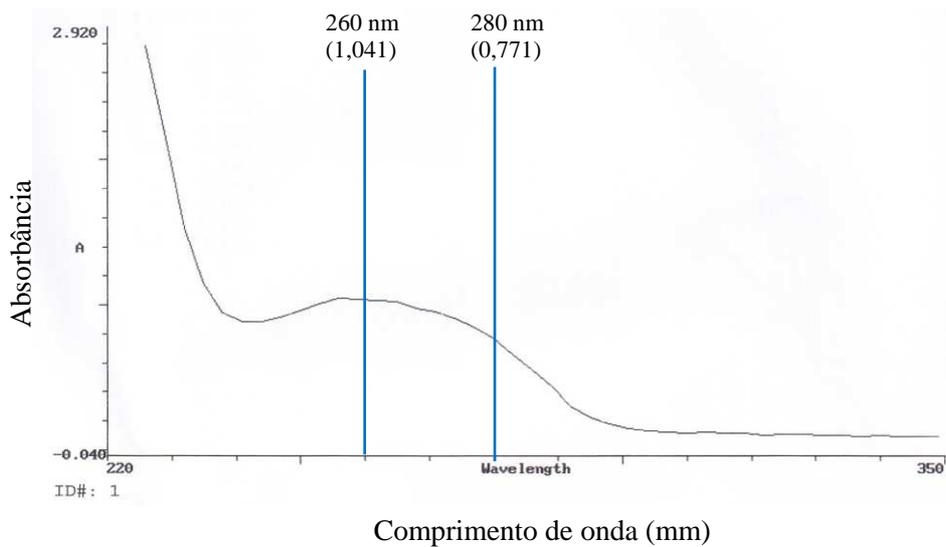


Figura 20 – Curva de absorção de nucleoproteínas da segunda preparação purificada de CsCMV, diluída a 1/10, com leitura em espectrofotômetro.

Através da densidade óptica (absorbância) obtida em 260 nm e 320 nm, a concentração do vírus nas soluções foi calculada em miligramas de vírus por mililitros da solução purificada através da seguinte fórmula descrita por Zerbini, Carvalho e Zambolim (2002):

$$C = (A_{260} - A_{320}) \times d/E$$

onde:

C = concentração (mg/mL);

A_{260} = valor de absorbância a 260 nm;

A_{320} = valor de absorbância a 320 nm;

d = fator de diluição;

E = coeficiente de extinção da partícula viral (dados obtidos na literatura para a maioria dos vírus de plantas).

As concentrações virais foram estimadas em 3,84 mg de vírus/mL e 3,15 mg de vírus/mL para a primeira e segunda purificações, respectivamente, utilizando um coeficiente de extinção do gênero Potexvirus de 2,94 (BERCKS, 1970). Estes valores são mais elevados do que os encontrados por Velame e Filho (2001), 1,18 mg/mL e 2,99 mg/mL, na purificação desse mesmo vírus.

Ao comparar os valores de absorbância para as 2 purificações, constatou-se que a primeira teve os maiores valores de comprimento de onda e de concentração do vírus em miligrama de vírus por mililitros da solução purificada do que a segunda. A primeira purificação, por ter sido realizada com folhas de *N. benthamiana* frescas, teve os resultados mais elevados do que os da segunda, obtendo um maior valor para a relação/razão de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), e uma concentração viral de 0,83 mg de vírus/mL de solução purificada a mais do que a da segunda, pois o pico obtido em 260 nm foi mais elevado na primeira purificação quando comparado ao da segunda (Figuras 19 e 20).

4.4.1 Produção de antissoro

Para detectar se o antissoro produzido reagia ou não com plantas saudas de *N.benthamiana*, a partir da qual foi realizado o processo de purificação, foi executado o teste de ELISA-indireto, com e sem adsorção do antissoro em extrato desta planta. Os resultados apontaram a ausência de reações entre o antissoro e o extrato vegetal. Assim, pode-se dizer que, no processo de purificação do vírus, proteínas vegetais podem não ter sido purificadas ou purificadas em quantidades extremamente pequenas que não reagiram com o antissoro, o que significa que o antissoro pode ser considerado específico para o CsCMV.

Para o antissoro testado, foi verificada uma clara distinção entre o extrato de planta sadia e o extrato de planta infectada, demonstrando a especificidade do antissoro, o qual poderá ser utilizado na indexação das plântulas de mandioca provenientes da cultura de tecidos.

O antissoro bruto produzido foi, ainda, testado em ELISA-indireto para a determinação de seu título (máxima diluição capaz de detectar o antígeno), e, das 9 diluições testadas (1/50, 1/300, 1/600, 1/800, 1/900, 1/1.600, 1/3.200, 1/5.000 e 1/10.000) (dados não mostrados), foi constatado que a máxima diluição (1/10.000) pode ser utilizada para a indexação de plantas, pois fornece resultados bem parecidos com os encontrados em diluições mais baixas, além de se utilizar uma quantidade bem menor de antissoro.

Os extratos aquosos das plantas de *N. benthamiana* saudas, inoculadas com o CsCMV, foram testadas em 7 diluições (1/20, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400, 1/800, 1/1600 e 1/3200) e, entre estas diluições, a diluição de 1/300 foi suficiente e a mais indicada para se proceder a indexação dos materiais, pois, para diluições menores, pode ser necessário uma quantidade mais elevada de folhas, que pode não estar disponível no momento da realização dos testes. Por outro lado, uma diluição muito alta pode conduzir a resultados falsos, ou seja, uma falsa ausência do vírus devido à elevada diluição do antígeno caso o mesmo esteja presente na amostra.

4.5 Massa molecular da proteína capsidial

O gel de poliacrilamida revelou que a preparação purificada continha proteínas com massa molecular estimada em 20 kDa, conforme determinação comparativa com proteínas de massas moleculares conhecidas (Figura 21). Segundo Murphy et al. (1995), a capa protéica dos Potexvirus é composta por subunidades com massa molecular de 18 a 27 kDa, comprovando, assim, que as preparações purificadas realmente continham proteínas de Potexvirus. A banda formada no purificado 1 foi mais intensa, indicando maior concentração protéica.

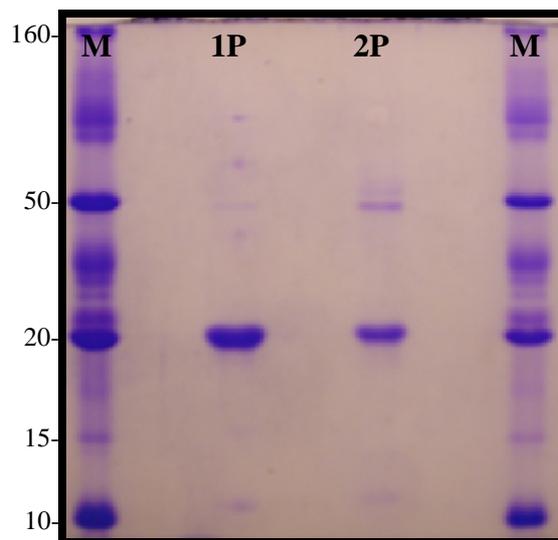


Figura 21 – Peso molecular da proteína capsidial de CsCMV em eletroforese de gel de poliacrilamida-SDS 15%, corado com Coomassie blue; M, marcador de peso molecular na faixa de 10 a 160 kDa (BenchMark[™] Protein Ladder, Invitrogen[®]); 1P – purificado viral 1; 2P – purificado viral 2.

4.6 Teste de difusão dupla em ágar

As alíquotas do antissoro utilizadas nos testes reagiram nítidamente com extratos de plantas infetadas com o CsCMV, e não reagiram com extratos de *N.*

benthamiana sadia (Figura 22). Ocorreu, então, a formação de faixas de precipitações brancas e densas, na posição central, ao redor do orifício do antissor, mostrando a ótima interação entre o antissor e os extratos de folhas de *N. benthamiana* infectados com o CsCMV, com folhas de mandioca inoculadas com o CsCMV e do CsCMV purificado.

Na Figura 22, pode-se observar que os antígenos presentes nos orifícios do lado direito da placa, no qual P (vírus CsCMV purificado), MI (extrato das folhas de mandioca inoculada com CsCMV) e BI (extrato das folhas de *N. benthamiana* inoculada com CsCMV) contém o mesmo vírus, formaram as faixas de precipitação pela reação antissor (As – cavidade central) que se uniram, sendo as faixas mais fortes ou evidentes nos orifícios P e BI, e mais fracas em MI. Já no orifício contendo BI, como se encontra ao redor de dois orifícios com extrato de planta de *N. benthamiana* sadia, não reagiram com antissor, sendo observada a formação de um esporão (Figura 22).

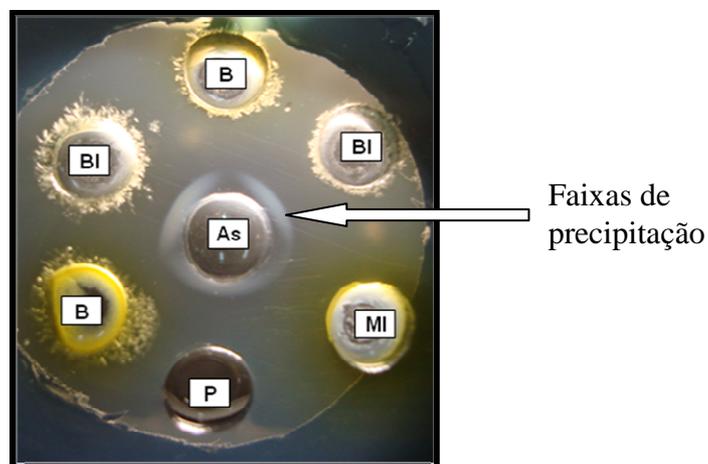


Figura 22 – Teste da dupla difusão em agar com antissor para *Cassava common mosaic virus* apresentando as faixas/bandas de precipitação formadas. AS – antissor (As) contra CsCMV; B – extrato das folhas de *N. benthamiana* sadia (Ag); BI – extrato das folhas de *N. benthamiana* (Ag) inoculada com CsCMV; MI - extrato das folhas de mandioca (Ag) inoculadas com CsCMV; P – vírus CsCMV purificado (Ag).

Este teste serviu para evidenciar que o antissoro produzido contra CsCMV reage com extratos das plantas *N. benthamiana* e de mandioca infectadas com CsCMV e não reage com extratos de planta sadia.

4.7 Purificação da IgG

Comparando a reatividade do antissoro “puro” diluído a 1/10.000 e da IgG purificada diluída a 1/1.000 através do teste ELISA-indireto, pode-se observar que os valores de absorvância encontrados nas amostras contendo IgG purificada são maiores do que as absorvâncias obtidas com antissoro “puro”, principalmente nas amostras 2 e 3 (Figura 23). Assim, observou-se uma maior sensibilidade da IgG purificada na detecção do CsCMV.

Valores de absorvância das leituras dos ensaios ELISA-indireto em plântulas de mandioca (*Manihot esculenta*), utilizando antissoro contra CsCMV e IgG purificada

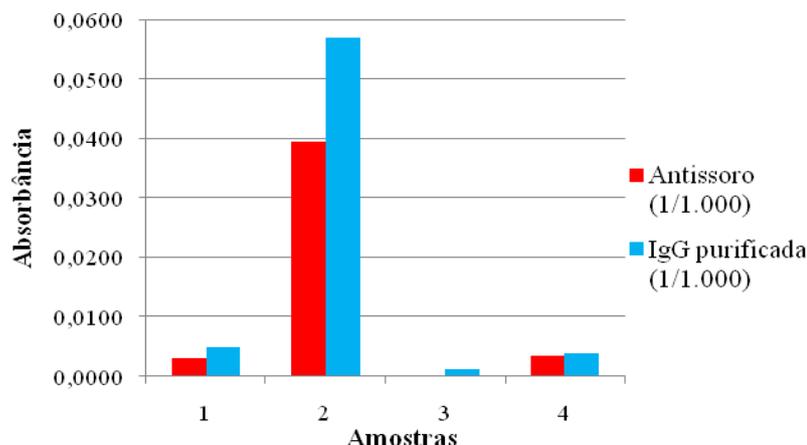


Figura 23 – Valores de absorvância para o teste ELISA-indireto em amostras de mandioca (*Manihot esculenta*), utilizando antissoro contra CsCMV e IgG purificada da solução viral de CsCMV, diluídos a 1.000.

4.8 Limpeza clonal

4.8.1 Termoterapia e cultura de meristemas

Durante os experimentos iniciais utilizando a termoterapia combinada com a cultura de meristemas foram necessários pequenos ajustes no protocolo de

micropropagação utilizado, visando melhores resultados na obtenção de plântulas das variedades utilizadas.

Para os trabalhos de micropropagação, sempre havia maior disponibilidade de materiais de ‘Olho Junto’, ‘Fécula Branca’ e ‘Baianinha’, por serem os mais cultivados na região de Paranavaí-PR. Sendo que os materiais de IAC 90, IAC 13 e IAC 14, e o material “Pasquini” foram obtidos em menor quantidade.

A porcentagem de brotos emitidos pelas manivas durante o tratamento térmico variou para cada variedade, sendo maior nas variedades citadas anteriormente como as mais cultivadas. Para as variedades IAC 13 e IAC 14, devido à baixa emissão de brotos, um número menor de meristemas apicais foi obtido. Portanto, pode-se observar que as variedades de mandioca utilizadas apresentaram comportamentos variáveis entre si quanto à adaptabilidade, desenvolvimento e estabelecimento de seus meristemas apicais em meio de cultura. Como estas variedades são geneticamente diferentes, elas necessitam, igualmente, de condições diferentes para que possam ser cultivadas *in vitro*. Segundo Mantell et al. (1994 apud ANDRADE, 2002), variedades de uma mesma espécie respondem de maneira diferente às condições de cultivo, todavia, toda espécie e toda cultivar são capazes de responder às condições de cultura *in vitro* desde que seja utilizada uma combinação correta dos demais fatores que afetam a regeneração. Estes resultados demonstraram que trabalhos subsequentes serão necessários, para determinação das melhores condições de cultivo *in vitro* para cada variedade.

De acordo com Oliveira, Gomes e Valarinhos (2000), dentro da espécie *Manihot esculenta* (Crantz) existe uma grande variabilidade quanto à resposta morfogênética, em função do genótipo da planta. Essa forte dependência do genótipo resulta em demandas nutricionais e condições de cultivo distintas, necessitando de estudos específicos para maximizar os processos de regeneração *in vitro*. Assim, adequações na composição dos meios de cultura e na

manipulação dos explantes podem ser realizadas principalmente nas variedades em que houve maiores perdas.

O número de meristemas apicais extraídos de cada variedade são mostrados no Tabela 4. As 7 variedades utilizadas somaram juntas um número de extrações de 1244 meristemas, dos quais apenas 662 regeneraram plântulas com um crescimento razoavelmente satisfatório, sobrevivendo após as trocas de meio de cultura.

Tabela 4 – Número de meristemas apicais extraídos, de explantes mortos e contaminados por fungos e bactérias e de plântulas desenvolvidas *in vitro* das variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) Olho Junto, Fécula Branca, Baianinha, IAC 90, IAC 13, IAC 14 e do material "Pasquini"

Variedades de Mandioca	Nº explantes extraídos	Nº explantes mortos	Nº explantes contaminados		Nº plântulas desenvolvidos <i>in vitro</i>
			Fungo	Bactéria	
Olho Junto	280	91	5	6	178
Fécula Branca	219	77	11	15	116
Baianinha	346	120	3	24	199
IAC 90	152	82	3	6	61
“Pasquini”*	139	55	2	16	66
IAC 14	51	28	7	6	12
IAC 13	57	21	2	4	30
Total	1244	474	33	77	662

*variedade não definida.

As contaminações por fungos e bactérias ocorreram nos primeiros 10 dias de estabelecimento dos meristemas apicais no meio de cultura e foram distintas entre as variedades de 3,9% a 31,37% (Figura 24). Foram encontrados 33 meristemas contaminados por fungos e 77 por bactérias, o que pode ter ocorrido devido à assepsia insuficiente dos equipamentos e do seu manuseio, à ineficiente desinfecção dos brotos e, até mesmo, às contaminações ocasionadas pelo operador no momento da retirada dos meristemas.

Porcentagem de explantes desenvolvidos *in vitro* de variedades de mandioca

(*Manihot esculenta*)

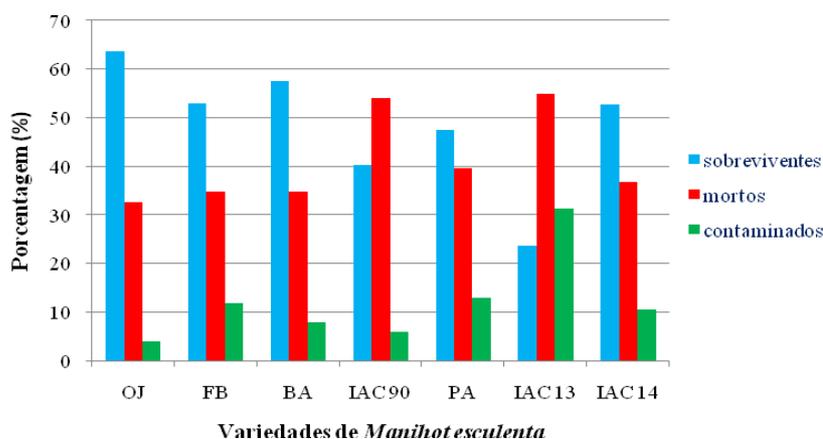


Figura 24 – Porcentagem de explantes sobreviventes, mortos e contaminados das variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) Olho Junto (OJ), Fécula Branca (FB), Baianinha (BA), IAC 90, IAC 13 e IAC 14 e do material "Pasquini" (PA), as quais foram desenvolvidas *in vitro* através da técnica da termoterapia associada à cultura de meristemas.

Trigano e Gray (2000 apud BARRUETO CID et al., 2007) enfatizam que, quando o material provém diretamente do campo, devido à alta ocorrência de contaminações endógenas, a sua desinfestação torna-se mais difícil, pois a utilização do hipoclorito de sódio pode ser pouco eficiente em função da superficialidade de sua ação. Porém, mesmo assim, é um consagrado anti-séptico em matéria de cultura de tecidos de plantas.

De acordo com Amaral (2006), os microrganismos contaminantes (fungos e bactérias) competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e colonizam os tecidos vegetais, podendo também eliminar no meio metabólitos que são tóxicos para as plantas, levando-as a morte. Contudo, o meio de cultura (concentração e combinação de sais, sacarose e pH) pode facilitar ou não o crescimento desses microrganismos, ao mesmo tempo em que pode ser mais adequado ou não à espécie vegetal utilizada.

Grattapaglia e Machado (1997) enfatizam que, apesar de ser realizada a desinfecção superficial dos explantes, diversos microrganismos de natureza endógena não são expostos aos agentes desinfestantes e devem ser controlados

posteriormente. Nesse sentido, a manutenção de plantas matrizes em casa de vegetação, mediante a aplicação de fungicidas, bactericidas e protegidas de intempéries climáticas, pode ser uma medida que previne a contaminação dos explantes.

A morte dos explantes ocorreu com o passar do tempo, principalmente durante a troca de meio de cultura. No total, 474 explantes morreram por diversos motivos, por exemplo: oxidação, que pode ter ocorrido devido à fitotoxidez ocasionada pelas soluções utilizadas na desinfestação superficial dos brotos; hiperhidricidade (os explantes apresentaram um aspecto translúcido e amolecido); ressecamento da parte aérea com posterior amarelecimento; extração de meristemas com tamanho reduzido, os quais não conseguiram se regenerar em explantes saudáveis e apresentaram uma descoloração dos tecidos; não regeneração dos meristemas durante a troca do meio de estabelecimento para o meio de multiplicação/enraizamento; à adaptação dos meristemas à condição de cultivo de estabelecida.

Segundo Guerra e Nodari (2006), o cultivo *in vitro*, como qualquer outro processo, é sensível a alguns problemas de ordem ambiental ou biológica que afetam diretamente o desenvolvimento das culturas. Dentre estes problemas, pode-se citar: a oxidação, que é o escurecimento dos explantes ocasionado pela liberação de fenóis dos ferimentos no processo de extração dos meristemas; o declínio do vigor, que ocasiona baixa taxa de desenvolvimento associado com a produção de substâncias fenólicas; a hiperhidricidade, que é o estado fisiológico em que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos, com aspecto translúcido; e a necrose, que se caracteriza pela perda parcial ou total da planta.

Com relação à variedade Olho Junto, 178, dos 280 meristemas extraídos, se estabeleceram *in vitro* (Tabela 4), ou seja, uma taxa de 63,57% de explantes regenerados (Figura 24). Destes, 73 materiais possuíam folhas verdes com um sistema radicular ramificado e abundante e 65 apresentavam folhas verdes sem formação de sistema radicular. Esta variedade foi a que apresentou as menores perdas de explantes – 32,5% morreram e 3,93% apresentaram contaminação por

fungos e bactérias. Segundo Oliveira, Gomes e Valarinhos (2000), na fase de estabelecimento, até 15% de perdas por contaminações microbianas são normais.

Dos 139 meristemas extraídos do material “Paquini” (variedade não definida) (Tabela 4), 47% regeneraram explantes saudios e, destes 47%, 41 possuíam folhas verdes com raízes ramificadas e abundantes e 6 possuíam apenas folhas. Foram descartados 12,95% de explantes contaminados por microrganismos e 39,57% mortos por oxidação (Figura 24).

Os meristemas apicais das variedades, Fécula Branca, IAC 90, IAC 13, IAC 14 e Baianinha não se adaptaram às condições *in vitro*, regenerando materiais raquíticos, muitas vezes, com coloração amarelada, com poucas folhas pequenas e frágeis senescendo rapidamente (Figura 25).

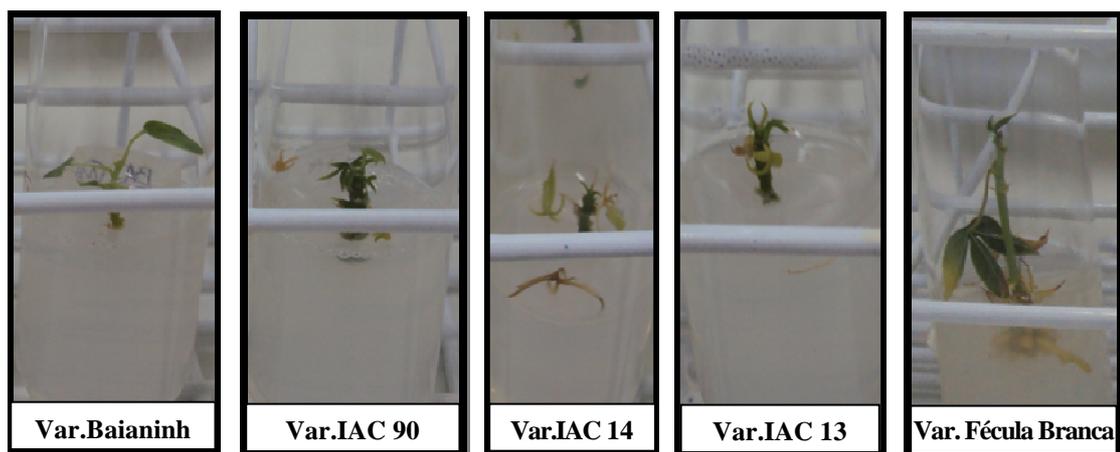


Figura 25 – Explantes das variedades Baianinha, IAC 90, IAC 14, IAC 13 e Fécula Branca em meio de cultura MS (Murashige e Skoog).

Inicialmente, estas variedades conseguiram se desenvolver satisfatoriamente no meio de cultura, com emissão de folhas. Com o passar do tempo e com a troca do meio de cultura, o crescimento dos explantes começou a ser paralisado, ocasionando a morte de alguns materiais devido à oxidação dos tecidos. Foram obtidos, nas variedades IAC 90 e IAC 13, uma porcentagem maior de explantes mortos – de 53,95% e 54,9% (Figura 24) – respectivamente,

do que regenerados, ou seja, sobreviventes. Já para as variedades IAC 13, a porcentagem de explantes contaminados por microrganismos patogênicos (fungos e bactérias) foi maior do que os encontrados nas demais variedades – 31,37%.

As variedades Olho Junto, IAC 12 e do material "Pasquini" foram, de todos os materiais testados, as que melhor se desenvolveram com a técnica da cultura de meristemas, regenerando plântulas verdes com um grande número de folhas, um sistema radicular bem formado, ramificado e abundante, e com formação de brotações laterais. Estes materiais foram aclimatadas em torno de 3 a 6 meses após a retirada dos meristemas de acordo com a variedade e as condições de desenvolvimento do explante (Figura 26). O material "Pasquini", com 3 meses e meio, já ocupava todo o volume, em comprimento, do tubo de ensaio, e estava pronta para ser aclimatada e levada para a casa de vegetação.

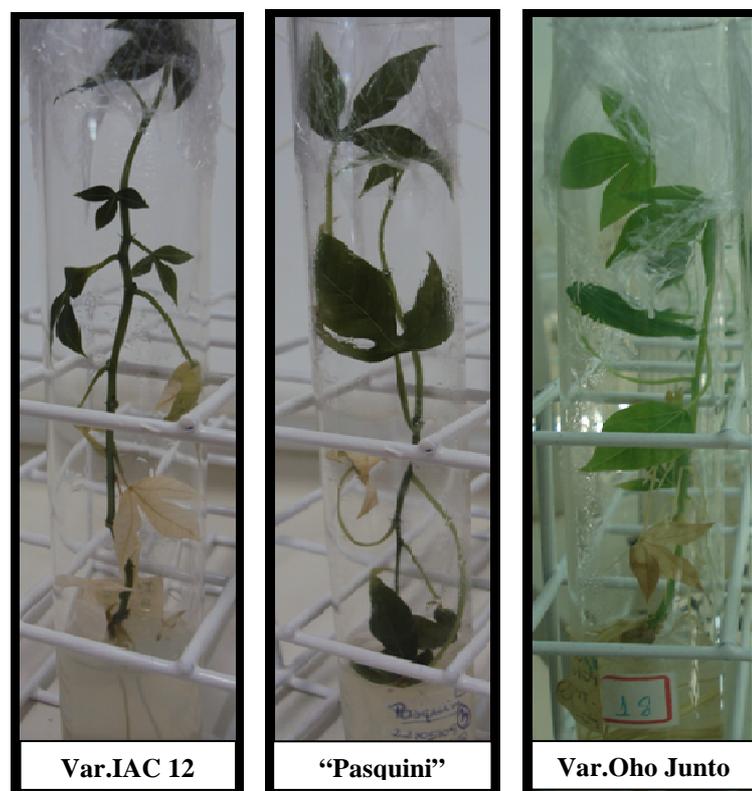


Figura 26 – Plântulas de mandioca das variedades IAC 12, Olho Junto e do material "Pasquini" em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) prontas para serem aclimatadas.

Estes materiais foram microprogadas através da técnica de segmentos nodais, no qual cada segmento do explante com 3 gemas apicais foi repicado e colocado em meio de cultura MS (Cf. metodologia). Segundo Murashige (1974), a técnica da cultura de tecidos com seguimentos nodais é a mais utilizada para a multiplicação de explantes e se baseia na capacidade que os meristemas axilares possuem de funcionar como broto principal na ausência da gema apical.

Para todas as variedades testadas, variantes somaclonais *in vitro*, quanto às características morfológicamente visíveis, não foram identificadas.

4.8.1.1 Avaliação dos meristemas apicais da variedade Olho Junto

De acordo com os resultados descritos nas Tabelas 5 e 6, dos 41 meristemas apicais extraídos, 22 foram perdidos por contaminações microbianas, sendo 24,39% por bactérias, 7,34% por fungos e 21,95% por oxidação dos tecidos, o que resultou no estabelecimento de apenas 19 meristemas (46,34%) em um intervalo de 10 dias após terem sido colocados em meio de cultivo MS. Do 10° ao 30° dia, a taxa de explantes sobreviventes foi constante, variando no 40° e no 60° dia. Na última avaliação do 70° dia, apenas 36,58% dos explantes se desenvolveram adequadamente, ou seja, dos 41 meristemas extraídos, apenas 15 sobreviveram após esse período de tempo.

Tabela 5 – Avaliação do número de meristemas sobreviventes; do número de explantes mortos; do número de meristemas com folhas, raízes e calos; do comprimento (cm) da parte aérea dos explantes do 1° ao 70° dia após a extração dos meristemas da variedade de mandioca Olho Junto, com intervalos de 10 dias para cada avaliação

Dias após extração	N° de meristemas sobreviventes	N° de explantes c/				Comprimento parte aérea
		Folhas	Raízes	Calos	Mortas	
1 dia	41	0	0	0	0	1mm
10 dias	19	17	4	16	16	0,2 a 2,7 cm
20 dias	19	17	12	17	1	0,5 a 5,0 cm
30 dias	19	18	13	17	0	0,6 a 5,0 cm
40 dias	18	16	13	18	1	1,0 a 5,0 cm
50 dias	18	16	14	18	0	1,0 a 5,0 cm
60 dias	16	15	14	16	2	1,4 a 5,3 cm
70 dias	15	15	12	15	1	1,7 a 6,3 cm

Tabela 6 – Porcentagem de explantes desenvolvidos *in vitro* e a porcentagem de explantes contaminados por fungos e bactérias do 10° ao 70° dia após a extração dos meristemas da variedade de mandioca Olho Junto, com intervalos de 10 dias para cada avaliação

Dias após Extração	% de explantes desenvolvidos <i>in vitro</i>	% de Contaminados	
		Fungos	Bactérias
10 dias	46,34	7,32	24,39
20 dias	46,34	0	0
30 dias	46,34	0	0
40 dias	43,90	0	0
50 dias	43,90	0	0
60 dias	39,02	0	0
70 dias	36,58	0	0

No 10° dia de avaliação (Tabelas 5), dos 19 explantes existentes até o momento, 17 possuíam folhas verdes e pequenas em estágio inicial de formação e, com o passar dos dias, o número de folhas aumentou consideravelmente. No último dia de avaliação, todos os 15 explantes sobreviventes *in vitro* possuíam folhas grandes, verdes e vistosas.

Já a formação do sistema radicular foi mais lenta do que a das folhas, na qual apenas 4 materiais possuíam pequenas raízes nos 10 primeiros dias de estabelecimento. Após 70 dias da extração dos meristemas, 12 dos 15 explantes existentes possuíam um sistema radicular ramificado e abundante. Segundo Oliveira e Silva (1997), na micropropagação, a presença de raízes nas plantas de mandioca em quantidade equilibrada com o desenvolvimento da parte aérea é benéfica à multiplicação por promover maior absorção de nutrientes e, conseqüentemente, maior produção de gemas, as quais servirão de explantes para os subcultivos subseqüentes.

A formação de calos foi observada no 10° dia de avaliação e, dos 19 explantes, 16 apresentavam pequenos calos amarelados em sua base. Na última avaliação, no 70 ° dia, todos os materiais continham calos amarelados. Segundo Oliveira, Gomes e Valarinhos (2000), na fase inicial de estabelecimento dos explantes, a formação de calos é comum devido à sua adaptação às condições de cultura *in vitro*, os quais, na maioria dos casos, são formados apenas na base dos explantes, de coloração amarelo esbranquiçada, não organogênicos ou embriogênicos. Já Roca (1984) enfatiza que a formação de calos na cultura de tecidos é indesejável, pois pode promover o aparecimento de variantes

somaclonais que são apenas desejáveis para o melhoramento genético. Para este autor, a formação de calos se associa a níveis elevados de BAP (maiores que 0,1 mg L⁻¹) no meio de cultura e o processo inibe o crescimento das plântulas.

Nos primeiros 10 dias de cultivo, 16 dos 41 meristemas extraídos morreram por diversos motivos, dentre eles, o mais detectado foi o escurecimento dos explantes, caracterizado como oxidação fenólica. No final das avaliações, no 70° dia, 21 explantes haviam morrido (Tabela 5). Modgil, Sharma e Bhardwaj (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*.

O comprimento da parte aérea das plântulas foi muito variável, de 0,2 a 2,7 cm nos 10 dias após a extração dos meristemas, e 1,7 a 6,3 cm nos 70° dia. Nos 30 primeiros dias, foi observado um crescimento constante da parte aérea dos explantes e, a partir deste momento, ocorreu um crescimento mais lento. Em torno dos 50° dia após a extração, o crescimento voltou a ser mais elevado até o último dia de avaliação. Segundo Kartha e Gamborg (1975), o tamanho do explante pode influenciar no número de plantas regeneradas por cultura de meristemas, ou seja, explantes excedendo 0,2 mm de comprimento podem formar plantas completas, enquanto que os menores que 0,2 mm de comprimento podem formar tanto calo quanto calo com raízes e os maiores podem ter uma rápida regeneração, embora ainda possam estar infectados com vírus.

Estes experimentos serviram para mostrar que é necessário extrair uma grande quantidade de meristemas apicais para obter um número relativamente elevado de plântulas de mandioca uniformes e sadias, pois, como descrito anteriormente, mais da metade dos explantes morreram e os regenerados nem sempre estão aptos a serem aclimatados e desenvolvidos em casa de vegetação.

4.8.2 Quimioterapia – uso de um antiviral

Para as variedades testadas, Baianinha e Olho Junto e para o material "Pasquini", as concentrações de 10, 15, 20, 30 e 40 mg/L de ribavirina foram indesejáveis para a regeneração de explantes extraídos de meristemas apicais. Assim, a grande maioria dos meristemas morreram nos 10 primeiros dia de cultivo por não suportarem essas concentrações, devido ao efeito fitotóxico

ocasionado por este composto químico. Nos explantes sobreviventes, foram observados distúrbios fisiológicos, além de uma coloração marrom-amarelada, com as folhas, quando formadas, finas, deformadas e fracas, de coloração verde-clara com partes marrons amareladas e com hastes alongadas (Figura 27). Mas, com o passar dos meses, todos os explantes morreram.

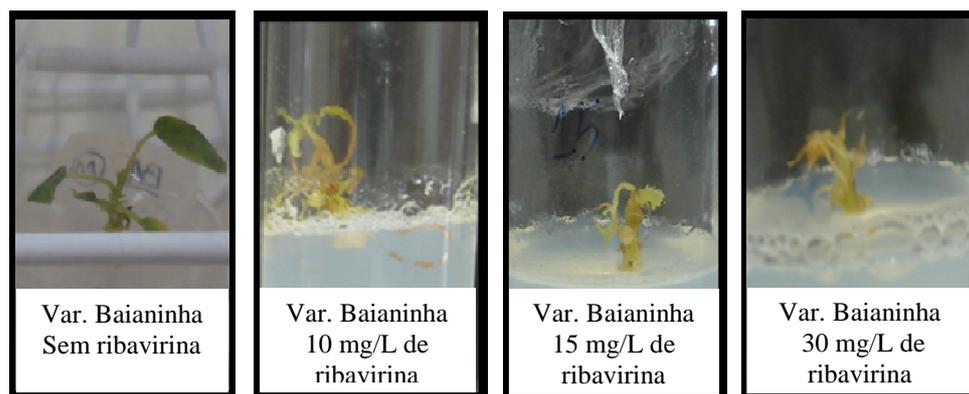


Figura 27 – Explantes de mandioca da variedade Baianinha cultura MS (Murashige e Skoog) – esquerda para direita – sem adição de Ribavirina; suplementado com 10, 15 e 30 mg/L de ribavirina.

Segundo Hazaa, El-Dougdoug e El-Maaty (2006), os efeitos fitotóxicos da ribavirina se mostraram particularmente fortes, podendo provocar interrupção ou o esgotamento dos componentes clorofiláticos e inibição da regeneração de plântulas. Enquanto que Barbosa et al. (2007) obtiveram efeitos fitotóxicos e morte dos explantes de cana-de-açúcar ao utilizarem concentrações iguais ou superiores a 30 mg/L de ribavirina em meio de cultura MS, as plântulas regeneradas nos meios contendo 10 a 25 mg/L de ribavirina se mostraram raquíticas, amareladas e deformadas.

Dos 3 materiais testados, os explantes regenerados com adição de ribavirina no meio de cultura apresentaram um desenvolvimento mais lento do que os explantes sem adição de ribavirina. Os regenerantes cresceram vigorosos, com folhas verdes, embora pequenas, e com um sistema radicular pouco desenvolvido (Figura 28). A variedade Olho Junto e o material "Pasquini" regeneraram explantes que se desenvolveram mais rapidamente do que os da variedade Baianinha.

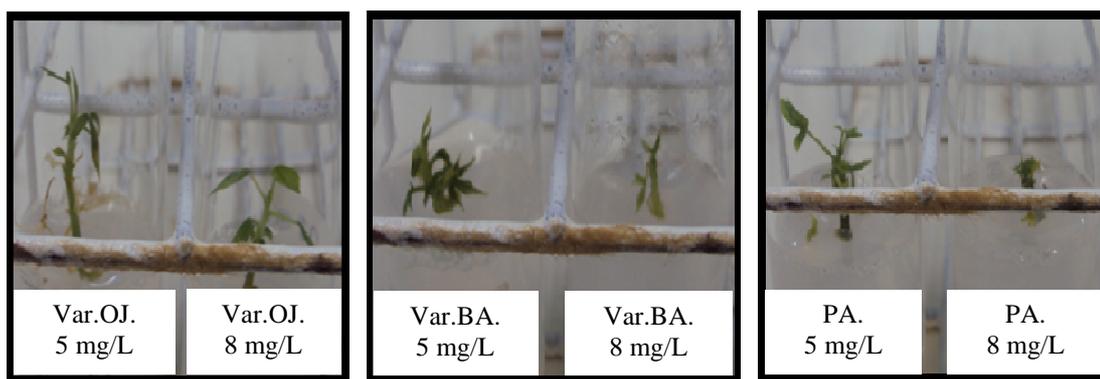


Figura 28 – Explantes de mandioca das variedades – esquerda para a direita – Olho Junto (OJ), Baianinha (BA) e do material "Pasquini" (PA) em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 5 e 8 mg/L de ribavirina, respectivamente.

Para as concentrações de 5 e 8 mg/L de ribavirina, 15 meristemas de cada material testado foram extraídos, sendo que a variedade Olho Junto foi a que resultou em um maior número de explantes regenerados, ou seja, 10 explantes para as concentrações de 5 mg/L de ribavirina e 12 explantes para a concentração de 8 mg/L. Para a variedade Baianinha nas concentrações de 5 e 8 mg/L de ribavirina, foram obtidos 8 e 7 explantes, respectivamente. Já para o material "Pasquini", 9 explantes foram obtidos para a concentração de 5 mg/L, enquanto que, para a concentração de 8 mg/L, não se obtiveram explantes regenerados em um total de 15 meristemas extraídos (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de explantes de mandioca das variedades Olho Junto, Baianinha e do material "Pasquini" regenerados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog), suplementado com 5 mg/L e 8 mg/L de ribavirina.

Variedades	N° de explantes regenerados com:	
	5 mg ribavirina/L	8 mg ribavirina/L
Mandioca		
Olho Junto	10	12
"Pasquini"*	9	0
Baianinha	8	7
Total	21	21

* variedade não definida.

Como os explantes regenerados com ribavirina não apresentaram um tamanho suficiente para serem aclimatados e por não possuírem uma quantidade de folhas suficientes para a realização do teste de ELISA, não foi possível indexar estes materiais com relação ao CsCMV.

4.8.3 Plantas aclimatadas e número de plantas livres de vírus

Das variedades de mandioca testadas, apenas as variedades Olho Junto e IAC 12 e o material "Pasquini" foram aclimatados, pois regeneraram plântulas bem desenvolvidas, com comprimento de 8 a 10 cm, com uma grande quantidade de folhas verdes e com um sistema radicular bem desenvolvido e abundante, sendo, posteriormente, transplantadas para vasos (Figura 29).



Figura 29 – Plantas de mandioca da variedade IAC 12 obtidas através das técnicas da termoterapia combinada com a cultura de meristemas em casa de vegetação, livres de CsCMV.

No total, 15 plantas de mandioca foram transplantadas para vasos: 5 do material "Pasquini" e 3 da variedade Olho Junto, as quais foram submetidas

apenas à termoterapia; 5 da variedade Olho Junto e 2 da variedade IAC 12, as quais foram submetidas ao tratamento térmico associado à cultura de meristemas. A quantidade de plantas transplantadas para vasos foi baixa devido à grande taxa de mortalidade destas na fase inicial de aclimação, quando a metodologia a ser utilizada nesta fase ainda estava sendo definida.

Através do teste sorológico ELISA-indireto, foram detectadas as plantas que estavam livres do CsCMV utilizando o antissoro específico para o CsCMV, produzido neste trabalho. Os resultados apontaram que apenas 1 das 5 plantas de mandioca da variedade Olho Junto, submetidas à termoterapia em combinação com a cultura de meristemas, apresentaram-se livres do CsCMV. Já para a variedade IAC 12, com a utilização dos mesmos tratamentos, as 2 plantas indexadas estavam livres do CsCMV (Tabela 8). Essa baixa taxa de plantas livres do vírus pode estar associada à inabilidade na extração de meristemas no tamanho recomendado para se obter maior porcentagem de plantas livres de vírus, o que corresponde à extração de meristemas medindo entre 0,1 a 1 mm (MURASHIGE; SKOOG, 1962), ou meristema apical, terminal ou axilar, com um ou dois primórdios foliares e ápices caulinares entre 0,3 a 20 mm (GUERRA; NODARI, 2006).

Tabela 8 – Número de plantas de mandioca das variedades Olho Junto, IAC 12 e do material "Pasquini" aclimatadas em casa de vegetação, apresentando sintomas de CsCMV e livres deste vírus através do teste ELISA-indireto.

Variedades de mandioca/ Tratamentos	Número de plantas:		
	Aclimatadas em vasos	Com sintomas CsCMV	Livres de CsCMV (ELISA-indireto)
"Pasquini"*- Termoterapia	5	3	0
Olho Junto- Termoterapia	3	2	0
Olho Junto- Termoterapia + CM**	5	3	1
IAC 12- Termoterapia + CM	2	0	2
Total	15	8	3

* Variedade não definida.

** CM - Cultura de meristemas.

Com relação aos sintomas visuais do CsCMV nas folhas de mandioca, 8 das 15 plantas apresentavam mosaico foliar característico da infecção por CsCMV (Figura 30). Nas amostras do material "Pasquini", 3 plantas apresentavam sintomas de mosaico, enquanto que 2 embora se mostrassem assintomáticas, reagiram positivamente no teste de ELISA-indireto.

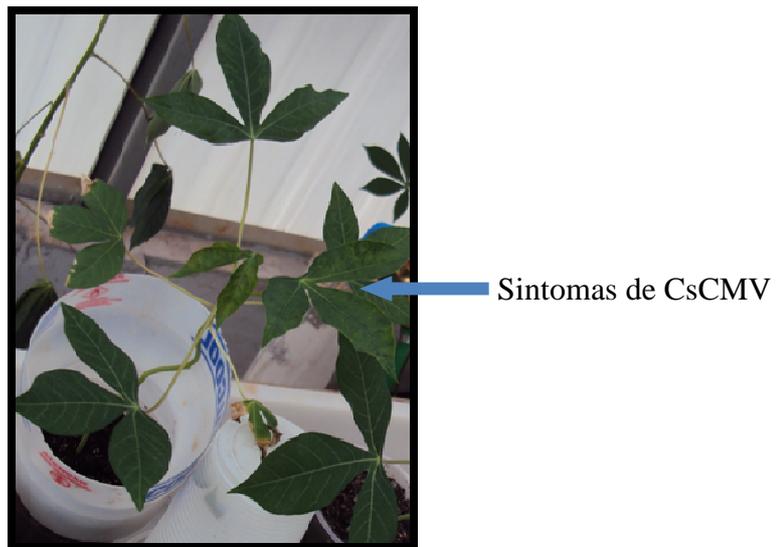


Figura 30 – Plântulas de mandioca do material "Pasquini" (variedade não definida) com sintomas causados pelo CsCMV.

Para a variedade Olho Junto, submetida à termoterapia, os sintomas foram observados em 2 plantas e, para esta mesma variedade utilizando a termoterapia associada à cultura de meristemas, os sintomas foram observados em 3 plantas. Nenhum sintoma foi observado nas plantas da variedade IAC 12, mas, ao submeter essas plantas ao teste de ELISA, estas reagiram positivamente, ou seja, mesmo sem apresentarem sintomas, estas plantas estavam infectadas por vírus (Tabela 8).

O vírus pode ser detectado em 4 das plantas que não apresentavam sintomas. Palazzo et al. (2006), utilizando diferentes variedades de mandioca da região Centro-Sul do país, constataram que o CsCMV pode permanecer assintomático nas plantas, pois diversas plântulas que não apresentavam sintomas da doença reagiram positivamente no teste de ELISA que realizaram.

As folhas de mandioca das variedades Olho Junto, IAC 19, IAC 12, Fécula Branca, Baianinha e do material "Pasquini" que ainda estavam em meio de cultura, também foram indexadas. Para isso, foram retiradas, sob condições assépticas e com auxílio de tesoura e bisturi, folhas jovens, maceradas em tampão-cobertura e diluídas a 1/300, com o antissoro produzido neste trabalho na diluição de 1/10.000.

Constatou-se que, dos 64 materiais indexados, 31 estavam livres do CsCMV (Tabela 9), ou seja, 40,97% dos materiais de mandioca provenientes das técnicas da termoterapia combinada com a cultura de tecidos estavam isentas de vírus, porém, esse número é dependente da variedade e da quantidade de plantas testadas. A variedade Olho Junto e o material "Pasquini" foram as que tiveram o maior número de amostras testadas, pois foram as que melhor se desenvolveram *in vitro*. Das 32 plantas da "Pasquini", 20 estavam isentas de vírus, ou seja, 62,50% de plantas sadias, livres do CsCMV. Para a variedade Olho Junto, das 27 plântulas indexadas, apenas 9 estavam isentas do CsCMV, um percentual de 33,33%. Já para as variedades IAC 90, IAC 12, Baianinha e Fécula Branca, como os explantes estavam pequenos e possuíam poucas folhas, apenas 1 planta das três primeiras variedades foram indexadas, enquanto que, da última variedade, somente 2. As plantas testadas das variedades IAC 90 e IAC 12 apresentaram-se infectadas por vírus; já a variedade Fécula Branca, das 2 plantas testadas, 1 estava isenta, enquanto que, para a variedade Baianinha, a única planta testada se mostrou livre de vírus.

Tabela 9 – Detecção do CsCMV por ELISA-indireto nas variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) Olho Junto, IAC 19, IAC 12, Fécula Branca, Baianinha e do material "Pasquini" obtidas por cultura de meristemas associada à termoterapia.

Variedades de Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	N° de Plantas		% de Plantas livres de vírus
	Indexadas (ELISA-indireto)	Livres de vírus	
Olho Junto	27	9	33,33
"Pasquini"*	32	20	62,50
IAC 90	1	0	0
IAC 12	1	0	0
Fécula Branca	2	1	50
Baianinha	1	1	100
Total	64	31	40,97

* variedade não definida.

Resultados semelhantes foram obtidos por Palazzo et al. (2006) que, ao utilizarem as técnicas da cultura de meristemas associada à termoterapia em variedades de mandioca, obtiveram em média 60,66% de plântulas de mandioca isentas de CsCMV nas variedades Fécula, Espeto, IAC 12, IAC 14 e IAC 15, 32,35% para as variedades Fibra, IAC 13, IAC 90 e Olho Junto, com variações de 16,6% a 50%, e, para a variedade Ouro do Vale, não foram obtidas plântulas sadias. Assim, estes autores obtiveram uma eficiência de aproximadamente 60% na eliminação do vírus entre as variedades testadas.

Kartha e Gamborg (1975) obtiveram 60% de eliminação da doença do mosaico da mandioca das cultivares Kalikalan e Ogunjobi de origem Indiana e Nigeriana, respectivamente. Em contrapartida, Adejere e Coutts (1981) obtiveram 80% de material livre de ACMV na Nigéria.

Assim, como Palazzo et al. (2006) enfatizam, apesar das técnicas de termoterapia e cultura de meristemas possibilitarem a obtenção de clones sadios, não são totalmente eficazes na eliminação do vírus, sendo indispensável o emprego de um teste complementar de indexação para identificar as plantas matrizes sadias.

5. CONCLUSÃO

O protocolo utilizado na micropropagação de mandioca, proposto por Roca et al (1991, apud, SOUZA et. al., 2008), associado à termoterapia, mostrou-se eficiente para a limpeza clonal das variedades Olho Junto, IAC 12 e para o material “Pasquini” (variedade não definida).

São necessários trabalhos complementares para determinação das melhores condições de cultivo *in vitro* para as demais variedades testadas.

O antissoro produzido para o CsCMV é altamente específico, e poderá ser utilizado na indexação de materiais propagativos de mandioca através do método ELISA-indireto, assegurando excelente qualidade fitossanitária do material produzido.

REFERÊNCIAS

ABAM-Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. **Produção por estado**. 2005. Disponível em: <http://abam.com.br/prod_amido_est_2005.php>. Acesso em: 8 out. 2009.

ABOUHAIDAR, M. G.; HUIMIN, X. U.; HEFFERON, K. L. Potexvirus Isolation and RNA Extration. In: FOSTER, G. D.; TAYLOR, S. C. (Orgs.). **Methods in molecular biology: plant virology protocols - from virus isolation to transgenic resistance**. Totowa: Humana Press Inc., 1998. p. 131-132.

ADEJARE, G. O.; COUTTS, R. H. A. Eradication of cassava mosaic disease from Nigerian cassava clones by meristem tip culture. **Journal of Plant Biotechnology**, Netherlands, v. 1, n. 1, p. 25-32, abr. 1981.

AGUIAR, E. B. **Produção e qualidade de mandioca de mesa (Manihot esculenta Crantz) em diferentes densidades populacionais e épocas de colheita**. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2003.

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo in vitro de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 363-366, abr./jun. 2000.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitovirologia. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Eds.) **Princípios e técnicas de diagnose aplicadas em Fitovirologia**. Fortaleza: SBF, 2001. p. 33-62.

ALVES, A. A. C.; SILVA, A. F. **Cultivo da mandioca para a região semi-árida**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003.

ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; RIBEIRO DE PAULA, J. C.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. I. A cultura de tecidos na agricultura. In: JORNADA CIENTÍFICA; FIPA CEFET, 6., 2008, Bambuí. **Anais...** Bambuí: Centro Federal de Educação Tecnológica, 2008. p.1-4.

ANDRADE, S. R. M. **Princípio da cultura de tecidos vegetais**. 1. ed. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. (Documento 58). Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br>>. Acesso: 20 out. 2009.

AMARAL, V. F. M.; **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

BALL, E.; HAMPTON, R.; BOER, S.; SHAAD, N. Polyclonal antibodies. In: HAMPTON, R.; BALL, E.; DE BOER, S. (Eds.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens: a laboratory manual.** St. Paul: APS Press, 1990. p. 33-54.

BARBOZA, A. A. L.; SILVA JÚNIOR, H. M.; SOUTO, E. R.; SILVA, C. M.; MARCUZ, F. S.; VIEIRA, R. A. Detecção do *Sugarcane mosaic virus* no Paraná, e limpeza somaclonal por cultura de tecidos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, p. 345-348, 2007.

BARRUETO CID, P.; CARVALHO, L. J. C. B.; SILVA, R. E. P.; SORIANO, L. Protocolo de micropropagação e conservação de 23 germoplasma de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Brasília, DF: EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 187).

BERCKS, R. Potato virus x. CMI/AAB. **Descriptions of plant viruses**, [S.l.], n. 4, 4 p., 1970.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1.

BOARI, A. J. **Avaliação do banco ativo de germoplasma de pimenteira-do-reino quanto a virose e elaboração de estratégia de controle.** 1. ed. Belém: EMBRAPA-Amazônia Oriental, 2008. (Documento 343). Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online>. Acesso em: 2 jul. 2009.

CALVERT, L. A.; CUERVO M. I.; OSPINA, M. D.; FAUQUET, C. M.; RAMIREZ, B. C. Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species; Short communication. **Journal of General Virology**, Great Britain, v. 77, p. 525-530, 1996.

CALVERT, L. A.; THRESH, J. M. The Viruses and Virus Diseases of Cassava. In: HILLOCKS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A.C. (Eds.). **Cassava: biology, production and utilization.** Wallingford: CABI Publishing, 2002. cap. 12, p. 237-260.

CEBALLOS, H.; CRUZ, G. A. A. Taxonomía e morfología de la yuca. In: OSPINA B.; CEBALLOS, H. (Eds.). **La Yuca en el tercer milenio.** Cali-Colombia: CIAT, 2002. p. 1-13.

CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A.; PEREZ, J. C.; DIXON, A. G. O. Cassava breeding: opportunities and challenges. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 56, n. 4, p. 503-516, 2004.

CHEN, W. Q.; SHERWOOD, J. L. Evaluation of Tip Culture, Thermo-therapy and Chemotherapy for Elimination of Peanut Mottle Virus from *Arachis hypogaea*. **Journal of Phytopathology**, Verlag, v. 132, n. 3, p. 230-236, maio 2008.

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

CLAUSEN, J. **Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules**. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1988.

COLARICCIO, A.; PERUCH, L. A. M.; PEREIRA, L. S.; POLA, A. C.; NEUBERT E. Primeiro relato do mosaico comum da mandioca em Santa Catarina. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13, 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu: CERAT/UNESP, 2009. p. 507-510.

CONCI, V. C.; NOME, S. F. Virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermo-therapy and meristem tip culture. **Journal Phytopathology**, Verlag, v. 132, n. 3, p. 186-192, 1991.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W. Cassava common mosaic virus. CMI/AAB. **Description of Plant Viruses**, [S.l.], n. 90, 4 p., jun. 1972.

DUVAL, C. M.; CALDAS, L. S.; RESENDE, R. O. Aplicações da cultura de tecidos na fitopatologia In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA- CNPH, 1998. v. 1, p. 45-68.

EL-SHARKAWY, M. A.; COCK, H. C.; PORTO, M. C. M. Características fotossintéticas da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 1, n. 2, p. 143-154, 1989.

FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production: Crops Primary - Cassava**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 12 jul. 2006.

FERREIRA, M. A.; CALDAS L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA SPI: EMBRAPA CNPH, 1998. v. 1, p. 21- 43.

FUKUDA, C. Doenças da mandioca. In: EMBRAPA-Centro Nacional de Mandioca e Fruticultura. **Instruções práticas para o cultivo de mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1993. p. 53-56.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. v. 1, 920 p.

GIBBS, A.; ARMSTRONG, J.; MACKENZIE, A. M.; WEILLER, G. F. The GPRIME package: computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridization-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. **Journal of Virological Methods** v. 74, n. 1, p. 67-76, set. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA CNPH, 1990. v. 1, p. 183-260.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: CURSO SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS, 1997, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA CNPH, 1997. p. 71-115.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Apostila de biotecnologia 1: cultura de tecidos vegetal – introdução ao conceito de biotecnologia**. Florianópolis: UFSC, 2006. (Material de apoio - 8º fase do curso de agronomia CCA). Disponível em: <<http://www.lfdgv.ufsc.br/Apostila.htm/>>. Acesso em: 15 ago. 2009.

GUO, J. Y.; LIU, Y. Rapid propagation of cassava by tissue culture and its applicatin in rural district in China. In: INTERNACIONAL SCIENTIFIC MEETING ON CASSAVA BIOTECNOLOGT NETWORK, 1994, Bogor. **Proceedings...** Bogor: [s.n.], 1994, v. 2, p. 183-189.

HANSEN, A. J.; AND LANE, W. D. Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. **Plant Disease**, [S.l.], v. 69, p. 134-135, 1985.

HAZAA, M. M.; EL-DOUGDOUG, Kh. A.; EL-MAATY, S. A. Eradication of Banana Viruses from Naturally Infected Banana Plants 2. Production of Certified Banana Plants and Virus Tested. **Journal of Applied Sciences Research**, [S.l.], v. 2, n. 10, p. 714-722, 2006.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia E Estatística. **Tabela 283: Produção vegetal e área colhida dos estabelecimentos agropecuários por tipo de produção vegetal – série histórica (1920/2006)**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=&i=P>>. Acesso em: 3 de set. 2009.

KARTHA, K. K.; GAMBORG, O. L. Eliminação da doença do mosaico da mandioca por cultura de meristemas. **Phytopathology**, [S.l.], v. 65, p. 826-828, 1975.

KASSANIS, B. Effects of changing temperature on plant virus diseases. **Advances Virus Resources**, [S.l.], v. 4, p. 221-241, 1957.

KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Partículas esféricas associadas ao vírus do mosaico das nervuras da mandioca. **Bragantia**, Campinas, v. 25, n. 18, p. 211-221, 1966.

KITAJIMA, E. W.; WETTER, C.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, D. M.; COSTA, A. S. Morfologia do vírus do mosaico comum da mandioca. **Bragantia - Boletim Científico do Instituto Agrônomo de São Paulo**, Campinas, v. 24, n. 21, p. 247-260, maio 1965.

KLEIN, R. E.; LIVINGSTON, C. H. Eradication of potato viruses X and S from potato shoot tip cultures with ribavirin. **Phytopathology**, [S.l.], v. 73, p. 1049-1050, 1983.

KOENIG, R.; PAUL, H. L. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, [S.l.], v. 5, p. 113-125, 1982.

LORENZI, J. O.; DIAS, C. A. C. **Cultura da mandioca**. Campinas: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI), 1993. (Boletim Técnico, n. 211).

LOZANO, J. C.; BELLOTTI, A.; REYS, J. A.; HOWELER, R.; LEIHNER, D.; DOLL, J. **Problemas en el cultivo de la yuca**. 2. ed. Brasília, DF: EMATER, 1983.

MABANZA, J.; RODRIGUEZ-ANDRIYAMASI, A.V.; MAHOUKA, J.; BOUMBA, B. Evaluation of MARYS, E.; IZAGUIRE-MAYORAL, M. L. Isolation and characterisation of a new Venezuelan strain of cassava common mosaic virus. **Annals of Applied Biology**, [S.l.], v. 127, p. 105-112, fev. 1995.

MARYS, E.; IZAGUIRE-MAYORAL, M. L. Isolation and characterisation of a new Venezuelan strain of cassava common mosaic virus. **Annals of Applied Biology**, [S.l.], v. 127, p. 105-112, 1995.

MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mandioca (Maninhota esculenta Crantz) In: KIMATI et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Editora Agrônoma Ceres Ltda, 1998. v. 2, 774 p.

MATTOS, P. L. P.; GOMES, J. C. **O cultivo da mandioca**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, 2000. (Circular Técnica, n. 37).

McMAHON, J. M.; WHITE, W. L. B.; SAYRE, R. T. Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 46, p. 731-714, 1995.

MEISSNER FILHO, P. E. **Vírus X do patchuli, caracterização biológica e molecular**. 1996. 172f. Tese (Doutorado)–Universidade de Brasília, Brasília, DF, 1996.

MERVAT, M. M.; FAR, E. L.; ASHOUB, A. Utility of Thermotherapy and Meristem Tip for Freeing Sweetpotato from Viral Infection. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Austrália, v. 3, n.1, p. 153-159, 2009.

MODGIL, M.; SHARMA, D. R.; BHARDWAJ, S. V. Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 81, p. 179-188, 1999.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, [S.l.], v. 25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. **Archives of Virology**, [S.l.], v. 10, n. 497, 568 p., 1995.

NOLT, B. L.; PINEDA, L. B.; VELASCO, A. C. Surveys of cassava plantations in Colombia for virus and virus-like diseases. **Plant Pathology**, [S.l.], v. 41, p. 348- 354, 1992.

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VALARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, 2000.

OLIVEIRA, R. P.; SILVA, S. O. Micropropagação massal em bananeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 4, p. 415-420, abr. 1997.

PALAZZO, S. R.; VALLE T.; FELTRAN, J. C.; COLARICCIO, A. Eliminação do *cassava common mosaic virus* - CsCMV por cultura de meristema associada a termoterapia; In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 19., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: [s.n.], 2006.

ROCA, W. M. Root and tuber crops. In: SHARPS, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture crop species**. New York: Macmillan Publishing Com, 1984. v. 2, p. 269-301.

RODRIGUES, A. R.; ALVES, J. M.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J. A. A.; RODRIGUES, G. S.; BARROS, M. M. A Avaliação da Capacidade de Enraizamento, em Água, de Brotações, Ponteiros e Estacas Herbáceas de Clones de Mandioca de Mesa. **Revista Brasileira de Agroambiente**, Boa Vista, v. 2, n. 1, p. 37-45, jan./jun. 2008.

SANJEEV, S.; BALWINDER, S.; GITA, R.; AIJAZ, A. Z.; VIPIN, H.; AVINASH, N.; GURDEEP, S. V. Production of indian citrus ringspot virus free plants of kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. **Journal Central European Agriculture**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

SANT'ANA, E. P.; FREIRE, A. B.; DIAS, M. D. Variação somaclonal em algumas características do grão e do ciclo da planta de arroz (*Oryza sativa* L.). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 336-345, mar./abr. 2001.

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *Pacovan*. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SEAB-Secretaria de Agricultura e do Abastecimento; DERAL-Departamento de Economia Rural. **Evolução da área colhida, produção, rendimento, participação e colocação Paraná/Brasil**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**: Centre for Agriculture and Biosciences International. Cambridge: Cambridge University Press. 1994.

SIDWELL, R. W.; HUFFAMN, J. H.; KHARE, G. P.; ALLEN, L. B.; WITKOWSKI, J. T.; ROBINS, R. K. Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. **Science**, [S.l.], v. 177, p. 705-706, 1972.

SILVA, R. P. Micropropagação e indução de crescimento secundário em raízes *in vitro* de diferentes genótipos de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). Brasília, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

SINCLAIR, T. R.; GARDNER, F. P. **Principles of Ecology in plant production**. New York: CAB International, 1998.

SOARES, M. B. B.; VALLE, T. L.; COLARICCIO, A.; FELTRAN, J. C.; VAZ LOBO, R. S.; MARTINS, A. L. M. Disseminação do Vírus do Mosaico Comum em área de mandioca (*Manihot esculenta* crantz.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 13., 2009, Botucatu. **Anais...** Botucatu: CERAT/UNESP, 2009. p. 394-398. Disponível em: <<http://www.cerat.unesp.br/compendio/artigos.html>>. Acesso em: 13 set 2009.

SOUZA, A. S.; PAZ, P. P.; MONTARROYOS, A. V. V.; GESTEIRA, A. S. Protocolo de micropropagação rápida da mandioca. **Biotecnologia em foco**, [S.l.], n. 8, 1995.

SOUZA, A. S.; SOUZA, F. V. D.; SEREJO, J. A. S.; JUNGHANS, T. G.; NETO, H. P. S. **Micropropagação da mandioca mediante ápice caulinares e segmentos nodais**. Cruz das Almas: EMBRAPA-Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. (Circular Técnica, n. 88).

SUTULA, C. L.; GILLET, J. M.; MORRISSEY, S. M.; RAMSDELL, D. C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. **Plant Disease**, [S.l.], v. 70, p. 722-726, 1986.

TAKAHASHI, M.; GONÇALO, S. A. Cultura da Mandioca INDEMIL. Paranavaí: [s.n.], 2001.

TASCON, A.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico comum da mandioca nos tecidos foliares de diferentes plantas hospedeiras. **Bragantia**, Campinas, v. 34, p. 5-10, 1975.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. O.; BUSO, J. A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering vírus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 18, n. 3, p. 192-195, 2000.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, D. M. C.; MOITA, A. W.; CAMPOS, M. A. Recuperação de plantas de batata-doce. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1996.

TORRES, A. C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de Ápices Caulinares e Recuperação de Plantas Livres de Vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA SPI: EMBRAPA CNPH, 1998. v. 1, p. 133-146.

VALDEIRA, M. L. Efeito da Ribavirina na replicação do vírus da peste suína africana. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, [S.l.]v. 96, n. 540, p. 183-189, 2001.

VAN REGENMORTEL, M. **Serology and Immunichemistry of Plant Viruses**. New York: Academic Press, 1982.

VASANTHI, V. J.; SHANMUGAM, V.; RAMIAH, M. Elimination of Indian cassava mosaic virus in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) through meristem tip culture and specific detection by serological means. **Journal of Horticulture**, Orissa, v. 29, n. 2, p. 69-74, 2001.

VAZ, R. L. Cultura de tecidos: potencial e aplicação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1985, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. v. 1, p. 9-10.

VELAME, K. V. C.; FILHO, P. E. M. Purificação e produção de anti-soro para o vírus do mosaico comum da mandioca. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, jul./dez. 2001.

WALKEY, D. G. A. **Applied Plant Virology**. New York: [s.n.], 1985.

YURI, J. E.; MOTA, J. H.; SOUZA, J. R.; RESENDE, G. M.; PASQUAL, M. Vernalização do alho para o cultivo *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 22, n. 3, p. 585-588, jul-set. 2004.

ZERBINI Jr, F. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução à Virologia vegetal**. Viçosa: UFV, 2002. (Caderno Didático – Ciências Agrárias).

ZETTLER, F. W.; HIEBERT, E.; ZAMBOLIM, E.; CHRISTIE R. G.; ABO EL-NIL, M. M. Potexvirus infecting *Nandina domestica* "Harbor dwarf". **Acta Horticulturae**, [S.l.], v. 110, p. 71-80, 1984.