

Risco identificado

Uma nova espécie de vírus, denominada *Wheat stripe mosaic virus* (WhSMV), associada ao mosaico do trigo, foi identificada através do uso de técnicas avançadas de sequenciamento genético. A identificação correta é essencial para apoiar os programas de melhoramento genético e a recomendação de medidas eficazes de manejo

Mosaico em trigo causado por vírus, cuja transmissão está ligada ao solo, ocorre em várias regiões produtoras do mundo. No Brasil, se dá principalmente no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e no Sul do Paraná. Estudos de caracterização de cultivares de trigo, indicadas para a região onde predomina essa virose, revelam que, em áreas afetadas, a redução do potencial produtivo das cultivares suscetíveis está ao redor de 50%. Embora não devidamente quantificada, há uma

percepção de aumento de áreas com mosaico e, consequentemente, de seu impacto no rendimento do trigo. Além da vulnerabilidade das cultivares, tem sido questionado se as práticas atuais nos sistemas de produção com uso de cereais de inverno têm levado ao aumento da incidência de mosaico-comum. É possível que a compactação do solo, associada ao plantio direto em sistema de sucessão trigo-soja, contribua para a expansão de áreas com danos à produtividade devido a essa virose.

No Brasil, a observação de sintomas de mosaico em trigo tem mais de 40 anos. Conforme relatado por Caetano e colaboradores em 1978, em estudo pioneiro que descreve a etiologia da doença no Brasil: "A preocupação dos tricultores com uma doença representada por sintomas de mosaico nas folhas e cuja disseminação estaria associada ao solo, data dos fins dos anos 60". No final da década de 1970, a distribuição da doença já era considerada generalizada nos trigais do Rio Grande do Sul. Àquela época, os pesquisadores, utilizando as tecnologias disponíveis, concluíram que a disseminação natural pelo solo, associada ao "fungo não verdadeiro" *Polymyxa graminis* Led, à transmissão mecânica, às propriedades físicas in vitro do agente etiológico, bem como à morfologia de partículas virais em forma de bastonetes associadas à infecção e à ultraestrutura dos tecidos afetados, sugeria que esta anomalia era causada pelo vírus do mosaico do trigo, transmitido pelo solo (*Soil-borne wheat mosaic virus - Furrovirus*) e descrito em Illinois e Indiana nos Estados Unidos em 1923 por McKinney. Além desse vírus, também se citou, posteriormente, o *Wheat Spindle Streak Mosaic Virus* (WSSMV), outro vírus transmitido por *P. graminis* e, possivelmente, associado aos sintomas de mosaico em trigo no Brasil.

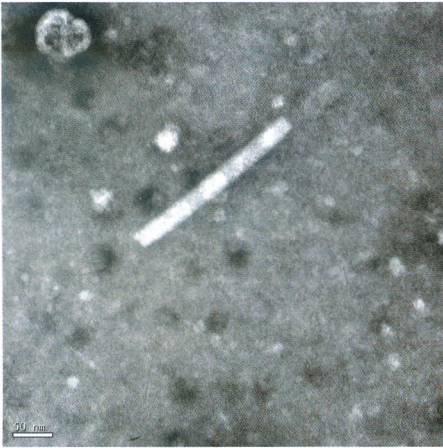
Ao longo destes 40 anos de história, com o surgimento de tecnologias mais precisas para a identificação de vírus, como os testes sorológicos e moleculares, foram realizadas várias tentativas de implementá-las para melhorar o diagnóstico da doença no Brasil e para desenvolver conhecimento sobre o vírus e sua interação com a planta. Porém, de forma intrigante, todas as tentativas de detecção baseadas na suposição de que SBWMV ou WSSMV seriam os agentes causais da doença em trigo no Brasil se mostraram sem sucesso.

A interação vírus-planta também alimentava o enigma. Embora no Brasil seja feita caracterização de cultivares, seleção de genótipos resistentes em campos com mosaico e estudos gené-



Douglas Lau (Embrapa Trigo)

Elliot Watanabe Kitajima



Partícula viral na forma de bastonete rígido frequentemente encontrada em amostras de trigo com sintomas de mosaico-comum do trigo

ticos de herança da resistência e herdabilidade, como o caso da cultivar brasileira de trigo Embrapa 16 (descrita como resistente ao SBWMV), a falta de ferramentas de diagnóstico preciso (antissoros e sequências virais para detecção molecular) dificultava o entendimento dos mecanismos de resistência. Testes recentes no Brasil, com a cultivar americana Karl 92 (que contém um QTL de maior efeito para resistência ao SBWMV, no braço longo do cromossomo 5D), demonstraram ser esta cultivar suscetível ao vírus do mosaico-comum no Brasil. Reação contraditória também foi observada para outras cultivares tidas como resistentes ao SBWMV e/ou WSSMV. Estes fatos, associados a informações discrepantes de reação de cultivares entre locais e anos de cultivo, reforçavam a necessidade de se obter informações precisas sobre a identidade e a variabilidade da população viral associada ao mosaico-comum no Brasil. Uma das hipóteses era de que mesmo pertencendo às espécies de vírus descritas, a população viral no Brasil era tão divergente que interagia de forma distinta com as fontes de resistência, e não reagia com os antissoros e “primers” produzidos a partir de isolados virais de outras regiões. Outra hipótese era de que outra espécie de vírus estava associada ao mosaico do trigo. Entre o conjunto de espécies candidatas estavam mais de 20 espécies de vírus pertencentes a cinco

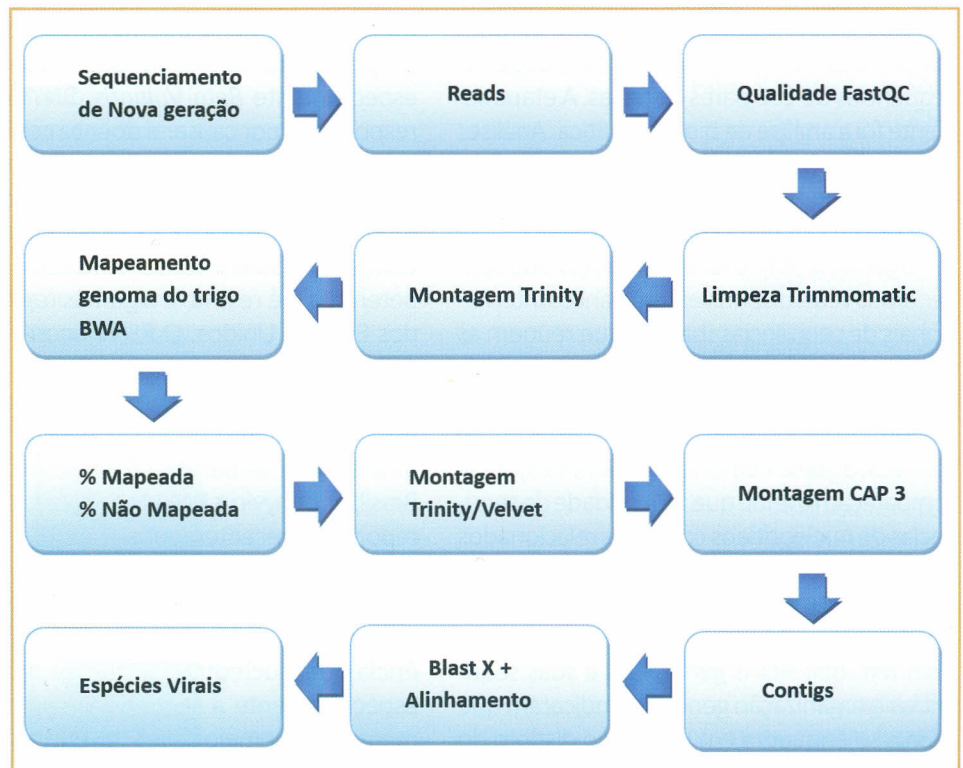
gêneros, *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* e *Bymovirus*, que são conhecidas por serem transmitidas por plasmídiomycetos, como *P. graminis*, para diversas culturas.

A partir dos anos 2000, novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* ou NGS), começaram a ser utilizadas comercialmente e evoluíram rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em um único procedimento. Assim, genomas pequenos, como os de bactérias e de alguns eucariotos, podem ser montados com facilidade. A caracterização molecular de diferentes espécies virais tem se tornado mais acessível com o sequenciamento de nova geração, permitindo o desenvolvimento de ferramentas específicas e seguras para o diagnóstico de tais vírus. O fato de realizar sequenciamento de maneira não direcionada permite explorar toda a gama de vírus que possa estar associada a uma patologia.

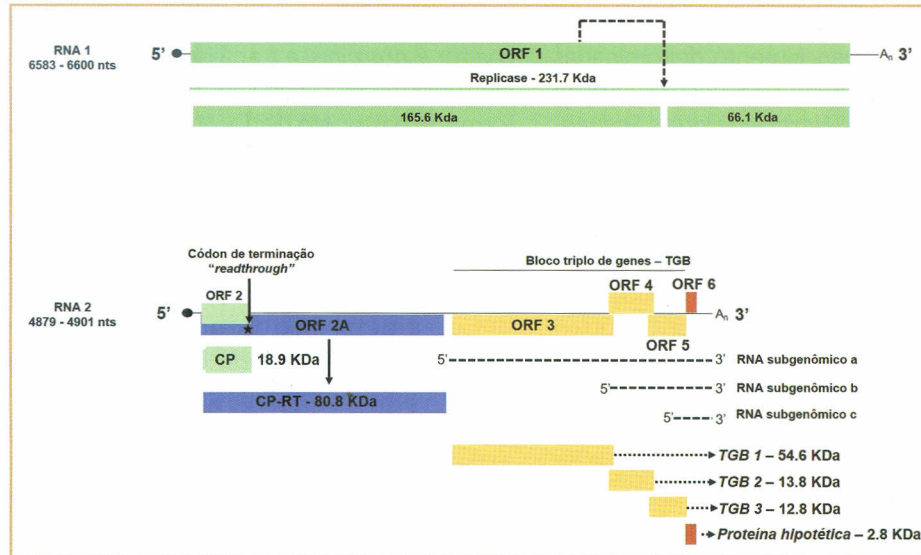
Assim foi descoberto o *Wheat Stripe*

Mosaic Virus (WhSMV). Primeiramente, foram coletadas amostras de oito cultivares de trigo com sintomas típicos de mosaico-comum. A área onde essas plantas foram coletadas tem longo histórico da doença. Nas raízes das plantas com mosaico frequentemente se encontra o vetor *P. graminis*, e a análise ao microscópio eletrônico revelou a presença de partículas em forma de bastonete rígido. Até então, todos os descritores estavam coerentes com a presença de um furovírus como o SBWMV. Além disso, o extrato obtido dessas plantas quando inoculado em *Chenopodium amaranticolor* (uma planta indicadora de vírus) produz reações locais, o que é esperado para um furovírus como o SBWMV. Na busca pelo material genético viral, das plantas coletadas, foi extraído o ácido ribonucleico (RNA). O genoma da grande maioria dos vírus de planta é constituído de RNA (diferentemente de bactérias e organismos eucariotos como o ser humano, cujo genoma é de DNA – ácido desoxirribonucleico). Na célula das plantas hospedeiras onde os vírus se multiplicam, existem vários tipos de RNA. Nessa pesquisa foi utilizado um método para extração de RNA total (todos os tipos de RNA) seguido de uma etapa que enriqueceu a amostra para RNA de dupla fita (double stranded RNA- dsRNA). Como os vírus em sua fase

Análises de bioinformática após sequenciamento de nova geração para obtenção de sequências virais



Representação diagramática do genoma e das estratégias de tradução das regiões codificadoras do WhSMV. O círculo preto representa a estrutura de CAP na extremidade 5' e A(n) da cauda poliadenilada na extremidade 3'. Replicase, CP e RTD estão associadas a replicação, formação da capa proteica e transmissão, respectivamente. A partir dos RNAs subgenômicos podem ser produzidas as três proteínas associadas ao movimento (TGB 1, 2 e 3) e a proteína hipotética (sem função conhecida) (Adaptado de Valente *et al.*, 2019)



replicativa na célula hospedeira utilizam seu próprio RNA como molde, ocorre a formação de RNA dupla fita, assim, o enriquecimento da amostra para dsRNA amplia as chances de se encontrar sequências gênicas virais. Após análise de qualidade e quantidade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao sequenciamento. Primeiramente, o RNA foi convertido em DNA para constituir uma “biblioteca” de fragmentos a serem sequenciados. De cada uma das amostras que foram sequenciadas, foram geradas aproximadamente 30 milhões de pequenas sequências de 100 pares de bases. A etapa seguinte foi a análise de bioinformática. Análises de bioinformática são usadas para juntar (por complementariedade) esses fragmentos, permitindo a montagem do genoma viral.

O genoma obtido foi então comparado com genomas virais disponíveis em bancos internacionais de sequências (bancos que reúnem as sequências nucleotídicas obtidas por laboratórios de todo o mundo, ou seja, nesse caso que contêm as sequências dos vírus atualmente conhecidos pela comunidade científica). Essa comparação revelou que a identidade de sequências de nucleotídeos com vírus relacionados já conhecidos é de, aproximadamente, 50%. Ou seja, o vírus encontrado nas amostras é uma nova espécie até então desconhecida. Esse vírus tem dois RNAs genômicos e suas sequências e organização genômica indicaram que o vírus se enquadra em um grupo distinto do que era hipotetizado originalmente. Ao invés

de um furovírus, o vírus do mosaico do trigo se assemelha mais aos membros da família Benyviridae. Atualmente, apenas o gênero *Benyvirus* compõe essa família, na qual, *Beet Necrotic Yellow Vein Virus* (BNYVV) é a espécie tipo. Nesse gênero também estão classificados *Beet Soil-Borne Mosaic Virus* (BSBMV), *Burdock Mottle Virus* (BdMV) e *Rice Stripe Necrosis Virus* (RSNV). BNYVV e BSBMV são encontrados naturalmente infectando espécies de plantas da família Amaranthaceae, especialmente *Beta Vulgaris*. BNYVV é responsável por causar a doença conhecida como rizomania, uma das doenças de maior importância econômica na cultura da beterraba açucareira no mundo, enquanto BSBMV causa o mosaico da beterraba e é restrito a algumas regiões dos Estados Unidos. O RSNV ocorre na África e nas américas do Sul e Central, infectando poáceas, originalmente o arroz. BdMV foi descrito no Japão, infectando uma espécie de bardana comestível. No Brasil, os benyvírus BNYVV e RSNV foram reportados recentemente.

Para confirmar que o mosaico do trigo está associado ao WhSMV, foram desenhados primers, pequenas sequências de nucleotídeos que se ligam especificamente a sequências complementares. Por meio da reação em cadeia da polimerase (conhecida como PCR), é

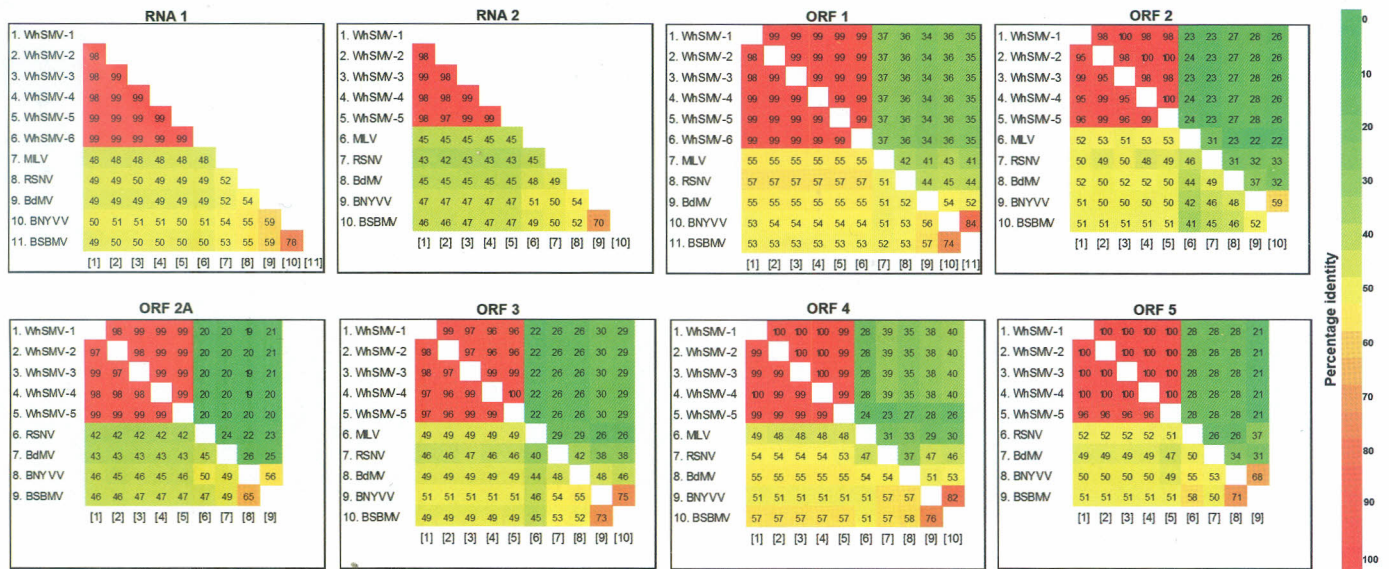
possível amplificar fragmentos que correspondem a regiões do genoma do alvo para os quais se desenharam os primers. Usando essa estratégia foi possível demonstrar que o WhSMV está presente em amostras de trigo com sintomas de mosaico-comum coletadas em regiões do Rio Grande do Sul e Paraná. Estes resultados não excluem a possibilidade de que outros vírus estejam associados aos sintomas de mosaico em trigo no Brasil. No entanto, WhSMV tem sido consistentemente encontrado nas amostras com sintomas típicos dessa patologia.

Novos estudos ainda serão necessários para esclarecer dúvidas sobre a origem do novo vírus, sua distribuição geográfica, sua variabilidade genética e como afeta a resistência das plantas. Fato curioso é que a história do vírus do mosaico do trigo no Brasil se assemelha, em parte, à história do Rice Stripe Necrosis Virus (RSNV). Esse vírus foi descrito em arroz (*Oryza sativa*) em 1977, na Costa do Marfim (Oeste da África). No continente americano foi relatado primeiramente na Colômbia, depois no Equador, Panamá e Brasil e, mais recentemente, na Argentina. RSNV também é transmitido por *P. graminis* e tem partículas na forma de bastonete rígido, e achava-se que era um Furovírus. Porém, o sequenciamento do seu genoma evidenciou que se trata de um Benyvirus. Teriam o WhSMV e RSNV alguma história evolutiva em comum?

ETAPAS FUTURAS

A identificação correta dos vírus é essencial para apoiar os programas de melhoramento genético do trigo e a recomendação de medidas eficazes de manejo. Por ser uma doença de difícil controle, a resistência genética ao mosaico do trigo tem sido a principal estratégia utilizada, desta forma esta doença é um dos principais focos dos programas de melhoramento de trigo no Brasil. Sem o conhecimento do agente causal, gastavam-se muito tempo e espaço tentando achar locais apropriados para seleção de materiais através da fenotipagem das linhagens, uma vez que o uso de marcadores moleculares definidos no exterior apresenta resultados inconsistentes. Com a descoberta deste novo vírus será possível mapear os genes de resistência

Matriz representando o percentual de identidade dos isolados de WhSMV em relação a outros vírus da família Benyviridae para RNA 1, RNA 2 e todas as regiões codificadoras (*Open Reading Frames - ORFs*), exceto a ORF 6. Fonte: extraído de Plant Pathology (Valente *et al.*, 2019)



e desenvolver marcadores moleculares confiáveis para auxiliar na seleção de genótipos resistentes. Com isso, os programas de melhoramento genético ganham eficiência e agilidade, e os produtores mais segurança para o cultivo do trigo nas regiões onde esta doença ocorre.

REDE DE PESQUISA MOSAICO-COMUM DO TRIGO

A identificação de uma nova espécie viral associada ao mosaico do trigo é o primeiro resultado divulgado pelo projeto “Análise da população viral e estratégias de manejo para o mosaico comum em trigo no Brasil”. Além de identificar com maior precisão os diferentes vírus que causam o mosaico do trigo, o projeto também avalia a eficiência de estratégias genéticas, químicas e culturais no controle da doença.

O projeto foi estruturado de forma multi-institucional, combinando universidades e empresas de pesquisa públicas e privadas. Etapas do sequenciamento e análise da variabilidade da população viral estão sendo realizadas na Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), com apoio da Embrapa Uva e Vinho e da Embrapa Informática Agropecuária. A caracterização fenotípica, a análise da população viral e a avaliação das práticas de manejo estão sendo executadas em rede de ensaios de campo nas regiões tritícolas do Sul do Brasil e conduzidas pela Biotrigo Genética, CCGL Tecnologia, Embrapa Trigo, Fundação ABC e OR Melhoramento de Sementes. No total, serão quatro anos de

pesquisa, com experimentos em sete municípios do Rio Grande do Sul e do Paraná. Como resultados, objetiva-se determinar a variabilidade genética da população viral e a eficiência de estratégias genéticas, químicas e culturais para o adequado manejo do mosaico-comum do trigo.

- Anderson Santi
Embrapa Trigo
- Antônio Nhani Junior
Embrapa Informática Agropecuária
- Caroline Wesp Guterres
CCGL TEC
- Douglas Lau
Embrapa Trigo
- Fabio Nascimento da Silva
UDESC
- Fernando Sartori Pereira
Udesc
- Genei Dalmago
Embrapa Trigo
- Juliana Borba Valente
Udesc
- Lucas Antônio Stempkowski
Udesc
- Osmar Rodrigues
Embrapa Trigo
- Paulo Kuhnem
Biotrigo Genética
- Ricardo Trezzi Casa
Udesc
- Sandra Maria Zoldan
OR Sementes
- Senio José Napoli Prestes
Fundação ABC
- Thor Vinícius Martins Fajardo
Embrapa Uva e Vinho



Biotrigo Genética