



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Análise da resistência e da tolerância da cultivar de trigo
BRS Timbaúva ao *Barley yellow dwarf virus-PAV*

DANUBIA GRASIANE DE CEZARE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, maio de 2009

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Análise da resistência e da tolerância da cultivar de trigo
BRS Timbaúva ao *Barley yellow dwarf virus*-PAV

Bióloga DANUBIA GRASIANE DE CEZARE

Orientador: Prof. Dra. Jurema Schons
Co-orientador: Dr. Douglas Lau

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, maio de 2009

*“A vida é feita por momentos.
Use cada momento para fazer algo. Faça, erre, acerte,
arrisque, caia, levante, falhe, lute, mas... não jogue fora,
se acomodando, a extraordinária oportunidade de ter
vívido. Um homem que ousa desperdiçar uma hora ainda
não descobriu o valor da vida.”*

(Charles Darwin)

*“Não é o desafio com que nos
deparamos que determina quem somos e o que estamos
tornando, mas a maneira com que
respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas,
mas plenamente conscientes, porque
o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as
coisas: só nos obriga a sermos conscientes.*

*Problemas para vencer, liberdade para provar e
enquanto acreditamos no nosso sonho nada é por acaso.”*

(Henfil)

Às pessoas mais importantes da minha vida,
que sempre acreditaram em mim, que me permitiram
sonhar e contribuíram para a realização desses sonhos...
meus pais Atair e Zilda S. De Cezare e minha irmã Débora.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus...

“No corre-corre de nossa vitória diária, esquecemos tantas vezes de te agradecer.

Obrigada senhor, pelos meus pais e amigos, por todos aqueles que entraram na minha história de vida e me ensinaram a

crescer, a ser mais gente;

Pelo término desta longa jornada, o mais sincero agradecimento a ti que nos confiaste a vida.

Através da minha fé, de minhas orações, do meu amor, te agradeço por tudo que fui, que sou e ainda serei e,

principalmente, por nunca me ter deixado nos momentos difíceis e por me ter permitido chegar até aqui.”

Aos Pais...

“ A vocês, que me deram a vida e me ensinaram a vive-la com dignidade, não bastaria um obrigada.

A vocês, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperança, não bastaria um muito obrigado.

A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigado.

A vocês pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso... se pudesse faze-los eternos... eternos os faríamos.

*A vocês, não mais que com justiça,
Dedico esta vitória.”*

Aos meus pais Atair e Zilda S. De Cezare e a minha irmã Débora, pelo apoio, por sempre estarem ao meu lado me dando força, por me compreenderem, mas principalmente pelo amor que nos une e que sempre está presente.

Aos Mestres e Orientadores...

A minha orientadora Dra. Jurema Schons, pela orientação, incentivo e compreensão. Que sempre será um exemplo de força, entusiasmo, dedicação e amor pela sua profissão.

Ao co-orientador Dr. Douglas Lau e orientadora, dedico os resultados de um esforço comum, consciente e honesto em prol do meu desenvolvimento humano e valorização de minha atividade profissional.

Aos amigos...

A minha amiga do coração Juliana Nienow que desde a graduação sempre esteve ao meu lado, me ajudando, me incentivando, me ensinando, que me deu força nas horas boas e ruins.

O tempo e a distância jamais poderão apagar de nossos corações a lembrança daqueles que souberam conquistar nossa amizade.

Às pessoas que sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim, me ajudando, os amigos, colegas e a equipe do laboratório de Fitovirologia, Vânia Bianchin, Elaine Deuner, Karina Toledo, Cassiane Oliveira e Leonardo Seidler De Marchi.

Outros agradecimentos

À Universidade de Passo Fundo, aos seus professores e funcionários pela oportunidade de realizar o curso;

À CAPES pela concessão da bolsa viabilizando os estudos.

À Embrapa Trigo de Passo Fundo/RS pela oportunidade de realizar os experimentos em suas dependências.

Aos funcionários da Entomologia e da casa de apoio da Embrapa Trigo que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia, pelos ensinamentos e disponibilidade.

Ao CNPq e à Fapergs pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Cultura de Trigo.....	21
2.2 Nanismo Amarelo dos Cereais.....	22
2.2.1 Classificação do Vírus.....	23
2.2.2 Vetores e mecanismo de transmissão.....	25
2.2.2.1 Relação patógeno/hospedeiro/vetor.....	30
2.2.3 Medidas de controle.....	31
2.2.3.1 Práticas culturais.....	31
2.2.3.2 Controle biológico e químico.....	31
2.2.3.3 Resistência e/ou tolerância.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Localização dos ensaios e análises.....	38
3.1.1 Material vegetal.....	38
3.1.2 Vetor e vírus.....	39
3.1.3 DAS-ELISA.....	40
3.2 Análise estatística.....	42
3.3 Experimento I – Avaliação da resistência da cultivar de trigo BRS Timbaúva ao <i>Rhopalosiphum padi</i> e ao BYDV-PAV.....	42
3.4 Experimento II – Estimativa da tolerância por meio da quantificação de componentes morfológicos e do rendimento... 44	44
3.5 Experimento III – Efeito do estágio de desenvolvimento do hospedeiro e da época da inoculação sobre componentes de rendimento.....	45
3.5 Experimento IV – Efeito de cinco níveis de infestação com afídeos avirulíferos e virulíferos sobre os componentes do rendimento de grãos.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Experimento I – Avaliação da resistência da cultivar de trigo BRS Timbaúva ao <i>Rhopalosiphum padi</i> e ao BYDV-PAV.....	47

4.2 Experimento II – Estimativa da tolerância por meio da quantificação de componentes morfológicos e de rendimento...	52
4.3 Experimento III – Efeito do estágio de desenvolvimento do hospedeiro e da época da inoculação sobre componentes de rendimento.....	55
4.4 Experimento IV – Efeito de cinco níveis de infestação com afídeos avirulíferos e virulíferos sobre os componentes do rendimento de grãos.....	62
5 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	75
ANEXO 1	76
ANEXO 2	76
ANEXO 3	76
ANEXO 4	77
ANEXO 5	77

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Número médio de ninfas por adulto de <i>Rhopalosiphum padi</i> mantido sobre duas cultivares de trigo.....	48
2	Número de espigas por planta, número de grãos por planta e peso estimado de mil grãos por planta, comparando as cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestadas com afídeos R. padi avirulíferos e virulíferos.....	52
3	Interação entre cultivares (Embrapa 16 e Timbaúva), estatura e número de afílios em plantas expostas à pulgões avirulíferos e virulíferos.....	53
4	Número de espigas por planta, nº de grãos por planta e peso de mil grãos nas cultivares de trigo Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestadas com afídeos avirulíferos e virulíferos (expostos ao BYDV-PAV) em quatro estádios de desenvolvimento (escala de Large).....	57
5	Frequência de plantas soropositivas para BYDV-PAV infestados com números variável (crescente) de afídeos virulíferos.....	62
6	Número de espigas por planta, número de grãos por planta, em duas cultivares de trigo infestadas com afídeos avirulíferos e virulíferos (expostos ao BYDV-PAV) submetidas a cinco pressões de inóculo.....	63
7	Peso médio de grãos por plantas (g) e peso total de grãos, independente da cultivar com cinco níveis de infestação por afídeos avirulíferos e virulíferos.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<p>Representação diagramática da organização genômica dos dois subgrupos de vírus associados ao nanismo amarelo de cereais de inverno. Áreas preenchidas em preto apresentam conservação entre os grupos. Área quadriculada apresenta similaridade com a polimerase de <i>Tombusviridae</i>. Área hachurada apresenta similaridade com a polimerase de sobemovirus. Área em branco, a exceção de um possível motivo tipo protease (ORF1 subgrupoII) não apresenta similaridade com ORF de nenhum vírus. CP – capa protéica, POL – polimerase, AT – domínio provavelmente requerido na transmissão por afídeo, MP – provável proteína envolvida no movimento célula a célula. Linhas abaixo das barras correspondem ao RNAs subgenômicos (sg) conhecidos (extraído de Miller W.A., Rasochová L. 1997).....</p>	24
2	<p>Representação diagramática das etapas do processo de aquisição e transmissão de partículas virais do vírus causador do nanismo amarelo em cereais. Partículas virais adquiridas junto com a seiva elaborada migram pelo aparelho digestivo, hemocele e se acumulam na glândula salivar acessória (GSA) de onde podem ser injetadas em uma nova planta (adaptado de Gildow & Gray, 1993).....</p>	27
3	<p>Representação das etapas do ciclo infeccioso do nanismo amarelo. Aquisição do vírus a partir de uma planta infectada, dispersão do vetor, transmissão do vírus para planta sadia e exibição dos sintomas após o período de incubação.....</p>	28
4	<p>Escala de Feekes, modificada por (LARGE, 1954).....</p>	44
5	<p>Número médio de ninfas por adulto nas cultivares de trigo Embrapa 16 e BRS Timbaúva</p>	

	em cinco ensaios distintos.....	44
6	Concentração de BYDV-PAV (estimada por absorbância a 405 nm) nas folhas, colmos e raízes de trigo, das cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva, em sete épocas (em dias) após a transmissão utilizando <i>Rhopalosiphum padi</i>	51
7	Interação entre as cultivares (Embrapa 16 e BRS Timbaúva) e estatura em plantas expostas a pulgões avirulíferos e virulíferos (Tratamento 1, avirulíferos e tratamento 2, virulíferos).....	53
8	Redução no rendimento do Peso total de grãos/planta nas cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestados com afídeos avirulíferos (avr) e virulíferos (vr).....	54
9	Sintomas típicos da infecção por BYDV em plantas da cultivar Embrapa 16 infestadas com <i>Rhopalosiphum padi</i> expostos ao BYDV-PAV, infestados em diferentes estádios de desenvolvimento (Escala de Feekes modificada (LARGE, 1954).....	56
10	Efeito da época de inoculação sobre o peso de grãos por espiga em plantas de trigo das cultivares BRS Timbaúva e Embrapa 16 infestadas com pulgões avirulíferos e virulíferos.	58
11	Peso total de grãos em função da estágio de desenvolvimento de plantas da cultivar Embrapa 16 infestados com pulgões avirulíferos (EAVR) e virulíferos (EVR) (expostos ao BYDV-PAV)...	59
12	Peso total de grãos em função do estágio de desenvolvimento de plantas da cultivar Embrapa 16 infestados com pulgões avirulíferos (TAVT) e virulíferos (TVR) (expostos ao BYDV-PAV)...	60
13	Redução do peso de grãos por planta (%) nas duas cultivares em quatro épocas (estádios de desenvolvimento) após a infestação com pulgões avirulíferos e virulíferos (BYDV-PAV), descontando-se o efeito do pulgão avirulífero.....	61
14	Número de afídeos em relação ao peso total de grãos na cultivar Embrapa 16 comparando plantas avirulíferos com virulíferos.....	64

15	Número de afídeos em relação ao peso total de grãos na cultivar BRS Timbaúva comparando plantas avirulíferos com virulíferos.....	65
16	Redução no rendimento de grãos para as cultivares de trigo Embrapa 16 e BRS Timbaúva inoculadas com BYDV-PAV, utilizando-se de 1 a 5 afídeos.....	66

Análise da resistência e da tolerância da cultivar de trigo
BRS Timbaúva ao *Barley yellow dwarf virus*-PAV

**DANUBIA GRASIANE DE CEZARE¹; JUREMA SCHONS² &
DOUGLAS LAU³**

RESUMO – A virose, conhecida como nanismo amarelo, causada por espécies de *Barley yellow dwarf virus* - BYDV e *Cereal yellow dwarf virus* - CYDV é uma das mais importantes doenças dos cereais de inverno, reduzindo a produção em cultivos de todo o mundo. Espécies do BYDV e de CYDV são capazes de infectar mais de 150 espécies de plantas dentro da família *Poaceae* sendo transmitidas por diversas espécies de afídeos (Hemiptera, Aphididae). Entre as espécies de BYDV e CYDV, BYDV-PAV predomina na maioria das regiões produtoras do mundo, inclusive nas regiões triticultoras brasileiras. Assim, é importante que os programas de melhoramento considerem a incorporação de resistência a esta espécie e aos seus afídeos vetores. O presente estudo foi conduzido a fim de determinar se a capacidade de BRS Timbaúva de manter alta produtividade quando exposto ao complexo vírus-vetor, se deve unicamente a resistência ao afídeo vetor, ou também apresenta resistência ou tolerância a BYDV-PAV. Todos os ensaios foram realizados comparando-se BRS Timbaúva

¹Bióloga, mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia - danubiologa@yahoo.com.br

²Orientadora, Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, professora do PPGAgro da FAMV e ICB/UPF – schons@upf.br

³Co-orientador, Biólogo, Doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa-Trigo – dlaubioagro@yahoo.com.br

com Embrapa 16, uma cultivar altamente suscetível a virose. A capacidade da planta de resistir à infecção viral foi avaliada através da construção de curvas do título viral (teste de ELISA) em diferentes órgãos por um período de 28 dias. A tolerância foi estimada avaliando-se aspectos morfológicos e componentes de rendimento de forma comparativa entre as cultivares e considerando-se a perda relativa em relação a plantas infestadas com afídeos avirulíferos. O possível efeito da resistência ao vetor sobre a eficiência de inoculação do vírus, foi avaliado variando-se o número de afídeos utilizados (1, 2, 3, 4 e 5) para a inoculação e determinando-se o número de plantas infectadas e o efeitos sobre a produção. O efeito do estágio de desenvolvimento do hospedeiro sobre a resistência ou tolerância foi avaliado, por meio da inoculação de plantas em diferentes estádios de desenvolvimento, avaliando-se a expressão de sintomas e do peso total de grãos. Os resultados obtidos sugerem que a produtividade de BRS Timbaúva, acima da média de outros genótipos em ensaios com exposição ao BYDV, se deve principalmente a resistência ao vetor. O número de afídeos que permaneceram sobre a planta e a taxa de reprodução destes sobre plantas de BRS Timbaúva foram inferiores aos observados para plantas de Embrapa 16. Embora os títulos virais por época e por órgão sejam similares, o padrão da curva do título viral é atrasada em relação ao material suscetível, fato que pode ter relação com o comportamento do vetor. A possibilidade de BRS Timbaúva apresentar certo nível de tolerância não pode ser inteiramente descartada, pois as perdas em relação ao controle (afídeos avirulíferos) foram sempre superiores na cultivar Embrapa 16.

Palavras – chave: BYDV-PAV, *Triticum aestivum*, *Rhopalosiphum padi*.

Analysis of resistance or tolerance in wheat BRS Timbaúva
cultivar to the *Barley yellow dwarf virus* -PAV

ABSTRACT – The virosis, known as yellow dwarf, caused by *Barley yellow dwarf virus* - BYDV e *Cereal yellow dwarf virus* - CYDV species is one of the most important cereal diseases of the winter cereals, reducing the production in cultures around the world. BYDV and CYDV species are able to infect more than 150 species of plants in the *Poaceae* family, being transmitted by various species of aphids (Hemiptera, Aphididae). Among the BYDV and CYDV species, BYDV-PAV predominates in the most of producing regions of the world, including brazilian wheat regions. So, it's important that the improvement programs consider the incorporation of resistance to this specie as to his aphids vectors. This study was conducted to determinate if the BRS Timbaúva capacity of keep high productivity when exposed to the virus-vector complex is caused only by the resistance to the aphid vector, or also presents BYDV-PAV resistance or tolerance. All the tests were done comparing BRS Timbaúva with Embrapa 16, one highly virus susceptible breed. The capacity or resistance to virus infection of the plant was evaluated through construction of curves of viral title (ELISA test) in different organs in a 28 days period. The tolerance was estimated evaluating morphological components and yield components in a comparative way between the breeds and consideratin the relative loss on plants infected by uncomtaminated aphids. The possible resistance effect to the vector on the virus inoculation efficiency was evaluated ranging the

number of aphids used (1, 2, 3, 4 e 5) to the inoculation and determining the number of infected plants and the effects on the reduction of production. The effect of the development stage of the host on the resistance or tolerance was evaluated by inoculation of plants in different development stages and evaluation of symptoms expression and the total weight of grains. The obtained results suggest that the BRS Timbaúva productivity, above the others genotypes averages in test with BYDV exposure, is caused mainly to the vector resistance. The aphid number that remained on the plant and the reproduction rate on the BRS Timbaúva were lower to the observed in the Embrapa 16 plants. Though the viral titles by season and by organ are similar, the curve of viral title is delayed on susceptible stuff, fact that can have relation with the vector behavior. The possibility of BRS Timbaúva presents a tolerance degree can't be entirely discarded, cause the losses related to the control plant (uncontaminated aphids) always were higher to the Embrapa 16 plant.

Key words: BYDV-PAV, *Triticum aestivum*, *Rhopalosiphum pad*.

1 INTRODUÇÃO

A virose originalmente conhecida como nanismo amarelo da cevada causada por espécies de *Barley yellow dwarf virus* – (BYDV) e *Cereal yellow dwarf virus* – (CYDV), devido a sua ampla distribuição geográfica e comprometimento da produtividade das plantas, é uma das principais doenças dos diversos cereais de inverno sendo, um fator limitador da produção de grãos no Brasil e no mundo (LISTER & RANIERI, 1995). Embora as perdas globais sejam difíceis de estimar, em média as perdas de produtividade devido à infecção natural por este complexo viral variam entre 11 e 33%, sendo em alguns casos reportadas perdas de até 86%. A relação entre incidência da doença e perdas de produtividade é linear em trigo e cevada. Um incremento de 1% de plantas infectadas pela virose causa redução de produtividade de 20 a 50 kg.ha⁻¹ em trigo e de 30 a 60 kg.ha⁻¹ em aveia (MILLER & RASOCHOVÁ, 1997).

Além do agente etiológico (vírus), o ciclo da doença depende da presença de plantas hospedeiras (gramíneas) e de vetores (afídeos). São várias as etapas deste ciclo. A aquisição do vírus pelo afídeo vetor, ocorre quando ele se alimenta da seiva de uma planta infectada. Uma vez ingeridas, as partículas virais circulam pelo aparelho digestivo, migram para a hemocele e acumulam-se nas glândulas salivares do inseto. Com a dispersão e o estabelecimento do vetor em uma nova planta, tem início a transmissão. Uma vez inseridas as partículas virais no floema da planta hospedeira, iniciam-se as etapas de replicação e movimentação do vírus nos tecidos hospedeiros. Considerando o ciclo da doença, é possível inferir que o controle

baseado na resistência genética do hospedeiro pode atuar sobre o vetor (afetando a aquisição, dispersão e transmissão) ou sobre o vírus (movimentação, replicação).

Como existem várias espécies de vetores e várias espécies virais é necessário monitorar a variabilidade, predominância e a interação destes para a região alvo do programa de melhoramento.

Os sintomas podem ser confundidos com deficiência nutricional e, como várias espécies do vírus causam a doença, são necessários métodos sorológicos para maior precisão na diagnose. É de extrema importância e de caráter prático o conhecimento das reações das cultivares às espécies de B/CYDVs ocorrentes em cada região, a fim de reduzir custo de produção e aumentar a lucratividade do produtor.

Nos países onde é expressiva a produção de trigo e outros cereais, o conhecimento sobre a diversidade do patógeno, das suas interações com espécies vectoras e hospedeiras, a busca por fontes de resistência natural ou derivada da engenharia genética e a dissecação dos mecanismos envolvidos na resistência são uma realidade.

O desconhecimento da variabilidade do patógeno e de como esta afeta as interações com as plantas hospedeiras pode levar a contradições no programa de seleção de genótipos resistentes como, por exemplo, genótipos apontados como resistentes podem apresentar comportamento distinto em avaliações subsequentes. Na ausência de condições controladas e componentes (variáveis) conhecidos torna-se difícil apontar as causas das diferenças de resultados.

Desta forma, torna-se fundamental o conhecimento da reação de genótipos de trigo no que se refere a resposta ao vetor predominante

do complexo BYDV/CYDV, bem como do efeito da virose sobre características agronômicas e componentes de rendimento de trigo.

Com isso, objetivou-se analisar a resistência e a tolerância da cultivar do trigo BRS Timbaúva ao complexo *Rhopalosiphum padi* x *Barley yellow dwarf* – PAV; determinar o potencial de dano do BYDV-PAV na cultivar BRS Timbaúva em detrimento do vetor; verificar o efeito do estágio de desenvolvimento dos hospedeiros (Embrapa 16 e BRS Timbaúva) e da época de inoculação sobre componentes do rendimento e; avaliar o efeito da pressão de inóculo viral sobre componentes do rendimento das cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura de trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é, globalmente, a segunda cultura dentre as espécies vegetais em produção, sendo superada apenas pelo milho. De acordo com a FAO (2008), no ano de 2005, foram produzidas 629,6 milhões de toneladas do grão, sendo, as áreas de maior produção, a Ásia, a Europa e a América do Norte.

No Brasil, em 2008 foram produzidas 5,8 milhões de toneladas (CONAB, 2008). A Região Sul do Brasil responde pela maior parte da produção nacional de trigo.

Na safra 2006/2007, por exemplo, o estado com maior produção do cereal foi o Paraná (1,13 milhões de toneladas de grão produzidas), seguido pelo Rio Grande do Sul (728 mil toneladas) e Santa Catarina (126 mil toneladas). Considerando-se a produção de 2,23 milhões de toneladas de trigo e o consumo nacional de 10,39 milhões de toneladas, percebe-se que a produção brasileira, atende apenas em parte a demanda pelo produto (BISOTTO, 2005).

O país tem condições de solo, de clima, de material genético e de tecnologia que permitem incrementar a produtividade do trigo (BISOTTO, 2005). É preciso, portanto, implementar medidas que estabilizem fatores adversos que limitam a produtividade, como é o caso de pragas e doenças.

2.2 Nanismo amarelo dos cereais

A virose conhecida como nanismo amarelo ocorre nas diversas regiões produtoras de cereais de inverno do mundo. Espécies de BYDV e CYDV são responsáveis por expressivos danos nas lavouras, reduzindo tanto a produção de grãos como de massa verde. Estes vírus são transmitidos por afídeos, e sua atividade na planta hospedeira interfere na translocação da seiva, interrompendo o fluxo do floema. Em consequência, causa alteração no crescimento da planta, inibe a formação de raiz e reduz o rendimento quanto ao peso e número de grãos. Estes vírus atacam várias outras espécies de gramíneas, como trigo, cevada e triticale (BURNETT et al. 1995).

Embora as perdas globais sejam difíceis de estimar, em média as perdas de produtividade devido à infecção natural por este complexo viral variam entre 11 e 33%, sendo em alguns casos reportadas perdas de até 86%. A relação entre incidência da doença e perdas de produtividade é linear em trigo e cevada. Um incremento de apenas 1% desta virose causa redução na produtividade de 20 a 50 kg.ha⁻¹ em trigo e de 30 a 60 kg.ha⁻¹ em aveia (MILLER & RASOCHOVÁ, 1997).

O nanismo é causado não apenas por uma espécie de vírus, mas por distintas espécies pertencentes a família *Luteoviridae*. Os membros desta família apresentam partículas virais compostas por capsídeos isométricos de 25 a 30 nm não envelopados. O genoma viral é não segmentado composto por um RNA que apresenta entre 5600 a 6900 nucleotídeos sendo fita simples e sentido positivo (ssRNA+). No

interior da partícula viral também podem ser encontrados RNAs satélites.

2.2.1 Classificação do vírus

Originalmente, este grupo de vírus foi classificado em função da especificidade de transmissão pela espécie de vetor, pela gama de hospedeiros e virulências. Assim, até meados de 2000, foram designados cinco estirpes, RPV - transmitido por *Rhopalosiphum padi*, RMV - por *Rhopalosiphum maidis*, MAV - por *Sitobion avenae* (sin. *Macrosiphum avenae*), SGV – por *Schizaphis graminum* e PAV- por *R. padi*, *S. avenae* e outros (REGEN MORTEL, 2000).

Essas estirpes eram divididas em dois subgrupos, sendo que PAV, MAV e SGV compunham subgrupo 1 e RPV e RMV o subgrupo 2 (BURNET et al., 1987).

Embora o sistema de identificação baseado nos serotipos e transmissão pela espécie vetora seja baseado na estabilidade desta característica, dentro de um mesmo serotipo podem ser agrupados isolados que apresentam variações em características biológicas como sintomas provocados em distintos hospedeiros e eficiência com que são transmitidos pelas espécies vetoras (ROCHOW et al., 1969).

Por outro lado, indivíduos da população de uma mesma espécie vetora podem transmitir um mesmo isolado viral com diferentes níveis de eficiência (DEDRYVER et al., 2005).

O Comitê Internacional de Taxonomia de vírus, no ano de 2000 apresentou uma nova classificação para estes vírus, permanecendo na família *Luteoviridae* e reclassificado em gêneros

distintos e em espécies (não mais estirpes). O BYDV-PAV, BYDV-MAV e BYDV-SGV são espécies do gênero *Luteovirus*.

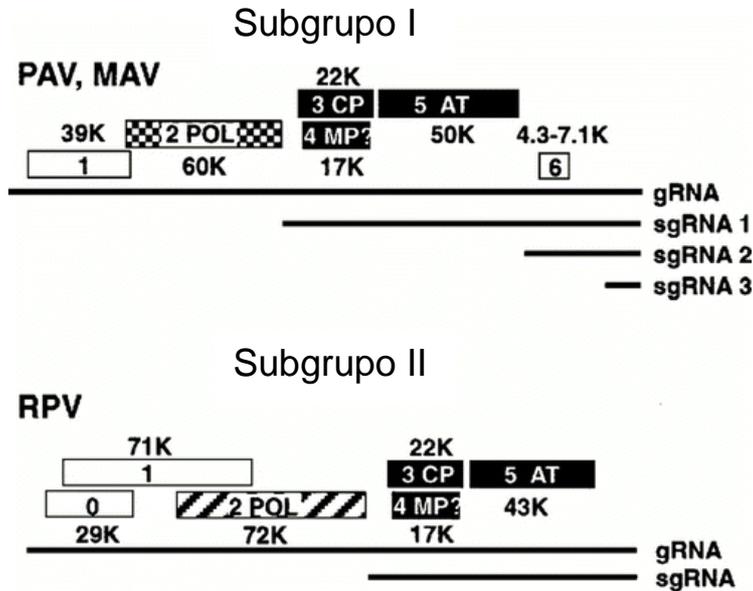


Figura 1 - Representação diagramática da organização genômica dos dois subgrupos de vírus associados ao nanismo amarelo de cereais de inverno. Áreas preenchidas em preto apresentam conservação entre os grupos. Área quadriculada apresenta similaridade com a polimerase de *Tombusviridae*. Área hachurada apresenta similaridade com a polimerase de sobemovirus. Área em branco, a exceção de um possível motivo tipo protease (ORF1 subgrupoII) não apresenta similaridade com ORF de nenhum vírus. CP – capa protéica, POL – polimerase, AT – domínio provavelmente requerido na transmissão por afídeo, MP – provável proteína envolvida no movimento célula a célula. Linhas abaixo das barras correspondem ao RNAs subgenômicos (sg) conhecidos (extraído de Miller W.A., Rasochová L. 1997).

O BYDV-RPV teve sua nomenclatura alterada pelo ICTV (2000) para vírus do nanismo amarelo dos cereais (*Cereal yellow dwarf virus* (CYDV-RPV)) e é uma espécie do gênero *Polerovirus*. As

espécies BYDV-RMV, BYDV-GPV, BYDV-SGV também pertencem à família *Luteoviridae*, entretanto, não estão, até o momento, classificados quanto ao gênero (Van REGENMORTEL et al., 2000). O genoma dos membros da família *Luteoviridae*, conforme apresentado na Figura 1, contém cinco ou seis regiões abertas de leitura (ORFs). Os diferentes gêneros dessa família diferem nas propriedades biológicas, organização genômica, seqüências de aminoácidos e na disposição e no tamanho das ORFs (PEDERSEN et al., 2003).

Os vírus da família *Luteoviridae* são transmitidos por insetos da ordem Hemiptera, família Aphididae.

No Brasil, até o momento a identificação e análise da variabilidade e predominância das espécies virais associados ao nanismo têm sido efetuadas por meio de testes sorológicos (Elisa), havendo predominância dos serotipos PAV e MAV (SCHONS & DALBOSCO, 1999).

2.2.2 Vetores e mecanismos de transmissão

Os afídeos associados à cultura de trigo são nativos da Ásia e da Europa de onde, provavelmente, foram introduzidos na América do Sul. No Brasil, apresentam ampla distribuição geográfica que se estende da região Sul ao Cerrado brasileiro. Os afídeos ocorrem em todas as regiões tritícolas brasileiras: na região Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), na região Centro-Sul (Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul) e na região Central (Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Mato Grosso) (SALVADORI & TONET, 2001).

Os afídeos do trigo podem viver até três meses a temperaturas inferiores a 5 °C, dando origem a poucas ninfas, e morrer a temperaturas constantes superiores a 28 °C. Atingem maior capacidade reprodutiva a uma temperatura que se situa entre 18 a 25 °C; nestas condições, quatro a oito dias após o nascimento, as ninfas chegam à fase adulta, parindo novas formas jovens. Aos 10 dias de vida alcançam a maior capacidade reprodutiva, podendo parir mais de 10 ninfas/fêmea diariamente. O número de instares, o número de ninfas por fêmea, a longevidade do adulto e a duração do ciclo de vida, variam de acordo com a espécie, a planta hospedeira, a qualidade do alimento e a temperatura (GASSEN, 1984).

A relação vírus-vetor para os membros da família *Luteoviridae*, é do tipo circulativa não propagativa, ou seja, o vírus circula pelos tecidos do vetor, porém sem replicar. O vírus precisa passar através das células epiteliais do intestino para atingir a cavidade corporal (hemocele). Passa então para a hemolinfa e pode permanecer ali durante toda a vida do afídeo mesmo que este não continue a se alimentar em plantas infectadas (POWER & GRAY, 1995). Elas interagem com uma proteína presente no vetor, denominada simbionina, a qual é produzida por uma bactéria endossimbionte (FILICHKIN et al., 1997). O papel da simbionina ainda não está bem esclarecido, mas Van Den Heuvel citado por Barbieri (1999), sugeriu que a interação entre o vírus e esta proteína esteja relacionada com a manutenção da integridade do vírus, e conseqüentemente com sua infectividade.

Para serem transmitidas, as partículas virais penetram nas glândulas salivares acessórias e são excretadas, junto com produtos

celulares das glândulas, para dentro do ducto salivar (Figura 2) (GILDOW, 1983). Quando o afídeo se alimenta na planta hospedeira, excreta uma variedade de substâncias através do ducto salivar do estilete para auxiliar a alimentação (MILES, 1972). Desta forma, as partículas virais são inoculadas no floema das plantas hospedeiras. Diversas tentativas de inocular artificialmente o vírus em plantas foram infrutíferas, sendo que ele pode ser transmitido somente através da passagem pelo organismo dos afídeos.

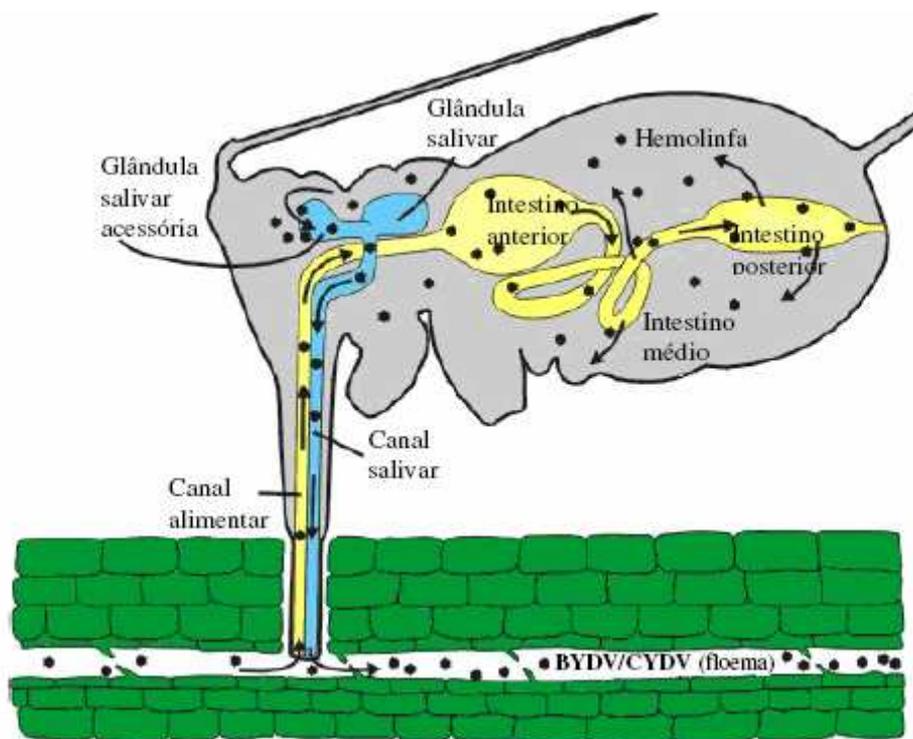


Figura 2 - Representação diagramática das etapas do processo de aquisição e transmissão de partículas virais do vírus causador do nanismo amarelo em cereais. Partículas virais adquiridas junto com a seiva elaborada migram pelo aparelho digestivo, hemocele e se acumulam na glândula salivar acessória (GSA) de onde podem ser injetadas em uma nova planta (adaptado de Gildow & Gray, 1993).

Para adquirir o vírus, os afídeos necessitam se alimentar em uma planta infectada por pelo menos 5 minutos, havendo um período de latência de 12 horas até que iniciem a transmissão. Assim como para outras viroses, os sintomas causados pelo vírus são difíceis de distinguir dos sintomas causados por deficiências nutricionais e estresses abióticos (MILLER & RASOCHOVÁ, 1997).

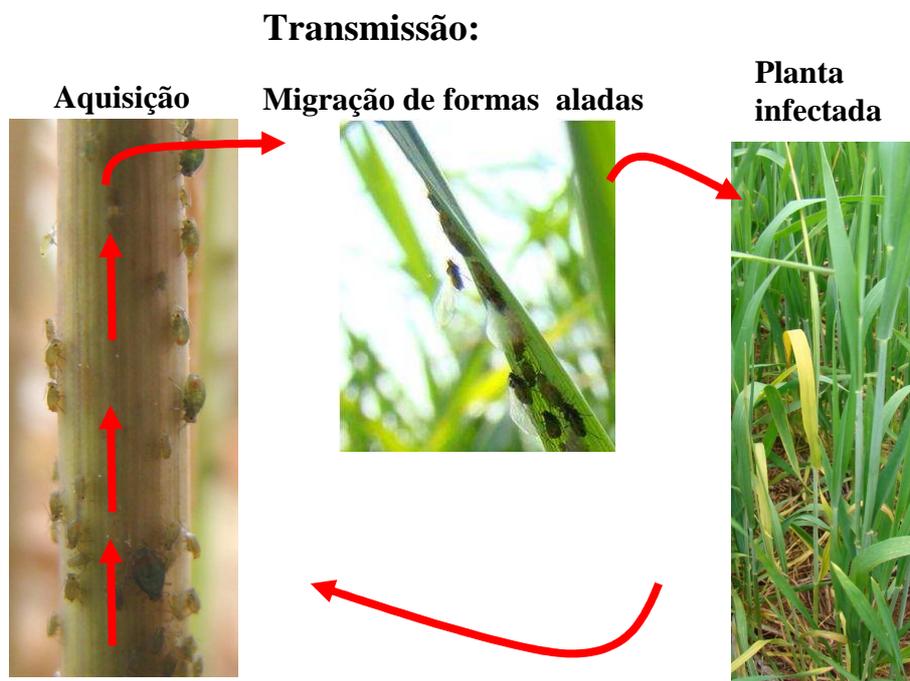


Figura 3 – Representação das etapas do ciclo infeccioso do nanismo amarelo. Aquisição do vírus a partir de uma planta infectada, dispersão do vetor, transmissão do vírus para planta sadia e exibição dos sintomas após o período de incubação.

Segundo Miller & Rasochová (1997), como o vírus não é transmitido por nenhum outro inseto, sementes, solo ou mecanicamente, a capacidade de infectar várias espécies de gramíneas

perenes e anuais que atuam como hospedeiras alternativas, permitindo a sobrevivência do vírus durante o verão, e a capacidade de transmissão pelas diversas espécies de afídeo são dois componentes importantes na epidemiologia do vírus e no êxito de uma determinada estirpe-espécie.

Durante o outono e primavera os afídeos migram das gramíneas infectadas para gramíneas sadias transmitindo o vírus. Particularmente para as condições brasileiras, ocorre a migração dos afídeos de plantações de aveia para os cultivos recém implantados de trigo.

Segundo Fargette et al. (1982), nos Estados Unidos da América, no estado de Indiana, foram analisadas algumas espécies de forrageiras perenes e algumas anuais a fim de verificar a possibilidade das mesmas estarem servindo de reservatório do BYDV que causaria doença na cultura do trigo quando implantada. Encontraram 50% das plantas infectadas pelo vírus, sendo que a espécie predominante foi CYDV-RPV, entretanto na cultura de trigo predominou o BYDV-PAV (BIANCHIN, 2008). Por este motivo, há suspeitas de que o milho estaria fazendo a “ponte verde” para a cultura do trigo.

Nas condições sul-brasileiras, com a perenização da aveia preta [*Avena strigosa* (Schreb)] no campo, utilizada como forrageira e/ou cobertura do solo, a “ponte verde” fica estabelecida entre as safras de trigo. Desta forma, tanto o vetor, quanto o vírus encontram condições adequadas para garantirem sua sobrevivência no período da entre safra.

2.2.2.1 Relação patógeno/hospedeiro/vetor

Um dos sintomas característicos do nanismo amarelo em cereais, como sugere o próprio nome, é o nanismo das plantas afetadas. Em trigo, os sintomas nem sempre são evidentes, podendo ser limitados ao nanismo e diminuição da produção. Já em cevada o amarelecimento das plantas é mais evidente. Em aveia ocorre o avermelhamento das folhas, além de alterações morfológicas do limbo foliar (MILLER & RASOCHOVÁ, 1997).

Em áreas de plantio os sintomas podem ser vistos na forma de reboleiras, que correspondem a áreas onde os afídeos estão se multiplicando e disseminando o vírus. Também podem ser vistos sintomas nas bordas da lavoura ou verdadeiros caminhos no interior da mesma, o que caracteriza a dinâmica populacional do vetor.

A redução da produtividade em trigo no que se refere ao complexo vírus/vetor pode ser analisada de duas formas. Dano direto do pulgão, que ao se alimentar na planta remove parte da seiva e com isso minimiza a disponibilidade de fotoassimilados para ser translocados para os órgãos de reserva; e dano indireto do vetor através da transmissão do vírus que virá causar sérios prejuízos à cultura. No primeiro caso, quando o pulgão é removido ou eliminado, acaba o efeito deste sobre a planta que poderá se recuperar. Já, no segundo caso, uma vez que o vírus foi transmitido, este irá se replicar no interior da planta e, dependendo do genótipo e do vírus, danos irreversíveis poderão ocorrer à planta hospedeira. Além disso, o comprometimento do funcionamento normal de tecidos e órgãos limita a capacidade do hospedeiro de responder a outros estresses. Em

situações como estas, por exemplo, de seca, os prejuízos causados pela virose são ainda mais evidentes.

2.2.3 Medidas de controle

Entre as estratégias de controle desta virose estão as práticas culturais, o controle químico e biológico do vetor envolvido e a resistência genética da planta hospedeira ao vetor e ao vírus.

O controle do vetor apresenta duplo papel, pois além de transmitir o vírus, o afídeo também provoca danos diretos na planta. Existem três estratégias que podem ser utilizadas para este fim: o controle biológico, o controle químico e a resistência genética.

2.2.3.1 Práticas culturais

As práticas culturais visam eliminar as “pontes verdes” que atuam como reservatórios do vírus e seu vetor fornecendo inóculo para culturas sadias em desenvolvimento (SALVADORI & TONET, 2001).

2.2.3.2 Controle biológico/químico

O controle biológico teve grande êxito no Brasil reduzindo de forma considerável a população de afídeos. Em julho de 1978, a Embrapa Trigo iniciou um programa de controle biológico clássico dos pulgões do trigo, uma vez que desde os últimos anos da década de 60, os pulgões vinham causando grandes prejuízos à triticultura

nacional e, o uso de inseticidas para o combate da praga, cresceu até atingir proporções econômicas, sociais e ecologicamente inaceitáveis (SALVADORI & SALLES, 2002).

Foram introduzidos no Brasil, 14 espécies de microhimenópteros parasitóides e duas espécies de joaninhas predadoras. O programa deu ênfase ao controle, através dos parasitóides que passaram a ser produzidos massalmente e distribuídos sem custo aos agricultores, para a liberação nas lavouras de trigo (SALVADORI, 2000).

O controle químico via tratamento de sementes ou pulverização da parte aérea com inseticidas, é comumente utilizado no combate a essa praga (SALVADORI & SALLES, 2002; SILVA et al., 2004). Contudo, além de onerar o custo de produção, o uso contínuo de inseticidas não seletivos apresenta riscos potenciais para operadores rurais, ao meio ambiente e organismos não visados (SALVADORI et al., 2005).

O controle químico que pode ser realizado no tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos, durante a fase de emergência ao afilhamento, é uma prática recomendável, uma vez que as pulverizações de inseticidas na parte aérea, muitas vezes, são realizadas tardiamente. Os inseticidas imidacloprido e tiametoxam têm registro e estão indicados para tal uso, em regiões com maior probabilidade de ocorrência de pulgões (SILVA, 2005). As aplicações na dose de 24,5g i.a., aplicados em 100 kg de sementes de trigo, controlam os pulgões vetores de B/CYDVs, após a implementação da cultura, que são determinadas em função da população do afídeo, pois,

segundo Colombo (2002), apesar do tratamento de sementes ser altamente eficaz, não atinge 100% das plantas.

2.2.3.3 Resistência e/ou tolerância

Dentro do enfoque de manejo integrado de pragas, seria importante a utilização de cultivares resistente a pulgões, pois pode acarretar benefícios importantes tanto para o produtor, pela diminuição dos custos de produção, como para a sociedade, pela diminuição da contaminação do agroecossistema, além de oferecer maior segurança para as pessoas envolvidas com a aplicação de agrotóxicos (SALVADORI & TONET, 2001; SALVADORI et al., 2006).

Segundo Cooper e Jones (1983), a resistência genética a vírus é caracterizada pela redução total ou parcial do título viral na planta a qual não é afetada significativamente em sua produtividade. A tolerância é caracterizada pela manutenção da produtividade, mesmo a planta hospedeira suportando títulos virais similares a genótipos suscetíveis.

De acordo com Painter (1968), a resistência genética de plantas a insetos pode se manifestar por meio de não preferência, antibiose e tolerância. Não preferência é quando o inseto não escolhe a planta para se alimentar, para abrigo e reprodução; a antibiose é quando há efeito negativo da planta na biologia do inseto; e a tolerância é a capacidade da planta de não sofrer danos, mesmo quando infestada pelo inseto.

A resistência a afídeos, em trigo e outros cereais de inverno tem sido estudada e empregada na obtenção de cultivares resistentes. Um dos casos mais conhecidos é a resistência ao pulgão verde *Schizaphis graminum*. Esta é uma interação bastante interessante, pois existem diferentes genes na planta que conferem resistência a biotipos específicos do afídeo. No Brasil, os estudos de resistência de genótipos de trigo a afídeos resultaram em cultivares como as cultivares de trigo BR 36 – Ianomâmi e Embrapa 16 resistentes a alguns biótipos desta espécie (ROSA & TONET, 1986).

R. padi é outro vetor importante de espécies de B/CYDVs para o qual se tem avaliado a resistência de plantas com evidências de existência de variados mecanismos de resistência. A resistência do tipo antibiose a *R. padi* em trigo (genótipo MV4) foi registrada por Hesler et al. (1999). A não-preferência, como mecanismo de resistência de genótipos de trigo e de triticales ao pulgão *R. padi*, foi demonstrada por Hesler et al. (2002) e Hesler & Tharp (2005), respectivamente. Hesler (2005) avaliou a alteração no crescimento de plântulas de trigo e triticales, infestadas por *R. padi*, e encontrou genótipos suscetíveis e genótipos tolerantes. A resistência do tipo antibiose a *R. padi* em trigo (genótipo MV4) foi registrada por Hesler et al. (1999), que consideram o seu uso como uma possível interação positiva com o controle biológico natural e os inseticidas.

No Brasil, a caracterização do nível e dos mecanismos de resistência de cultivares de trigo ao *R. padi* foram recentemente conduzidos e indicam que entre as cultivares brasileiras há resistência a esta espécie de afídeo (PERUZZO et al. 2007).

Considerando que o ciclo da doença depende da interação entre o vírus, o vetor e a planta hospedeira, interferências na interação vetor hospedeiro devem afetar o ciclo da doença. O efeito da resistência do hospedeiro sobre as fases de aquisição e transmissão do vírus foi demonstrado por Tanguy & Dedryver (2009) utilizando plantas da cultivar TM44 (*Triticum monococcum*) com resistência específica a *Sitobion avenae*. Nesta cultivar, as condições de vida e alimentação de *S. avenae* são fortemente afetadas e em consequência também são reduzidas a eficiência de aquisição e transmissão de BYDV-PAV. Os efeitos sobre estas etapas do ciclo infeccioso se restringiram a *S. avenae*, não ocorrendo para outros vetores para os quais a cultivar utilizada não apresentava resistência.

Embora as estratégias de controle baseadas no vetor tenham marcante efeito na redução da população de afídeos e consequentemente nos danos causados, estes podem não ser suficientes para evitar a transmissão do vírus (HESLER et al.,1999). Desta forma a resistência genética e/ou tolerância da planta ao vírus devem ser utilizadas em conjunto com medidas do controle do vetor para o êxito na redução dos danos causados pelo complexo pulgões/vírus. Há alguns genes de resistência ao vírus que são conhecidos e empregados.

Em cevada, o gene semidominante *Yd2*, que confere resistência a BYDV-PAV e MAV, tem sido transferido para vários cultivares e inúmeras linhagens (Burnett et al., citado por SÌP et al., 2006; Baltenberger et al.,1987). No entanto, esse gene não garante proteção suficiente em certos cruzamentos e em certas condições (SÌP et al.,

2006). Resistência moderada ao BYDV baseada em outros genes além do *Yd2* foi detectada por Osvená et al. (2000) na Alemanha.

Em trigo, o gene *Bdv1*, parcialmente dominante, confere tolerância ao BYDV (SINGH et al., 1993). O gene dominante *Yd2* para resistência ao BYDV está presente na cultivar de trigo MacKellar (TANGUY & DEDRYVER, 2009). Como em trigo são poucas as fontes de resistência ao vírus, tem ocorrido a busca e incorporação de resistência a partir de outras espécies e gêneros da família *Triticeae*. O gênero *Thynopyrum* tem se mostrado uma fonte de resistência a diversas doenças dos cereais (JONES et al., 1995).

Recentemente, um segmento cromossômico de *Thynopyrum intermedium* contendo o gene de resistência *Bdv2* foi introduzido no genoma do trigo e linhagens de trigo resistentes ao BYDV foram obtidas. Marcadores moleculares baseados em PCR para o gene *Bdv2* estão disponíveis auxiliando na transferência deste gene para cultivares comerciais (ZHANG et al., 2004).

Este gene confere resistência completa para o subgrupo II de BYDV em todos os tecidos da planta, e resistência parcial para o subgrupo I (PAV) em tecidos da folha e do colmo e nenhuma resistência na raiz. Apesar do uso destes genes em programas de desenvolvimento de cultivares resistentes, e da disponibilidade de marcadores moleculares localizados próximos, estes genes ainda não foram isolados e caracterizados (JEANG et al., 2004).

Entre as cultivares de trigo brasileiras BR35, descendentes de IAC-5 Maringá, são consideradas fontes de resistência e capazes de produzir descendentes tolerantes à virose (BARBIERI et al., 2001), mas faltam estudos que caracterizem e precisem os mecanismos de

resistência dos genótipos brasileiros. Em geral são realizadas avaliações que não permitem discriminar a resistência ao vetor ou ao vírus.

De acordo com Bianchin (2008), em ensaios de genótipos de trigo em telado e a campo com infestação de *R. padi* virulífero, a cultivar BRS Timbaúva exibiu constantemente as menores perdas de produtividade em relação a outras cultivares quando exposta ao vírus. Parte deste comportamento provavelmente é explicado pela resistência ao vetor *R. padi* conforme demonstrado por Peruzzo et al. (2007). O presente estudo foi conduzido no sentido de verificar se esta cultivar apresenta também algum nível de resistência ou tolerância diretamente ao vírus.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos gerais

Foram conduzidos quatro ensaios em condições controladas (câmaras com temperatura, fotoperíodo e umidade controlada), e em condições de telado, na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Trigo em Passo Fundo – RS, no ano de 2008.

3.1.1 Material vegetal

As cultivares de trigo utilizadas no presente estudo foram BRS Timbaúva e Embrapa 16. A cultivar BRS Timbaúva apresenta resistência ao vetor *Rhopalosiphum padi* (PERUZZO, 2007) e possível resistência ou tolerância ao vírus (BIANCHIN, 2008). A cultivar Embrapa 16 foi utilizada como controle por ser altamente suscetível ao BYDV-PAV.

Para a realização dos experimentos a semeadura foi feita em baldes com capacidade de dois litros, com solo adubado conforme as recomendações técnicas para a cultura do trigo (COMISSÃO..., 2004). A adubação de cobertura foi realizada 30 dias após a emergência e repetida a cada 15 dias com N, na forma de uréia, cerca de 100 mg por vaso. Os tratamentos fitossanitários para controle de eventuais doenças fúngicas foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura (REUNIÃO..., 2008).

Foram semeadas cerca de 20 sementes por balde, e após a emergência foi feito o desbaste, mantendo cinco plantas por balde.

Os afídeos foram transferidos com um pincel úmido, cuidando para não danificar o aparelho bucal do inseto. Após a infestação, cada planta foi isolada em gaiolas entomológicas (tubo de polietileno, 4 cm de diâmetro e 15 cm de altura, coberta com tela de nylon na extremidade superior). O período para a transmissão foi de 72 horas, 12 horas luz a temperatura de 20 °C e 12 horas escuro a 8 °C, simulando dias de inverno. Após esse período as plantas foram pulverizadas com inseticida Nuvan, (diclorvós) na dose 6 mL.L⁻¹ de água, para eliminação dos insetos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

3.1.2 Vetor e vírus

Os afídeos utilizados nos ensaios foram da espécie *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus). A colônia de *R. padi* utilizada é oriunda de exemplares obtidos em Passo Fundo - RS e vem sendo mantida no insetário da Embrapa Trigo desde 2006. A colônia de indivíduos avirulíferos foi iniciada a partir de ninfas recém-paridas sem contato com tecidos de planta infectada. Para a produção da colônia com indivíduos virulíferos, adultos foram transferidos e multiplicados sobre plantas de aveia preta [*Avena strigosa* (Schreb)], infectadas com um isolado de BYDV-PAV. O período para a aquisição do vírus não foi controlado, apenas tomou-se o cuidado de substituir as plantas mais afetadas por plantas novas.

O isolado viral utilizado denominado 40 Rp pertence a espécie BYDV-PAV e é oriundo de plantas de aveia coletadas em Passo Fundo em julho de 2007. O isolado apresenta capacidade de infectar plantas de aveia e trigo e é eficientemente transmitido por *R. padi* (PARIZOTO et al., 2007 e 2008). A identificação da espécie viral foi realizada por testes sorológicos e sequenciamento da capa protéica viral (YAMAZAKI LAU et al., 2008). O isolado 40 Rp vem sendo mantido no insetário da Embrapa Trigo em plantas de aveia.

Quanto a escolha de três dias (72 horas) para transmissão do vírus, Gomes (2006), não constatou diferença entre a duração de infestação de 2 e 7 dias, para nenhuma característica agrônômica. Bianchin (2008) também constatou que o tempo de transmissão (de 24, 36 e 48 horas), não interferiu na concentração do vírus. Entretanto, houve diferença significativa para 12 horas, a qual apresentou título viral menor que as demais durações (BIANCHIN, 2008).

3.1.3 DAS-ELISA

O ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), foi realizado através de uma adaptação do método descrito por Clark & Adams, (1977). Para a realização do teste de Elisa direto foram utilizados reagentes adquiridos da firma AGDIA Inc., e microplacas de poliestireno fundo chato com 96 cavidades.

As amostras foram maceradas em tampão de extração (Anexo 1), na proporção de 100 mg de tecido vegetal para 1 mL de tampão. As placas foram cobertas com anti-soro policlonal para BYDV-PAV, diluído na proporção de 1:200 (de acordo com a recomendação do

fabricante) em tampão de cobertura (Anexo 2), sendo depositados 100 μ L do preparado em cada cavidade da placa.

Para incubação as placas foram protegidas com papel toalha úmidos e mantidas em caixa de isopor, por 16 horas no refrigerador a 4 °C. Após este período realizou-se a lavagem da placa por três vezes com PBST (Anexo 3) e adicionou-se aos orifícios das microplacas 100 μ L da amostra macerada e diluída em tampão de extração (Anexo 1), acompanhado de um controle positivo e outro negativo. Em seguida foi acondicionado novamente em caixa de isopor para incubação por 16 horas em refrigerador a 4 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem PBST. Em seguida, secaram-se as placas antes de adicionar o conjugado.

Foi usado tampão para o conjugado (Anexo 4) (1:200) e enzima do conjugado (fosfatase alcalina) na diluição indicada pelo fabricante. Em seguida, foram depositados nos orifícios, 100 μ L do preparado da enzima conjugada e a seguir incubou-se novamente em câmara úmida por 2 horas a 37 °C. Após completar a incubação, procedeu-se nova lavagem por três vezes com PBST.

O substrato PNP (p-nitrofenil fosfato – SIGMA 104/105) foi diluído 1mg/mL em tampão do substrato (Anexo 5) e aplicado diretamente na placa (100 μ L/célula). Após a aplicação do substrato as placas foram mantidas em temperatura ambiente até obtenção da coloração (30 a 60 minutos). A planta foi submetida à leitura verificando-se a reação colorimétrica das amostras em espectrofotômetro de placas, (leitora de Elisa) modelo Rosys Anthos 2010, com absorvância de 405nm. Foram consideradas positivas para BYDV-PAV as amostras que apresentaram valor maior ou igual a

duas vezes (2x) o valor do controle negativo e o resultado expresso em absorbância a 405 nm (indicando o valor de absorbância de acordo com a intensidade da cor desenvolvida para a reação do anti-soro contra o antígeno viral).

3.2 Análise estatística

Em todos os experimentos, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (teste F), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Foi empregado o programa SISVAR versão 5.0 (DEX/UFLA) Daniel Furtado Ferreira (2003). As curvas com intervalo de confiança do experimento I foram geradas no programa R.

3.3 Experimento I – Avaliação da resistência da cultivar de trigo BRS Timbaúva ao *Rhopalosiphum padi* e ao BYDV-PAV

A fim de verificar a resistência ou a tolerância ao BYDV-PAV da cultivar de trigo BRS Timbaúva, foi conduzido um ensaio para determinar o título viral em diferentes órgãos da planta em diferentes tempos (dias) após a inoculação.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com cinco repetições (plantas individualizadas), para cada combinação de tempo, 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 28 dias após a remoção dos pulgões.

As plantas no estágio 1 da escala de Feekes modificada (LARGE, 1954), com duas folhas expandidas (Figura 4), foram infestadas com cinco afídeos ápteros.

Após este período as gaiolas foram removidas e realizou-se a contagem do número de ninfas por adulto para cada planta.

Este procedimento foi repetido em cinco ensaios estabelecidos em datas distintas (30/05, 06/06, 13/06, 20/06 e 27/06/2008), para verificar o comportamento dos afídeos no que se refere a permanência, alimentação e reprodução, sobre as duas cultivares de trigo. Além disso, no ensaio estabelecido em 27/06 determinou-se a taxa de permanência dos afídeos adultos sobre as plantas.

No primeiro ensaio (estabelecido em 30/05) as plantas foram pulverizadas com inseticida Nuvan, (diclorvós) na dose 6 mL.L⁻¹ de água, para eliminação dos insetos.

Após a aplicação do inseticida as plantas foram mantidas em câmara climatizada, com condição de temperatura, fotoperíodo e umidade controlada (12 horas luz a 20 °C e 12 horas escuro a 8 °C), simulando dias de inverno e para cada tempo estabelecido, as plantas foram coletadas, seccionadas em folha, colmo e raiz para realização do teste de Elisa. Cada amostra foi processada logo após a coleta, e armazenada em refrigerador a - 20 °C sendo o teste sorológico realizado em uma única vez após o término do ensaio.

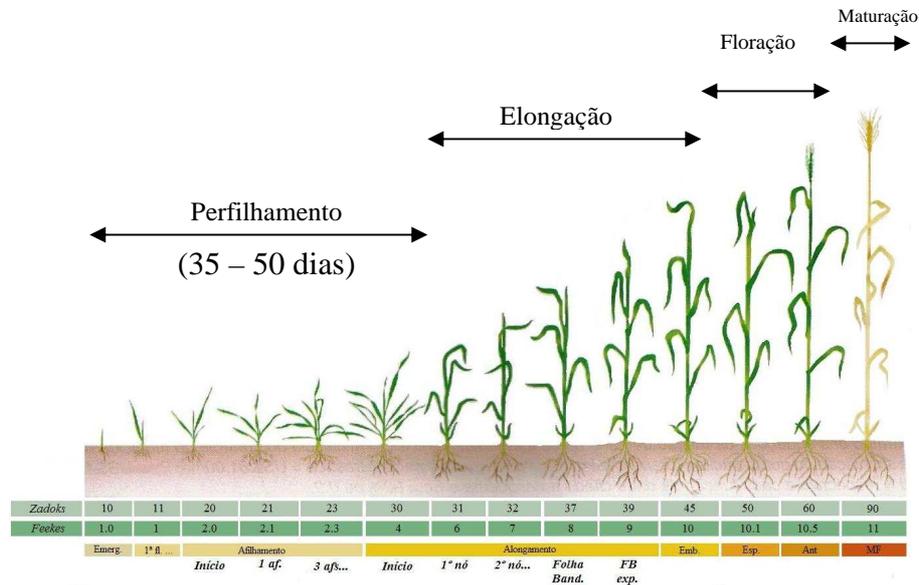


Figura 4 - Escala de Feekes modificada (LARGE, 1954)

3.4 Experimento II - Estimativa da tolerância por meio da quantificação de componentes morfológicos e do rendimento

O experimento foi estabelecido no mês de junho de 2008, conduzido em delineamento completamente casualizado, com dois fatores: hospedeiros (cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva) e ausência/presença de vírus (infestação com afídeos avirulíferos e virulíferos). Para cada combinação de fatores foram utilizadas 10 repetições, sendo que cada vaso com cinco plantas foi considerado uma repetição. Uma semana após o plantio, no estágio 1 de desenvolvimento, escala de Feekes modificada (LARGE, 1954), com duas folhas expandidas, foram colocados cinco afídeos adultos por planta. A transferência dos afídeos e posterior eliminação, seguiu a

metodologia já descrita. As plantas foram mantidas em telado, sem controle de temperatura ou fotoperíodo. A eficiência da inoculação foi estimada por meio de DAS-ELISA. Aos 15 dias após a eliminação dos afídeos foram coletadas amostras da última folha expandida de cada planta para a determinação do título viral. No estágio de maturação, determinou-se o número de afilhos, estatura e os componentes do rendimento (número de espigas por planta, número de grãos por espiga e peso de mil grãos).

3.5 Experimento III – Efeito do estágio de desenvolvimento do hospedeiro e da época da inoculação do vírus sobre o rendimento de grãos e seus componentes

O experimento foi conduzido nas dependências da Embrapa trigo em casa de vegetação. Duas cultivares de trigo, em quatro diferentes estádios (Escala de Large (1954), estágio de crescimento 1, 4, 7 e 10) de desenvolvimento foram submetidas à infestação com *R. padi* avirulíferos ou virulíferos (expostos ao BYDV-PAV). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O arranjo fatorial foi 2x4x2 sendo, 2 cultivares, 4 estádios e 2 condições de inóculo. Cada tratamento constou de cinco repetições sendo que a unidade experimental foi constituída de um vaso com cinco plantas.

Para que plantas em diferentes estádios de desenvolvimento pudessem ser inoculadas em um mesmo momento foram realizadas semeaduras em épocas distintas (04/06 – 16/06 – 30/06 e 14/07/2008).

Em 21/07, sete dias após a última semeadura realizou-se a infestação das plantas com *R. padi* virulíferos e avirulíferos conforme

descrito anteriormente. Após a infestação as plantas foram isoladas com gaiolas entomológicas, protegidas com tela de nylon. Após a eliminação dos afídeos, as plantas foram transferidas para telado, (temperatura e fotoperíodo não controlados).

Ao surgirem os sintomas, 15 dias após a inoculação foi coletada parte da última folha expandida, separadamente de cada uma das plantas, juntou-se os cinco fragmentos das cinco plantas do vaso para realização do teste sorológico. Confirmou-se a infecção viral por teste sorológico DAS-Elisa. Além do título viral, ao final do ensaio foram avaliados os componentes de rendimento: número de espigas, número de grãos e peso de mil grãos.

3.6 Experimento IV – Efeito de cinco níveis de infestação com afídeos avirulíferos e virulíferos sobre os componentes do rendimento de grãos

O efeito da pressão de inóculo sobre a resistência ou a tolerância de BRS Timbaúva foi estimada por meio de diferentes níveis de infestação com afídeos e quantificação do seu impacto sobre componentes do rendimento.

O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições (cinco vasos com cinco plantas) sendo que cada repetição foi constituída de uma planta. Em cada uma das cinco plantas de um vaso, foi utilizado um dos níveis de infestação (1, 2, 3, 4, 5 afídeos virulíferos obtidos conforme descrito anteriormente). Este procedimento foi utilizado para as duas cultivares do ensaio (Embrapa 16 e BRS Timbaúva). O experimento foi

conduzido em telado, exposto às condições ambientais. A eficiência da inoculação foi estimada por meio de DAS-ELISA. Aos 15 dias após a eliminação dos afídeos foram coletadas amostras da última folha expandida de cada planta para a determinação do título viral. Ao final do ensaio foram avaliados os componentes de rendimento: número de espigas, número de grãos e peso de mil grãos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I – Avaliação da resistência da cultivar de trigo BRS Timbaúva ao *Rhopalosiphum padi* e ao BYDV-PAV

O comportamento de *R. padi* em relação às duas cultivares utilizadas neste estudo foi distinto. Considerando a permanência sobre as plantas e a sua reprodução no período de 72 horas, os afídeos permaneceram mais tempo e apresentaram maior reprodução sobre Embrapa 16 em relação à BRS Timbaúva (Tabela 1).

Considerando os dados do quinto ensaio, do total de cinco afídeos colocados por planta, todos (100%) permaneceram sobre as plantas da cultivar Embrapa 16 e 89,6% permaneceram sobre as plantas da cultivar BRS Timbaúva.

O número médio de ninfas produzidas por adulto em plantas infestadas com *R. padi*, foi distinto entre as cultivares em estudo (Tabela 1 e Figura 5). Em quatro dos cinco ensaios que foram realizados, na cultivar Embrapa 16 houve maior multiplicação dos afídeos (maior produção de ninfas por adulto) em relação a cultivar BRS Timbaúva.

Estes resultados estão em conformidade com os encontrados por Peruzzo et al. (2007), que relataram que na cultivar BRS Timbaúva, há uma provável inadequação qualitativa do alimento e consideraram a possibilidade de os insetos não terem se alimentado normalmente. O comportamento de *R. padi* sobre BRS Timbaúva se assemelha aos relatados por Hesler et al. (1999), que foi designado antibiose e posteriormente por Hesler et al. (2002) fenômeno que os autores designaram de não preferência.

Tabela 1 – Número médio de ninfas por afídeo adulto de *Rhopalosiphum padi* mantido sobre duas cultivares de trigo

Ensaio	Número de ninfas/adulto	
	Embrapa 16	BRS Timbaúva
1	A 1,32 ns*	A 1,01ns*
2	A 1,19	B 0,42
3	A 1,22	B 0,31
4	A 2,53	B 1,13
5	A 2,01	B 0,71
Média	1,65	0,72
CV (%)	31,62	

Médias precedidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.ns* =não significativo na coluna.

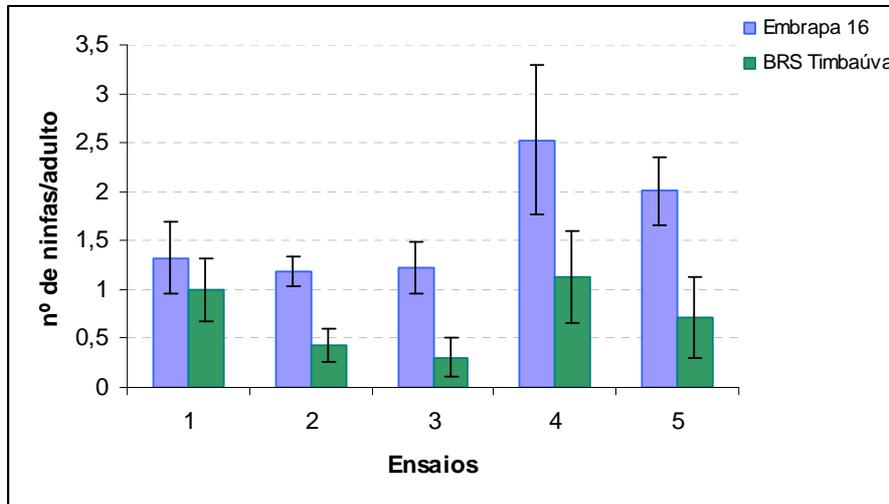


Figura 5 – Número médio de ninfas por adulto nas cultivares de trigo Embrapa 16 e BRS Timbaúva em cinco ensaios distintos. (Barras acima das colunas correspondem ao desvio padrão).

Embora as tendências observadas tenham sido as mesmas, com o número médio de ninfas produzidas por adulto maior para Embrapa 16, o número médio de ninfas produzidas e o valor da diferença entre as cultivares oscilou, não sendo significativo no primeiro ensaio. As diferenças observadas entre os ensaios, possivelmente sejam devido a variações do ambiente onde foram mantidos. O primeiro ensaio foi mantido em condições controladas, câmara de crescimento, simulando dias de inverno e os demais mantidos em condições de temperatura e luz semi-controladas.

Na câmara de crescimento, simulando dias de inverno a luminosidade foi mais intensa e a variação de temperatura precisamente controlada. Nos demais ensaios em condições semi-controladas, além da menor intensidade de luz, a temperatura sofreu influência das condições ambientais externas à câmara.

No primeiro ensaio, é possível que um fator tenha afetado exclusivamente BRS Timbaúva, pois o número médio de ninfas produzido por Embrapa 16 foi similar nos três primeiros ensaios, mas para BRS Timbaúva o número médio foi maior no primeiro em relação aos ensaios 2 e 3. Os mecanismos envolvidos na resistência de BRS Timbaúva a *R. padi* (antibiose) provavelmente tenham sido afetados pelas condições do ambiente.

O teste sorológico confirmou a infecção por BYDV-PAV, sendo que, a concentração do vírus diferiu entre as datas de coleta. Conforme esperado, a curva de absorbância apresenta um padrão logístico em que, após a fase inicial, observa-se um rápido incremento da absorbância até a estabilização e decréscimo (Figura 6). As curvas são ligeiramente diferentes dependendo do órgão (folha, colmo e raiz) analisado. A estabilização da concentração viral ocorreu entre 17 e 21 dias após o período para a transmissão.

Não houve diferença significativa entre as cultivares em nenhum dos pontos da curva. Embora a variação dos dados não permita apontar diferenças, considerando o padrão de curva, principalmente para os órgãos folha e colmo, há um atraso no início da fase exponencial na cultivar BRS Timbaúva em relação a Embrapa 16. Posteriormente os valores médios obtidos de absorbância se igualam ou mesmo ultrapassam os obtidos para Embrapa 16. É possível que o atraso inicial no incremento da absorbância tenha relação com a fase de inoculação do vírus na planta. Como há evidências de resistência ao vetor é possível que o inóculo inicial transmitido para Embrapa 16 seja maior do que para BRS Timbaúva e isto justificaria o atraso representado através das curvas da absorbância (Figura 6).

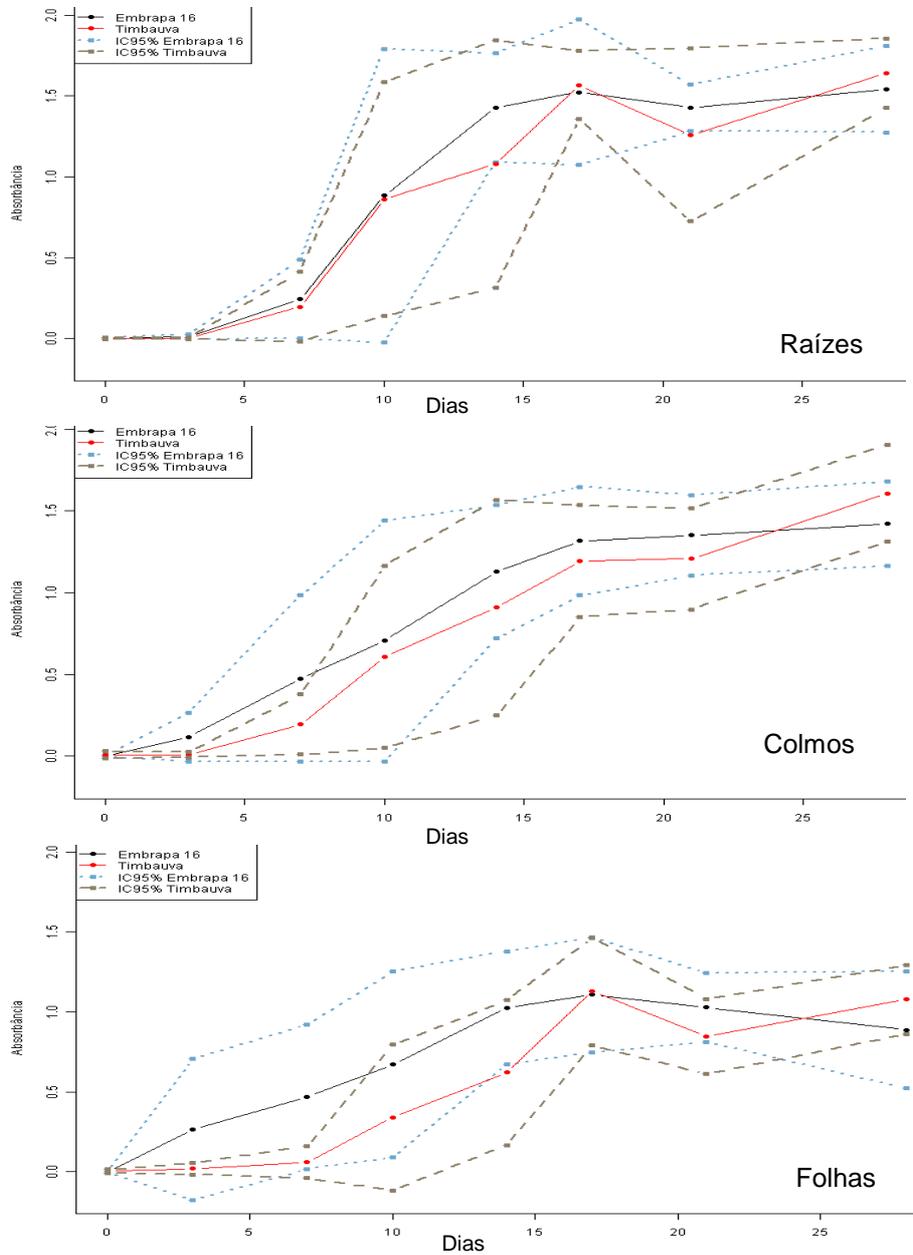


Figura 6 - Concentração de BYDV-PAV (estimada por absorbância a 405 nm) nas raízes, colmos e folhas de trigo, das cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva, em sete épocas (em dias) após a transmissão utilizando *Rhopalosiphum padi*.

4.2 Experimento II - Estimativa da tolerância por meio da quantificação de componentes morfológicos e do rendimento

Independentemente da presença ou da ausência do vírus confirmado por DAS-ELISA, em função das características varietais e potencial produtivo de cada cultivar utilizada neste estudo, foram observadas diferenças na estatura de planta, número de espigas por planta, número de grãos por planta e peso de mil grãos. O peso total de grãos (g) foi 39% superior em BRS Timbaúva em relação a Embrapa 16 (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de espigas por planta, número de grãos por planta e peso estimado de mil grãos por planta, comparando as cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestados com afídeos *R. padi* avirulíferos e virulíferos

Cultivar	Nº Espigas/ Planta	Nº Grãos/ Planta	Peso total de grãos(g)/espiga	Peso de mil grãos (g)
Embrapa16	2,90 b	54,65 a	1,48 b	36,39
BRS Timbaúva	3,75 a	64,10 a	2,22 a	37,78
Tratamento				
Avirulíferos	3,70 a	63,90 a	2,36 a	37,01
Virulíferos	2,95 b	54,90 a	1,34 b	24,51
CV (%)	17,86	27,28	12,73	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

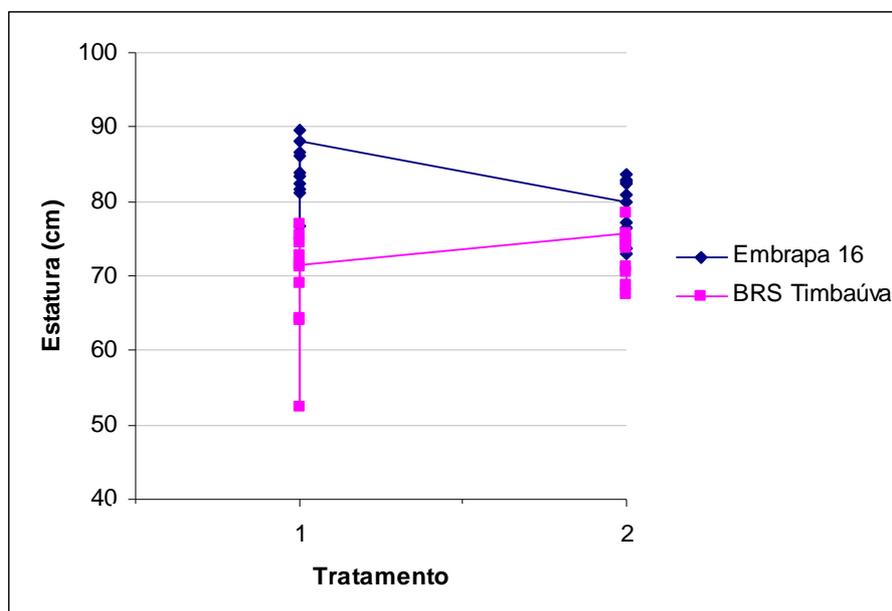


Figura 7 – Interação entre as cultivares (Embrapa 16 e BRS Timbaúva) e estatura em plantas expostas a pulgões avirulíferos e virulíferos (Tratamento 1, avirulíferos e tratamento 2, virulíferos).

Tabela 3 – Interação entre as cultivares (Embrapa 16 e BRS Timbaúva), estatura e número de afilhos em plantas expostas à pulgões avirulíferos e virulíferos

Cultivar	ESTATURA (cm)		Nº de AFILHOS	
	Avirulífero	Virulífero	Avirulífero	Virulífero
Embrapa 16	A 84,00 a	B 79,30 a	A 7,70 a	B 5,80 a
BRS Timbaúva	A 69,10 b	A 72,90 b	A 7,00 a	B 4,97 a
CV (%)	16,27		6,29	

Médias precedidas de mesma letra maiúscula na linha e seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Houve efeito da infecção viral no desenvolvimento das plantas em ambas as cultivares (Figura 7), embora não tenham diferenças significativas entre si em suas estaturas. Em relação às plantas infestadas com afídeos avirulíferos, as plantas com vírus apresentaram

redução da estatura, redução do número de afilhos, redução do número de espigas, redução do peso total de grãos e por consequência do peso de mil grãos (Tabelas 2 e 3). Os efeitos da infecção viral resultaram na perda média de produção, estimada pelo peso de mil grãos de aproximadamente 43%, porcentagem também observada para o peso total de grãos (g) (Tabela 2).

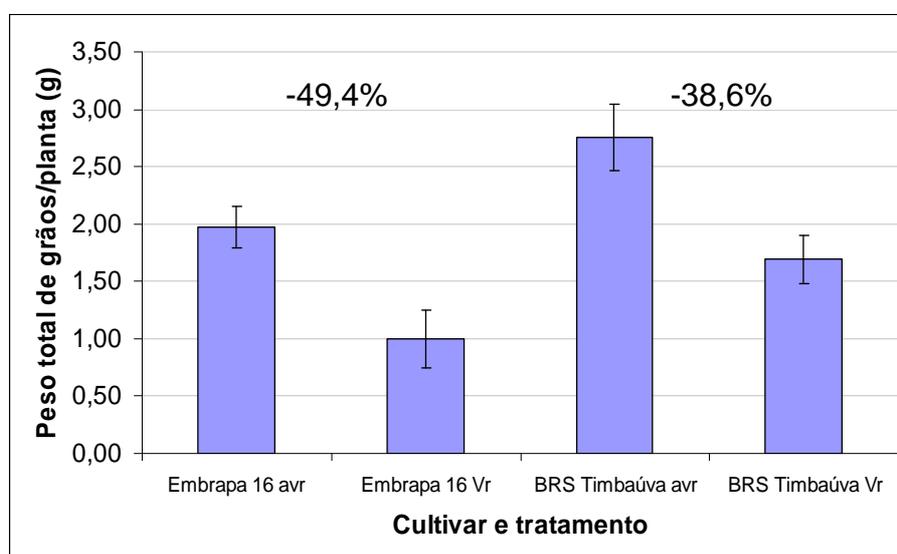


Figura 8 - Redução no rendimento do Peso total de grãos/planta nas cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestados com afídeos avirulíferos (avr) e virulíferos (vr).

O efeito do vírus sobre a estatura das plantas foi significativo para Embrapa 16 que apresentou uma redução de aproximadamente 17,8% em relação às plantas não infectadas, enquanto que para BRS Timbaúva, não houve redução significativa (Tabela 3).

Considerando o número de espigas por planta e o peso de grãos por planta, calculou-se a redução no rendimento de grãos por planta, sendo que na cultivar Embrapa 16, em plantas infestadas com pulgões

virulíferos em comparação com avirulíferos foi de 49,4%, enquanto que, para BRS Timbaúva a redução foi de 38,6% (Figura 8).

4.3 Experimento III – Efeito do estágio de desenvolvimento do hospedeiro e da época da inoculação sobre componentes de rendimento

Assim como constatado no ensaio anterior, as cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva apresentaram diferenças nas características agronômicas e nos componentes do rendimento.

A cultivar Embrapa 16 apresentou os primeiros sintomas típicos da infecção por BYDV oito dias após a remoção dos afídeos. Os sintomas de amarelecimento intenso, principalmente na folha bandeira, foram evidentes nas plantas inoculadas no estágio de desenvolvimento mais avançado (emborrachamento) (Figura 9). Na cultivar BRS Timbaúva, somente 15 dias após o final da transmissão foram observados os primeiros sintomas nas plantas, neste mesmo estágio.



Figura 9 – Sintomas típicos da infecção por BYDV em plantas da cultivar Embrapa 16 infestadas com *Rhopalosiphum padi* expostos ao BYDV-PAV, infestados em diferentes estádios de desenvolvimento (Escala de Feekes modificada (LARGE, 1954).

Na figura 9, os quatro vasos que aparecem em primeiro plano representam os quatro estádios que foram realizadas as inoculações, sendo os sintomas de amarelecimento da folha bandeira evidentes nas plantas inoculadas no estágio mais avançado (emborrachamento).

Nas plantas infectadas nos estádios mais precoces, os sintomas tornaram-se evidentes, a partir dos 20 e 30 dias após a transmissão nas cultivares Embrapa 16 e BRS Timbaúva, respectivamente, sendo que, em ambas as cultivares as plantas infectadas em estádios mais juvenis foram as que apresentaram os sintomas da virose mais tardiamente.

Através da análise sorológica foi possível estimar a concentração viral na planta que não diferiu estatisticamente entre as plantas inoculadas nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Também houve efeito significativo da infecção viral promovendo redução do número de espigas por planta, do número médio de grãos por planta e do peso de mil grãos (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de espigas por planta, número de grãos por planta e peso de mil grãos nas cultivares de trigo Embrapa 16 e BRS Timbaúva infestadas com afídeos avirulíferos e virulíferos (expostos ao BYDV-PAV) em quatro estádios de desenvolvimento (escala de Large)

<i>Cultivar</i>	<i>nºespigas/ planta</i>	<i>nº grãos/ planta</i>	<i>Peso Total de Grãos(g)/ planta</i>	<i>Peso de mil Grãos(%)</i>
Embrapa16	2,34 b	41,42 a	1,13 b	29,81
BRS Timbaúva	2,88 a	39,28 a	1,66 a	42,48
<i>Afídeos</i>				
Avirulíferos	2,77 a	45,88 a	1,72 a	37,57
Virulíferos	2,45 b	34,82 b	1,08 b	31,18
<i>Estádios</i>				
10	2,68 a	51,50 a	1,63 a	39,75
7	2,79 a	53,04 a	1,60 a	43,54
4	2,41 a	31,92 b	1,28 b	43,08
1	2,56 a	24,94 b	1,07 b	30,47
CV (%)	19,43	30,89	25,28	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

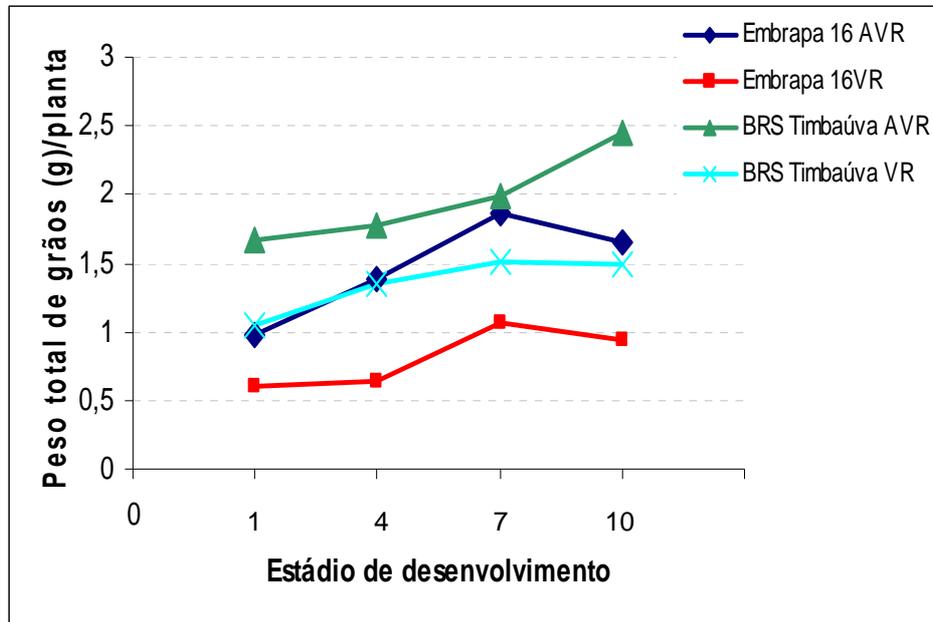


Figura 10 - Efeito da época de inoculação sobre o peso de grãos por espiga em plantas de trigo das cultivares BRS Timbaúva e Embrapa 16 infestadas com pulgões avirulíferos e virulíferos.

A exceção da inoculação em plantas em estágio mais avançado de desenvolvimento, em todas as demais, as perdas em Embrapa 16 foram superiores as observada em BRS Timbaúva (Figura 10).

O número médio de grãos por planta foi superior na cultivar Embrapa 16, embora não diferindo estatisticamente de BRS Timbaúva, entretanto, o peso de grãos foi significativamente maior na BRS Timbaúva indicando que, conforme já relatado por Caetano (1972); Schons et al. (1999); Nicolini-Teixeira et al. (2006), podem ocorrer compensações fisiológicas na planta, já que a redução observada no número de grãos, provavelmente devido à esterilidade

de parte da espiga provocada por colapsos no floema da região por ação do vírus, se refletiu em um maior peso de grãos por espiga.

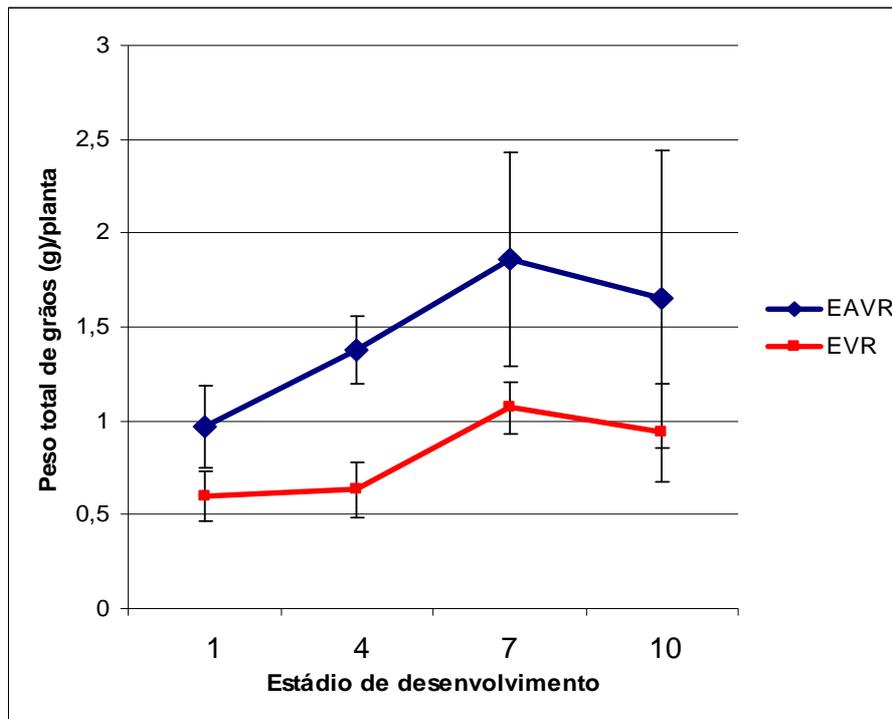


Figura 11 – Peso total de grãos em função da estágio de desenvolvimento de plantas da cultivar Embrapa 16 infestadas com pulgões avirulíferos (EAVR) e virulíferos (EVR) (expostos ao BYDV-PAV).

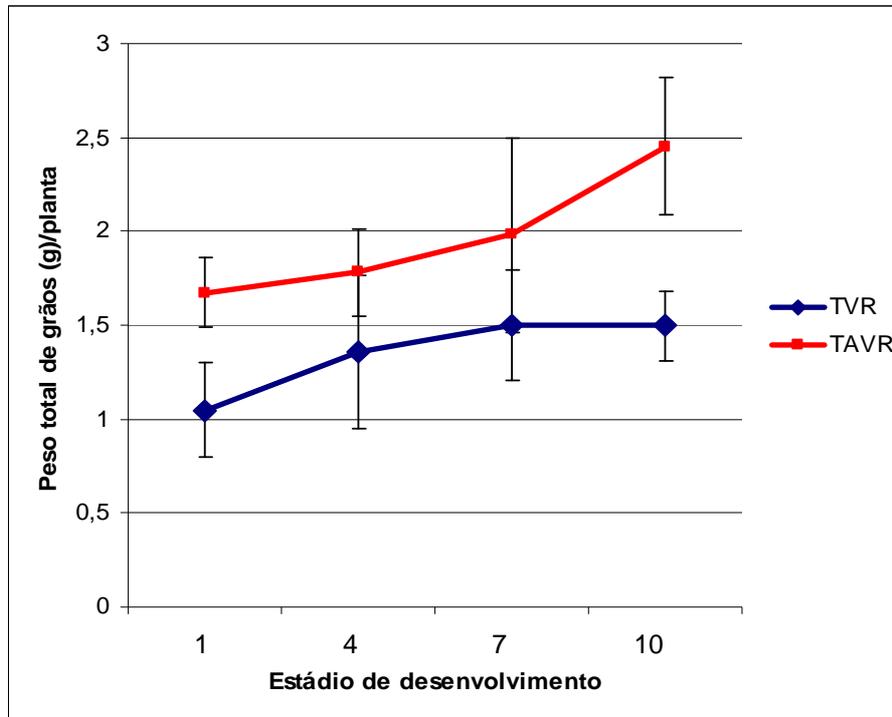


Figura 12 - Peso total de grãos em função do estágio de desenvolvimento de plantas da cultivar Embrapa 16 infestadas com pulgões avirulíferos (TAVT) e virulíferos (TVR) (expostos ao BYDV-PAV).

Os resultados apresentados na figura 11 e 12 mostram que BRS Timbaúva apresenta rendimento em torno de 8% superior, no peso de grãos, em plantas infectadas pelo BYDV-PAV em relação à Embrapa 16 na mesma condição.

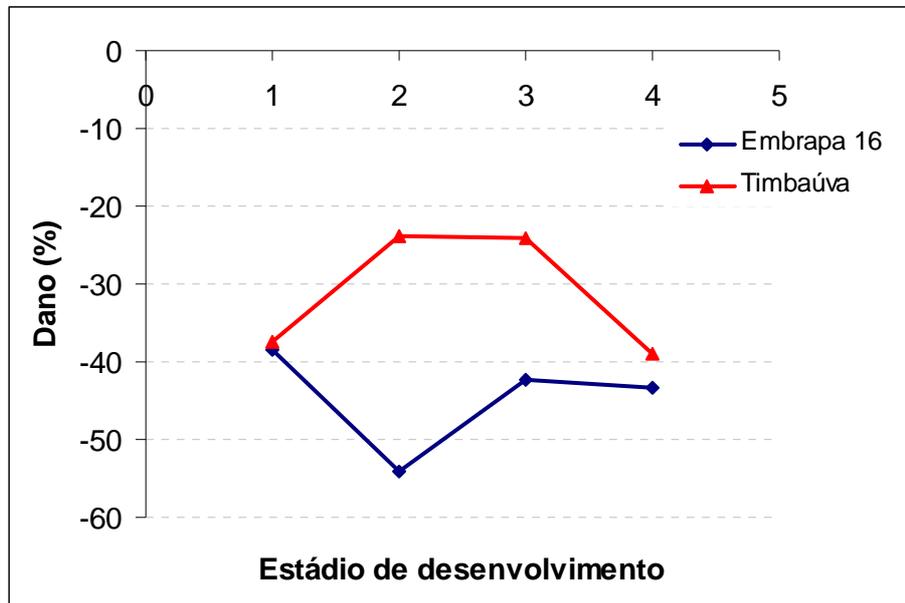


Figura 13 - Redução do peso de grãos por planta (%) nas duas cultivares em quatro épocas (estádios de desenvolvimento) após a infestação com pulgões avirulíferos e virulíferos (BYDV-PAV), descontando-se o efeito do pulgão avirulífero.

Na figura 13, os dados apresentados evidenciam a redução no peso total de grãos por planta após descontar-se o efeito do dano do pulgão avirulífero. Nas plantas inoculadas no estágio 1 de desenvolvimento, os danos são idênticos em ambas as cultivares, já nos estádios 3, 7 e 10, embora não haja diferença significativa entre as cultivares, é possível observar danos de até -53,5 % na cultivar Embrapa 16, enquanto que, os danos na cultivar BRS Timbaúva não passam de -40,0 %, ou seja, há uma diferença de 13,5%, que é convertido, em um dado momento, em perda a mais na cultivar Embrapa 16 quando comparada à BRS Timbaúva.

4.4 Experimento IV – Efeito da pressão de inóculo sobre componentes do rendimento

Por meio de teste sorológico confirmou-se a infecção por BYDV-PAV e estimou-se a frequência de plantas infectadas para cada cultivar e para cada nível de infestação com *R. padi*. Nenhuma das plantas infestadas com afídeos avirulíferos apresentou reação positiva no teste sorológico, indicando que não houve fuga de afídeos virulíferos para outras plantas. Na cultivar Embrapa 16, 100% das plantas infestadas com afídeos virulíferos, independentemente do número de afídeos utilizados, foram soropositivas e na cultivar BRS Timbaúva houve efeito do número de afídeos. Das plantas infestadas com um afídeo, apenas 40% foram soropositivas, percentual que atingiu 80% para dois afídeos e 100% a partir de 3 afídeos (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência de plantas soropositivas para BYDV-PAV infestadas com número variável (crescente) de afídeos virulíferos

Nº afídeos/ planta	Tratamentos			
	Avirulíferos		Virulíferos	
	Embrapa16	BRS Timbaúva	Embrapa16	BRS Timbaúva
1	0/5	0/5	5/5	2/5
2	0/5	0/5	5/5	4/5
3	0/5	0/5	5/5	5/5
4	0/5	0/5	5/5	5/5
5	0/5	0/5	5/5	5/5

* plantas soropositivas/total de plantas

Tabela 6 – Número de espigas por planta, número de grãos por planta, em duas cultivares de trigo, infestadas com afídeos avirulíferos e virulíferos (expostos ao BYDV-PAV) submetidas a cinco pressões de inóculo

Cultivar	Nº de Espigas/planta	Nº de Grãos/planta
Embrapa 16	2,68 b	57,16 b
BRS Timbaúva	3,22 a	73,92 a
Afídios		
Avirulífero	2,84 a	68,02 a
Virulífero	3,06 a	63,06 a
Nº de Afídios/plantas		
1	3,50 a	84,15 a
2	2,75 a	62,90 a b
3	2,95 a	66,25 a b
4	2,85 a	62,65 a b
5	2,70 a	51,75 b
CV (%)	31,34	39,76

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Quanto maior o número de afídeos exposto ao BYDV-PAV, empregados na inoculação, menor a produtividade (Figura 14).

O efeito do número de afídeos estimado por meio da produtividade (peso total de grãos) é evidente para os afídeos virulíferos (Tabela 7). Assim, à medida que se aumenta o número de afídeos virulíferos mais se reduz a produção, fato não observado para afídeos avirulíferos.

Tabela 7 – Peso médio de grãos por plantas (g) e peso total de grãos, independente da cultivar com cinco níveis de infestação por afídeos avirulíferos e virulíferos

Nº de afídeos	Peso total de grãos			
	Avirulíferos		Virulíferos	
1	A	2,17 a	A	2,16 a
2	A	1,81 a	A	1,69 a b
3	A	2,23 a	B	1,50 b c
4	A	2,05 a	B	1,15 b c
5	A	1,88 a	B	0,98 c
CV (%)	24,16			

Médias precedidas de mesma letra maiúscula na linha e seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Deduz-se, portanto, que para o número de afídeos utilizados e o período de exposição das plantas de 72 horas o efeito de dano direto do vetor pode ser desconsiderado e que as diferenças observadas tenham relação direta com a eficiência de inoculação do vírus.

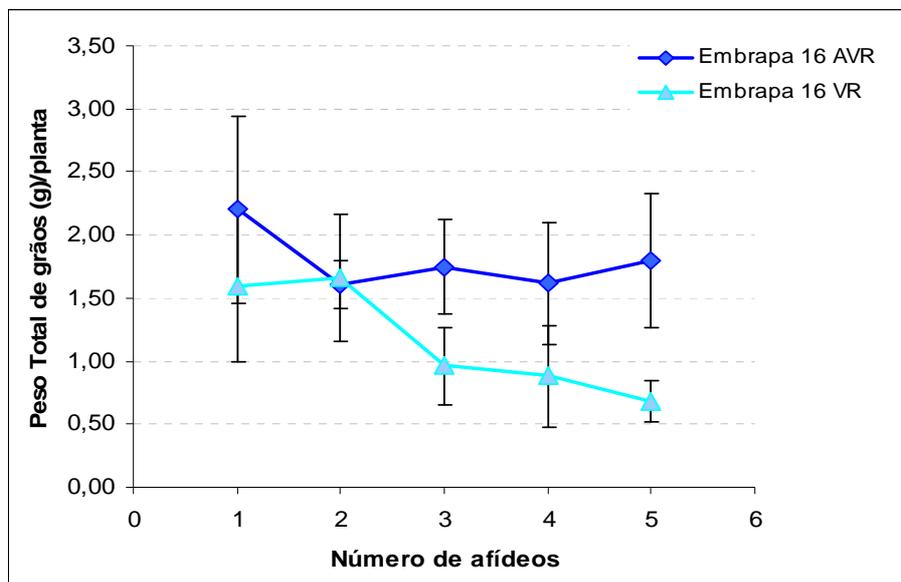


Figura 14 – Número de afídeos em relação ao peso total de grãos na cultivar Embrapa 16 comparando plantas avirulíferos com virulíferos.

As equações que representam a relação entre o número de afídeos e o peso total de grãos para afídeos avirulíferos e virulíferos na cultivar Embrapa 16 mostram a tendência de diminuição no peso total de grãos, quando as plantas foram expostas aos pulgões virulíferos, que é acentuada conforme aumenta a pressão de inóculo (Figura 14).

Na cultivar BRS Timbaúva (Figura 15) observa-se, da mesma forma, redução do peso total de grãos por planta conforme o aumento do número de afídeos virulíferos. De forma geral as perdas observadas para Embrapa 16 são superiores as observadas para BRS Timbaúva, fato que se torna mais evidente quando apenas 1 afídeo foi utilizado na inoculação (Figura 15).

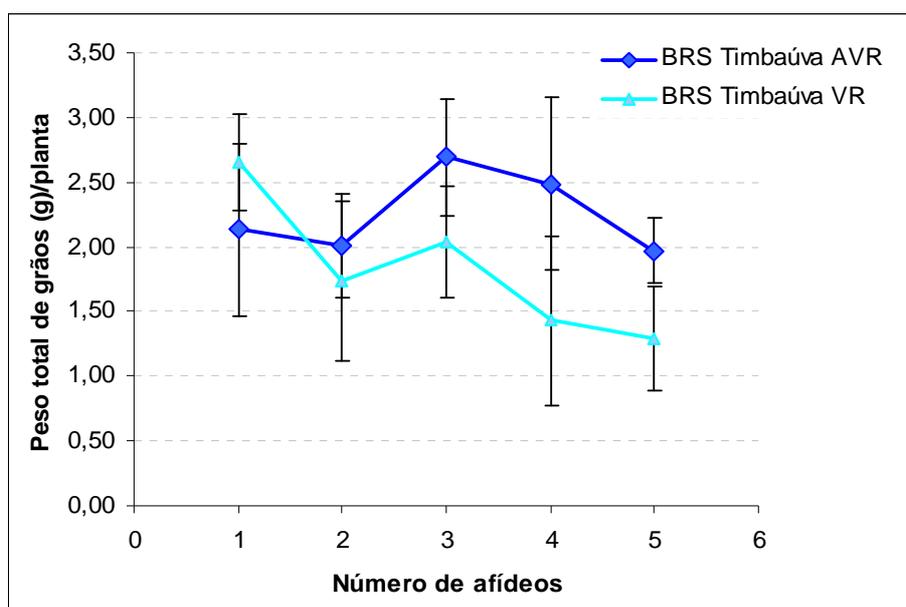


Figura 15 – Número de afídeos em relação ao peso total de grãos na cultivar BRS Timbaúva comparando plantas avirulíferas com virulíferas.

As cultivares em estudo não diferiram estatisticamente entre si, mas biologicamente, através da curva é possível observar os danos crescentes de acordo com o número de afídeos utilizados na transmissão, embora a linha de tendência apresentada na Figura 16 não evidencie essa diferença.

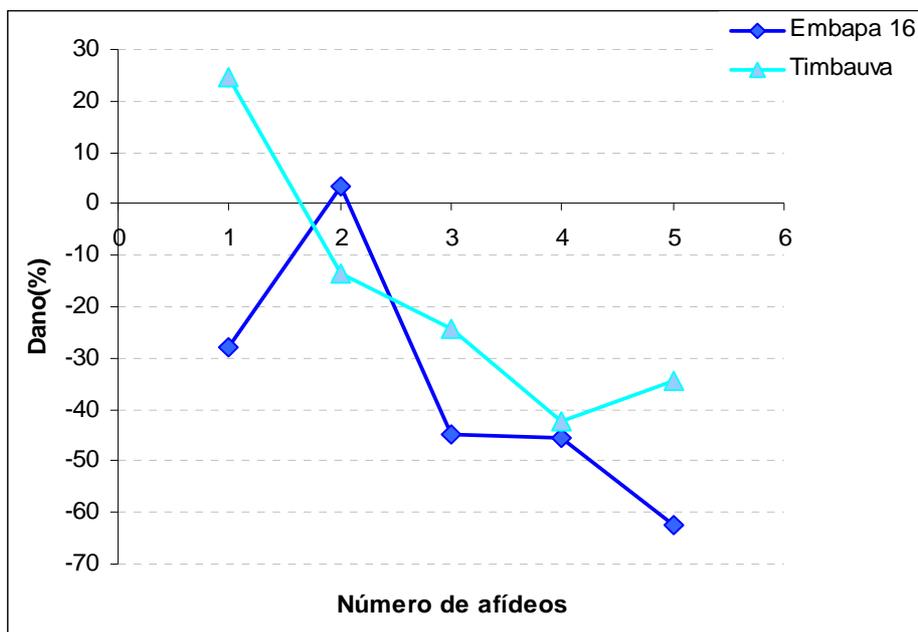


Figura 16 – Redução no rendimento de grãos para as cultivares de trigo Embapa 16 e BRS Timbaúva inoculadas com BYDV-PAV, utilizando-se de 1 a 5 afídeos.

5 CONCLUSÕES

Para as condições em que foram conduzidos, considerando BYDV-PAV transmitido por *R. padi* e as duas cultivares de trigo avaliadas, Embrapa 16 e BRS Timbaúva, os experimentos permitem concluir que:

a) a produtividade de BRS Timbaúva acima da média em ensaios com exposição ao BYDV tem relação com a resistência ao vetor, não havendo evidências claras de resistência ao vírus;

b) o efeito da resistência ao vetor se manifesta através da menor frequência de plantas soropositivas em testes com diferentes números de afídeos, fato não detectável na cultivar suscetível Embrapa 16;

c) plantas de trigo da cultivar BRS Timbaúva apresentam curva de título viral atrasada em relação a cultivar suscetível (Embrapa 16), em função do comportamento do vetor;

d) ressalvadas as diferenças no inóculo inicial, uma vez que o vírus foi introduzido nos tecidos da planta, se multiplica e se movimenta de forma comparável ao observado no material suscetível;

e) a possibilidade de BRS Timbaúva apresentar tolerância ao BYDV-PAV, não pode ser inteiramente descartada, pois as perdas em relação ao controle (afídeos avirulíferos) sempre foram inferiores quando comparadas à Embrapa 16.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALTENBERGER, D. E.; OHM, H. W.; FOSTER, J. E. **Reactions of oat, barley, and wheat to infection with Barley yellow dwarf isolates.** *Crop Science*, Madison, v. 27, p. 195-198, 1987.

BARBIERI, R. L. **Genética da tolerância em trigo ao vírus do nanismo-amarelo-da-cevada (barley yellow dwarf virus - BYDV).** Porto Alegre : UFRGS, 1999. 122 p. Tese de Doutorado.

BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA-NETO, J.F.; CAETANO, V.R.; MARCHIORO, V.S.; AZEVEDO, R.; LORENCETTI, C. **Análise dialélica para tolerância ao vírus donanismo-amarelo-da-cevada em cultivares brasileiras de trigo.** *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 36, n. 1, p. 131-135, 2001.

BIANCHIN, V. **Ocorrência do Barley yellow dwarf virus e Cereal yellow dwarf virus, transmissibilidade do BYDV-PAV pelo pulgão *Rhopalosiphum padi* e reação de cultivares de trigo ao complexo Vírus/Vetor.** 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária – Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2008.

BISOTTO, V. Algumas considerações sobre a cultura de trigo. In: *Indicações Técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo*. Cruz Alta, RS: FUNDACEP, 2005. p. 11-45.

BURNETTt, P. A., **What is barley yellow dwarf .** In World perspectives on barley yellow dwarf virus. Proc. Int. Workshop, 6– 11 July, Udine, Italy. *Edited by* P.A. Burnett. pp. IX–X. 1987.

BURNETT, P. A.; COMEAU, A.; QUALSET, C. O. Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf. In: *BARLEY yellow dwarf: 40 years of progress*. St. Paul : APS, 1995. p. 321-343.

CAETANO, V.R. **Estudo sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada, em trigo, no Rio Grande do Sul.** 1972. Tese (Doutorado em

Agronomia) Piracicaba: Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, 1972. 75p.

CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal General Virology**, Reading, v.34, p.475-483, 1977.

COLOMBO, C. R. Efeito do tratamento de sementes com o inseticida imidacloprid sobre a virose do nanismo amarelo da cevada em aveia. 2002. Dissertação (mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2002.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre: SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004.

CONAB. **Central de informações agropecuárias**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>>. Acesso em: 14 out. 2008.

COOPER, J.I.; JONES, A.T. Responses of plants to viruses: proposals for use of terms. *Phytopathology*, v. 73, p. 127-128, 1983.

DEDRYVER, C.A.; RIAULT, G.; TANGUY, S.; LE GALLIC, J. F.; TROTTE, M.; JACQUOT, E. Intra-specific variation and inheritance of BYDV-PAV transmission in the aphid *Sitobion avenae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.111, p.341-354, 2005.

FARGETTE, D.; LISTER, R.M.; HOOD, E.L. Grasses as a reservoir of Barley yellow dwarf virus in Indiana. *Plant Disease*, v. 66, n. 11, p. 1041-1045, 1982.

FILICHKIN, S. A., LISTER, R. M., MCGRATH, P. F., and YOUNG, M. J. (1997). *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic Sym1 chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J. Virol.* 71, 569±577.

GASSEN, D. N. Insetos associados à cultura do trigo no Brasil. Passo Fundo: Embrapa- CNPT, 1984. 39p. (Circular Técnica, 3).

GILDOW, F. E. and ROCHOW, W. F. Barley yellow dwarf in California: Vectors competence and luteovirus identification. **Plant Dis.** v. 67, p 140-143. 1983.

GOMES, M.F.R.; SALVADORI, J.R.; SCHONS, J. Danos de *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemíptera: Aphididae) no trigo em função da duração e da densidade de infestação. *Neotropical Entomology*, v. 37, n. 5, 2008.

HESLER, L.S.; RIEDELL, W.E.; KIECKHEFER, R.W.; HALEY, S.D.; COLLINS, R.D. Resistance to *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in wheat germplasm accessions. **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.1234-1238, 1999.

HESLER, L.S.; RIEDELL, W.E.; KIECKHEFER, R.W.; HALEY, S.D. Responses of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) on cereal aphid-resistant wheat accessions. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v.19, p.133-140, 2002.

HESLER, L.S. Resistance to *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) in three triticales accessions. **Journal of Economic Entomology**, v.98, p.603-610, 2005.

HESLER, L.S.; THARP, C. Antibiosis and antixenosis to *Rhopalosiphum padi* among triticales accessions. **Euphytica**, v.143, p.153-160, 2005.

JENSEN, S.G. Composition and metabolism of barley leaves infected with Barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, v. 59, p. 1694-1698, 1969.

JONES, S.S.; MURRAY, T.D.; ALLAN, R.E. Use of alien genes for the development of disease resistance in wheat. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.429-443, 1995.

KANG, B-C.; YEAM, I.; JAHN, M.M. Genetics of Plant Virus Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.581-621, 2005.

LARGE, E.C. Growth stages in cereals. Illustration of Feekes scale. *Plant Pathology*, London, v. 3, p. 128-129, 1954.

LISTER, R.M.; RANIERI, R. Distribution and economic importance of *Barley yellow dwarf*. In: D'ARCY, C.J.; BURNETT, P.A. (Ed.). *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*. St Paul: American Phytopathology Society, 1995. p.55-74.

MARTIN, R.R.; D'ARCY, C. **Taxonomy of Barley yellow dwarf viroses**. In: D'ARCY, C. J. and BURNETT, P. A. *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*. The American Phytopathological Society. Minnesota-USA, 1995. p. 203-214.

MILLER, W. A.; RASOCHOVÁ, L. Barley yellow dwarf viruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 167-190, 1997.

NICOLINI-TEIXEIRA, F.; SCHONS, J.; COLOMBO, C.R.; SOUZA, R. **Avaliação de Barley yellow dwarf virus em genótipos de aveia**. *Revista Brasileira Agrociência*, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 423-427, 2006.

PAINTER, R. H. *Insect resistance in crop plants*. New York: Mac Millan, 1968. 520p.

PERUZZO, R.; SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R.V.S.; BERTOLLO, E. C. **Resposta de cultivares de trigo à infestação do pulgão *Rhopalosiphum padi***. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.42, n.12, p.1681-1685, 2007.

POWER, A.G.; GRAY, S.M. **Aphid Transmission of Barley Yellow Dwarf Viruses: Interactions between viruses, vectors, and host plants**. In: D'ARCY, C. J. and BURNETT, P. A. *Barley yellow dwarf: 40 years of progress*. The American Phytopathological Society. Minnesota-USA, 1995. p. 259-289.

RANIERI, R.; LISTER, R.M.; BURNETT, P.A. **Relationships between Barley yellow dwarf virus titer and symptom expression in barley**. *Crop Science*, v. 33, p. 968-973, 1993.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO, 37., 2005, Cruz Alta. **Indicações técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo: trigo e triticales - 2005.** Cruz Alta: Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2005. 162p.

REUNIÃO DA COMISSÃO SUL E CENTRO-SUL BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO E TRITICALE. Informações técnicas para a safra 2007. Embrapa Trigo. Passo Fundo, 2007. (Embra Trigo. Documentos 71).

ROCHOW, W.F. Biological properties of four isolates of *Barley yellow dwarf virus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, p.1580-1589, 1969.

ROSA, O. S.; TONET, G. E. L. Melhoramento genético de trigo para resistência ao pulgão *Schizaphis graminum*. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. **Resultados de pesquisa do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo apresentados na XIV Reunião Nacional de Pesquisa de Trigo.** Passo Fundo, 1986. p. 187-188. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 8).

SALVADORI, J. R. Pragas da lavoura de trigo. In: CUNHA, G.R.; BACALTCHUK, B. (Org.). **Tecnologia para produzir trigo no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Assembléia Legislativa do Rio Grande do Sul, Comissão de Agricultura, Pecuária e Cooperativismo; Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. p.267-287. (Série Culturas, 2).

SALVADORI, J.R.; TONET, G.L. **Manejo integrado dos pulgões do trigo.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. (Embrapa Trigo. Documentos, 34).

SALVADORI, J.R.; SALLES, L.A.B. de. Controle biológico dos pulgões do trigo. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊAFERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Org.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo: Manole, 2002. p.427- 447.

SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.V.; SILVA, M.T.B. Manejo de pulgões. **Revista Cultivar**, v.75, p.32-34, 2005.

SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.V.; VOSS, M. Controle biológico de pragas do trigo. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. (Org.). **Controle biológico de pragas**. Piracicaba: CP 2, 2006.

SÍP, V.; SIRLOVÁ, L.; CHRPOVÁ, J. Screening for *Barley yellow dwarf virus*-Resistant Barley Genotypes by Assessment of Virus Contet in Inoculation Seedlings. January 27, 2006.

SCHONS, J.; DALBOSCO, M. Identificação das estirpes do vírus do nanismo amarelo da cevada. In: XXXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, Curitiba. Revista Brasileira de Fitopatologia. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. v.24, p. 359. 1999.

SILVA, M.T.B.; COSTA, E.C.; BALARDIN, R.S. Cultivars reaction and efficiency of chemical control of aphids vectors of *Barley yellow dwarf virus* in wheat. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 5, 2004.

SINGH, R. P.; BURNETT, P. A.; ALBARRÁN, M.; RAJARAM, S. BDV 1: a gene for tolerance to barley yellow dwarf virus in bread wheats. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 231-234, 1993.

TANGUY, S & DEDRYVER C. A. Reduced BYDV-PAV transmission by the grain aphid in a *Triticum monococcum* line. *Eur J Plant Pathol* v. 123, p. 281- 289, 2009.

VANCE, V.; VAUCHERET, H. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. **Science**, v.292, p.2277-2280, 2001.

Van REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R. B. **Virus Taxonomy- Seventh report of the Internacional Committee on Taxonomy of viruses**. Academic Press. New York. 2000. 1162p.

Van REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M. ; BISHOP, D. H.L. et al. Luteoviridae. In: Van REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L. et al. (Eds.) **Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**. San Diego: Academic

Press, 2000. p.775-784. (Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of viruses).

ZHANG, Z.-Y.; XU, J.-S.; XU, Q.-J.; LARKIN, P.; XIN, Z.-Y. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene *Bdv2* useful in wheat for marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 109, p. 433-439, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

Tampão de Extração (EXTRACTION BUFERR - dissolvido em 1000 mL de PBST (1x))

Sulfito de sódio	1,3 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP) MW 24 – 40,000	20,0 g
Azida sódica	0,2 g
Albumina (POWDERED EGG – Chicken)	2,0 g
Tween 20	20,0 g
Ph ajustado para	7,4

ANEXO 2

Tampão de cobertura ou tampão de revestimento (COATING BUFFER) – dissolvido em 1000 mL de água destilada

Carbonato de sódio	1,59 g
Bicarbonato de sódio	2,95 g
Azida sódica	0,2 g
pH ajustado para	9,6

ANEXO 3

Tampão de lavagem (PBST) – dissolvido em 1000 mL de água destilada

Cloreto de sódio	8,0 g
Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	1,15 g
Fosfato de potássio, monobásico	0,2 g
Cloreto de potássio	0,2 g
Tween 20	0,5 g
pH ajustado para	7,4

ANEXO 4

Tampão para o conjugado ECI BUFFER – dissolvido em 1000 mL de
PBST

Soro albumina bovina (BSA)	2,0 g
Polyvinylpyrrolidona (PVP) MW 24 – 40,000	20,0 g
Azida sódica	0,2 g
pH ajustado para	7,4

ANEXO 5

Tampão para o substrato (PNP Buffer) – dissolvido em 800 mL de
água destilada

Cloreto de magnésio	0,1 g
Azida sódica	0,2 g
Dieta nolamina	97,0 mL
pH ajustado para (volume final para 1000 mL)	9,8