

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO WHEAT STRIPE MOSAIC VIRUS (WhSMV) ASSOCIADO A CULTURA DO TRIGO ¹

Samara Campos do Nascimento^{2*}, Monica Farias², Fábio Nascimento da Silva³, Fernando Sartori Pereira⁴, Lucas Antônio Stempkowski⁴, Paulo Kuhnem⁵, Douglas Lau⁶, Ricardo Trezzi Casa⁷

¹ Vinculado ao projeto “Caracterização molecular utilizando sequenciamento de nova geração, estudo de variabilidade genética e manejo do mosaico comum do trigo”

² Acadêmica do Curso de Agronomia - CAV - *bolsista PROBIC/UDESC

³ Orientador Departamento de Agronomia - CAV – fabio.silva@udesc.br

⁴ Acadêmico do Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal - CAV

⁵ Pesquisador da empresa BIOTRIGO Genética Ltda.

⁶ Pesquisador da EMBRAPA Trigo

⁷ Professor do Departamento de Agronomia – CAV

Recentemente, a virose conhecida como mosaico comum do trigo foi atribuída a uma nova espécie viral denominada Wheat stripe mosaic virus. O Wheat stripe mosaic virus (WhSMV) possui genoma composto por duas fitas de RNA fita simples sentido positivo (RNA1 e RNA2). Populações virais são geneticamente diferentes, suas estruturas são passíveis de mudança com o tempo, processo denominado evolução. O conhecimento da variabilidade genética de uma população viral é importante para que se tenha otimização no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e estratégias de manejo adequadas a tais patógenos. Trabalhos de caracterização da variabilidade genética fornecem subsídios para programas de melhoramento, indicando as regiões do genoma do vírus com menor propensão a variações. Essas regiões podem ser alvos preferenciais em programas de melhoramento genético. Diante disso, analisar a variabilidade genética do WhSMV se torna fundamental, já que a utilização de genótipos resistentes é o principal método de controle do vírus. O objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética de WhSMV.

Para realização do estudo da variabilidade genética, durante as safras de trigo de 2017, 2018 e 2019 foram coletadas 100 amostras de plantas de trigo com sintomas típicos do mosaico-comum. As amostras foram coletadas em Condor, Coronel Bicaco, Coxilha, Cruz Alta, Passo Fundo (RS) e Santo Augusto no estado do Rio Grande do Sul; e nas cidades de Ivaiporã e Ponta Grossa no estado do Paraná. Após a coleta, as amostras foram submetidas à extração de RNA total, seguida da síntese de DNA complementar (cDNA). Duas regiões genômicas do WhSMV foram avaliadas por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos; essas regiões incluem a região codificadora da capa proteica (CP, RNA2) e o domínio de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp, RNA1) presente na replicase viral. Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram corados com GelRed (Biotium) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos com tamanho esperado foram purificados e enviados para sequenciamento (ACTGene Análises Moleculares). As sequências de nucleotídeos (nts) de 38 amostras para CP e 49 para RdRp foram obtidas. As sequências da CP e da RdRp foram analisadas quanto aos descritores de variabilidade genética, incluindo a diversidade de nts (π), número de sítios segregantes (S), número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Hd) e taxa de mutação escalonada para população (Θ -W). Além das sequências obtidas nesse estudo, foram utilizadas sequências de nts da CP e da RdRp de isolados previamente caracterizados no

Brasil, Paraguai e África do Sul, formando três populações analisadas: Global, Brasil e África do Sul. Adicionalmente, o valor de π foi determinado ao longo das regiões codificadoras da CP e RdRp. A identidade de nts e aminoácidos (aa) foi determinada utilizando o programa SDT, e o relacionamento filogenético foi verificado utilizando o programa Mega X.

Na tabela 1 são indicados os descritores de variabilidade genética do WhSMV, onde observa-se a maior variabilidade genética na população global, seguida da população do Brasil e da África do Sul, respectivamente. Para a população brasileira de WhSMV a região mais variável é a RdRp. De maneira geral o valor de Θ -W foi na ordem de 10^{-2} , exceto para a população da África do Sul (10^{-3}), a qual se mostrou menos variável para as duas regiões codificadoras analisadas (CP e RdRp). Esses dados estão em concordância com outras populações virais já caracterizadas (incluindo espécies virais com genoma de RNA e DNA).

Tabela 1. Descritores da variabilidade genética para populações de Wheat stripe mosaic virus (WhSMV).

Região genômica*	População	Nº de isolados	Nº sites (nt)	S ^a	K ^b	π ^c	H ^d	Hd ^e	Θ -W ^f
ORF3 (CP)	Brasil	43	525	34	3,711	0,00707±0,00270	12	0,643	0,01497
	África do Sul	19	525	4	1,31	0,0025±0,00028	5	0,737	0,00218
	Global	63	525	43	16,533	0,03149±0,00243	18	0,812	0,01738
ORF1 (RdRp)	Brasil	55	684	48	10,82	0,01582±0,00232	24	0,666	0,01534
	África do Sul	18	684	9	1,412	0,00206±0,00061	7	0,686	0,00383
	Global	73	684	54	15,022	0,02196±0,00111	31	0,793	0,01624

^a Número de sítios segregantes; ^b Número médio de diferenças nucleotídicas entre sequências; ^c Diversidade de nucleotídeos; ^d Número de haplótipos; ^e Diversidade de haplótipos; ^f Estimativa de Watterson da taxa de mutação da população com base no número total de locais de segregação; *CP, capa proteica; RdRp, RNA-dependente RNA polimerase.

A análise de π ao longo das regiões codificadoras da CP e RdRp, indicou que para a CP ocorre uma maior variabilidade entre as posições nucleotídicas 150 e 250, nas três populações analisadas. Já para a região da RdRp, a maior variabilidade é encontrada entre as posições 75 e 175 nts. Essas regiões devem ser evitadas do desenho de iniciadores para o diagnóstico utilizando PCR.

Nas regiões codificadoras da CP e da RdRp, quando comparados entre si, os isolados brasileiros de WhSMV apresentaram identidade de nts de 94%-100% e 95%-100%, respectivamente; já quando comparados com os isolados da África do Sul, a identidade de nts foi de 93%-100% e 95%-100%, respectivamente. As identidades de aa foram superiores a 96% em todas as comparações. Esses resultados são corroborados pela análise filogenética que indicou a formação de dois clados (população do Brasil e da África do Sul); as análises filogenéticas também demonstraram que não existe separação entre os isolados brasileiros com relação ao ano de coleta, área geográfica e cultivar.

Os dados apresentados nesse estudo demonstram que a população brasileira de WhSMV apresenta maior variabilidade genética quando comparada a africana. Além disso, com base nos dados observa-se que como ferramenta de diagnóstico a utilização de primers específicos para CP seria uma estratégia mais adequada, uma vez que a região da RdRp se apresentou mais variável.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*, mosaico comum, caracterização.