

Ocorrência de vírus em morangos no Rio Grande do Sul e detecção biológica e molecular

Fabio N. da Silva¹

Osmar Nicke²

Iraci Sinski²

Amauri Bogo¹

Thor V.M. Fajardo²

João Bernardi²

Introdução

A cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne) representa um segmento importante da fruticultura no RS. Destacam-se três regiões produtoras: o Vale do Caí, o principal produtor de morangos de mesa, seguido da Serra Gaúcha, enquanto a região de Pelotas têm ênfase na produção de morango de indústria (Antunes & Duarte, 2005).

A produção desta fruteira, devido às características epidemiológicas dos agentes patogênicos virais, deve ser feita com mudas livres de vírus. As mudas importadas são oriundas principalmente do Chile, Argentina e dos Estados Unidos e entram no país após controles massais de pouco rigor. Este quadro demonstra a fragilidade no sistema de produção de mudas de morangos no país.

Os principais vírus do morango, o mosqueado (*Strawberry mottle virus* - SMOV), a "clorose marginal" (*Strawberry mild yellow edge virus* - SMYEV), o "encrespamento" (*Strawberry crinkle virus* - SCV), o "bandeamento de nervuras" (*Strawberry vein banding virus* - SVBV) e a "palidose" (*Strawberry pallidosis-associated virus*), geralmente, não induzem sintomas perceptíveis em cultivares comerciais. O presente trabalho teve como objetivo oferecer um quadro da situação fitossanitária de morangueiros cultivados e de mudas comercializadas no RS, com respeito às infecções dos vírus transmissíveis por vetores alados.

Material e Métodos

1. Cultivares analisadas e locais de coleta

Foram amostradas as cvs. Camarosa, Oso grande, Dover, Tudla, Aromas, Verão, Burkley, Diamante, Serrana, Comanche, Sweet Charlie e Ventana em S. Sebastião do Caí, Feliz, Vacaria, Bom Princípio, região de Pelotas, Farroupilha, Caxias do Sul, Bento Gonçalves e Flores da Cunha. As amostras foram transplantadas para uma mistura de substrato, terra e palha de arroz, e mantidas em casa de vegetação com temperaturas entre 10 e 28°C, recebendo adubo foliar a cada 15 dias.

¹Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC; UDESC, Cx. Postal 281, 88.520-000 - Lages, SC.

²Embrapa Uva e Vinho, Cx. Postal 130, 95.700-000 - Bento Gonçalves, RS. (nickel@cnpuv.embrapa.br)

2. Indexagem biológica, análises sorológicas e moleculares

A indexagem em UC-5 e UC-10 foi executada por enxertia de folíolos. Foram avaliados os sintomas, a partir de 7 d.p.i. UC5 e UC10 infectadas individualmente foram controles positivos. O teste imunoenzimático ELISA direto e indireto para SMYEV foi como descrito anteriormente (Nickel et al., 2004). As cvs. avaliadas foram Camarosa, Oso Grande, Verão, Aromas, Dover e Tudla. UC5 e UC10 sadias foram controles negativos. Para a RT-PCR utilizaram-se três métodos de extração de RNA total (Rott & Jelkmann, 2001; Thompson & Jelkmann, 2003; RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). A RT-PCR foi executada como descrito anteriormente (Nickel et al. 1999) com modificações (Rott & Jelkmann 2001) e iniciadores para SCV, SMoV, SMYEV, SVBV (Thompson et al., 2004) e palidose (Tzanetakis et al. (2004). Os produtos da PCR foram separados em gel e visualizados sobre luz UV.

Resultados

Em UC5 e UC10 foram observados sintomas virais como epinastia, deformação foliar, enfezamento, salpicado clorótico e manchas necróticas, amarelecimento da borda das folhas, clareamento de nervuras e mosaico. Na indicadora UC-5 os controles positivos dos vírus SCV, SMYEV e SMoV apresentaram sintomas muito semelhantes uns aos outros. Esta observação confirma relato de Frazier et al. (1987) em que os autores descrevem sintomas similares de doenças diferentes em *F. vesca* var. *semperflorens* cv. 'Alpine'. SMYEV ocorreu em cerca de 50% do material avaliado. Cerca de 10% apresentaram deformação foliar em UC10, típica da induzida por SCV. 40% de sintomas ocorreram somente em UC10, indicando presença de "palidose", o que deve ser validado por RT-PCR. Foi comum a ocorrência de infecções múltiplas. O teste ELISA confirmou a RT-PCR.

O método de extração de ácidos nucléicos totais descrito por Thompson *et al.* (2003), foi o mais consistente. A baixa reproducibilidade das reações de RT-PCR é atribuída à presença de inibidores em extratos de morangos. Conseguiu-se a amplificação por RT-PCR de fragmentos de SMYEV das cultivares Camarosa e Tudla. O SCV foi amplificado dos controles positivos, mas não de plantas a campo. Com estes resultados conclui-se que há necessidade de melhorar os protocolos de extração de ácidos nucléicos totais de morangos. Fragmentos de SMYEV de 271 pb da cv. Camarosa foram amplificados e clonados em vetor pGEM-T Easy para sequenciamento e comparação com seqüências de bases de dados, como subsídio a um melhor conhecimento dos isolados regionais e maior precisão na síntese de iniciadores de PCR. Outro uso previsto para os fragmentos é a síntese de sondas para detecção de SMYEV como suporte ao trabalho de diagnóstico que até o momento ainda esbarra na qualidade dos extratos de ácidos nucléicos totais, o que não foi sanado superados durante a execução deste trabalho. Constata-se que a detecção de vírus de morangos, pelos fatores mencionados não é um procedimento trivial e exige protocolos muito elaborados.

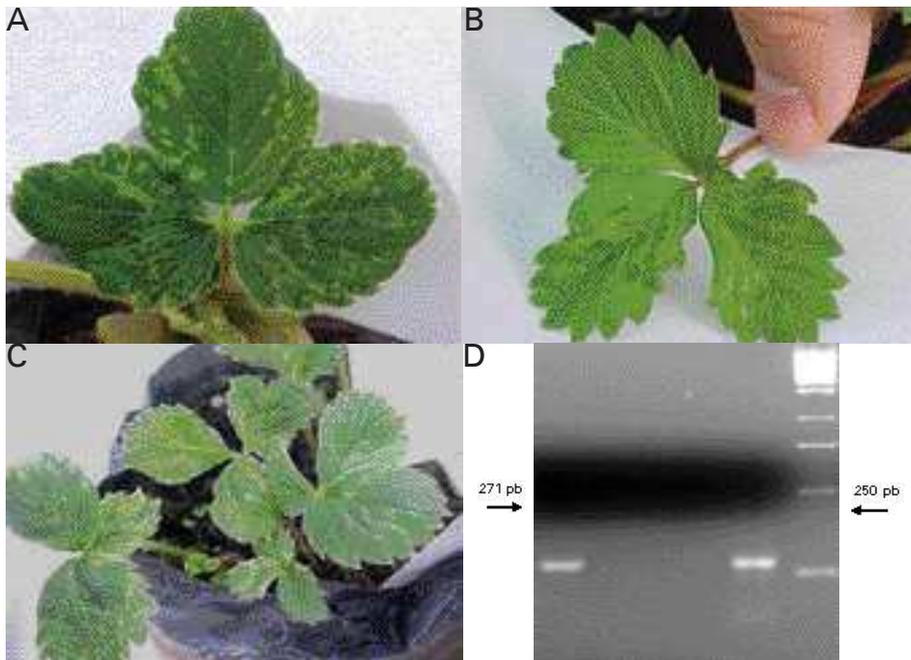


Figura 1. Sintomas produzidos por diferentes inóculos. (A) Mosaico salpicado em UC5, inóculo de 'Aromas' (Farroupilha, RS); *Strawberry mottle virus*; (B) Deformação foliar, manchas cloróticas e clareamento de nervuras em UC10 inoculada com 'Oso Grande'; *Strawberry crinkle virus* (Farroupilha, RS); (C) Enfezamento, deformação foliar e manchas cloróticas em 'Camarosa' (Farroupilha, RS) causadas por uma infecção mixta. D) Análise de produtos de RT-PCR para amplificação de SMYEV, Agarose 1%, M. Marcador molecular (1 Kb DNA Ladder, Fermentas); C+, Controle positivo; C-, Controle negativo. 1 e 2. Amostras das cultivares Camarosa, infectada, (Farroupilha, RS) e Camarosa não infectada (Bento Gonçalves, RS), respectivamente.

Conclusões

As reações de UC5 e UC10 indicam infecções; entretanto, geralmente, não permitem a identificação inequívoca das espécies virais.

Amostras provenientes do Chile, Argentina e viveiros do Rio Grande do Sul estão infectados, geralmente, por pelo menos 1 vírus; infecções mixtas são comuns

Os protocolos de diagnóstico por RT-PCR têm que ser ajustados

Referências Bibliográficas

ANTUNES, L.E.C. & DUARTE FILHO, J. Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 5, Versão eletrônica, novembro, 2005.

FRAZIER, N.W. Six new strawberry indicator clones evaluated for the detection and diagnosis of twelve graft-transmissible diseases. *Plant Disease Reporter*. n. 58, p.28-31, 1975.

FRAZIER, N.W., E.S. SYLVESTER & R. RICHARDSON. Strawberry crinkle. In: R.H. Converse (ed.) *Virus Diseases of Small Fruits*. USDA, ARS, Agricultural Handbook n° 631, p. 20-25. 1987.

NICKEL, O., TARGON, M.L.N.P.; FAJARDO, T.V.M.; MACHADO, M.A.; TRIVILIN, A.P. Production and use of polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in *Escherichia coli*. *Acta Horticulturae* 657, 35-40. 2004

NICKEL, O., W. JELKMANN & G.B. KUHN. Occurrence of in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. *Fitopatol. bras.* 24(3), 444-446; 1999.

ROTT, M. E. & JELKMANN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *Eur. J. Plant Pathol.* n. 107, p. 411-420. 2001.

THOMPSON, J.R.; WETZEL, S.; KLERKS, M.M.; VASKOVÁ, D.; SCHOEN, C.D.; SPAK, J.; JELKMANN, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Jornal of Virological Methods.* n. 111, p. 85 – 93, 2003.

TZANETAKIS, I.E., E.B. HALGREN, W.M. WINTERMANTEL, K.E. KELLER & R.R. MARTIN. Two Criniviruses are associated with the strawberry pallidosis disease. *Acta Hort* 656, 21-26. 2004.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do projeto 04/573.2 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS. O primeiro autor foi bolsista da FAPERGS.