

Catarina Corrêa Puttkammer

**Morfo-histodiferenciação de culturas nodulares de morangueiro
(*Fragaria ananassa* x Duch.) e análise molecular do “vírus da faixa
das nervuras do morangueiro”**

Dissertação submetida ao Programa de
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
mestre em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro
Guerra
Coorientador :Prof. Dr. Neusa Steiner

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Puttkammer, Catarina Corrêa

Morfo-histodiferenciação de culturas nodulares de morangueiro (*Fragaria ananassa* x Duch.) e análise molecular do "vírus da faixa das nervuras do morangueiro" / Catarina Corrêa Puttkammer ; orientador, Miguel Pedro Guerra, coorientador, Neusa Steiner, 2018.

77 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. micropropagação. 3. Virose de morangueiro. 4. vírus do bandeamento das nervuras do morangueiro. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Steiner, Neusa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

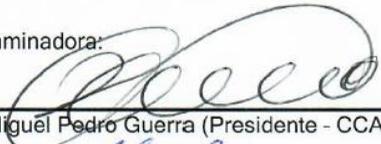
Morfo-histodiferenciação de culturas nodulares de morangueiro (*Fragaria ananassa* x Duch.) e análise molecular do "vírus da faixa das nervuras do morangueiro

por

Catarina Corrêa Puttkammer

Dissertação julgada e aprovada em 27/02/2018, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

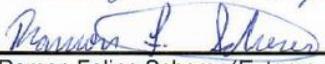
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Presidente - CCA/UFSC)



Dr. Angelo Schuabb Heringer (Interno - CCA/UFSC)



Dr. Ramon Felipe Scherer (Externo - EPAGRI/Itajai)



Dr. Gustavo Henrique Ferrero Klabunde (Externo - EPAGRI/SC)



Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2018

Dedico aos meus avós Eloy
Puttkammer (*in memoriam*), Amélia
Corrêa dos Santos (*in memoriam*) e
Nair Puttkammer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e por todas as oportunidades que tive.

Agradeço a UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais por toda a minha formação acadêmica. Ao meu orientador Miguel Pedro Guerra, por todos os ensinamentos e oportunidades nesses quase cinco anos de orientação. A minha co-orientadora, Neusa Steiner, nossas conversas e seus conselhos foram essenciais para minha formação.

Aos meus pais Arley e Mara, por todos os conselhos, toda a força, todo o amor e por muitas vezes colocarem a mão na massa comigo. Sem vocês eu não seria nada. A minha irmã, por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos em que eu achei que não conseguiria. Vocês três são a razão do meu viver e a motivação para qualquer conquista minha.

A minha vó Nair Puttkammer, por me fazer companhia durante a escrita deste documento e por me mimar desde pequena.

Ao Guilherme, meu namorado, que esteve pacientemente comigo nessa caminhada. As minhas amigas Marina Rubik, Gabrielli Vieira, Caroline Hawerth, Camila Goetzinger, Ana Volpato, Deize Fernandes e ao meu amigo Victor Feldman por sempre estarem comigo, me dando força e carinho. Vocês são incríveis.

A Vanessa e a Mariana que cuidaram da minha saúde com tanto zelo e carinho nesse final de mestrado.

A Clarissa Caprestano, por ser um anjo na minha vida e não cansar de mim. A Júlia Zappellini, por dividir comigo o conhecimento e me estender a mão quando eu mais precisei. Meninas, vocês foram essenciais nesse momento da minha vida, muito obrigada.

Ao Gustavo Klabunde, Newton Costa e Angelo Heringer por me ajudarem em muitas etapas do mestrado. A Vanessa Petry e ao Luciano Saifert por tantas dicas, conselhos, dias no laboratório e por dividir as angústias do mestrado comigo. Agradeço também ao Vinicius Vilperte pelo acesso remoto e pela amizade.

A Dani Werner, a Dani Goeten, ao Edison Cardona, ao Thiago Ornellas e ao Yohan Fritsche pela amizade, pelos momentos de descontração e pela parceria. Vocês fizeram meus dias mais leves e divertidos.

Aos demais amigos do LFDGV, vocês fizeram parte de muitos momentos da minha vida durante esses quase cinco anos e ficarão eternamente guardados em minhas lembranças.

A FAPESC, pela minha bolsa de estudos e pelos recursos para pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O morango é uma fruta amplamente consumida por seu aroma único, sabor adocicado, coloração e pelo seu valor nutricional. A produção do morangueiro gera grande rentabilidade econômica para os pequenos agricultores e tem expressiva relevância na pequena agricultura familiar do Estado de SC. Para uma produção de alta qualidade atributos associados ao valor genético e qualidade sanitária são fundamentais. Para a produção de mudas de morangueiro é recomendada a aquisição de plantas matrizes oriundas de técnicas de micropropagação. Estas técnicas permitem a produção massal de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária. A cultura do morangueiro é atingida por cerca de 26 vírus e similares, sendo os vírus com maior importância no Brasil: vírus da clorose marginal, vírus do encrespamento, vírus da faixa-das-nervuras e vírus do mosqueado. Esses vírus também são relatados como os mais importantes nas áreas produtoras dos EUA. Atualmente o método mais utilizado para a detecção de viroses em morangueiro é a RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), baseada em métodos moleculares. Porém ainda existem alguns problemas a cerca da detecção, devido a grande dificuldade de extração em morangueiro e amplificação de fragmentos virais fazendo com que os métodos sejam muitas vezes imprecisos e ineficazes. Desta forma, para a produção de mudas com alto padrão genético e fitossanitário, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos eficazes de micropropagação de morangueiro e detecção eficiente das principais viroses que acometem essa cultura. Com isso o objetivo do trabalho foi o de estudar a indução de culturas nodulares de morangueiro *Fragaria x ananassa* Duch. e caracterizar filogeneticamente através de técnicas moleculares o vírus SVBV.

Palavras-chave: viroses, culturas nodulares, morangueiro, SVBV

ABSTRACT

Strawberry is a fruit widely consumed for its unique aroma, sweet taste, coloring and for its nutritional value. Strawberry production generates great economic for small farmers and has high demand from the consumer market. For this reason, there is needed high quality fruit for commercialization, seedlings of high standard and in sufficient quantity because demand. In the production of strawberry seedlings is recommended the acquisition of matrices originating from micropropagation techniques. These techniques allow the mass production of seedlings with high genetic and phytosanitary quality, meeting the standards required for the production of strawberry matrices. The problem with viruses is not of great importance for plants propagated through seeds, but is aggravated when it comes to vegetative propagation, making up one of the main phytosanitary problems for the production of high quality and quantity seedlings. The strawberry crop is affected by about 26 viruses and the like, being the most important viruses in Brazil: strawberry mild yellow edge virus, strawberry crinkel virus, strawberry vein banding virus and strawberry mottle virus. These viruses are also reported as the most important in the USA producing areas. Currently the most widely used method for the detection of strawberry virus is the RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), based on molecular methods. However, there are still some problems about detection, due to the great difficulty of extraction in strawberry and amplification of viral fragments making the methods are often imprecise and ineffective. Thus, for the production of seedlings with high genetic and phytosanitary standards, it is necessary to develop efficient protocols for micropropagation of strawberry and efficient detection of the main viruses that affect this crop. The objective of the work was to study the induction of nodular cultures of strawberry *Fragaria x ananassa* Duch. and characterize phylogenetically through molecular techniques the SVBV virus.

Keywords: viroses, nodular cultures, strawberry, SVBV.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Morfologia do Morangueiro.....27

CAPÍTULO 1

Figura 1. Indução das culturas nodulares por meio de secções foliares de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) aos 0, 14, 28 e 42 dois dias da indução..... 45

Figura 2. Formação dos policentros e acúmulo de amido aos 42 dias após a indução de culturas nodulares em morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.).....46

Figura 3. Reações histoquímicas de culturas nodulares em morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.).....48

CAPÍTULO 2

Figura 1. Plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) infectadas por viroses..... 55

Figura 2. Sequência genética parcial do gene da proteína do capsídeo do vírus SVBV (*Strawberry vein banding vírus*) sequenciado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV – UFSC).....62

Figura 3. Árvore Neighbor joining baseada na sequencia parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV)..... 63

Figura 4. Árvore de Máxima Verossimilhança baseada na sequencia parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV)..... 63

Figura 5. Inferência Bayesiana baseada na sequencia parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV).....64

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Programa para reação de cDNA.....	57
Tabela 2: Primers desenhados pelos autores para a amplificação de fragmentos de cDNA dos vírus de morangueiro.....	58
Tabela 3: Códigos do GenBank utilizados para a análise filogenética do Vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV).....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 MORANGUEIRO.....	27
2.2 MICROPROPAGAÇÃO.....	29
2.3 MICROPROPAGAÇÃO EM MORANGUEIRO.....	31
2.4 VIROSES EM MORANGUEIRO.....	31
2.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO.....	34
2.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE CULTURAS NODULARES DE MORANGUEIRO (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....	39
4.1 INTRODUÇÃO.....	40
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.2.1 Material vegetal.....	41
4.2.2 Indução das culturas in vitro.....	41
4.2.3 Acompanhamento e análises morfo-histológicas das culturas.....	42
4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.4 CONCLUSÕES.....	49
5. SEQUÊNCIA PARCIAL E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO VÍRUS DA FAIXA-DAS-NERVURAS DO MORANGUEIRO (SVBV).....	51
5.1 INTRODUÇÃO.....	52
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5.2.1 Material Vegetal.....	54
5.2.2 Extração, quantificação e qualidade do RNA total.....	55
5.2.3 Precipitação do RNA total.....	56

5.2.4 Digestão do DNA.....	56
5.2.5 Construção do cDNA.....	56
5.2.6 Amplificação dos fragmentos de cDNA.....	57
5.2.7 Purificação e sequenciamento do cDNA.....	58
5.2.8 Análise filogenética.....	59
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.4 CONCLUSÃO.....	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O morango é uma fruta amplamente consumida em todo o mundo pelo seu aroma característico, sabor adocicado, coloração e valor nutricional (Wang *et al.*, 2015). A produção do morangueiro gera expressiva rentabilidade econômica para os agricultores e possui alta exigência e demanda do mercado consumidor (Fachinelo *et al.*, 2011). A produção em um hectare de morangueiro pode-se arrecadar até R\$ 180.000,00 (Reisser Junior *et al.*, 2015).

No Brasil são utilizadas mudas provenientes de viveiros do Chile e Argentina, mudas produzidas por viveiristas locais e mudas produzidas pelo agricultor. As mudas-matrizes são, normalmente, adquiridas de laboratórios de culturas de tecidos credenciados, plantadas em campo aberto durante a primavera e os estolões (novas mudas) são coletados no início do outono para então serem utilizados na produção (Antunes e Reisser Junior, 2007). Segundo a instrução normativa número 14 (abril/2008) do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), é proibido o uso de mudas produzidas diretamente das plantas de produção e institui que mesmo para a produção de mudas na propriedade devem ser adquiridas mudas matrizes de laboratórios credenciados pelo MAPA para os cultivos integrados de morangueiro.

A cultura do morangueiro é afetada por cerca de 26 vírus e similares, sendo quatro as viroses com maior importância no Brasil: vírus da clorose marginal do morangueiro (SMYEV), vírus do encrespamento (SCV), vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro (SVBV) e vírus do mosqueado do morangueiro (SMoV) (Ueno, 2004). Esses vírus também são relatados como os mais importantes nas áreas produtoras dos EUA (Martin e Tzanekis, 2006). O problema com viroses não é de grande importância para plantas propagadas por sementes, porém se agrava quando se trata de plantas com propagação vegetativa (Panattoni, Luvisi e Triolo, 2013), compondo um dos principais problemas fitossanitários para a produção clonal em larga escala de mudas de alta qualidade (Wang *et al.*, 2008).

Neste contexto, pela necessidade de frutas de alta qualidade para a comercialização, são exigidas mudas de alto padrão e em quantidade suficiente para atender a demanda (Dias *et al.*, 2014). Na produção de mudas de morangueiro é recomendada a aquisição de plantas matrizes oriundas de técnicas de cultura de tecidos e órgãos (Antunes e Filho, 2005). Estas técnicas permitem a produção de mudas em larga escala e com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo os padrões

necessários para a produção de matrizes de morangueiro (Dias et al., 2014).

As mudas matrizes de morangueiro utilizadas atualmente são produzidas em viveiros-telados a partir de matrizes provenientes de culturas *in vitro* de meristemas (Brahm e Oliveira, 2004). As células meristemáticas comumente são livres de vírus, pois possuem rápida multiplicação celular (Brison et al., 1997). Contudo, a técnica de cultura de meristemas tem sido trocada devido à grande dificuldade de excisão dos meristemas, por serem pequenos (Wang e Valkonen, 2009).

A utilização de mudas sadias é o melhor método de controle, porém como não existem sintomas que caracterizem os quatro principais vírus que acometem a cultura (Thompson et al, 2003) são necessários estudos de caracterização molecular destes vírus (Martin e Tzanetakis, 2006). Entretanto, ainda existem problemas na detecção das viroses em morangueiro devido a fatores como: a grande quantidade de compostos fenólicos que dificultam ou até impossibilitam a amplificação de fragmentos de DNA/RNA (Thompson et al, 2003); a grande taxa de mutação viral e o uso de primers degenerados (Holland et al, 1982) e a fase de infecção (Posthuma *et al*, 2002).

Desta forma, são necessários estudos de caracterização viral que complementem os já existentes, assim como o desenvolvimento de protocolos mais eficientes para a produção de mudas de morangueiro com alta qualidade genética e fitossanitária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MORANGUEIRO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família Rosaceae, gênero *Fragaria* e é um híbrido proveniente do cruzamento das espécies americanas *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Silva, Dias e Maro, 2007), sendo o morango atualmente cultivado um octaploide (Debnath e Silva, 2007).

Fragaria x ananassa é uma planta herbácea estolonífera, com caule semi-subterrâneo e possui folhas trifoliadas que se originam de forma helicoidal (figura 1A) (Silva, Dias e Maro, 2007). A coroa, parte que se sobressai do solo, dá origem a gemas que podem formar inflorescências, estolões ou uma nova coroa, dependendo do fotoperíodo e da temperatura a qual a planta é submetida (Silva, Dias e Maro, 2007). O morangueiro possui flores hermafroditas com pétalas brancas ou avermelhadas (figura 1B), variando de acordo com a cultivar. O receptáculo floral, após a fecundação, se desenvolve formando o que é chamado de pseudofruto, os frutos verdadeiros, pequenos aquênios, ficam sobre o receptáculo proeminente (figura 1C) (Hoffman e Bernardi, 2006).

Figura 1: Morangueiro (*Fragaria x ananassa*). A) Planta de morangueiro; B) Flor de morangueiro; C) Pseudofruto e aquênios (frutos verdadeiros). Fonte: o autor.



Fonte: Próprio autor

Antigamente o cultivo de morangueiro era feito em jardins e tinha fins ornamentais e medicinais na Europa; hoje seu cultivo ocorre em todo mundo e os programas de melhoramento genético geraram cultivares adaptadas aos mais diversos ambientes e condições de cultivo (Silva, Dias e Maro, 2007). Os consumidores possuem amplo conhecimento sobre esta fruta, em parte pelas suas diferentes formas de

processamento e utilização, seja *in natura* ou na forma de compotas, geleias, sorvetes, polpas e sucos (Facchinelo *et al.*, 2011).

A principal forma de propagação da espécie é vegetativa, a partir dos estolões que crescem sobre a superfície do solo, emitem raízes e dão origem a novas plantas (Hoffmann e Bernardi, 2006). A formação dos estolões ocorre ao final da primavera e durante o verão devido aos estímulos provocados por altas temperaturas e dias mais longos. Apesar de ser um processo natural que ocorre nos plantios, a recomendação é que periodicamente sejam adquiridas mudas de viveiros credenciados, de preferência anualmente, pois durante o ciclo de produção de frutos é comum a incidência de pragas e patógenos sistêmicos de difícil controle, que são transmitidas às gerações seguintes, diminuindo a produtividade e aumentando os custos da produção (Assis, 2004).

As mudas matrizes, que darão origem as mudas de plantio comercial, devem ter alta qualidade genética, serem livres de patógenos e pragas, com atenção especial às viroses e outros organismos difíceis de serem erradicados. Em estudos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC – Campinas) na década de 60, foi demonstrado que as mudas de morangueiro livres de vírus eram capazes de produzir o dobro de frutos quando comparadas à mudas infectadas por vírus, desta forma iniciou-se a conscientização para que as mudas fossem produzidas com cuidados adequados e as matrizes adquiridas de viveiristas certificados (Assis, 2004). Hoje em dia, grande parte das mudas matrizes são oriundas de laboratórios de culturas de tecidos (Assis, 2004).

A utilização de mudas sadias, além de aumentar a produtividade, também é importante para que a cultura responda melhor as tecnologias empregadas no cultivo. Essas mudas devem produzidas em viveiros-telados a partir de matrizes provenientes de culturas *in vitro* de meristemas. No Brasil existem poucos laboratórios que fazem a micropropagação de morangueiro e assim não atendem a demanda por mudas, sendo que 80% das mudas utilizadas são provenientes de viveiros da Argentina e do Chile (Brahm e Oliveira, 2004).

Apesar do Brasil não estar listado entre os maiores produtores de morango no mundo até o ano de 2013 (FAO, 2016), nos últimos anos, a produção desta fruta tem aumentado expressivamente devido às condições ambientais favoráveis ao cultivo e a produção ao longo de todo o ano, devido ao melhoramento de cultivares (Dalagnol, 2010). No Brasil, o maior produtor de morango é Minas Gerais, com produção concentrada na região sul do estado devido às características edafoclimáticas que favorecem a cultura (Silveira e Guimarães, 2014). A área plantada, no Brasil em 2015, era de aproximadamente 4.000

hectares, com produção estimada em 105 mil toneladas de frutos por ano e produtividade média de 30 toneladas por hectare plantado (Reisser Junior et al, 2015).

Santa Catarina não possui produção expressiva de pequenas frutas, sendo seu mercado suprido por outros estados. Em um levantamento acerca da produção catarinense de morango no ano de 2006, foram verificados o cultivo em 29 municípios, 363 produtores envolvidos e 128,6 ha com produtividade média de 28,4 t/ha variando entre 12 e 60 t/ha conforme o clima da região e o sistema de cultivo. Porém, 78,5% da produção do estado se concentra nos municípios de Rancho Queimado, Águas Mornas e Água Doce (Nesi, Verona e Grossi, 2008).

2.2 MICROPROPAÇÃO

Cultura de tecidos é a cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes sobre condições químicas e físicas definidas *in vitro* (Thorpe, 2007) ou ainda, a ciência de recrescer células, órgãos e tecidos de plantas isoladas da planta mãe em meio artificial (George, 2008). É parte de um grande grupo de estratégias e tecnologias chamado biotecnologias de plantas e tem diversas abordagens como, por exemplo, melhoramento de plantas, hibridização, haploidia e clonagem de mudas em larga escala (Brown e Thorpe, 1995).

Os tecidos ou órgãos utilizados para iniciar as culturas são chamados de explantes. A parte da planta em que serão retirados esses explantes depende do tipo de cultura que será iniciada, da espécie utilizada e do propósito para a qual se está iniciando a cultura (George, 2008). As décadas de 40, 50 e 60 do século passado foram essenciais para o avanço e o desenvolvimento de novas tecnologias (Thorpe, 2007) e tornou-se possível regenerar um grande número de plantas através de explantes ou calos de diversas espécies através de micropropagação (Brown e Thorpe, 1995). Os dois fatores mais importantes para o sucesso de um protocolo de micropropagação são o meio de cultura e o tipo de explante (Gamborg et al, 1976).

As duas rotas morfogênicas *in vitro* mais utilizadas são a embriogênese e a organogênese. A diferenciação de células de plantas *in vitro*, formando órgãos (raízes, brotos) e originando novas plantas, é chamado de organogênese (Andrade, 2012). A formação de embriões *in vitro* sem que ocorra a fusão de gametas ou de células gametofíticas, a partir de um tecido somático, é chamada de embriogênese somática, é

um processo que ocorre também naturalmente através da apomixia (Merkle, Parrott e Flinn, 1995).

A descoberta do balanço hormonal auxina-citocina descrito por Skoog e Miller (1957) foi um ponto-chave para entender e regular mecanismos morfogênicos de plantas *in vitro* (Thorpe e Biondi, 1981). A formação tanto de órgãos quanto de embriões somáticos pode ser direta, formando os órgãos ou embriões diretamente do explante, ou indireta, formando massas de células desorganizadas (calos) a partir do explante (George e Debergh, 2008).

Entretanto, culturas nodulares tem sido proposta como uma terceira rota morfogênica, sendo relatadas em trabalhos com bromeliáceas (Fermino Júnior et al, 2014; Souza et al, 2016; Scherer et al, 2013; Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco et al., 2011; Alves, Dal Vesco e Guerra, 2006; Teng, 1997), chicória (Pierón, Belaizi e Boxus, 1993), eucalipto (Trindade e Pais, 2003; Warrag, Lesney e Rockwood, 1991), álamo (McCown et al, 1987) e lúpulo (Batista et al, 2000). Nas culturas nodulares, os nódulos são clusters densos de células que formam uma unidade coesa e mostra uma estrutura celular interna diferenciada, são independentes e esféricos. Em álamo esses clusters possuem no mínimo três tipos celulares (células meristemáticas, células parenquimáticas com plastídios densos e elementos vasculares) e duas camadas de células (McCown et al, 1987). É comum a formação de centros organizacionais, descritos como áreas de vascularização circundadas por três a cinco camadas de células meristemáticas (Batista et al, 2000; Souza et al, 2016). Esses centros são formados continuamente e ficam dispersos em células parenquimáticas (Batista et al, 2000). As culturas nodulares formam eixos monopolares e podem dar origem a brotos ou raízes (Souza et al, 2016).

Independente da rota morfogênica, as vantagens da micropropagação incluem principalmente: o uso de pequenos pedaços de plantas e pequenos espaços para iniciar o cultivo; a possibilidade de produzir plantas livres de vírus e outras pragas; a realização das atividades sob condições controladas de cultivo; a possibilidade de produzir clones de forma mais eficiente que outros métodos, além de possibilitar a aquisição de características específicas durante o cultivo *in vitro* (no morangueiro, por exemplo, pode induzir o número de estolões para a produção de mudas macropropagadas); a produção constante devido as condições controladas de cultivo e a capacidade de conservar microplantas por longos períodos de tempo; a requisição de menor energia e espaço, entre outros (George e Debergh, 2008). Porém algumas desvantagens também devem ser discutidas, como a

necessidade de métodos específicos e caros e a necessidade de um período de adaptação (aclimatização) devido à baixa capacidade fotossintética das plantas *in vitro* e a maior sensibilidade à desidratação das microplantas em ambientes *ex vitro* (George e Debergh, 2008).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO EM MORANGUEIRO

A propagação via estolões não é um método adequado de propagação de morangueiro, pois além de acumular diversas doenças também não possui produção suficiente para suprir o mercado (Mozafari e Gerdakaneh, 2012). Desta forma, a planta matriz deve ser originada de material de propagação proveniente de propagação *in vitro* (Brasil, 2012).

A infecção viral em plantas depende de três fatores principais, a capacidade de replicação viral, o movimento do vírus entre as células e a capacidade do vírus ser transportado a longas distancias através do floema (ROJAS *et al.*, 2016), por isso, células meristemáticas comumente são livres de vírus (Brison *et al.*, 1997). Boxus (1974) desenvolveu o primeiro estudo com micropropagação de morangueiro, através da indução de meristemas, porém, em morangueiro, a técnica de cultura de meristemas tem sido trocada devido à grande dificuldade de excisão dos meristemas, por serem pequenos e facilmente perdem sua capacidade de multiplicação devido a excisões realizadas erroneamente (Wang e Valkonen, 2009). Nesse sentido, protocolos de micropropagação de morangueiro com diferentes explantes são alvos de estudos, são utilizadas folhas (Hanhieva, Kokko e Kärenlampi, 2005; Omar *et al.*, 2013; Debnath, 2008; Mohamed *et al.*, 2007; Nehra, Stushnoff e Kartha, 1990; Zhang, Folta e Davis, 2014), pétalas (Omar *et al.*, 2013; Debnath, 2008), sépalas (Debnath, 2008), segmentos nodais (Shakila *et al.*, 2007) e meristemas (Mohamed *et al.*, 2007; Bhanker *et al.*, 2008).

2.4 VIROSES EM MORANGUEIRO

Em morangueiro as viroses transmitidas por afídeos são as mais importantes e mais bem estudadas, tanto na caracterização do vírus quanto na epidemiologia (Tzanetakis e Martin, 2013), pois são as mais críticas para a manutenção de plantas matrizes livres de vírus, devido ao longo período que essas plantas permanecem no campo. São sete as viroses descritas para o morangueiro e transmitidas por afídeos (Martin e Tzanetakis, 2006), incluindo as quatro doenças virais de maior

importância no Brasil: vírus da clorose marginal do morangueiro (SMYEV, do inglês *Strawberry Mild Yellow Edge Virus*), vírus do encrespamento (SCV, do inglês *Strawberry Crinkle Virus*), vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro (SVBV, do inglês, *Strawberry Vein Banding Virus*) e vírus do mosqueado do morangueiro (SMoV, do inglês, *Strawberry Mottle Virus*) (Ueno, 2004; Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005). Esses vírus também são relatados como os mais importantes em grandes produtores desta fruta, como os EUA (Martin e Tzanetakis, 2006).

O principal vetor das viroses em morangueiro é o pulgão *Chaetosiphon fragaefolli* (Tzanetakis e Martin, 2013). A infecção de plantas por vírus depende de três fatores principais, a capacidade de replicação viral, o movimento do vírus entre as células e a capacidade de o vírus ser transportado a longas distancias através do floema (Rojas *et al.*, 2016).

O morangueiro quando é infectado por apenas um vírus, normalmente, não apresenta sintomas característicos, porém, no campo, dificilmente uma planta é infectada por apenas um tipo de vírus, sendo comum a formação de complexos virais (Martin e Tzanetakis, 2006). Com isso, o ataque por viroses em morangueiro pode reduzir em até 80% a produção e levar as plantas ao declínio (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005).

O SCV pertence à família Rhabdoviridae (Thompson *et al.*, 2003) e é um dos vírus mais agressivos em morangueiro, e mesmo sem apresentar normalmente sintomas característicos nas folhas, pode reduzir tamanho, vigor e produtividade do morangueiro. Suas estirpes variam de fraca a severa, sendo todas as cultivares utilizadas atualmente suscetíveis a ele. Além disso, é um vírus persistente e uma vez que um pulgão adquire o vírus pode transmitir para diversas plantas ao longo da vida, tendo sua disseminação favorecida pelo tempo quente (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005; Martin e Tzanetakis, 2006). Se a infecção for causada por estirpes fortes pode apresentar sintomas como: deformação das folhas, pecíolo distorcido, folhas com pontos cloróticos, diminuição do tamanho da folha, entre outros (Martin e Tzanetakis, 2006). Suas partículas são envelopadas e baciliformes, com comprimento entre 190 e 380 nm e diâmetro entre 74 e 88 nm (Hunter, 1990). Seu genoma ainda não está completamente sequenciado, porém já existem sequências parciais depositadas no *Genbank*. O gene RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) foi sequenciado e tem um comprimento de 1368 nucleotídeos (Klerks *et al.*, 2004).

Já o SMYEV, do gênero *Potexvirus* (Thompson et al, 2003), é o vírus de morangueiro mais disseminado, ocorrendo até em populações de *F. chiloensis* em áreas remotas no Chile, distantes de outras populações e cultivos. Normalmente o SMYEV forma complexos com outras doenças virais e junto com os outros três vírus citados pode levar a planta ao declínio. Seus sintomas variam de acordo com a estirpe viral e a cultivar afetada e comumente são clorose foliar, quando em estirpes mais fortes as plantas podem apresentar nanismo, formação de frutos pequenos e deformação das folhas (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005; Martin e Tzanetakis, 2006). A sequência completa desse vírus tem comprimento de 5970 nucleotídeos (Thompson, 2004) e suas partículas tem entre 550 e 600 nm de comprimento (Cho et al, 2011).

Assim como o vírus da clorose marginal, o SMoV é semi-persistente, comumente encontrado e geralmente forma complexos virais, porém na maioria dos casos é assintomático e em estirpes mais fortes pode apresentar redução de 30% da produção (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005; Martin e Tzanetakis, 2006). As partículas desse vírus são hexagonais e tubulares com diâmetro aproximado de 28 nm e possuem aparências fráglil. É composto por duas cadeias de RNA, sendo o RNA1 é um ORF (*open reading frame*) que possui um comprimento de 7036 de nucleotídeos e o RNA2 um comprimento de 5619 de nucleotídeos (Thompson et al, 2002).

O SVBV pertence ao gênero *Caulimovirus* e tem cadeia circular dupla de DNA (Vasková et al, 2004). Os sintomas na planta são manchas cloróticas ao longo das nervuras principais, além disso, folhas mais velhas apresentam-se retorcidas, com manchas e estrias. Esses sintomas variam entre latentes até plantas totalmente necrosadas (Vasková, Spak e Petrzik, 2006). Quando a planta está infectada ocorre a diminuição da produção de estolões, menor produção e qualidade de frutos. É um vírus de baixa ocorrência nas áreas produtoras no Brasil (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005) e na Europa é considerada uma doença quarentenária (Vasková, Spak e Petrzik, 2006). Quando a infecção é mista, as perdas são mais drásticas e os sintomas mais severos (Martin e Tzanetakis, 2006). Kitajima, Betti e Costa (1973) visualizaram em microscopia eletrônica de transmissão partículas do SVBV com perfil anelar de 40 a 45 nm de diâmetro e Petrzik et al (1998), sequenciaram o genoma completo do SVBV o qual contém 7876 pares de bases.

2.5 MÉTODOS DE DETECÇÃO

Não são reportados na literatura resistência ou imunidade a nenhum dos quatro vírus descritos e a detecção visual e identificação individual das infecções virais nas cultivares comerciais é quase impossível, uma vez que não há descrição de sintomas característicos para as doenças. Uma alternativa seria a indexação em plantas indicadoras, porém, de acordo com Thompson *et al.* (2003), como comumente há a infecção mista a identificação confiável através desta metodologia é dificultada.

Assim, iniciaram-se os estudos de caracterização molecular das principais viroses em morangueiro, sendo que atualmente os principais métodos utilizados para a detecção de viroses em morangueiro são a RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e teste ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) (Martin e Tzanetakis, 2006). Para viroses em gerais há também métodos como a PCR convencional, a PCR em tempo real, dot-ELISA e indexação em plantas (Fajardo e Nickel, 2015).

Entretanto, os estudos das viroses em morangueiro têm se mostrado relativamente problemáticos, principalmente por ser uma planta que produz grande quantidade de compostos fenólicos, que podem inativar a Taq polimerase, não amplificando os fragmentos de DNA/RNA (Thompson et al, 2003). Além disso, a grande taxa de mutação viral faz com que muitas vezes sejam utilizados primers degenerados, aumentando a complexidade da detecção (Holland et al, 1982). Por isso, apesar de já terem sido sequenciadas as quatro principais viroses, ainda existem insucessos na detecção através de ferramentas moleculares (Chang et al, 2007).

Outro fator importante é a fase de infecção em que o vírus se encontra. Os vírus têm uma fase de grande transcrição e replicação, chamada de fase aguda de infecção. Quando os sintomas começam a ser menos severos, na chamada fase crônica de infecção é possível que seja mais difícil detectar o vírus (Posthuma *et al.*, 2002). Além disso, a grande taxa de mutação viral faz com que muitas vezes sejam utilizados primers degenerados, aumentando a complexidade da detecção (Holland et al, 1982). Por isso, apesar de já terem sido sequenciadas as quatro principais viroses, ainda existem insucessos na detecção através de ferramentas moleculares (Chang et al, 2007).

2.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA

O entendimento de relações evolutivas, identificação e relacionamento entre espécies são estudados através da filogenia. Esses estudos podem ser feitos para identificar características similares e definir a relação histórica ou evolucionária, incluindo fragmentos de DNA ou genes (Buso, 2005).

Os dados moleculares inovaram as formas de obtenção de dados para análises filogenéticas, substituindo as principais fontes de informações comumente utilizadas (morfológicas, geográficas, comportamentais ou ontogênicas). Defensores de técnicas moleculares afirmam que essa é a melhor forma de conhecer a história filogenética (Page e Holmes, 1998). Nesse sentido, análises comparativas de sequências podem auxiliar na elucidação das relações entre grupos de vírus aparentemente distantes (Koonin e Dolja, 1993).

Apesar de um grande número de dados sobre sequências de RNA viral, ainda é pouco conhecido sobre como ocorre a substituição de nucleotídeos e qual é o processo de evolução desses agentes (Jenkins, 2002). RNA vírus geralmente possuem uma alta taxa de mutação e por este motivo os genomas de RNA evoluem muito mais frequentemente do que genomas de DNA (Holland et al, 1982). A taxa de evolução depende das taxas de mutações e replicação do vírus (Jenkins, 2002).

Análises filogenéticas tem se mostrado uma ferramenta importante para a comparação de genomas (Yang e Rannala, 2012) e para conhecer o mecanismo de substituição de nucleotídeos e evolução dos vírus, que ainda são pouco conhecidos, apesar do crescimento no conhecimento de sequências de RNA e DNA viral (Jenkins, 2002). Muitos são os métodos para análise filogenética, fazendo com que a escolha da análise mais adequada seja uma tarefa difícil (Huelsenbeck, 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a indução de culturas nodulares de morangueiro *Fragaria x ananassa* Duch. e caracterizar filogeneticamente através de técnicas moleculares o vírus SVBV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar análises morfo-histológicas para a confirmação da rota regenerativa baseada em culturas nodulares.
- Verificar o acúmulo de substâncias de reserva durante o desenvolvimento inicial de culturas nodulares de morangueiro.
- Sequenciar as cepas dos vírus SCV, SVBV, SMYEV e SMoV recebidas no LFDGV/ UFSC.
- Compreender as relações evolutivas entre a cepa do vírus SVBV mantido no LFDGV/UFSC e os demais acessos deste vírus depositados no GenBank.

4 MORFO-HISTODIFERENCIAÇÃO DE CULTURAS NODULARES DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch.)

RESUMO

O morango é uma fruta amplamente consumida devido suas características de aroma e sabor. Técnicas de cultura de tecidos são ferramentas úteis para sua propagação clonal em larga escala. Os primeiros relatos de micropropagação de morangueiro foram feitos nos anos 70 e para o melhor desenvolvimento dos protocolos de micropropagação são necessários estudos histológicos visando a elucidação das rotas morfogenéticas. O presente trabalho objetivou descrever morfo-histologicamente a indução de culturas nodulares de morangueiro. A formação destas culturas foi observada a partir dos 14 dias após a indução e através de métodos histológicos foi possível observar como ocorre a desorganização do mesófilo foliar e a formação de novas células, agrupadas em centros organizacionais. Através de análises histoquímicas, foi observado também acúmulo de substâncias de reserva nas células, principalmente amido, formadas durante a fase de indução.

ABSTRACT

Strawberry is a widely consumed fruit because of its aroma and flavor characteristics. Tissue culture techniques are useful tools for large-scale clonal propagation. The first reports of micropropagation of strawberry were made in the 1970s and for the better development of micropropagation protocols, histological studies are needed to better understand the morphogenetic routes. The aim of the present study was to describe morphologically the induction of nodular cultures of strawberry. The formation of these cultures was observed 14 days after induction and through histological methods it was possible to observe how disorganization of the foliar mesophyll occurs and the formation of new cells, grouped in organizational centers. Through histochemical analysis it was also observed the accumulation of reserve substances in cells, mainly starch, which occurred in the induction phase.

4.1 INTRODUÇÃO

O morango é uma fruta amplamente consumida em todo o mundo pelo seu aroma único, sabor adocicado, coloração e valor nutricional (Wang *et al.*, 2015). A sua principal forma de propagação é vegetativa, ocorrendo através dos estolões que crescem sobre a superfície do solo, emitem raízes e dão origem a novas plantas (Hoffmann e Bernardi, 2006). É comum a ocorrência de viroses ou outros patógenos em espécies propagadas vegetativamente (Nukari *et al.*, 2009), por isso, na produção de mudas de morangueiro é recomendada a aquisição de plantas matrizes oriundas de técnicas de cultura de tecidos (Antunes e Filho, 2005). Estas técnicas permitem a produção de mudas em larga escala e com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo os padrões necessários para a produção de matrizes de morangueiro (Dias *et al.*, 2014).

Boxus (1974) descreveu o primeiro relato de micropropagação *in vitro* de morangueiro. Desde então, diferentes protocolos têm sido desenvolvidos para o aperfeiçoamento da técnica e obtenção de maior número de brotos. As principais rotas morfogenéticas utilizadas *in vitro* são a organogênese e a embriogênese somática. A organogênese é caracterizada pela reorganização celular nos tecidos, que servem de explante inicial, e o surgimento de novos órgãos onde antes eles não existiam, podendo ocorrer de duas maneiras: a formação direta de células diferenciadas a partir de um tecido vegetal (organogênese direta) ou a formação de células indiferenciadas chamadas de calos (organogênese indireta) (Lemos, 2010). Já a embriogênese somática consiste na formação de embriões a partir de células somáticas podendo ser direta ou indireta como ocorre na organogênese (Zimmermann, 2010).

Porém uma terceira rota morfogenética denominada culturas nodulares têm sido proposta. Elas são definidas como aglomerados de nódulos friáveis, de coloração translúcida amarelo-esverdeada e que evoluem para o desenvolvimento de gemas e brotos (Dal Vesco e Guerra, 2010). Elas são definidas pela presença de duas características anatômicas principais: a) nódulos formados por massas celulares, independentes, sendo que as células de um nódulo não se separam a não ser para a formação de nódulos menores; b) diferenciação do tecido com pelo menos duas camadas celulares e três tipos de células diferentes. A formação de culturas nodulares foi relatada para várias espécies de bromeliáceas, tais como *Bilbergia zebrina*, *Ananas comosus*, *Vriesia reitzii*, *Bilbergia Thunb.* (Dal Vesco e Guerra, 2010; Dal Vesco *et al.*,

2011; Scherer *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2016) e em dicotiledôneas, como o lúpulo (Batista *et al.*, 2000).

Diferenças nos meios de cultura, desenvolvimento e idade da planta matriz, origem das células e taxas de crescimento podem explicar um comportamento específico de uma linhagem ou uma característica geral das células de uma planta (Gamborg *et al.*, 1976). Entender as respostas morfológicas que ocorrem durante o cultivo *in vitro* é um dos pontos críticos para entender as rotas de regeneração (Woo e Wetzstein, 2008).

Desta forma, o objetivo do trabalho é descrever e elucidar o processo de indução de culturas nodulares de morangueiro, confirmando a rota morfogenética obtida.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (CCA/UFSC) e no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.

4.2.1 Material vegetal

Foram adquiridas mudas de morangueiro cv Albion advindas de viveiros na Argentina. Essas mudas foram acondicionadas em vasos de 1 litro, contendo substrato comercial Tropstrato[®], mantidas em casa de vegetação e irrigadas de acordo com a necessidade da cultura.

4.2.2 Indução das culturas *in vitro*

O protocolo de indução das culturas nodulares foi obtido em trabalhos anteriores realizados no LFDGV – UFSC. Para isso, secções foliares com dimensões aproximadas de 10 mm x 2 mm, foram utilizados como explantes para a indução das culturas. Para isso, folhas jovens de morangueiro foram lavadas em água corrente e, em câmara de fluxo laminar, passaram por assepsia em álcool (70%) com 2 gotas de Tween[®]20 por 30 segundos, hipoclorito de sódio (1%) com 1 gota de Tween 20[®] por 12 minutos, após a assepsia realizou-se uma tríplice lavagem com água destilada esterilizada.

Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (150 mm x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura contendo a solução salina MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel

(Morel e Wetmore, 1951), sacarose (3%), Phytigel (0,2%), 2,5 μM de metatopolina (mT) e 2,5 μM ácido indolbutírico (AIB), tendo o pH foi ajustado para 5,8. Após a inoculação, as culturas foram transferidas para sala de crescimento a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, permaneceram na ausência de luz por 7 dias e, então, expostas a um fotoperíodo de 16h até os 30 dias, quando foram repicadas para frascos contendo meio de cultura com a mesma composição da indução. A repicagem ocorreu aos 28 dias.

4.2.3 Acompanhamento e análises morfo-histológicas das culturas

As culturas foram avaliadas em microscópio estereoscópio aos 0, 14, 28 e 42 dias e fotografadas em microscópio estereoscópio Olympus SZH10, sendo também coletadas amostras para microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os tempos de coleta foram definidos em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório.

As amostras coletadas foram fixadas em solução contendo paraformaldeído 2,5% e tampão fosfato 0,1 M (1:1, V/V) por 24 horas em geladeira. Após esse período, as amostras foram desidratadas em série etílica e infiltradas em Historesina[®] (Leica) segundo recomendações do fabricante. As amostras foram então encapsuladas em Historesina[®] (Leica) e endurecidas por 24 horas a 60°C .

As secções de 5 μm foram obtidas com auxílio de micrótomo rotativo Leica[®] e navalhas de aço, sendo feitas 5 lâminas sequenciais, que passaram por coloração com azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1987) e diferentes reações histoquímicas.

Para a identificação da presença de proteínas totais, as lâminas foram tratadas com azul brilhante de Coomassie (CBB), permanecendo 30 minutos em solução de CBB 0,4% diluído em solução etanólica de Clark e lavadas, posteriormente com a mesma solução (Fisher, 1968).

Para a observação de amido, as lâminas foram tratadas com lugol por 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada (Johansen, 1940). Para carboidratos totais, foi utilizado o Ácido periódico de Schiff (PAS). Para isso, as lâminas ficaram 30 minutos em ácido periódico 1%, lavados em água corrente por 20 minutos e reagidos em reativo de Schiff durante 30 minutos em ambiente escuro (O'Brien & McCully 1981).

Os lipídeos totais foram observados através da reação com Sudan Black e as amostras foram colocadas em recipiente fechado contendo solução de Sudan Black 3% durante 30 minutos, depois foram lavadas com álcool 70% e água, respectivamente (Ventrela et al, 2013).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Olympus BX 40 e fotografadas com auxílio de equipamento fotográfico modelo Olympus UTV0.5XC-3 Japan.

4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Para análise ultraestrutural foram coletadas amostras aos 0, 14, 28 e 42 dias, as quais foram fixadas em glutaraldeído (7,5%), tampão cacodilato de sódio (0,3M) e sacarose (2%) (1:1:1, V/V/V) em geladeira por 24h. Após a fixação foram feitas cinco lavagens, de 20 minutos cada, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, sacarose (2%) e água, tendo como proporção 1:1:1 na primeira lavagem, reduzindo a sacarose em (0,25%) e aumentando a quantidade de água na mesma proporção a cada lavagem.

Para a pós fixação foi utilizada solução de tampão de cacodilato de sódio (0,2M) e tetróxido de ósmio (2%) (1:1, V/V), durante 4 horas. Foram então realizadas 3 lavagens de 15 minutos com tampão cacodilato de sódio (0,1M) e as amostras passaram por desidratação em série de acetona e foram então infiltradas lentamente em resina Spur. Foram então montados os blocos com resina Spur, os quais, após polimerizados, foram seccionadas em ultramicrotomo (Leica), alocados em grids de cobre e contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo (Reynolds, 1963).

Foram então, observadas em microscópio eletrônico de transmissão modelo TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo Japan, 80 kW).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o processo de indução de calos em morangueiro, aos 14 dias foi observado o intumescimento do explante inicial (figura 1A) bem como a formação de pequenos nódulos esverdeados e translúcidos nas bordas foliares (figura 1B), onde foi realizada a incisão. Esses nódulos não apresentavam conexões entre si e destacavam facilmente do explante (figuras 1C e D) características estas que se assemelham às descrições de culturas nodulares em trabalhos anteriores (McCown *et al.*, 1988; Dal Vesco e Guerra, 2010; Scherer *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2016)

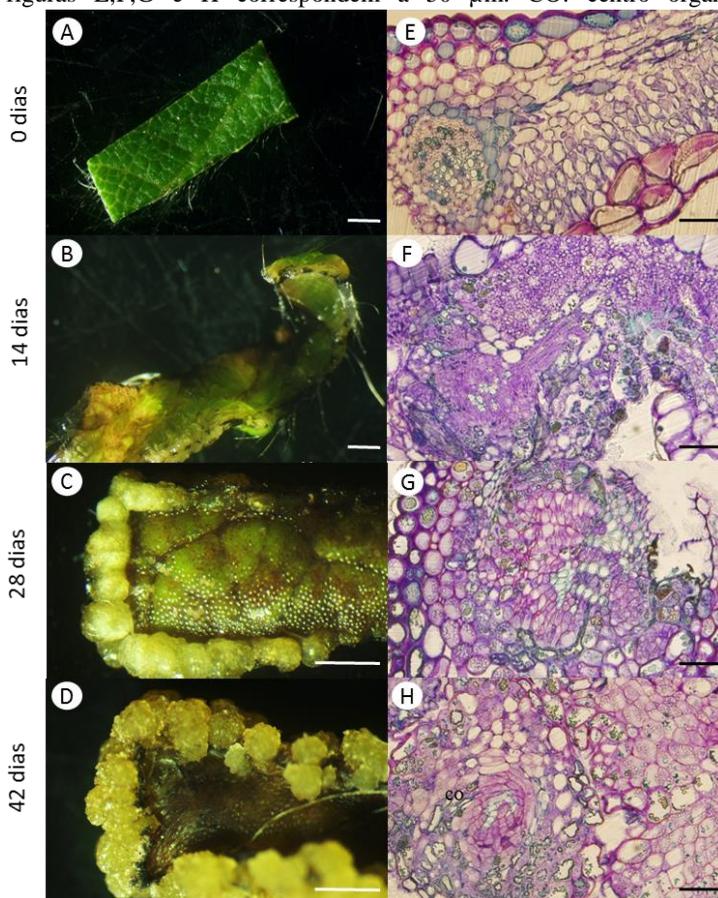
Em microscópio de luz observou-se o início da desorganização no mesófilo foliar do explante inicial durante o intumescimento e o início da formação dos nódulos aos 14 dias após a inoculação (Figuras 1E e 1F). Ressalta-se que essas formações estavam concentradas nas regiões

marginais do explante, sempre onde havia excisão do tecido e tecidos vasculares próximos. A maioria das células formadas inicialmente foi parenquimática, sendo que elas possuíam diferentes formatos. Porém, de uma forma geral, elas apresentavam grandes vacúolos, citoplasma na periferia das células e acúmulo de substâncias de reserva.

Centros organizacionais (CO) são formações características de culturas nodulares sendo formados áreas de vascularização cercadas de quatro a cinco camadas de células meristemáticas, pequenas e isodiamétricas observados na periferia dos calos (Batista *et al.*, 2000). No presente trabalho, aos 28 dias da indução, foi observada a formação de núcleos celulares organizados (figura 1G), sendo que aos 42 dias estes apresentavam-se melhor estruturados (figura 1H), sendo que as áreas de vascularização estavam cercadas de 3 a 5 camadas de células meristemáticas (figura 1H).

Aos 28 dias da inoculação foi observado o início da formação de núcleos celulares organizados (Figura 1G), sendo que aos 42 dias estes se apresentavam melhores estruturados (Figura 1H). Estes núcleos apresentavam áreas de vascularização cercadas de 3 a 5 camadas de células meristemáticas (figura 1H). De acordo com Batista *et al.*, (2000) estas formações caracterizam-se como os centros organizacionais (CO), que são formações características de culturas nodulares sendo formadas por áreas de vascularização cercadas de quatro a cinco camadas de células meristemáticas, pequenas e isodiamétricas, observadas na periferia das culturas (Batista *et al.*, 2000). Os COs são formados continuamente durante o desenvolvimento das culturas nodulares, como o resultado da formação de neoelementos traqueais, sugerindo que ocorrem divisões celulares como no estágio inicial, formando então os chamados policentros (Batista *et al.*, 2000). Nesse sentido, observou-se também no presente trabalho que quando os nódulos começavam a ficar mais proeminentes estes se destacavam do explante inicial com facilidade (figura 1D). Em microscópio de luz observou-se a formação destes policentros, onde os COs ficavam dispersos em células parenquimáticas (figura 2A) e podiam se destacar das culturas com facilidade (figura 2B).

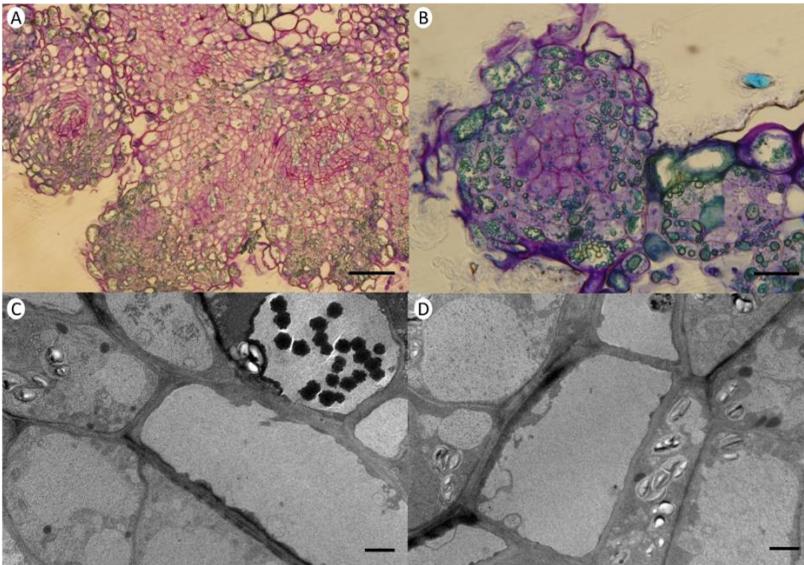
Figura 1: Indução das culturas nodulares por meio de secções foliares de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) aos 0, 14, 28 e 42 dias após a indução. Fotos da mesma linha correspondem ao mesmo tempo de coleta. A) secção foliar de morangueiro antes da indução das culturas nodulares; B) intumescimento do tecido foliar aos 14 dias após a indução e início da formação dos nódulos na margem da secção; C e D) evolução da formação dos nódulos, aos 28 e 42 dias após a indução, respectivamente; E) secção transversal de folha de morangueiro antes da indução das culturas nodulares F) secção transversal da folha de morangueiro, mostrando o início da divisão celular no mesófilo foliar do explante inicial; G e H) secção transversal mostrando o início da formação das células parenquimáticas e dos COs, culturas já independentes do explante inicial. As barras das figuras A,B,C e D correspondem a 1 mm; as barras das figuras E,F,G e H correspondem a 50 μ m. CO: centro organizacional.



Fonte: Próprio Autor

Células parenquimáticas possuem diversas faces e formatos, sendo altamente vacuoladas resultando em citoplasma localizado próximo a parede celular e estão associadas a tecidos vasculares (primários e secundários) (Rodrigues, Amano e Almeida, 2010). Observou-se desde a indução de culturas nodulares de morangueiro, até as formações dos COs, a presença de células com essas características. Além disso, em microscopia eletrônica de transmissão pôde-se observar essas células com grandes vacúolos, formatos irregulares, conteúdo citoplasmático na periferia celular e acúmulo de substâncias eletrodensas (figura 2C), provavelmente compostos fenólicos, e também acúmulo de grãos de amido (figuras 2C e D).

Figura 2: Formação dos policentros e acúmulo de amido aos 42 dias após a indução de culturas nodulares em morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.). A) Centros organizacionais imersos em células parenquimáticas formando os chamados policentros; B) Centro organizacional destacando-se do nódulo; C e D) Células com grandes vacúolos, citoplasma na área periférica e acúmulo de grãos de amido, vistos em microscopia eletrônica de transmissão. A barra da figura A corresponde a 100 μm ; da figura B corresponde a 500 μm e das figuras C e D correspondem a 2 μm .

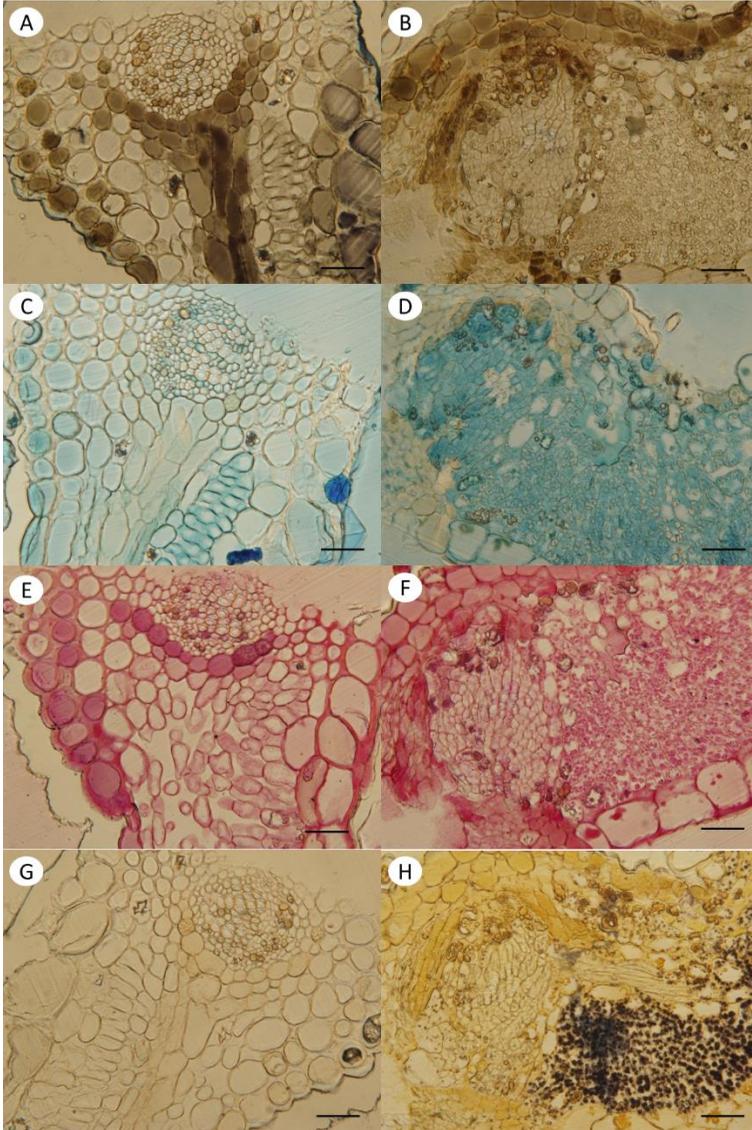


Fonte: o autor.

Análises histoquímicas, com Sudan Black e Azul de Coomassie, mostraram que não houve acúmulo de lipídeos (figuras 3A e 3B) e proteínas (figuras 3C e 3D) aos 14 dias da indução quando comparado ao explante inicial (tempo 0). Entretanto, aos 14 dias da indução ocorreu um acúmulo de carboidratos na forma de amido. Isto foi comprovado na reação com lugol, onde pode-se notar um grande acúmulo de amido quando comparou-se as secções do explante inicial com as dos 14 dias após a indução (figuras 3G e 3H), corroborando o que já havia sido relatado das observações das imagens obtidas em microscopia eletrônica de transmissão (figuras 2C e D).

Em lúpulo foi observado o acúmulo de amido durante a formação de nódulos e pré-nódulos, e esse acúmulo de amido durante a organogênese foi associado com a sacarose adicionada ao meio de cultura, à mobilização dessas reservas para a formação de órgãos e o desenvolvimento dos brotos (Fortes e Pais, 2000). A associação da formação de amido com a formação de meristemóides já tinha sido relatada em trabalhos tabaco (Thorpe e Murashige, 1968) . A hipótese é de que o acúmulo de amido ocorra para iniciar a formação de estruturas organizadas em plantas, pois antes da indução não há formação de amido e após a indução ocorrem grandes acúmulos nas áreas de formação e organização das estruturas que darão origem aos nódulos. O acúmulo de amido também foi relatado durante a formação de calos de tomate (Branca *et al.*, 1994), a formação de embriões de eucalipto (Pinto, 2010) e a organogênese em *Begonia* (Mangat, Pelekis e Cassells, 1990).

Figura 3: Reações histoquímicas de culturas nodulares em morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) antes da indução das culturas nodulares (a esquerda) e 14 dias após a indução (a direita). A e B) Reação com Sudan Black; C e D) reação com azul de coomassie; E e F) Reação com Ácido periódico de Schiff; G e H) Reação com Lugol. Barra: 500 µm.



Fonte: o autor.

4.4 CONCLUSÕES

As culturas formadas a partir de secções foliares de morangueiro em meio contendo Metatopolina e AIB possuem todas as características morfo-histológicas relatadas na literatura para a formação de cultura nodulares.

A formação das culturas nodulares pode ser observada já aos 14 dias após a indução. A desorganização do mesofilo foliar inicia com a formação de células parenquimáticas e depois se desenvolvem células meristemáticas e vasculares, típico da formação inicial de culturas nodulares.

Durante a formação das culturas nodulares de morangueiro ocorre o acúmulo de amido, uma substância de reserva comprovadamente associada com a formação de brotos em culturas micropropagadas.

5. SEQUÊNCIA PARCIAL E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA PROTEÍNA DO CAPSÍDEO DO VÍRUS DA FAIXA-DAS-NERVURAS DO MORANGUEIRO (SVBV).

RESUMO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é um híbrido proveniente do cruzamento das espécies americanas *F. chiloensis* e *F. virginiana*, pertencente à família Rosaceae. Por ser uma planta de propagação vegetativa, comumente acumula viroses e outras doenças de difícil controle. As quatro principais viroses da cultura são: o vírus do encrespamento (SCV), o vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro (SVBV), o vírus do mosqueado do morangueiro (SMoV) e o vírus da clorose marginal do morangueiro (SMYEV). Por não terem sintomas característicos e muitas vezes não apresentarem sintomas foliares, estas viroses são de difícil detecção, e, por isso, são recomendadas técnicas moleculares. Porém, por causa da alta taxa de mutação viral, muitas vezes essa tarefa torna-se onerosa. Conhecer as taxas de mutação e evolução são essenciais, e desta forma, análises filogenéticas podem fornecer muitas informações neste sentido. O objetivo deste trabalho foi sequenciar as cepas dos vírus SCV, SVBV, SMYEV e SMoV e compreender as relações evolutivas entre a cepa do vírus SVBV mantido no LFDGV e os demais acessos deste vírus depositados no GenBank. Para isso foram desenhados primers para cada uma das espécies virais, extraído RNA total de folhas de morangueiro infectadas, realizando-se a amplificação e o sequenciamento de fragmentos virais. Apenas fragmentos do SVBV foram obtidos e o sequenciamento parcial da proteína do capsídeo resultou em 684 pares de bases. Em análises filogenéticas observou-se que ele é mais semelhante a acessos dos EUA e Egito. São necessários trabalhos que analisem a melhor época de coleta de material para análise das viroses estudadas nesse trabalho, uma vez que não foi possível a detecção dos outros três vírus.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is a hybrid from the cross of the American species *F. chiloensis* and *F. virginiana*, belonging to the Rosaceae family. Because it is a plant of vegetative propagation, it commonly accumulates viruses and other difficult control diseases. The most important viruses of the crop are: strawberry crinkle virus (SCV), strawberry vein banding virus (SVBV), strawberry mottle virus (SMoV)

and strawberry mild yellow edge virus (SMYEV). Because they haven't characteristic symptoms and often haven't foliar symptoms, these viruses are difficult to detect, and therefore, molecular techniques are recommended. However, because of the high viral mutation rate, this task often becomes onerous. Knowing mutation rates and evolution are essential. Phylogenetic analyzes can provide a lot of information in this sense. The objective of this work was to sequence the SCV, SVBV, SMYEV and SMoV strains and to understand the evolutionary relationships between the strain of the SVBV virus maintained in LFDGV and other accesses of this virus deposited in GenBank. For this, primers were designed for each of viral species, extracted total RNA from infected strawberry leaves, and amplification and sequencing of viral fragments were performed. Only SVBV fragments were obtained and partial sequencing of the capsid protein resulted in 684 base pairs. In phylogenetic analyzes it was observed that it is more similar to accesses from the USA and Egypt. It is necessary to analyze the best time to collect material for the analysis of viruses studied in this study, since it was not possible to detect the other three viruses.

5.1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família Rosaceae, e é um híbrido proveniente do cruzamento das espécies americanas *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Silva, Dias e Maro, 2007). O morango cultivado é um octaplóide ($2n = 8x = 28$) (Debnath e Silva, 2007) e sua principal forma de propagação é via estolões (Hoffmann e Bernardi, 2006), porém, devido a propagação vegetativa é bastante comum o acúmulo de viroses e outras doenças de difícil controle (Assis, 2004).

Em morangueiro, as quatro viroses de maior importância econômica nas áreas produtoras do Brasil (Ueno, 2004; Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005) e dos EUA (Martin e Tzanetakis, 2006) são transmitidas por pulgões, sendo elas o vírus do encrespamento (SCV, do inglês, *Strawberry Crinkle Virus*), o vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro (SVBV, do inglês, *Strawberry Vein Banding Virus*), o vírus do mosqueado do morangueiro (SMoV, do inglês, *Strawberry Mottle Virus*) e o vírus da clorose marginal do morangueiro (SMYEV, do inglês *Strawberry Mild Yellow Edge Virus*) (Ueno, 2004; Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005).

O SCV pertence à família Rhabdoviridae (Thompson et al, 2003) e é um dos vírus mais agressivos em morangueiro (Martin e Tzanetakis, 2006). Muitas vezes não apresenta sintomas foliares, porém pode reduzir o tamanho, o vigor e a produtividade da planta (Martin e Tzanetakis, 2006). O SMYEV pertence à família *Alphaflexiviridae* (Bhagwat, 2015), é o vírus de morangueiro mais disseminado dentro da cultura. Em estirpes mais fortes, este pode causar distorção nas folhas, nanismo e diminuição do tamanho dos frutos (Martin e Tzanetakis, 2006). O SMoV é um vírus comumente encontrado em plantações de morangueiro e pode acarretar na redução de cerca de 30% da produção de frutos. O SVBV pertence ao gênero *Caulimovirus*, família Caulimoviridae e tem cadeia circular dupla de DNA (Vasková et al, 2004), sendo encontrado com baixa frequência nas áreas produtoras do Brasil. Pode diminuir a produção de estolões e frutos (Nickel, Ueno e Sanhueza, 2005), assim como sintomas foliares como a deformação de folhas (Vasková, Spak e Petrzik, 2006).

Essas viroses são mais comumente encontradas em infecções mistas, podendo aumentar as perdas de 30% (com infecções simples) para 80% (Thompson et al, 2003), sendo a principal forma de controle a utilização de material de propagação livre de vírus (Brahm e Oliveira, 2004). Não existem resistência ou imunidade reportadas, nem sintomas característicos desses quatro vírus em morangueiro, por isso a sua detecção não é possível visualmente (Thompson et al, 2003). Atualmente os principais métodos de detecção de viroses em morangueiro são a RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) e teste ELISA (Martin e Tzanetakis, 2006).

O genoma viral possui alta taxa de mutação (Holland et al, 1982) e o uso de *primers* degenerados pode dificultar a detecção de algumas espécies virais (Posthuma et al, 2002). *Primers* degenerados são aqueles que em uma mesma posição podem ter diferentes bases. O desenho deles é feito para que compreenda muitas sequências genéticas de um gene homólogo, por exemplo, mas não todas (Linhart e Shamir, 2005). Podendo se hibridizar com mais de um nucleotídeo.

Atualmente, estudos de sequências genéticas iniciam com análises filogenéticas (Huelsenbeck, 2001), que permitem a melhor compreensão das relações históricas e evolutivas entre diferentes táxons (Buso, 2005). As análises comparativas de sequências podem auxiliar na elucidação das relações entre grupos de vírus aparentemente distantes (Koonin e Dolja, 1993) e tem se mostrado uma ferramenta importante para a comparação entre genomas (Yang e Rannala, 2012). É utilizada para conhecer o mecanismo de substituição de nucleotídeos e evolução

dos vírus, que ainda são pouco conhecidos, apesar do crescimento no conhecimento de sequências de RNA e DNA viral (Jenkins, 2002). Muitos são os métodos para análise filogenética, fazendo com que a escolha da análise mais adequada seja uma tarefa difícil (Huelsenbeck, 2001).

Por fim, o objetivo desse trabalho foi sequenciar as cepas dos vírus SCV, SVBV, SMYEV e SMoV e compreender as relações evolutivas entre a cepa do vírus SVBV mantido no LFDGV e os demais acessos deste vírus depositados no GenBank.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV – CCA/UFSC) em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

5.2.1 Material Vegetal

Plantas infectadas com as quatro principais viroses de morangueiro (SCV, SVBV, SMoV e SMYEV) foram cedidas pelo Dr. Osmar Nickel da Embrapa Uva e Vinho de Bento Gonçalves. Essas mudas foram recebidas da Alemanha e mantidas na Embrapa por mais de 10 anos, antes de serem enviadas ao LFDGV no ano de 2016. Depois de chegarem ao LFDGV (CCA-UFSC), as plantas foram mantidas em casa de vegetação, em vasos de 1 L, sendo irrigadas e adubadas de acordo com as exigências da cultura.

As plantas infectadas com o vírus SCV apresentavam manchas cloróticas dispersas pelo limbo foliar, e encarquilhamento da folha (figura 1A). As plantas com SMoV apresentavam pontuações cloróticas por todo o mesófilo foliar (figura 1B). As plantas com SVBV apresentavam manchas cloróticas as margens das nervuras, principalmente a nervura central (figura 1C). As plantas com SMYEV não apresentavam sintomas foliares, porém, as plantas apresentavam um tamanho reduzido (figura 1D).

Figura 1: Plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) infectadas por viroses analisadas neste trabalho. a) Planta infectada pelo vírus do encrespamento do morangueiro (SCV); b) Planta infectada pelo vírus do mosqueado do morangueiro (SMoV); c) Planta infectada pelo vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro (SVBV); d) Planta infectada pelo vírus da clorose marginal do morangueiro (SMYEV).



Fonte: Próprio autor.

5.2.2 Extração, quantificação e qualidade do RNA total

Para a extração de RNA, foi utilizado o kit RNeasy Quiagen®. Cerca de 100 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, e o macerado foi transferido para microtubos contendo 3,5 µl de β-mercaptoetanol e tampão de lise celular. As demais etapas seguiram as recomendações do fabricante.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 *Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific®) e avaliadas quanto à qualidade em gel de agarose 1%. Para a preparação do gel, foi utilizado 1,5 g de agarose, 30 ml de tampão MOPs 1x, 27 ml de formaldeído e 93 ml de água DEPC. As amostras correram em tampão MOPs 1x durante 45 minutos à corrente elétrica constante de 80 V.

5.2.3 Precipitação do RNA total

A precipitação do RNA total foi realizada para amostras que obtiveram baixas relações espectrofotométricas (260/280 e 260/230). Para isso, foi adicionado etanol absoluto em microtubo contendo o RNA total (3:1, V/V) e 5 µl de tampão acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$) 3M, as amostras foram acondicionadas por 12 horas em freezer -20 °C. Após 12 horas, os microtubos foram centrifugados a 11000 x g por 40 minutos, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 200 µl de etanol 75%. Os microtubos foram, novamente, centrifugados a 11000 x g por 5 minutos, removendo-se o sobrenadante. O *pellet* foi seco à vácuo por 30 minutos e, então, ressuspenso em 20 µl de água DEPC.

5.2.4 Digestão do DNA

A digestão do DNA foi feita com auxílio do kit TurboTM DNase (Life Technologies[®]), seguindo as recomendações do fabricante. Cada reação foi constituída de 14 µl de amostra de RNA, 5µl de tampão Buffer DNase TURBO, 1 µl de enzima TURBO DNase e 30 µl de água DEPC. A digestão do DNA foi realizada em termociclador por 30 minutos a 37°C e 10 minutos a 70°C. Por fim, as amostras retiradas do termociclador foram armazenadas a -20 °C.

5.2.5 Construção do cDNA

O cDNA foi construído com auxílio do kit GoScriptTM Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega[®]). Para isso, foram preparados 10 µl de mix de reação de cDNA (4 µl de água livre de nucleasse, 4 µl de Buffer de reação GoScriptTM Reaction Buffer e 2 µl mix de enzima GoScriptTM) para cada amostra e adicionados em um microtubo contendo 10 µl de amostra de RNA. A reação foi homogeneizada e levada ao termociclador com o programa contido na tabela 1.

Tabela 1: Programa para reação de construção do cDNA.

Etapas	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Anelamento do primer	25°C	5 minutos	1
Extensão	42°C	60 minutos	1
Inativação	70°C	15 minutos	1
hold	4°C	∞	1

5.2.6 Amplificação dos fragmentos de cDNA

Para o desenho dos *primers*, seqüências importadas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foram alinhadas e analisadas pelo programa CLC workbench 8.0.1 (Quiagen bioinformatics®). Para o SCV, foi utilizado o gene RNA dependente RNA polimerase (RdRp), para o SVBV, foi utilizado o gene que codifica a proteína do capsídeo, para o SMYEV e o SMoV foram desenhados primers com base na seqüência do genoma completo. Foram desenhados dois pares de *primers* para cada virose. Para o SVBV, o *primer 2* foi desenhado a partir do sequenciamento do fragmento amplificado através do *primer 1*. Os *primers* estão representados na tabela 2 e foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia – Integrated DNA Technologies®.

Para a reação de PCR foram utilizados 17 μ l de mastermix (1x PCR buffer, 3mM solução Mg, 0,4 mM de cada dNTPs, 0,3 μ M de cada *primer* (forward e reverse), água ultrapura e 1 U de Taq polimerase) e 3 μ l de amostra de cDNA.

Em termociclador, as amostras foram amplificadas de acordo com o seguinte programa: um ciclo de 2 minutos a 95 °C para a desnaturação, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos na temperatura de anelamento de cada primer (tabela 1) e 1 minutos e vinte segundos a 72 °C, a amplificação foi finalizada com a extensão final por 15 minutos a 72 °C.

Tabela 2: *Primers* desenhados pelos autores para a amplificação de fragmentos de cDNA dos vírus de morangueiro. SMoV: Vírus do mosqueado do morangueiro; SCV: Vírus do encrespamento do morangueiro; SVBV: Vírus da faixa-das-nervuras do morangueiro; SMYEV: Vírus da clorose marginal do morangueiro. T.A.: Temperatura de anelamento. F: *Primer* Forward (5'- 3'). R: *Primer* Reverse (3'- 5').

Vírus		Primers 1	T.A. (°C)
SMoV RNA 1	F	CTCACTTTTCCTCTTTTCCT	49
	R	ASGWTATCGCCTCYTGGAW	
SMoV RNA 2	F	TTCTGTCAAGGCTATGT	50
	R	GGTGTCAAAGGRATRGGT	
SCV	F	TYTTATTCTGYATYGGKGCY	49
	R	ATCYAACAAGGTRTCTGTC	
SVBV	F	AGGAAGARGACGAAGAAA	48
	R	GGTGAGGAAAACCTTAGGA	
SMYEV	F	GTATTCTCCTCCCTCACG	51
	R	TCTGTACRATDGTCTTRTGCT	
		Primers 2	
SMoV RNA 1	F	TCTCACTTTTCCTCTTTTCC	50
	R	TYTTRTCMCCYTYTCCTT	
SMoV RNA 2	F	TCCTCTACACYCTCTTYR	49
	R	RTCWTCAGRSAARCCYTCY	
SCV	F	GGRGATRRRGTKTTRAGRYY	52
	R	TTTGTCTTCCTTCTGCTG	
SVBV	F	CACAATCTCATCAAAGCC	54
	R	CAGACTTGTTCCCTGCAAT	
SMYEV	F	AAAYWTAWCCAACMCACTC	50
	R	CTCDTYMKYCTCATYYKYVYY	

Fonte: Próprio autor.

5.2.7 Purificação e sequenciamento do cDNA

Para a purificação do cDNA amplificado foi utilizado o kit QIAquick PCR Purification (Quiagen®), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a precipitação da reação de sequenciamento, foram adicionados 5 µl de EDTA 125 mM (pH 8) e 60 µl de etanol absoluto em cada amostra, homogeneizados e deixados por 15 minutos em temperatura ambiente com ausência de luz. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos a 4°C, o líquido foi descartado e a placa passou por um *spin* invertido (para que todo o líquido fosse retirado). Foram adicionados 85 µl de etanol 75% em cada amostra e

centrifugou-se a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O líquido foi novamente descartado e deu-se um *spin* com a placa invertida. As amostras ficaram secando por 60 minutos em escuro. Foram então adicionados 10 µl de formamida em cada poço e as amostras foram então sequenciadas no LFDGV – CCA/UFSC em sequenciador modelo 3500 XL Genetic Analyzer (Thermofisher®). As sequências obtidas foram montadas e analisadas no *software* MEGA7.

5.2.8 Análise filogenética

As sequências obtidas do vírus SVBV foram editadas e montadas manualmente, obtendo a sequência nomeada Sequência Parcial LFGDV (BRA). A Sequência Parcial LFGDV (BRA) foi comparada com sequências depositadas no GenBank (tabela 3), através da plataforma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; www.ncbi.nlm.nih.gov), e alinhadas através do *software* MEGA7.

Para estimar as relações filogenéticas entre as sequências selecionadas e a Sequência Parcial LFGDV (BRA) alinhadas, três abordagens diferentes foram empregadas: Neighbour-joining (NJ), Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB).

A árvore de NJ foi construída através do *software* MEGA7, aplicando-se o modelo K2P (Kimura-2-Parameter; Kimura, 1980) para a correção das distâncias genéticas. A avaliação da árvore de NJ foi calculada com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

Para os métodos MV e IB, o modelo de evolução mais adequado para o conjunto de dados foi selecionado através do *software* jModelTest (Posada, 2008). A análise de MV foi realizada através do servidor *online* RaxML (RAxML-HPC2 Workflow on XSEDE, pelo portal Cipres; <https://www.phylo.org/>), utilizando-se o modelo de evolução TIM3+G e os acessos KJ198841 e HE978788 como *outgroups*. A sustentação dos ramos foi calculada com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*.

A IB foi realizada pelo servidor *online* XSEDE no programa MrBayes (MrBayes on XSEDE, pelo portal Cipres; <https://www.phylo.org/>), aplicando-se o método de Cadeia de Markov via Monte Carlo (MCMC), o modelo de evolução HKY+G e o acesso KJ198841 como *outgroup* para o enraizamento da árvore. Foram realizadas 4 cadeias MCMC simultaneamente, com 200000 gerações e *burn-in* de 25%, e as árvores foram amostradas a cada 100 gerações. Os valores de probabilidade posterior foram estimados a partir da árvore consenso.

Tabela 3: Códigos do GenBank utilizados para a análise filogenética do Vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV). O gene utilizado foi o da proteína do capsídeo.

CÓDIGOS NCBI	Vírus	Autores	Origem
KX950837	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950838	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950839	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950840	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950841	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950842	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
KX950843	SVBV – coat protein	Dickison <i>et al</i> , 2017	Canadá
FM867860	SVBV – coat protein	Jiang, 2008	China
AY605662	SVBV – coat protein	Vaskova, Spak e Petrzik, 2004	EUA
AY605663	SVBV – coat protein	Vaskova, Spak e Petrzik, 2004	EUA
AY605664	SVBV – coat protein	Vaskova, Spak e Petrzik, 2004	EUA
KU366260	SVBV – coat protein	Sofy, 2015	Egito
KJ198841	CaMV – coat protein	Pourrahim e Farzadfar	Iran

Fonte: Próprio Autor

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de testar diferentes primers, diferentes métodos de extração e otimizar a temperatura de anelamento dos primers, apenas fragmentos do vírus SVBV foram amplificados após a realização de PCR. Sugere-se que isto possa ter sido consequência da baixa qualidade do RNA extraído, uma vez que a extração de RNA em morangueiro é complexa e alguns compostos produzidos pela planta podem inibir a ação da *Taq* polimerase, fazendo com que não ocorra a amplificação dos fragmentos (Thompson e Jelkmann, 2003). É possível também que no momento da extração a quantidade de RNA viral presente nas plantas estivesse baixa. Isto também inviabilizaria a metodologia de detecção dos vírus. Apesar da quantificação do RNA total indicar a presença de fragmentos de RNA na amostra, não se pode determinar qual é a

quantidade exata de RNA de cada vírus estudado, assim como do RNA da planta. Além disso, uma combinação desses fatores pode também ser a causa.

Nesse sentido, Posthuma *et al* (2002) detectaram o vírus SCV usando *primers* degenerados da região L através de RT-PCR, porém um mês depois desta detecção os sintomas ficaram menos acentuados e não foi mais possível detectar o vírus, mesmo utilizando a mesma metodologia.

A falha na detecção do SCV em parte das plantas infectadas pode ter sido devido à falta na sensibilidade da metodologia (RT-PCR), à distribuição desigual do vírus, à presença de inibidores (como compostos fenólicos), ou mesmo uma combinação desses fatores. Possivelmente existe apenas uma janela no ciclo da infecção onde o vírus pode ser detectado por esse método, sugerindo que estudos de campo devem ser realizados para complementar os resultados obtidos por estes autores, determinando a melhor estação do ano e melhor tecido para amostrar. Desta forma, a análise molecular poderá ser considerada confiável para o diagnóstico (Posthuma *et al*, 2002). Thompson e Jelkman (2003), utilizaram *primers* degenerados para amplificar as regiões CPL e RdRp do vírus SMoV. As duas regiões se mostraram difíceis de amplificar, e a detecção através de RT-PCR foi possível apenas em alguns isolados. Provavelmente, isso ocorreu devido à grande variação da sequência de nucleotídeos, o que pode ter impossibilitado o anelamento de forma eficiente.

O gene que codifica a proteína do capsídeo do vírus SVBV foi sequenciado parcialmente, com um total de 722 pares de bases (Figura 2). A sequência obtida foi comparada com outras sequências depositadas no GenBank através de análises filogenéticas (Figuras 3, 4 e 5).

Figura 2: Sequência genética parcial do gene da proteína do capsídeo do vírus SVBV (*Strawberry vein banding vírus*) sequenciado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV – UFSC).

```

5'
AAACCTATCGTCCGAACCGAAAGCGAAGAGGAAACAGCTCCTCTCAGCCA      50
AATTACACCAGGTATGATATCCACAAGAATACATTCTAACAGAAAAAC        100
AGGTTTGACCAACACCAAAAAGCTTGGACCTCGATTGCGCCAGCAACCGAA      150
GACAACCTATTGAAGAATGGGACAATGAAATGAGATTAATCATTAAAAACA      200
GAGAAAGCTCTTACTAATGATTTTGATCTAATCTTAACTCTTGCAAAGAG      250
TAAGACTGTTGTAATGCCAAACAATTATTAGAATCTCTTCACACTGAAG      300
CTTTTAAACAAGCCTCTACAACAGGAGAAGAATTCTAACAACTCTAACAA      350
AATTCGTTTTATACTATATTTGTTGGAACTAACTACTTGACGCAGGGAAC      400
TCGAGAAAAAGAGAAAGCTGTTCAAGAAGCTAGAAACAGGTTAGTCAAAT      450
TACAAATTTGCAATCTCTGTTCACTAGAAAGTTTTTTCTGTGACTATGAA      500
ACCAATCTTCTTAAATTACCAATAGAAGAATGCCCAAATATATGAAGA      550
ATATATTAGGAAAATACCCTTTGTGGGATGGAAGTACTCGAAGAGTATT      600
CCAAACAAGACAGCATAACTAAAGGATCACTTGATATGCTCACAATCTC      650
ATCAAAGCCTACATGGAGAAAAAGTGAAGTCTTTGAAGATCAAAAAGGA      700
AATACGTAGAAATATGTGTTGT                                     722
3'

```

Fonte: Próprio autor.

As 3 árvores indicaram congruências, apresentando dois cladogramas monofiléticos distintos – um formado pelos acessos do Canadá e da China e outro pelos acessos do EUA, Egito e o Sequencia parcial do LFDGV (com valores máximos de BS na NJ e na MV, e PP na IB). É provável que os 2 cladogramas divergiram de um ancestral comum, sendo essa teoria bastante sustentada pelos altos valores de BS e PP, que indicam alta confiabilidade.

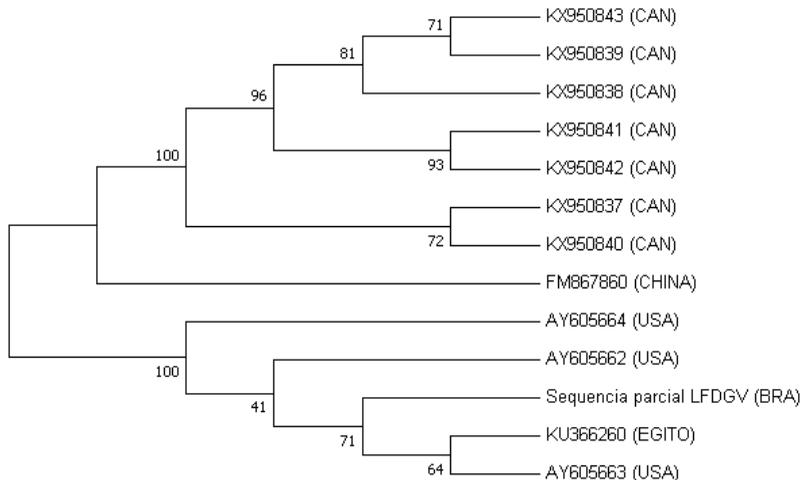
Alguns rearranjos dentro dos cladogramas foram observados de uma abordagem para outra, tal como a presença de grupos monofiléticos dos isolados dos EUA AY605662 e AY605664 e a Sequência parcial LFDGV, e também dos isolados canadenses KX950843, KX950838, KX950839, que não aparecem nas demais abordagens. Isso provavelmente ocorre devido a diferenças nas análises; enquanto que em NJ a análise é feita a partir das distâncias entre os ramos (e não considera modelo de evolução das sequências) (Tamura, Nei e Kumar, 2004) as de IB e MV são feitas analisando diretamente as amostras considerando muitas possíveis substituições, ponderadas pela sua

probabilidade de acontecer sob um modelo específico de evolução (Huelsenbeck, 2001).

Conforme as análises de Máxima verossimilhança e Inferência Bayesiana o isolado de SVBV sequenciado neste trabalho apresenta maior similaridade com os isolados AY605662 e AY605664 dos EUA. Utilizando o método de *Neighbor Joining*, o isolado estudado foi mais similar aos isolados AY605663 dos EUA e ao isolado do Egito.

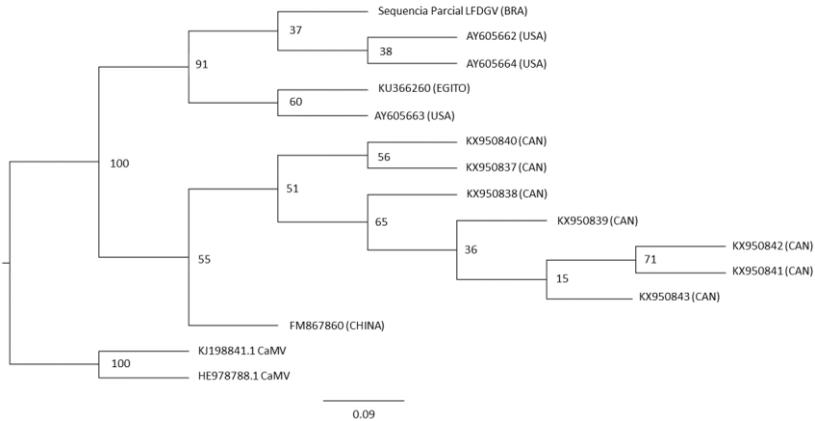
Em estudo anterior, Dickison *et al* (2017) realizou análise filogenética utilizando a abordagem de *Neighbor Joining* e os isolados foram separados em três clados: um com os isolados do Canadá (os mesmos utilizados neste trabalho), um com os isolados chineses (incluindo o FM867860 utilizado no presente trabalho) e outro clado com os isolados dos EUA e o isolado egípcio (também utilizados neste trabalho). Os resultados apresentados se mostraram bastante semelhantes aos apresentados neste trabalho.

Figura 3: Árvore Neighbor joining baseada na sequência parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV). Todos os nós apresentam valores de bootstrap.



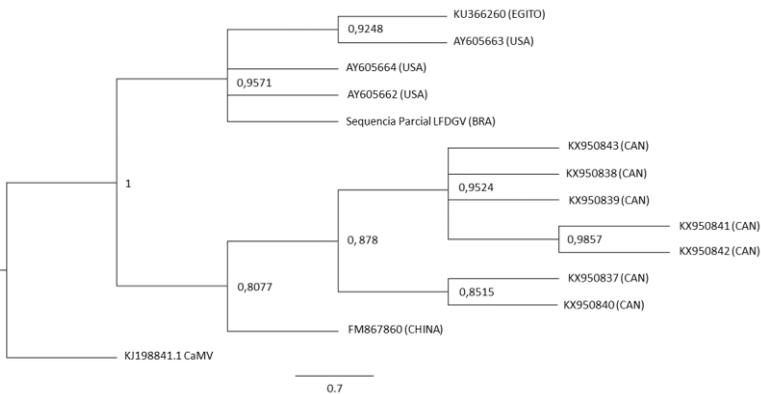
Fonte: Próprio autor

Figura 4: Árvore de Máxima Verossimilhança baseada na sequencia parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV). Todos os nós apresentam valores de bootstrap. A barra de escala apresenta o número de substituições por sítio.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5: Inferência Bayesiana baseada na sequencia parcial do gene do capsídeo do vírus da faixa-das-nervuras de morangueiro (SVBV). Todos os nós apresentam valores de probabilidade posterior. A barra de escala indica o número de substituições por sítios.



Fonte: Próprio autor.

5.4 CONCLUSÃO

Foi possível amplificar e sequenciar parcialmente o vírus SVBV. A comparação da sequência parcial do gene da proteína do capsídeo deste vírus foi comparada com outros acessos do GenBank por meio de análises filogenéticas, constatando-se ele é mais semelhante aos acessos dos EUA e do Egito, do que de acessos do Canadá e China.

É necessário realizar trabalhos que analisem a melhor época de coleta de material infectado pelas principais viroses de morangueiro, assim como a fase de infecção em que se encontram as viroses, uma vez que não foi possível a amplificação de fragmentos dos vírus SCV, SMYEV e SMoV.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Glaise Mara; VESCO, Lírio Luiz dal; GUERRA, Miguel Pedro. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 110, n. 2, p.204-207, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.06.014>.

ANDRADE, S. R. M.. **Documentos 58**: Principios da Cultura de Tecidos Vegetais. Planaltina: Embrapa, 2002. 14 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/546466/1/doc58.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J.. **Sistema de Produção do Morango**: Produção de mudas. 2005. Embrapa Clima Temperado. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap01.htm>>. Acesso em: 28 out. 2016.

ASSIS, M. de. Produção de matrizes e mudas de morangueiro no Brasil. In: 2º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO E 1º ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 2., 2004, **Pelotas, Rs. Documento 124**. Pelotas, Rs: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 46 - 51.

BATISTA, Dora et al. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Science**. [s.l.], p. 47-57. 2000.

BHAGWAT, B. et al. Molecular characterization of divergent strawberry mild yellow edge virus isolates from eastern Canada. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 9, p. 691-696, 2016.

BISWAS, M.k. et al. Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 122, n. 3, p.409-416, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2009.06.002>.

BOXUS, P.h.. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. **Journal Of Horticultural Science**, [s.l.], v. 49, n. 3,

p.209-210, jan. 1974. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/00221589.1974.11514571>.

BRAHM, Rafael Ucker; OLIVEIRA, Roberto Pedroso de. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, Sp, v. 26, n. 3, p.507-510, dez. 2004.

BRANCA, C. et al. Early phases in in vitro culture of tomato cotyledons: starch accumulation and protein pattern in relation to the hormonal treatment. **Protoplasma**, v. 182, n. 1, p. 59-64, 1994.

BRASIL. **Instrução Normativa no - 28, de 18 de Setembro de 2012.**, SP, 19 set. 2012.

BRISON, Marthe et al. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. **Plant Science**, [s.l.], n. 123, p.189-196, 1997.

BROWN, D. C. W.; THORPE, T. A.. Crop improvement through tissue culture. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 11, p.409-415, 1995.

BUSO, G. S. C.. **Documentos 137: Marcadores moleculares e análise filogenética.** Brasília, Df: Embrapa Recursos Genéticos e Bviotecnologia, 2005. 22 p.

CHANG, L. et al. Detection of Strawberry RNA and DNA Viruses by RT-PCR Using Total Nucleic Acid as a Template. **Journal Of Phytopathology**, [s.l.], v. 155, n. 7-8, p.431-436, ago. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01254.x>.

CHO, Jeom-deog et al. Strawberry mild yellow edge potexvirus from Strawberry in Korea. **The Plant Pathology Journal**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.187-190, 30 jun. 2011. Korean Society of Plant Pathology. <http://dx.doi.org/10.5423/ppj.2011.27.2.187>

DAL VESCO, Lirio L. et al. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.515-522, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.018>.

DAL VESCO, Lirio L.; GUERRA, Miguel P.. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 125, n. 4, p.748-755, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.030>.

DALAGNOL, G. L.. **Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação**. 2010. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DEBNATH, S. C.. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication o thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. **Canadian Journal Of Plant Science**, p. 737-746. mar. 2008.

DEBNATH, S. C.; SILVA, J. A. Teixeira da. Strawberry culture in vitro: Applications in genetic transformation and biotechnology. **Fruit, Vegetable And Cereal Science And Biotechnology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-12, abr. 2007.

DIAS, M. S. C. et al. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.39-47, mar./abr. 2014.

DICKISON, V. et al. Strawberry vein banding virus isolates in eastern Canada are molecularly divergent from other isolates. **Archives of virology**, v. 162, n. 6, p. 1777-1781, 2017.

DUDITS, Dénes; BÖGRE, László; GYÖRGYÉY, János. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. **Journal Of Cell Science**. [s.l.], p. 475-484. 1991.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, volume especial, p.109-120, out. 2011.

FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O.. **Comunicado Técnico 179: Técnicas de Detecção e Estudo de Vírus em Plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa, 2015. 8 p. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/131838/1/Comunicado-Tecnico-179.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

FERMINO JUNIOR, P. C.p. et al. Morfo-histologia de culturas nodulares na micropropagação de *Aechmea setigera* MART. EX SCHULT. & SCHULT. F. (BROMELIACEAE). **Evidência**, Joaçaba, v. 14, n. 2, p.86-97, jul/dez. 2014.

FISHER, Donald B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 92-96, 1968.

FORTES, Ana M; PAIS, Maria S.. Organogenesis from internode-derived nodules of *Humulus lupulus* var. Nugget (Cannabaceae): Histological studies and changes in the starch content. **American Journal Of Botany**. [s.l.], p. 971-979. 2000.

GAMBORG, O. L. et al. Plant tissue culture media. **In vitro**, v. 12, n. 7, p. 473-478, 1976.

GEORGE, E. F.. Plant tissue culture procedure: Background. In: GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; HALL, Michael A.. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. The Netherlands: Springer, 2008. Cap. 1. p. 1-28.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P.C.. Micropopagation: Uses and Methods. In: GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; HALL, Michael A.. **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3. ed. The Netherlands: Springer, 2008. Cap. 2. p. 29-64.

HALL, Robert D. An introduction to plant-cell culture: Pointers to success. **Plant Cell Culture Protocols**, p. 1-18, 1999.

HANHINEVA, K.; KOKKO, H. ; KARENLAMPI, S. K.. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, n. 41, p.826-831, nov./dez. 2005.

HOFFMANN, A.; BERNARDI, J.. **Produção de Morangos no Sistema Semi-Hidropônico**: Introdução. 2006. Embrapa Uva e Vinho. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MorangoSemiHidroponico/introducao.htm>>. Acesso em: 28 out. 2014.

HOLLAND, J et al. Rapid evolution of RNA genomes. *Science*, [s.l.], v. 215, n. 4540, p.1577-1585, 26 mar. 1982. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**. <http://dx.doi.org/10.1126/science.7041255>

HUELSENBECK, J. P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *science*, v. 294, n. 5550, p. 2310-2314, 2001.

HUNTER, B. G. et al. Purification and Characterization of Strawberry Crinkle Virus. **Phytopathology**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.282-287, Não é um mês valido! 1990.

JENKINS, G. M. et al. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. **Journal of molecular evolution**, v. 54, n. 2, p. 156-165, 2002.

JOHANSEN, Donald Alexander. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill Book Company, Inc: London; 530p, 1940.

JONES, Richard W.; JACKSON, A. O.. Replication of Sonchus Yellow Net Virus in Infected Protoplasts. **Virology**, [s.l.], v. 179, p.815-820, 1990.

KADHIMI, Ahsan A. et al. Effect of Genotype and Growth Regulators in Induction of Embryogenic Callus in Rice. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.4573-4578, dez. 2014.

KHAN, I. A.; KHATRI, A.. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: Histological studies. **Pak. J. Bot**, [s.l.], v. 38, n. 3, p.631-636, 2006.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KITAJIMA, e . W .; BETTI, J . A .; COSTA, A . S .. Strawberry Vein-Banding Virus, a Member of the Cauliflower Mosaic Virus Group. **J. Gen. Virol**, [s.l.], v. 20, p.117-119, 1973.

KLERKS, M. M. et al. Detection and tentative grouping of Strawberry crinkle virus isolates. **European Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 110, n. , p.45-52, 2004.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.. Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences. **Criticat reviews In Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.375-430, 1993.

LAKSHMANAN, Prakash et al. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 25, n. 10, p.1007-1015, 18 jul. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-006-0154-1>.

LEMOS, Eurico Eduardo Pinto de. Organogênese. In: CID, L. Pedro Barrueto (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, Df: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. Cap. 4. p. 103-127.

LINHART, C.; SHAMIR, Ron. The degenerate primer design problem: theory and applications. **Journal of Computational Biology**, v. 12, n. 4, p. 431-456, 2005.

MANGAT, B. S.; PELEKIS, M. K.; CASSELLS, A. C. Changes in the starch content during organogenesis in in vitro cultured *Begonia rex* stem explants. **Physiologia Plantarum**, v. 79, n. 2, p. 267-274, 1990.

MANNING, K.. Isolation of Nucleic Acids from Plants by Differential Solvent Precipitation. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 195, p.45-50, 1991.

MARTIN, R. R.; TZANETAKIS, I. E.. Characterization and Recent Advances in Detection of Strawberry Viruses. **Plant Disease**, [s.l.], v. 90, n. 4, p.384-396, abr. 2006. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-90-0384>.

MCCOWN, Brent H. et al. Nodule culture: a developmental pathway with high potential for regeneration, automated micropropagation, and plant metabolite production from woody plants. In: **Genetic manipulation of woody plants**. Springer, Boston, MA, 1988. p. 149-166.

MERKLE, S.a.; PARROTT, W.a.; FLINN, B.s.. . Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis. In: THORPE, Trevor A. (Ed.). **In Vitro Embryogenesis in Plants**. [s.l.]: Springer Science + Business Media, B.v., 1995. Cap. 5. p. 155-203.

MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, p. 138-140, 1951.

MOZAFARI, A.; GERDAKANEH, M.. Influence of media and growth regulators on regeneration and morphological characteristics of strawberry cvs Kurdistan and Merck (*Fragaria x ananassa* Duch.). **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v. 4, n. 5, p. 99-104, 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG F.A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, n. 15, p. 473-497, 1962.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K.. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria X ananassa*). **Plant Science**, p. 119-126. ago. 1990.

NESI, C. N.; VERONA, L. A. F. & GROSSI, R. A produção de morangos em Santa Catarina no ano de 2006 In: IV Simpósio Nacional do Morango e III Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do MERCOSUL, 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.100, 2008.

NICKEL, O.; UENO, B.; SANHUEZA, R. M. V.. **Sistema de Produção de Morango para Mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste**. 2005. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MesaSerraGaucha/virus.htm>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

NUKARI, Anna et al. Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crop plants in Finland. 2009.

O'BRIEN, J. P. et al. A model of chronic nerve compression in the rat. **Annals of plastic surgery**, v. 19, n. 5, p. 430-435, 1987.

O'BRIEN, Terence P.; MCCULLY, Margaret E. The study of plant structure: principles and selected methods. **Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd**, 1981.

OMAR, G. F. et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated in vitro on media supplemented with 2,4D and BAP. **Indian Journal Of Experimental Biology**, p. 739-745. jun. 2013.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C.. Applications of Molecular Phylogenetics. In: PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C.. **Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 1998. Cap. 8. p. 280-314.

PANATTONI, A.; LUVISI, A.; TRIOLO, E.. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. **Spanish Journal Of Agricultural Research**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.173-189, 5 mar. 2013. Instituto Nacional de Investigacion y Tecnologia Agraria y Alimentaria (INIA). <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>.

PETRZIK, Karel et al. Strawberry Vein Banding Virus: Definitive member of de Genus Caulimovirus. **Virus Genes**, Netherlands, v. 16, n. 3, p.303-305, 1998.

PIÉRON, S.; BELAIZI, M.; BOXUS, Ph.. Nodule culture, a possible morphogenetic pathway in *Chicorium intybus* L. propagation. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 53, p.1-11, 1993.

PINTO, Glória et al. Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. **Trees**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.763-769, 25 maio 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00468-010-0446-5>.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

POSTHUMA, K. I. et al. Detection of Blackwell Science, Ltd Strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. **Plant Pathology**, [s.l.], v. 51, p.266-274, 2002.

REYNOLDS, Edward S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, n. 1, p. 208, 1963.

RODRIGUES, A.c.; AMANO, É.; ALMEIDA, S. L.. Sistema fundamental. In: RODRIGUES, A.c.; AMANO, É.; ALMEIDA, S. L.. **Anatomia Vegetal**. Florianópolis: Biologia Ead Ufsc, 2010. Cap. 4. p. 53-64.

ROJAS, Maria R. et al. Cell-to-Cell Movement of Plant Viruses: A Diversity of Mechanisms and Strategies. In: **Current Research Topics in Plant Virology**. Springer International Publishing, 2016. p. 113-152.

ROUT, G. R.; DAS, P. In vitro plant regeneration via callogenesis and organogenesis in *Bambusa vulgaris*. **Biologia plantarum**, v. 39, n. 4, p. 515-522, 1997.

ROUT, G. R.; DAS, P. Somatic embryogenesis and in vitro flowering of 3 species of bamboo. **Plant cell reports**, v. 13, n. 12, p. 683-686, 1994.

SCHERER, R. F. et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 151, p.38-45, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.027>.

SHAKILA, S. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) A newly introduced crop in Bangladesh. **American- Eurasian Journal Of Scientific Research**. p. 151-154. Janeiro, 2007.

SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe agropecuário**, v. 28, n. 236, p. 7-13, 2007.

SILVEIRA, G. S. R.; GUIMARÃES, B. C.. Aspectos sociais e econômicos da cultura do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.7-10, mar./abr., 2014.

SOUZA, Thaysi Ventura de et al. Morpho-histodifferentiation of *Billbergia* Thunb. (Bromeliaceae) nodular cultures. **Protoplasma**, [s.l.], v. 254, n. 1, p.435-443, 22 mar. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-016-0962-2>.

TAMURA, K; NEI, Mi; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11030-11035, 2004.

TENG, W. L.. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**. [s.l.], p. 454-457. 1997.

THOMPSON, J. R., and JELKMANN, W. The detection and variation of Strawberry mottle virus. *Plant Dis*. v. 87, p. 385-390, 2003.

THOMPSON, J. R.; JELKMANN, W.. Strain diversity and conserved genome elements in Strawberry mild yellow edge virus. **Archives Of Virology**, [s.l.], v. , n. , p.1897-1909, 15 jun. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0353-4>.

THOMPSON, J. R. et al. Characterization and complete nucleotide sequence of Strawberry mottle virus: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. **Journal Of General Virology**, Great Britain, v. 83, n. , p.229-239, Não é um mês valido! 2002.

THOMPSON, J.r. et al. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal Of Virological Methods**, [s.l.], v. 111, n. 2, p.85-93, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00164-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00164-2).

THORPE, T. A.. History of plant tissue. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totowa, Nj: Humana Press Inc., 2007. Cap. 2. p. 9-32.

THORPE, T. A.; BIONDI, Stefania. Regulation of Plant Organogenesis. In: MARAMOROSCH, Karl (Ed.). **Advances in Cell Culture**. Eua: Academic Press, 1981. p. 213-239.

THORPE, T. A.; MURASHIGE, Toshio. Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. **Science**, v. 160, n. 3826, p. 421-422, 1968.

TORRICO, A. K. et al. Genetic variability and recombination analysis of the coat protein gene of Strawberry mild yellow edge virus. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.401-409, 6 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13313-016-0426-3>.

TRINDADE, H.; PAIS, M. S.. Meristematic nodule culture: a new pathway for in vitro propagation of Eucalyptus globulus. **Trees**, [s.l.], v. 17, p.308-315, jan. 2003.

TZANETAKIS, Ioannis E.; MARTIN, Robert R.. Expanding Field of Strawberry Viruses Which Are Important in North America. **International Journal Of Fruit Science**, [s.l.], v. 13, n. 1-2, p.184-195, jan. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2012.698164>.

UENO, Bernardo. Manejo integrado de doenças do morango. In: 2º SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2004, Pelotas, Rs. **Documentos 124**. Pelotas: Embrapa, 2004. p. 70 - 76.

VASKOVÁ, D. et al. Real-time NASBA for detection of Strawberry vein banding virus. **European Journal Of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p.213-221, jan. 2004.

VASKOVÁ, D. H.; SPAK, J.; PETRZIK, K.. Variability in sequence of Strawberry vein banding virus. **Biologia Plantarum**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.660-666, 2006.

VENTRELLA, M. C. et al. Lípidios. In: VENTRELLA, M. C. et al. **Métodos histoquímicos aplicados a sementes**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. Cap. 1. p. 10-13.

WANG, Hua et al. Histological and endogenous plant growth regulators changes associated with adventitious shoot regeneration from in vitro

leaf explants of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. ‘Honeoye’). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, [s.l.], v. 123, n. 3, p.479-488, 27 ago. 2015. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-015-0851-y>.

WANG, Qiaochun; VALKONEN, Jari P.t.. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.119-122, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>.

WARRAG, Esam; LESNEY, M. S.; ROCKWOOD, D. J.. Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis* hybrids. **Plant Cell Reports**. [s.l.], p. 586-589. 1991.

WOO, Seong Min; WETZSTEIN, Hazel Y. Morphological and histological evaluations of in vitro regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 2, p. 167-172, 2008.

YANG, Z.; RANNALA, B.. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 303, 2012.

ZHANG, Q.; FOLTA, K. M.; DAVIS, T. M.. Somatic embryogenesis, tetraploidy, and variant leaf morphology in transgenic diploid strawberry (*Fragaria vesca* subspecies *vesca* ‘Hawaii 4’). **BMC Plant Biol**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.23, 2014. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1186/1471-2229-14-23.

ZIMMERMANN, Miguel Jordan. Embriogênese somática. In: CID, L. Pedro Barrueto (Ed.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, Df: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. Cap. 3. p. 67-101.

