

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ESPIGA BRANCA DO TRIGO NO BRASIL

Fernando Sartori Pereira¹, Lucas Antonio Stempkowski², Douglas Lau³, Thor Vinícius Martins Fajardo⁴, Antonio Nhani Júnior⁵, Amauri Bogo⁶, Ricardo Trezzi Casa⁶, Fabio Nascimento da Silva⁶

¹Bolsista Doutorado Capes, Programa de pós-graduação Universidade Estado de Santa Catarina, Lages, SC. ²Bolsista Doutorado CNPq, Programa de pós-graduação Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. ³Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. ⁴Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS. ⁵Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP. ⁶Universidade Estado de Santa Catarina, Lages, SC E-mail: fernandopereira2254@hotmail.com

Sintomas similares ao da virose da espiga branca foram relatados no Brasil desde 1948 na região de Pelotas no Rio Grande do Sul (DESLANDES, 1949). A identificação do agente etiológico e ocorrência em outros estados brasileiros, foram reportados nos anos 1970, sendo observada sua ocorrência em áreas tritícolas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1970; CAETANO, 1982).

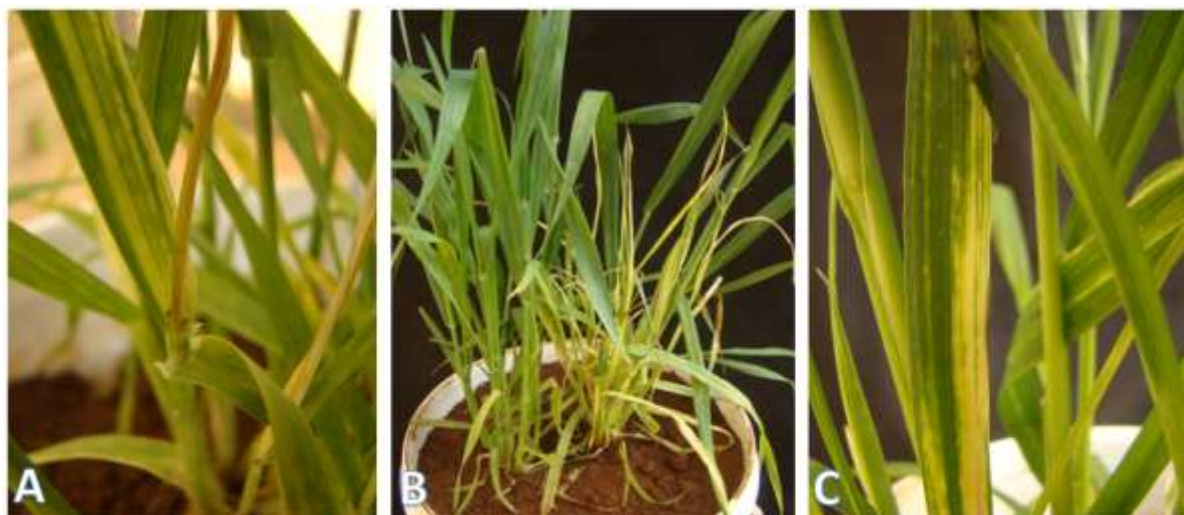
Os sintomas da doença consistem na redução da estatura da planta, amarelecimento pálido em faixas nas folhas de trigo, estrias cloróticas e mosaico estriado, podendo causar morte da planta antes do perfilhamento. As espigas das plantas afetadas são parcialmente e/ou inteiramente de coloração amarelo-pálido, apresentando em alguns casos malformação nas aristas, sem grãos e, por vezes, torcidas anormalmente para baixo (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1970).

Ao examinar tecidos de folhas sintomáticas, com auxílio de microscopia convencional e eletrônica, são observadas inclusões intracelulares de aspecto fibroso e enovelado, que se localizam no citoplasma e são formadas por uma massa de partículas filamentosas. Ocorrem alterações celulares, como hipertrofia do nucléolo, degeneração dos cloroplastos e vesicularização do retículo endoplasmático (KITAJIMA; CAETANO; COSTA, 1971). Trabalhos realizados na década de 1970 associaram os sintomas dessa doença a partículas virais compatíveis com o gênero *Tenuivirus* (CAETANO; KITAJIMA; COSTA, 1970). Atualmente, os vírus pertencentes a esse gênero são: *echinocloa hoja blanca virus* (EHBV), *iranian wheat stripe virus* (IWSV), *maize stripe virus* (MSpV), *melon chlorotic spot virus* (MeCSV), *rice grassy stunt virus* (RGSV), *rice hoja blanca virus* (RHBV), *urochloa hoja blanca virus* (UHBV), *rice stripe virus* (RSV) e *european wheat striate mosaic virus* (EWSMV) (ICTV, 2021).

A transmissão de espécies virais do gênero *Tenuivirus* ocorre por cigarrinhas de maneira persistente propagativa. Em estudo realizado por Costa et al. (1973) com o vírus da espiga branca em plantas de trigo, a espécie *Sogatella kolophon* (Kirkaldy, 1907) apresentou capacidade de transmissão. Atualmente, os sintomas característicos dessa virose podem ser observados esporadicamente em lavouras de trigo da região Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (principalmente no Estado do Paraná). O vírus da espiga branca ainda não foi aprovado como espécie definitiva pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - ICTV), existindo pouca informação sobre esse vírus no Brasil.

O objetivo desse estudo foi caracterizar molecularmente a espécie viral associada a plantas de trigo apresentando sintomas da virose da espiga branca utilizando o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS). Em 2018, amostra composta de folhas e colmos de trigo sintomáticos das cultivares [TBIO Sinuelo, TBIO Itaipu e BRS Reponte (Figura 1)] foi coletada no município de Ponta Grossa no estado do Paraná, Brasil (25°00'50"S; 50°09'07"W; 886 m altitude).

Figura 1. Sintomas típicos da virose da espiga branca em três cultivares de trigo (*Triticum aestivum*) coletadas em Ponta Grossa no estado do Paraná em 2018.



A, B, C – Cultivares de trigo TBIO Sinuelo, TBIO Itaipu e BRS Reponte respectivamente. Fonte: Douglas Lau, 2018.

A amostra composta foi armazenada em ultrafreezer (-80°C) para posterior extração de RNA de fita dupla (dsRNA), conforme descrito por Valverde et al. (1990), com algumas modificações. A quantidade total de dsRNA extraído foi de 15,3 microgramas. A partir do dsRNA foi gerada a biblioteca de DNA complementar (cDNA)

utilizando o Kit de Preparação de Amostras de RNA Total TruSeq Stranded (Illumina, EUA). A qualidade da biblioteca foi verificada com o software FastQC e as leituras e adaptadores de baixa qualidade foram removidos pelo Trimmomatic (Bolger et al., 2014). A biblioteca foi sequenciada na plataforma Illumina X ten utilizando “*paired end 150 bp sequencing*”. A biblioteca e o sequenciamento foram realizados por Proteimax Biotecnologia Ltda (São Paulo, SP).

As leituras (*reads*) foram inicialmente analisadas com o auxílio do software Trinity (Haas et al., 2013) para montagem de RNaseq. Os contigs resultantes foram analisados quanto à similaridade com sequências depositadas em bancos de dados públicos, buscando identificar sequências similares a genomas virais. As sequências homólogas a porções do genoma do trigo e outros cereais, após o mapeamento no genoma do trigo (Ensembl Plants, http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index) com auxílio do software BWA (Li; Durbin, 2009), foram eliminadas. Os contigs restantes foram subsequentemente comparados com sequências depositadas nos bancos de dados NCBI usando-se as ferramentas de pesquisa BLASTn e BLASTx com parâmetros padrões.

Foram gerados cerca de 55 milhões de *reads* para a amostra analisada. Após análise dos dados, foram identificados 39 contigs com similaridade a sequências de vírus. A partir desses contigs, uma sequência quase completa do genoma viral foi montada.

O genoma viral apresenta material genético com ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, sentido negativo, apresentando cinco segmentos. O RNA1 apresenta (8959 nt), RNA2 (3602 nt), RNA3 (2257 nt), RNA4 (1864 nt) e RNA5 (1447 nt). O genoma apresenta oito *Open Reading Frames* (ORFs), sendo que o RNA1, de polaridade negativa, apresenta o maior segmento do genoma, codificando uma proteína que contém o domínio de RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) de 336 kilodalton (kDa). O RNA2, RNA3 e RNA4 são ambisenso, ou seja, codificam proteína na sequência no sentido viral (5'-3') e no sentido viral complementar (3'-5'), o RNA5 de polaridade negativa codifica uma proteína com 40 kDa.

Em análises preliminares, o genoma viral apresentou maior identidade com sequências de vírus relatado na cultura do trigo e arroz. Serão desenhados iniciadores específicos para a validação de que o genoma viral montado está presente nas amostras originais. Desta forma, será determinado o agente etiológico da virose da

espiga branca no Brasil e poderão ser disponibilizadas novas ferramentas de diagnóstico molecular, favorecendo estudos desse patossistema.

REFERÊNCIAS

BOLGER, A. M., LOHSE M., USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, p. 2114-2120, 2014.

CAETANO, V.R., KITAJIMA, E.W., COSTA, A.S. Espiga branca do trigo, uma possível moléstia de vírus. **Bragantia**, Campinas, v. 29, p. XLI-XLIV, 1970.

CAETANO, V. da R. Vírus da espiga branca do trigo. In: OSÓRIO, E.A. (Ed.). Trigo no Brasil. Campinas: Fundação Cargill, 1982. v. 2, p. 570-573.

COSTA, A. S.; CAETANO, V. R.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Transmissão da espiga branca por cigarrinhas (Sogatella). **VI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**. 2p.,1973.

DESLANDES, J. A. Doenças de vírus em cereais em Pelotas. **AGROS** 2, 1949.

HAAS, B.J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P.D.; BOWDEN, J.; COUGER, M.B; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M.D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHE, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C.N.; HENSCHER, R.; LEDUC, R.D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. De novo transcript sequence reconstruction from RNAseq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v.8, p.1494-512, 2013.

International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/215/tenuivirus. Acesso em 22 de jun. 2021.

KITAJIMA, E.W., CAETANO, V.R., COSTA, A.S. Inclusões intracelulares associadas a espiga branca do trigo. **Bragantia**, v.30, n. 10, p.101-108, 1971.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. **Bioinformatics**, v.25, p.1754-1760, 2009.

VALVERDE, R. A, NAMETH S. T, JORDAN R. L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. **Plant Disease**, v.74, p. 255–8, 1990.