

Caracterização biológica e molecular de isolados de *Wheat streak mosaic virus* no Brasil

Talita Bernardon Mar¹, Douglas Lau², Jurema Schons¹ e Paulo Roberto Valle da Silva Pereira²

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

Introdução

O *Wheat streak mosaic virus* (WSMV - *Potyviridae*, *Tritimovirus*), transmitido pelo ácaro *Aceria tosichella* Keifer (Acaria: Eriophyidae), é considerado um dos vírus de maior importância econômica nas regiões de cultivo de trigo no mundo (NAVIA et al., 2013). Na América do Sul, o vírus foi detectado em 2002 na Argentina (TRUOL et al., 2004), onde posteriormente a presença do vetor foi confirmada (NAVIA et al., 2006). No Brasil, *A. tosichella* foi observado na região norte e noroeste do Rio Grande do Sul (NAVIA et al., 2013) e nos municípios de Passo Fundo e São Luíz Gonzaga plantas de trigo com sintomas da virose tiveram o agente etiológico identificado como WSMV através de sequências dos genes da capa proteica e VPg-Nia (MAR et al., 2013). O objetivo deste trabalho é descrever a caracterização sob os aspectos biológico e molecular da população de WSMV nessas regiões.

Material e Métodos

A caracterização molecular dos isolados brasileiros foi realizada para seis sequências de nucleotídeos do gene da capa proteica e três sequências parciais da região VPg-Nia depositadas no GeneBank. As sequências dos isolados brasileiros foram comparadas com 13 isolados de WSMV disponíveis no GeneBank utilizando *Oat necrotic mottle virus* (ONMV - AY377938) como grupo externo. Um alinhamento para cada região sequenciada foi utilizado para a construção de uma árvore filogenética, pelo método de análise Neighbor-joining, gerada no MEGA com 1000 bootstraps. A caracterização biológica consistiu no estudo da gama de hospedeiro utilizando dois isolados (915 e 1256) inoculados via extrato vegetal tamponado (tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 7) em quatro plantas de cada hospedeiro: *Chenopodium amaranticolor* Coste and Reyn, *Nicotiana tabacum* L., aveia (*Avena strigosa* Schreb.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milho (*Zea mays* L.), centeio (*Secale cereale* L. cv. BRS Serrano) três cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva, e dois triticales (x *Triticosecale* Witt.) BRS Saturno e BRS Ulisses. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, os sintomas sistêmicos foram avaliados e 20 dias realizou-se RT-PCR (MAR et al., 2013) para confirmar a presença do vírus. Também foi testada a reinoculação a partir de plantas inoculadas com o isolado 915 (exceto *Nicotiana tabacum*) para trigo (indicadora cv. Guabiju). A confirmação da infecção foi realizada por RT-PCR.

Resultados e Discussão

Todos os isolados brasileiros, independentemente da região sequenciada ou localidade da coleta, apresentam 99 – 100% de identidade entre si e 99% de similaridade com o isolado Arg2 (FJ348359) da Argentina (Figura 1), onde a presença do WSMV foi relatada recentemente

(TRUOL et al., 2004). Assim como os isolados argentinos os isolados brasileiros agrupam-se no Clado D, possivelmente o vírus foi introduzido no Brasil a partir de uma fonte comum (semente) e/ou por migração direta (através do vetor) da Argentina. Os isolados brasileiros testados na caracterização biológica foram capazes de infectar trigo, cevada, aveia, centeio, triticale e milho e nenhuma eudicotiledônea (Tabela 1), a infecção foi confirmada por RT-PCR (Figura 2). Todos os hospedeiros infectados exibiram sintomas quando inoculados com pelo menos um dos isolados, exceto aveia. Os sintomas de mosaico induzidos pelo isolado 915 foram mais visíveis, as estrias longitudinais apresentaram-se numa coloração mais intensa, em maior número e cobrindo uma porção maior das folhas comparando com o isolado 1256. Em trigo e triticale os sintomas apresentaram-se mais precocemente e em maior frequência (6-8 dai). Todas as plantas de trigo infectadas exibiram pequenas lesões cloróticas nas folhas mais jovens evoluindo para estrias amarelas paralelas às nervuras das folhas que posteriormente fundiram-se formando um padrão de estrias verde e amarelas em linhas descontínuas típico de mosaico. O mosaico foi mais intenso na cv. Guabiju do que na cv. Embrapa 16 e cv. BRS Timbaúva respectivamente, indicando diferença na resposta a infecção entre essas cultivares (Figura 3 A, B e C). Em cevada e centeio observou-se um padrão de mosaico semelhante ao trigo, porém mais suave, expresso em poucas estrias de menor tamanho e distribuídas em poucas folhas (Figura 3E e F). Apenas duas plantas de milho exibiram sintomas de estrias brancas paralelas às nervuras das folhas em padrão de mosaico (Figura 3D), nessas plantas a infecção foi confirmada por RT-PCR, mas não foi possível retransmitir o isolado via extrato vegetal para a indicadora (Figura 2). É possível, como já observado por Sanchez-Sanchez et al. (2001), que o híbrido de milho utilizado não seja um bom hospedeiro. Sintomas necróticos já foram descritos em aveia (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001), embora a aveia tenha se mostrado assintomática foi possível detectar RNA viral na planta inoculada e retransmitir via extrato vegetal para a indicadora (Figura 2). Sintomas necróticos foram observados apenas em triticale cv. BRS Ulisses quando inoculada com o isolado 915 (Figura 3H), as lesões apresentaram-se alongadas e circundadas por um bordo amarelo com halo interior e exterior cor de palha, distribuindo-se uniformemente por todas as folhas. A cv. BRS Saturno apresentou padrão de mosaico mosqueado (Figura 3G) em 44% das plantas em média, contrastando com 95,8 – 100% das plantas de BRS Ulisses inoculadas expressando mosaico ou sintomas necróticos. A variação observada na severidade e frequência dos sintomas entre as cultivares de trigo e triticale testadas indica que há variação na interação entre vírus e hospedeiro. Esta variação pode ser utilizada para a seleção de genótipos mais resistentes/tolerantes. Entretanto a população viral recentemente introduzida que se mostrou homogênea no estudo molecular induziu intensas reações diferenciais em um mesmo hospedeiro, indicando que pequenas mutações na população viral também poderão conferir habilidade de quebra rápida da resistência.

Referências

- 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>>.
- NAVIA, D.; MENDONÇA, R. S.; SKORACKA, A.; SZYDŁO, W.; KNIHINICKI, D.; HEIN, G. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; TRUOL, G.; LAU, D. Wheat curl mite, *Aceria tosichella*, and transmitted viruses: an expanding pest complex affecting cereal crops. *Experimental and Applied Acarology*, Amsterdam, v. 59, n. 1/2, p. 95-143, 2013.

NAVIA, D.; TRUOL, G.; MENDONÇA, R. S.; SAGADIN, M. *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae) from *Wheat Streak Mosaic Virus*-infected wheat plants in Argentina. **International Journal of Acarology**, Michigan, v. 32, n. 2, p. 189-193, 2006.

SANCHEZ-SANCHEZ, H. M.; HENRY, M.; CARDENAS-SORIANO, E.; ALVIZO-VILLASANA, H. F. Identification of *Wheat streak mosaic virus* and its vector *Aceria tosichella* in Mexico. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 1, p. 13-17, 2001.

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.

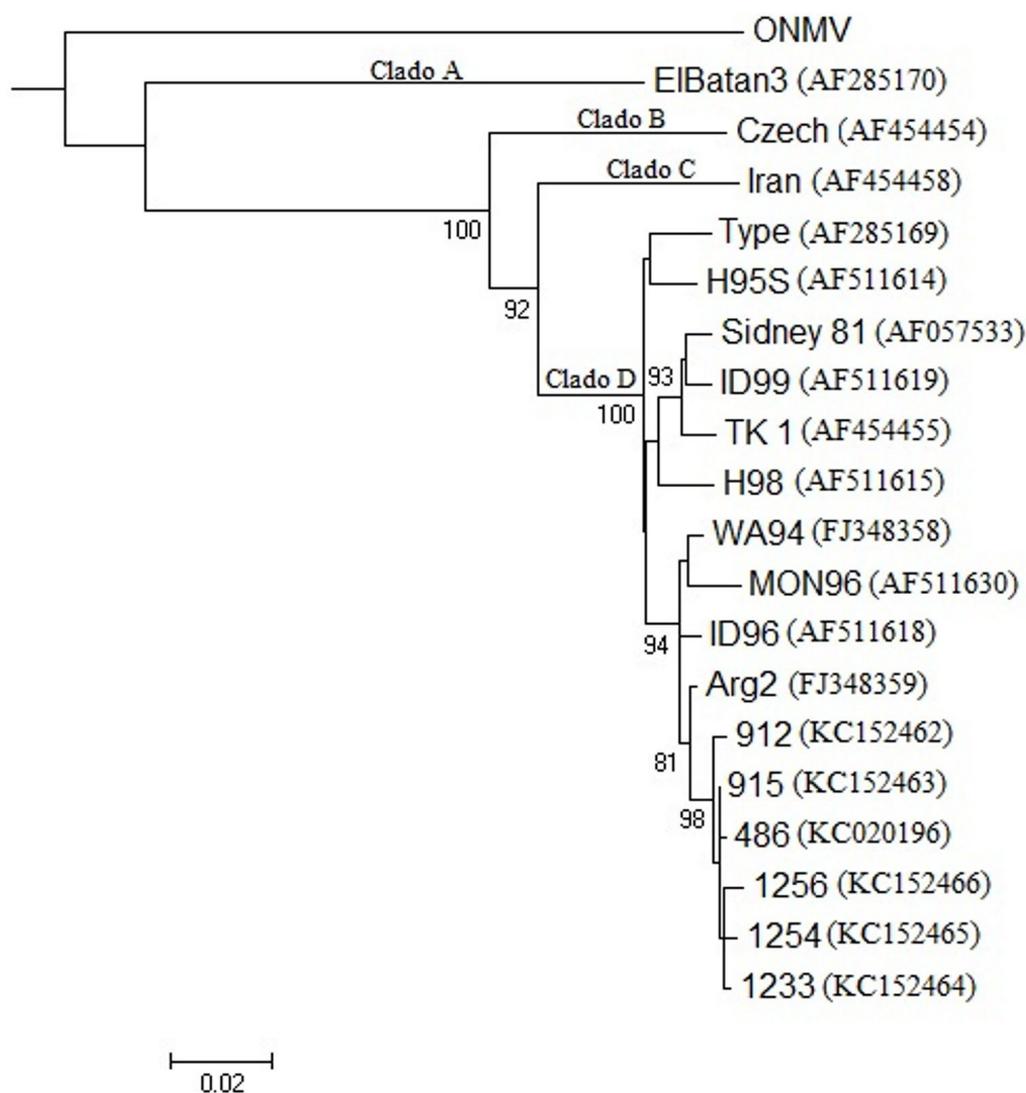


Figura 1. Árvore filogenética construída para a sequência de 828 nucleotídeos correspondente ao gene da capa proteica de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com a sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética, comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,02. São isolados brasileiros: 486, 912, 915 e 1256 coletados em casa de vegetação e 1233 coletado no município de São Luiz Gonzaga e 1254 em Passo Fundo.

Tabela 1. Tipo e frequência de sintomas em hospedeiros inoculados com dois isolados brasileiros de WSMV

Espécies testadas	915			1256		
	sint	freq	%	sint	freq	%
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-	0/4	0	-	0/4	0
<i>Nicotiana tabacum</i>	-	0/4	0	-	0/4	0
<i>Avena strigosa</i>	-	0/20	0	-	0/20	0
<i>Hordeum vulgare</i>	M	8/20	40	M	10/21	47,6
<i>Zea mays</i>	M	2/14	14,3	-	0/12	0
<i>T. aestivum</i> (cv. Embrapa 16)	M	21/21	100	M	24/24	100
<i>T. aestivum</i> (cv. BRS Guabiju)	M	21/21	100	M	19/19	100
<i>T. aestivum</i> (cv. BRS Timbaúva)	M	24/24	100	M	21/21	100
<i>Secale cereale</i> (cv. BRS Serrano)	M	5/20	25	M	9/19	47,4
x <i>Triticosecale</i> (cv. BRS Saturno)	M	10/21	47,6	M	10/24	41,7
x <i>Triticosecale</i> (cv. BRS Ulisses)	M; LN	20/20	100	M	23/24	95,8

M = mosaico; LN = lesão necrótica.

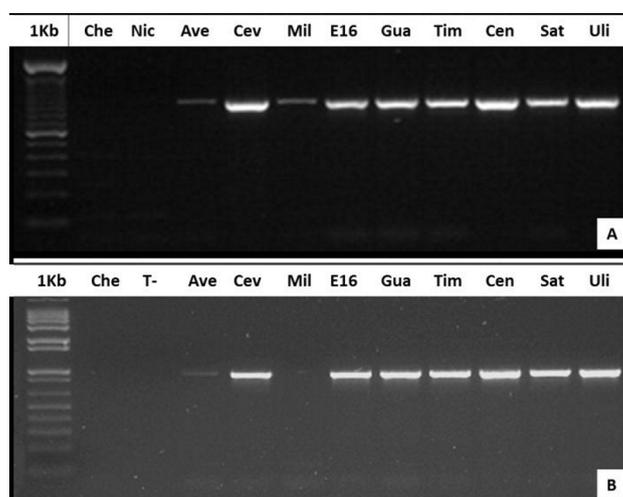


Figura 2. Fragmentos de 948 pb correspondente ao gene da capa proteica de WSMV amplificados (A) a partir de plantas hospedeiras inoculadas com o isolado 915 e (B) indicadora (trigo cv. BRS Guabiju) reinoculada com extrato vegetal das hospedeiras. Che – *Chenopodium amaranticolor*, Nic – *Nicotiana tabacum*, Ave – aveia, Cev – cevada, Mil – milho, E16 – trigo cv. Embrapa 16, Gua – trigo cv. BRS Guabiju, Tim – trigo cv. BRS Timbaúva, Cen – centeio, Sat – tritcale cv. BRS Saturno, Uli – tritcale BRS Ulisses, T- – trigo não infectado.

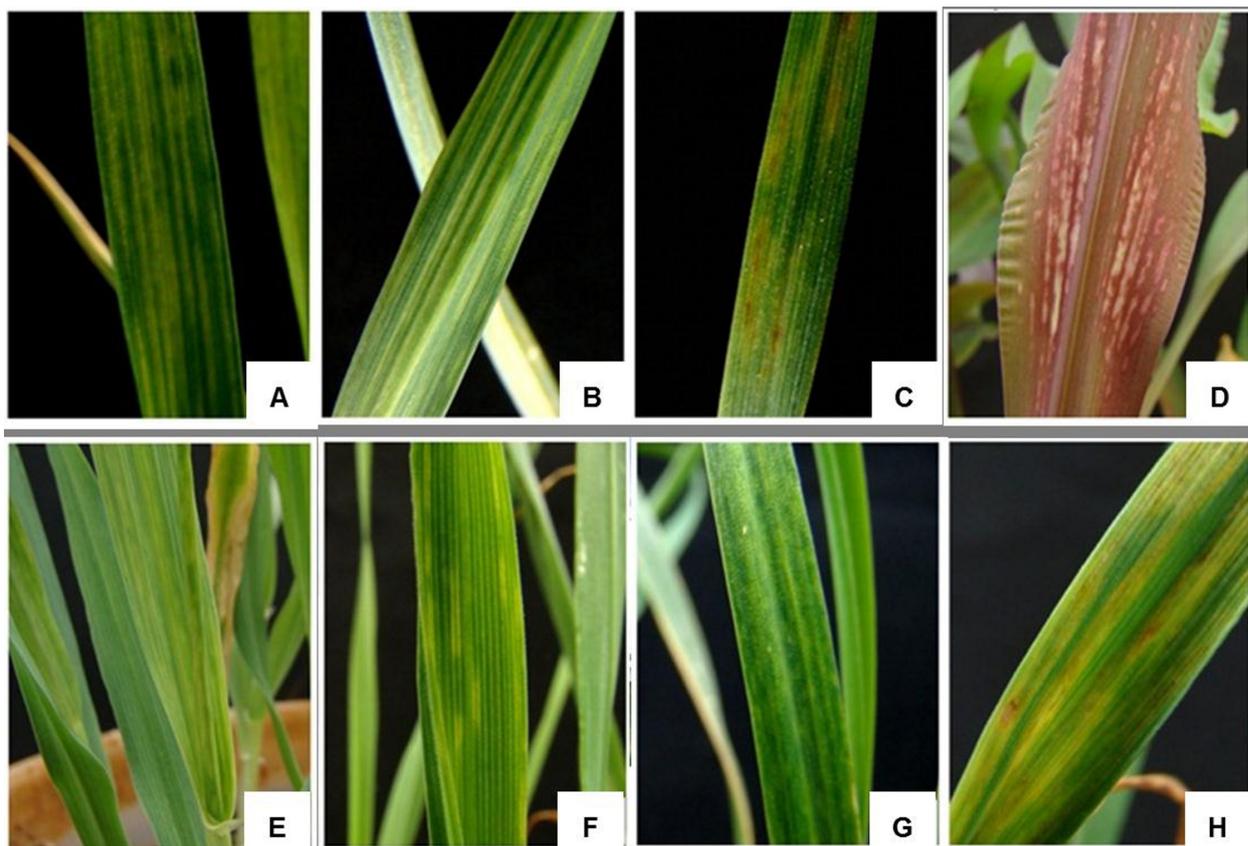


Figura 3. Sintomas sistêmicos causados pelo isolado 915 de WSMV em *Triticum aestivum* cv. BRS Guabiju (A), Embrapa 16 (B) e BRS Timbaúva (C), *Zea mays* (D), *Secale cereale* cv. BRS Serrano (E), *Hordeum vulgare* (F), × Triticosecale cv. BRS Saturno (G) e BRS Ulisses (H).