

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS ASSOCIADO AO MOSAICO COMUM DO TRIGO UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Monica Farias¹, Juliana Borba Valente², Fernando Sartori Pereira², Lucas Antônio Stempkowski², Paulo Kuhnem³, Douglas Lau⁴, Ricardo Trezzi Casa⁵, Fábio Nascimento da Silva⁶

¹ Acadêmica do Curso de Agronomia - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

² Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal – CAV.

³ Pesquisador da empresa BIOTRIGO Genética Ltda.

⁴ Pesquisador da EMBRAPA Trigo.

⁵ Professor do Departamento de Agronomia – CAV.

⁶ Orientador, Departamento de Agronomia - CAV – fabio.silva@udesc.br.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*. Wheat stripe mosaic virus. *Polymyxa graminis*.

O mosaico comum está entre as principais doenças associadas à cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.). Desde seu primeiro relato oficial no Brasil em 1978, esta virose vem sendo atribuída ao agente causal *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV - *Furovirus*). Esse vírus é transmitido pelo plasmodioforomiceto habitante do solo *Polymyxa graminis*. Entretanto, trabalhos realizados no Brasil visando detectar esse vírus em plantas sintomáticas utilizando testes sorológicos e RT-PCR, não obtiveram sucesso. Os iniciadores e antissoro utilizados nestes estudos eram obtidos a partir de isolados virais de outros países, sugerindo duas hipóteses: (i) o vírus SBWMV encontrado no Brasil possui alta variabilidade genética; e (ii) outra espécie viral ainda não relatada em trigo é o agente causal do mosaico comum no Brasil. O diagnóstico da doença utilizando análise visual não é preciso, uma vez que o sintoma de mosaico pode ser associado a diversos vírus. Portanto, a correta identificação do vírus é essencial para dar suporte aos ensaios regionais de cultivares, a programas de melhoramento genético e na recomendação de medidas de manejo efetivas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização molecular da espécie viral associada à virose do mosaico comum do trigo utilizando sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS); e também verificar a presença de *P. graminis* em raízes de trigo sintomáticas. Foram coletadas plantas de trigo com sintomas característicos de mosaico comum nas cultivares Karl 92, Everest, OR-1, CEP 11, TBIO Toruk, TBIO Tibagi, Esporão, LG Oro, na sede da EMBRAPA trigo em Passo Fundo (RS) durante a safra 2016. A partir dessas amostras foram extraídos RNA de fita dupla (dsRNA), sendo que das oito cultivares duas constituíram amostras compostas devido a baixa concentração de material vegetal, resultando em seis amostras analisadas. O dsRNA extraído foi analisado quanto a qualidade e quantidade em espectrofotômetro e posteriormente as amostras de dsRNA foram utilizadas como molde para a síntese de uma biblioteca de cDNA e submetidas ao NGS utilizando a plataforma HiSeq 2500 (Macrogen Inc.). As sequências obtidas (*reads*) foram analisadas com as ferramentas Velvet e Trinity para montagem dos contigs. Os contigs gerados foram comparados com sequências virais disponíveis no banco de dados (*GenBank*) utilizando o algoritmo *Blast-X* disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para determinar as

sequências correspondentes às regiões codificadoras do vírus os *contigs* foram analisados no *ORF finder* também disponível no NCBI. Os resultados apontaram para a presença de um vírus com genoma de RNA bipartido (RNA1 e RNA2). Os genomas dos isolados virais obtidos foram alinhados entre si e com espécies relacionadas para geração de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 6.0. O grupo que apresentou maior relação com as sequências geradas nesse estudo foi a família *Benyviridae*, porém com baixa identidade de sequência de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) com as espécies dessa família. Para a validação dos dados obtidos pelo NGS foram desenhados cinco pares de iniciadores a partir das sequências geradas, sendo estes: a região codificadora da capa proteica (CP) e do bloco triplo de genes 2 (TGB2); parte da região codificadora da polimerase; e as regiões 3' não traduzidas (UTR) dos RNAs 1 e 2. A síntese do DNA complementar (cDNA), a partir das 6 amostras originais de dsRNA, foi realizada utilizando o Kit ImProm II-Reverse Transcription System (Promega), conforme recomendações do fabricante. As reações de PCR, utilizando os cDNAs produzidos foram realizadas utilizando o Kit GoTaq DNA polymerase (Promega), conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos amplificados nas reações de PCR foram corados com GelRed (Biotium) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos obtidos foram recortados do gel, purificados e enviados para sequenciamento e os resultados validaram as sequências obtidas no NGS. A organização genômica, as identidades de nt e aa e o relacionamento filogenético indicam que a espécie viral caracterizada nesse estudo pertence não somente a uma nova espécie viral, mas também a um possível novo gênero dentro da família *Benyviridae*, demonstrando que pelo menos nas amostras analisadas, o SBWMV não é o agente causal da doença. Seguindo as regras de nomenclatura internacional de vírus de plantas este novo vírus foi denominado Wheat stripe mosaic virus (WhSMV). Membros da família *Benyviridae* também podem ser transmitidos por *Polymyxa* spp. Por isso, foram coletadas raízes de plantas de trigo sintomáticas de duas cultivares (BRS Guamirim e TBIO Toruk) para verificação da presença do possível vetor do WhSMV. As raízes foram utilizadas para observação de estruturas do plasmodioforomiceto e para extração de RNA total e DNA, visando a detecção do vírus e do vetor, respectivamente. O DNA e RNA total foram utilizados como molde nas reações de PCR e RT-PCR, respectivamente, utilizando iniciadores específicos. Os fragmentos amplificados foram sequenciados e comparados com sequências do banco de dados. Os resultados da caracterização morfológica, molecular e filogenia indicam a associação de *P. graminis* com raízes de plantas de trigo infectadas por WhSMV. Os dados apresentados sugerem que o vírus WhSMV é transmitido pelo plasmodioforomiceto *P. graminis*. Os dados apresentados indicam que o mosaico comum do trigo é causado por WhSMV, uma nova espécie viral pertencente à família *Benyviridae*, sendo possivelmente transmitido por *P. graminis*. Trabalhos adicionais são necessários para determinar a prevalência dessa nova espécie viral em diferentes áreas de produção de trigo no Brasil.