

## Monitoramento da distribuição de vírus transmitidos por *A. tosichella* no Brasil

Douglas Lau<sup>1</sup>, Talita Bernardon Mar<sup>2</sup>, Paulo Roberto Valle da Silva Pereira<sup>1</sup> e Jurema Schons<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Trigo, BR 285, km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo- RS, Brasil. <sup>2</sup>Universidade de Passo Fundo, BR 285, São José, CEP: 99052-900, Passo Fundo-RS, Brasil.

### Introdução

Dos vírus transmitidos por *Aceria tosichella* Keifer, o *Wheat streak mosaic virus* (Tritimovirus, Potyviridae) e o *High plains virus* (HPV) encontram-se distribuídos em várias regiões tritícolas da Argentina (TRUOL et al., 2004; TRUOL, 2009). Naquele país, existem condições ambientais que permitem o desenvolvimento de populações do ácaro que resultam em epidemias de ambos os vírus. No Brasil, *A. tosichella* era considerada praga quarentenária até 2008, quando foi oficialmente relatada (PEREIRA et al., 2009). Desde então, monitoramentos a campo em regiões tritícolas revelam que sua distribuição geográfica tem ampliado (vide resumos anteriores sobre o mapeamento da distribuição geográfica de *A. tosichella* no Brasil). As populações deste ácaro presentes no Brasil e na Argentina são muito similares (SKORAKA et al., 2012) o que pode indicar uma origem comum e/ou migração dado a proximidade dessas regiões. Assim, se há populações de *A. tosichella* da Argentina virulíferas é plausível supor que as populações brasileiras também sejam e que com o aumento da distribuição do vetor no Brasil também ocorra aumento da probabilidade de detecção dos vírus transmitidos. Neste trabalho, o monitoramento da ocorrência de vírus transmitidos por *A. tosichella* foi conduzido concomitantemente ao processo de monitoramento da população vetora. As amostras oriundas dos pontos de coleta foram destinadas além da avaliação da presença de *A. tosichella* para avaliação da presença de WSMV e HPV.

### Material e Métodos

Nos anos de 2009, 2010 e 2011 foram consideradas na análise 959 amostras oriundas de 187 pontos georreferenciados, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, cobrindo 99 municípios das principais regiões produtoras de trigo destes estados. Em 2012, foram analisadas 216 amostras oriundas do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Foram utilizados como critérios diagnósticos a presença de sintomas de mosaico e amarellecimento nas plantas coletadas, testes sorológicos (DAS-ELISA), testes biológicos (inoculação em plantas hospedeiras) e testes moleculares.

*Procedimentos de coleta e processamento das amostras.* Para as coletas realizadas entre 2009 e 2011, o material para ELISA (folhas e colmos) era colocado em sacos plásticos e armazenados em caixas de isopor com gelo. O material para transplante (retirado com raízes) era colocado em sacos plásticos e umedecido para suportar a viagem. Em laboratório, o ELISA era aplicado diretamente a amostra de campo e, em caso de amostra positiva, o RNA total era extraído da planta correspondente que havia sido transplantada visando detecção do vírus por RT-PCR. Por motivos de suspeitas de reação cruzada quando da aplicação do teste sorológico, sobretudo em gramíneas nativas, adicionou-se uma etapa de inoculação em trigo. O trigo além de ser uma planta hospedeira que permite a detecção do vírus por exibição de sintomas, também garante uniformidade nos testes sorológico (evitando o problema de se trabalhar com diferentes hospedeiros). Infelizmente esta técnica pode ser aplicada apenas ao WSMV, que é facilmente

transmitido por inoculação mecânica, mas não ao HPV que não é transmitido por este método. Para as coletas do ano de 2012, as amostras de plantas foram colocadas em sacos plásticos e armazenados em caixas de isopor com gelo sendo submetidas a inoculação (detecção biológica) e testes sorológicos.

**Detecção biológica.** A fim de diagnosticar a presença de vírus (WSMV) (por método biológico) foram inoculadas plantas de trigo da cultivar BRS Guabiju (Figura 1A). A amostra de campo foi macerada em tampão fosfato de potássio (0,1M, pH 7,2) gelado com celite. O extrato vegetal tamponado foi inoculado nas folhas de plantas no estágio de três folhas expandidas, com auxílio de um algodão. Os sintomas foram observados de 15 a 30 dias após a inoculação. Após 30 dias da inoculação foi realizado DAS-ELISA. No ano de 2012, também foram realizadas inoculações em *Chenopodium amaranticolor* que exibe reações a outros vírus que causam mosaico em trigo.

**Detecção sorológica.** A detecção dos fitovírus *Wheat streak mosaic virus* e *High plains virus* em amostras de cereais foi realizada por DAS-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando anti-soros da Agdia ([www.agdia.com](http://www.agdia.com)). Após a reação enzimática, a intensidade da coloração foi medida em leitora de placa de ELISA (TP-Reader), no comprimento de onda de 405 nm.

**Detecção molecular.** A detecção molecular foi realizada para amostras com absorvância superior a 1,5 vezes ao controle negativo, com sintomas típicos de mosaico estriado e/ou presença do ácaro ou sintomas em plantas inoculadas. A detecção molecular foi feita por meio de RT-PCR utilizando dois pares de oligonucleotídeos. Um par de oligonucleotídeos parecia no gene da capa protéica e outro no gene VPg-NIA. Os detalhes dos métodos moleculares empregados e testes de marcadores estão descritos em Mar et al. (2013).

## Resultados e Discussão

As amostras analisadas entre 2009 e 2011 resultaram no relato da ocorrência do WSMV no Brasil (MAR et al., 2013). Das 959 amostras coletadas nesse período, 450 foram inoculadas em trigo. Destas apenas duas reproduziram sintomas de mosaico estriado nas plantas inoculadas (Figura 1B). Estas amostras eram oriundas de plantas de casa de vegetação com fortes sintomas de mosaico estriado e com altas populações do ácaro *A. tosichella*. A partir de amostras de campo não foi possível reproduzir sintomas nas plantas de trigo inoculadas. A infecção por WSMV nas plantas de trigo sintomáticas foi confirmada por DAS-ELISA. RNA total foi extraído de 120 plantas com sintomas de mosaico. Por meio de RT-PCR foi possível detectar a presença de WSMV em 9 amostras (Tabela 1). Não foi possível amplificar HPV em nenhuma amostra. Apesar de por meio de RT-PCR ter sido obtida amplificação positiva para WSMV em 9 amostras, resultados positivos de detecção biológica por meio de inoculação vegetal tamponado (reprodução dos sintomas) seguido de confirmação por sorologia só foi possível para duas amostras. Ocorre que das 9 amostras cinco (485, 486, 912, 915, 1256) são oriundas de casa de vegetação, nas quais surtos de *Aceria tosichella*, com populações elevadas do ácaro, vem ocorrendo desde 2006. Para estas plantas obtém-se consistentemente bandas “intensas” na RT-PCR. Para as amostras de campo, o DAS – ELISA efetuado diretamente das plantas coletadas foi negativo ou duvidoso (com sinal pouco superior ao controle negativo), a inoculação nas plantas hospedeiras não reproduziu sintomas e as bandas na RT-PCR foram de fraca intensidade. É possível, para as plantas coletadas a campo, que o título viral esteja abaixo do limiar para detecção por sorologia e para a transmissão mecânica, mas suficiente para ser detectado por RT-PCR. Das amostras de campo com detecção de WSMV, apenas no ponto de São Luiz Gonzaga (amostra 1233) foi encontrado concomitantemente a presença de espécimes de *A. tosichella*. No entanto, os pontos RT-PCR positivos estão dentro da circunscrição da ocorrência de *A. tosichella* no Brasil.

Outro ponto importante a ser considerado na interpretação dos resultados é que embora o número de plantas hospedeiras com sintomas de mosaico seja elevado (sobretudo trigo), outros vírus causam sintomas similares. Em trigo, principalmente, é comum no sul do Brasil mosaico causado por vírus transmitidos por *Polymyxa graminis* (CAETANO, 1982).

HPV não foi detectado em nenhuma amostra analisada, porém no caso específico deste vírus o maior peso das análises recai sobre o teste sorológico. O teste biológico não é aplicável e para a RT-PCR não havia disponibilidade de um controle positivo.

Para o ano de 2012, mesmo nos pontos como ocorrência de *A. tosichella* (vide resumos anteriores sobre o mapeamento da distribuição geográfica de *A. tosichella* no Brasil) não foi detectado WSMV ou HPV em campo.

Considerando o total de amostras analisadas, e que os métodos sorológicos biológicos e moleculares sempre foram capazes de detectar WSMV quando de surtos em casa de vegetação, é razoável supor que a dificuldade para detecção de WSMV nos campos do Brasil se deve a sua baixa ocorrência, hipótese sustentada pelos dados da população do vetor (que igualmente se mantém em baixos níveis).

O número de plantas hospedeiras coletadas com sintomas de mosaico foi elevado (sobretudo trigo), indicando a necessidade de aprimorar diagnóstico para outros vírus.

HPV não foi detectado em nenhuma amostra analisada, porém no caso específico deste vírus o maior peso das análises recaiu sobre o teste sorológico. O teste biológico não é aplicável e para a RT-PCR somente recentemente foi demonstrada a eficácia de detecção.

## Referências

CAETANO VR (1982) Mosaico do trigo transmitido pelo solo '*Wheat Soilborne Mosaic Virus*' Tobamovirus. In: OSÓRIO, E. A. (Ed.). Trigo no Brasil. Campinas: Fundação Cargill, 2:563-570.

PEREIRA, P. R. V. S.; NAVIA, D.; SALVADORI, J. R.; LAU, D. Occurrence of *Aceria tosichella* in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 5, p. 539-542, 2009.

SKORACKA, A.; KUCZYNSKI, L.; MENDONÇA, R. S.; DABERT, M.; SZYDŁO, W.; KNIHINICKI, D.; TRUOL, G.; NAVIA, D. Cryptic species within the wheat curl mite *Aceria tosichella* (Keifer) (Acari, Eriophyoidea) revealed by mitochondrial, nuclear and morphometric data. **Invertebrate Systematics**, Collingwood, v. 26, n. 4, p. 417-433, 2012.

MAR, T. B.; LAU, D.; SCHONS, J.; PEREIRA, P. R. V. S.; CARMINATTI, A. J. Identification and characterization of *Wheat Streak Mosaic Virus* Isolates in wheat-growing areas in Brazil. **International Journal of Agronomy**. Cairo, 2013. 6 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/983414>>.

TRUOL, G.; FRENCH, R.; SAGADIN, M.; ARNEODO, J. First report of *Wheat streak mosaic virus* infecting wheat in Argentina. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 33, n. 1, p. 137-138, 2004.

TRUOL, G. **Enfermedades virales asociadas al cultivo de trigo en Argentina**: reconocimiento, importancia, formas de transmisión y manejo. [S. l.]: Ed. Autor, 2009. 77 p.



**Figura 1.** Detecção de WSMV por meio de inoculação em plantas de trigo. A - Visão geral de um ensaio. B - Plantas com sintomas de infecção por WSMV (direita) em relação a plantas controle (esquerda). Detalhes dos sintomas no quadro pequeno.

**Tabela 1.** Amostras positivas para WSMV nos anos de 2009, 2010 e 2011

<b>Código</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>Localidade</b>	<b>UF</b>	<b>Data</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>A. tosicHELLa</b>	<b>Sintoma</b>
485	-28°13'49,89"	-52°24'15,99"	Passo Fundo	RS	18/01/10	<i>T. aestivum</i>	P*	Mos**
486	-28°13'49,89"	-52°24'15,99"	Passo Fundo	RS	18/01/10	<i>T. aestivum</i>	P	Mos
912	-28°13'49,89"	-52°24'15,99"	Passo Fundo	RS	1/10/10	<i>T. aestivum</i>	P	Mos
913	-28°13'33,99"	-52°23'23,75"	Passo Fundo	RS	25/10/10	<i>T. aestivum</i>	ND	Mos
915	-28°13'49,89"	-52°24'15,99"	Passo Fundo	RS	24/1/11	<i>T. aestivum</i>	P	Mos
1233	-28°24'57,22"	-55°00'29,41"	São Luiz Gonzaga	RS	15/9/11	<i>T. aestivum</i>	P	Mos
1241	-28°54'48,00"	-54°15'28,00"	Jóia	RS	16/9/11	<i>T. aestivum</i>	ND	Mos
1254	-28°13'33,99"	-52°23'23,75"	Passo Fundo	RS	26/9/11	<i>T. aestivum</i>	ND	Mos
1256	-28°13'49,89"	-52°24'15,99"	Passo Fundo	RS	10/10/11	<i>T. aestivum</i>	P	Mos

\*P – presente; ND – não detectado

\*\* - Mos – mosaico