

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

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DO *Wheat***  
***streak mosaic virus* NO BRASIL**

**TALITA BERNARDON MAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2012

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

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DO *Wheat*  
*streak mosaic virus* NO BRASIL**

**TALITA BERNARDON MAR**

**Orientadora: Prof. Dra. Jurema Schons**  
**Coorientador: Dr. Douglas Lau**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, março de 2012



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



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

"Ocorrência e caracterização do *Wheat streak mosaic virus* no Brasil "

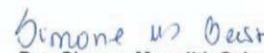
Elaborada por

TALITA BERNARDON MAR

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Agronomia – Área de Fitopatologia

Aprovada em: 23/03/2012  
Pela Comissão Examinadora

  
Dra. Jurema Schons  
Presidente da Comissão Examinadora  
Orientadora

  
Dra. Simone Meredith Scheffer Basso  
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia

  
Dr. Douglas Lau  
Embrapa Trigo  
Co-orientador

  
Dr. Hélio Carlos Rocha  
Diretor FAMV

  
Dr. Paulo Roberto Valle da Silva Pereira  
Embrapa Trigo

  
Dr. Márcio Martinello Sanches  
Embrapa - Cenargen

CIP – Catalogação na Publicação

---

- M298o Mar, Talita Bernardon  
Ocorrência e caracterização do wheat streak mosaic virus no Brasil / Talita Bernardon Mar. – 2012.  
113 f. : il. color. ; 25 cm.
- Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2012.  
Orientadora: Prof. Dra. Jurema Schons.  
Coorientador: Dr. Douglas Lau.
1. Fitopatologia. 2. Trigo – Doenças e pragas. 3. Wheat streak mosaic disease – Brasil. 4. Eriophyidae. I. Schons, Jurema, orientadora. II. Lau, Douglas, coorientador. III. Título.

CDU: 633.11

---

Catalogação: Bibliotecária Daniele Rosa Monteiro- CRB 10/2091

**Dedico este trabalho aos meus pais, sem os quais minhas conquistas jamais seriam especiais.**

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho só é desenvolvido com a colaboração de muitas pessoas. A todas elas meu sincero agradecimento.

A toda a minha família pelo incentivo e compreensão.

À Dra. Jurema Schons pela orientação, amizade, carinho e incentivo.

Ao Dr. Douglas Lau pela co-orientação e ensinamentos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Passo Fundo pela dedicação e disponibilidade.

A todos os funcionários e estagiários do núcleo de Entomologia e Biotecnologia da Embrapa Trigo pela ajuda, amizade e incentivo.

À Universidade de Passo Fundo pela oportunidade de realizar o curso.

À Capes pela concessão da bolsa.

À Embrapa Trigo pela infra-estrutura.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Transmissão.....	18
2.2 O vetor.....	18
2.3 Taxonomia.....	22
2.4 Gama de hospedeiros.....	27
2.5 Sintomas.....	29
2.6 Danos.....	31
2.7 Controle (manejo).....	33
2.8 Distribuição espaço temporal.....	33
2.9 Relações filogenéticas.....	36
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
3.1 Local de execução.....	40
3.2 Coletas.....	40
3.3 Detecção sorológica.....	42
3.4 Detecção biológica.....	43
3.5 Detecção e caracterização molecular.....	43
3.5.1 Extração de RNA.....	44
3.5.2 Amplificação de seqüências virais por meio de RT-PCR..	45
3.5.3 Clonagem.....	48
3.5.4 Extração de plasmídeos para confirmação dos clones.....	49
3.5.5 Estocagem em glicerol.....	50
3.5.6 Extração de plasmídeos para sequenciamento.....	51
3.5.7 Determinação do padrão de restrição com HinfI.....	52
3.5.8 Sequenciamento.....	53
3.5.9 Análise das sequencias.....	54
3.6 Determinação da gama de hospedeiros.....	55
<b>4 RESULTADOS</b> .....	57
4.1 Detecção sorológica.....	57
4.2 Detecção biológica.....	57
4.3 Detecção molecular.....	59
4.4 Análise filogenética.....	64
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	78
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
<b>APÊNDICES</b> .....	107

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Municípios de ocorrência e ano de detecção do ácaro <i>Aceria tosichella</i> no Brasil. ....	22
2	Oligonucleotídeos utilizados para detecção do WSMV .....	46
3	Isolados de <i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV) utilizados na comparação das sequencias .....	55
4	Amostras submetidas a detecção de WSMV por meio de RT-PCR e que foram positivas para pelo menos uma região alvo. ....	60
5	Comparação entre as sequencias de nucleotídeos dos isolados brasileiros seqüenciados e o isolado Arg2 (FJ348359) da Argentina .....	65
6	Análise de similaridade da sequencia de nucleotídeos da proteína capsidial (COOH-terminal da poliproteína) dos isolados brasileiros. ....	66
7	Tipo e frequência de sintomas por hospedeiros inoculados com dois isolados de WSMV .....	71



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1	Localidades de ocorrência do ácaro <i>Aceria tosichella</i> no Brasil. Pontos numerados conforme Tabela 1..... 21
2	Partícula viral e organização genômica dos vírus pertencentes à família <i>Potyviridae</i> . Representação diagramática do RNA genômico com uma ORF que codifica a poliproteína. Na extremidade 5' localiza-se a proteína VPg e na extremidade 3' a cauda poli A. Sítios de clivagem que dão origem as proteínas maduras representados por triângulos. Fonte: <a href="http://expasy.org/viralzone/all_by_species/48.html">http://expasy.org/viralzone/all_by_species/48.html</a> > ..... 23
3	Mosaico causado pelo <i>Wheat streak mosaic virus</i> em trigo..... 30
4	Relações filogenéticas entre isolados de <i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV) estabelecida por comparação de nucleotídeos da região da proteína capsidial (CP). Reproduzido de: STENGER & FRENCH, 2009..... 38
5	Municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul amostrados entre 2009 e 2011. O diâmetro de cada ponto é proporcional ao número de coletas realizadas em cada município durante os três anos de pesquisa. .... 41
6	Representação diagramática do genoma do WSMV com a localização das sequencias amplificadas pelos conjuntos de oligonucleotídeos. .... 47
7	Detecção biológica de WSMV por inoculação via extrato vegetal tamponado em plantas de trigo (cv. BRS Guabiju). A. Apresentação geral de um ensaio. B. Sintomas iniciais exibidos nas folhas jovens. C. Sintomas aos 15 dpi. .... 58
8	Perfil eletroforético, dos fragmentos amplificados correspondentes ao gene da actina. Marcador 100pb. 13 amostras testadas, controle negativo e positivo..... 59

- 9 Perfil eletroforético, em gel de agarose 1,5%, dos fragmentos de (A) 948pb amplificados com os oligonucleotídeos WSMV R/F e (B) 198pb com WSMV L2/R2. Marcador 100pb. Isolados testados, amostra de trigo sadia e controle negativo (c-). ..... 62
- 10 Análise de restrição com a enzima *HinfI* dos fragmentos de 948pb amplificados com os primers WSMV R / WSMV F, das amostras 915 e 1244. .... 63
- 11 Árvore filogenética construída para sequência de nucleotídeos de um fragmento da região COOH-terminal da poliproteína, onde está codificada a proteína capsial, de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. São isolados oriundos do Brasil: 486, 912, 915 e 1256 coletados em casa de vegetação e 1233 coletado no municípios de São Luiz Gonzaga, 1241 em Jóia, 1254 e 913 em Passo Fundo. .... 67
- 12 Árvore filogenética construída para sequência de nucleotídeos de um fragmento do gene VPg-N1a de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. 912 e 913 são isolados oriundos de Passo Fundo – RS (Brasil). .... 69
- 13 Árvore filogenética construída para a sequência de aminoácidos da região COOH-terminal da poliproteína (CP) de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. São isolados

	brasileiros: 486, 912, 915 e 1256 coletados em casa de vegetação e 1233 coletado no municípios de São Luiz Gonzaga, 1241 em Jóia, 1254 e 913 em Passo Fundo. ....	70
14	Sintomas causados por WSMV nas espécies testadas na determinação da gama de hospedeiros. Controle (A) e inoculada (B). ....	74
15	Comparação entre os sintomas induzidos pelo isolado 915 nas folhas de triticales. Mosaico na cv. BRS Saturno (A) e lesões necróticas na cv. BRS Ulisses (B). ....	75
16	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% das espécies testadas na determinação da gama de hospedeiros inoculadas com os isolados 915, 1256 e controle negativo não inoculado. Ordem do gel: Marcador 100 pb, <i>Chenopodium amaranticolor</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , aveia preta ( <i>Avena strigosa</i> ), cevada ( <i>Hordeum vulgare</i> ), milho ( <i>Zea mays</i> ), trigo ( <i>Triticum aestivum</i> cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva) centeio ( <i>Secale cereale</i> cv. BRS Serrano), triticales ( $\times$ <i>Triticosecale</i> cv. BRS Saturno e BRS Ulisses), controle negativo da reação e marcador 1 Kb. ....	76
17	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% do fragmento de 948pb amplificado de trigo (cv. BRS Guabiju) re-inoculado a partir das plantas inoculadas com o isolado 915 na determinação da gama de hospedeiros. Ordem do gel: Chen. <i>C. amaranticolor</i> ; Trigo-. trigo controle negativo; Aveia; Cev. cevada; Milho; T. em. trigo cv. Embrapa 16; T. gua. trigo cv. BRS Guabiju; T.Tim. trigo cv. BRS Timbaúva; Cent. centeio; T. Sat. triticales cv. BRS Saturno; T. Ulis. triticales cv. BRS Ulisses e c-. controle negativo da reação. ....	77

## OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DO *Wheat streak mosaic virus* NO BRASIL

TALITA BERNARDON MAR<sup>1</sup>

**RESUMO** – O *Wheat streak mosaic virus* (WSMV - *Potyviridae*, *Tritimovirus*) é transmitido pelo ácaro *Aceria tosichella* Keifer (Acaria: Eriophyidae). O complexo vírus-vetor está amplamente distribuído em importantes regiões agrícolas do mundo causando impacto principalmente na cultura do trigo. Na América do Sul, o WSMV teve sua primeira detecção na Argentina em 2002, e em 2004 o vetor *A. tosichella* foi encontrado associado a plantas infectadas. O vetor também foi detectado no Brasil em 2006 e no Uruguai em 2007. Desde o primeiro registro no Brasil até 2011, a ocorrência do *A. tosichella* foi confirmada em 18 municípios da região norte e noroeste do Rio Grande do Sul e em um município no oeste de Santa Catarina. Considerando a ampliação da área de ocorrência do vetor e a presença do vírus na Argentina, a ocorrência do WSMV no Brasil foi investigada. Entre 2009 e 2011, foram coletadas 959 amostras de gramíneas nas regiões produtoras de trigo do Rio Grande do Sul (57,2%), Santa Catarina (5,2%), Paraná (32,5%) e Mato Grosso do Sul (5,1%) totalizando 451 pontos amostrados em 93 municípios. Do conjunto total de amostras, subconjuntos foram submetidos a diferentes estratégias de detecção:

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda do programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Fitopatologia.

sorológica, biológica e molecular e os isolados de WSMV foram caracterizados por métodos moleculares e biológicos. O diagnóstico sorológico para as amostras oriundas de campo foi inconclusivo. No diagnóstico biológico, apenas a partir das amostras oriundas de casa de vegetação foi possível reproduzir sintomas. Em testes moleculares (RT-PCR) para 96 amostras, foi possível amplificação positiva para 25 amostras de trigo com sintomas de mosaico. Através da sequência de nucleotídeos da região da proteína capsidial e VPg-NIa foi possível identificar quatro isolados de WSMV oriundos de casa de vegetação (486, 912, 915 e 1256) e quatro isolados de amostras de campo coletadas no municípios de São Luiz Gonzaga (1233), Jóia (1241) e Passo Fundo (1254 e 913), confirmando a presença do WSMV em regiões produtoras de trigo no Brasil. Os isolados brasileiros pertencem ao clado D e estão intimamente relacionados ao isolado Argentino Arg2 (FJ348359). Causam mosaico no trigo (*Triticum aestivum* cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva), cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale* cv. BRS Serrano), triticale ( $\times$  *Triticosecale* cv. BRS Saturno e BRS Ulisses) e milho (*Zea mays*) e são capazes de infectar a aveia (*Avena strigosa*).

**Palavras-chave:** *Aceria tosichella*, *Triticum aestivum*, WSMV.

## OCCURRENCE AND CHARACTERIZATION OF *Wheat streak mosaic virus* IN BRAZIL

**ABSTRACT** - The *Wheat streak mosaic virus* (WSMV - *Potyviridae*, *Tritimovirus*) is transmitted by the eriophyid mite *Aceria tosichella* Keifer (Acaria: Eriophyidae). Currently, the complex (virus and vector) is widely distributed in important agricultural regions of the world impacting mainly wheat growing. In South America, the WSMV was first detected in Argentina in 2002 and in 2004 the vector *A. tosichella* was found associated with infected plants. The vector was also detected in Brazil in 2006 and Uruguay in 2007. Since that first report in Brazil until 2011, the occurrence of *A. tosichella* has been confirmed in 18 northern and northwestern municipalities in the state of Rio Grande do Sul and one in the western part of Santa Catarina. Due to the expansion of the vector's occurrence area and the presence of the virus in Argentina, the occurrence of WSMV in Brazil was investigated. Between 2009 and 2011, 959 grasses samples were collected in wheat producing areas of Rio Grande do Sul (57,2%), Santa Catarina (5,2%), Paraná (32,5%) and Mato Grosso do Sul (5,1%), total of 451 sampling points in 93 municipalities. Of the total set of samples, subsets were submitted to different strategies for virus detection: molecular and biological. The WSMV isolates were characterized by biological and molecular methods. The serological diagnosis for field samples was inconclusive. In the biological diagnosis, only greenhouse samples were able to reproduce symptoms. In molecular tests (RT-PCR) for 96 samples, positive amplification for

25 samples of wheat mosaic was possible. Through the sequence of nucleotides of the coat protein and VPg-NIa region was possible to identify four WSMV isolates from greenhouse (486, 912, 915 and 1256) and four isolates from field samples collected in the municipalities of São Luiz Gonzaga (1233), Jóia (1241) and Passo Fundo (1254 and 913), confirming the presence of WSMV in wheat growing regions of Brazil. The sequences of Brazilian isolates clustered in clade D are closely related to the Argentine isolate Arg2 (FJ348359). It causes mosaic in wheat (*Triticum aestivum* cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva), barley (*Hordeum vulgare*), rye (*Secale cereale* cv. BRS Serrano), triticale (× *Triticosecale* cv. BRS Saturno e BRS Ulisses) and maize (*Zea mays*). It was also able to infect oat (*Avena strigosa*).

**Key words:** *Aceria tosichella*, *Triticum aestivum*, WSMV.

## 1 INTRODUÇÃO

O *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) foi descrito em 1929 em áreas de cultivo de trigo em Kansas nos Estados Unidos (MCKINNEY, 1937). O vírus causa mosaico sistêmico, nanismo e necrose que afetam drasticamente o rendimento (SLYKHUIS, 1955; BRAKKE, 1971; COUTTS et al., 2008b), sendo considerado uma das doenças virais mais importantes para o cultivo de trigo na América do Norte, Europa, Oceania e Oriente Médio (MAHMOOD et al., 1998; NAVIA et al., 2006).

A grande importância econômica do WSMV resulta dos efeitos sobre a produção das plantas infectadas e da eficiente transmissão, por meio do ácaro eriofídeo *Aceria tosichella*, embora também possa ocorrer por sementes em pequenas porcentagens (SLYKHUIS, 1955; HILL et al., 1974; JONES et al., 2005; DWYER et al., 2007; LANOISELET et al., 2008). Os prejuízos causados pelo WSMV em áreas de produção de trigo nos Estados Unidos e Canadá têm sido significativos, já foram descritas perdas de até 100% quando a infecção ocorre no outono (SIM et al., 1988; HUNGER et al., 1992; CHRISTIAN & WILLIS, 1993; MCNEIL et al., 1996; MASUMI et al., 2001; FRENCH & STENGER, 2003; DWYER et al., 2007). A virose pode ocorrer também em milho, aveia, cevada e outras gramíneas (OLDFIELD, 1970; OLDFIELD & PROESELER, 1996).

Diferentes estirpes de WSMV ocorrem nos Estados Unidos, México e Eurásia (BRAKKE, 1971; MCNEIL et al., 1996; CHOI et al., 2001; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; STENGER et al., 2002) e recentemente isolados similares aos encontrados na região



Noroeste Pacífico Americana (APNW – “*American Pacific Northwest*”) foram detectados no hemisfério sul (ELLIS et al., 2003a,b; ELLIS et al., 2004; TRUOL et al., 2004; DWYER et al., 2007; STENGER & FRENCH, 2009).

Até dez anos atrás o complexo *A. tosichella* e WSMV não havia sido encontrado na América do Sul, sendo considerado, até então, praga quarentenária. Entretanto, em 2002, foi relatada a presença do WSMV na área central da província de Córdoba na Argentina (TRUOL et al., 2004) e, em 2004 o vetor *A. tosichella* foi detectado associado a plantas infectadas pelo WSMV (NAVIA et al., 2006).

Em 2006, *A. tosichella* foi encontrado no Brasil infestando lavouras de trigo em quatro municípios da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul (PEREIRA et al., 2009) e em 2007 a presença do vetor foi relatada no Uruguai (CASTIGLIONI & NAVIA, 2010). A presença do ácaro na Argentina, Uruguai e Brasil e a ocorrência da virose na Argentina indicam um elevado risco de disseminação do complexo na América do Sul.

O potencial de expansão de *A. tosichella* no Brasil e, por consequência a introdução dos vírus transmitidos, vem se confirmando. Desde a primeira detecção do ácaro vetor, até 2011, a ocorrência de *A. tosichella* foi confirmada em 18 municípios da região norte e noroeste do Rio Grande do Sul e em um município no oeste de Santa Catarina em 11 hospedeiros diferentes (PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012).

Considerando a importância econômica do WSMV, ampliação da área de ocorrência do vetor no Brasil e a presença do

vírus em país vizinho, propôs-se o presente trabalho objetivando investigar a ocorrência do WSMV no Brasil e caracterizar a população viral por métodos moleculares e biológicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O *Wheat streak mosaic virus* (WSMV- *Potyviridae*, *Tritimovirus*) foi descrito em 1929 em áreas de cultivo de trigo em Kansas nos Estados Unidos (MCKINNEY, 1937). O vírus é transmitido pelo ácaro *Aceria tosichella* Keifer (Acaria: Eriophyidae) (SLYKHUIS, 1955; OLDFIELD, 1970; SLYKHUIS, 1976; OLDFIELD & PROESELER, 1996) e infecta várias espécies da família Poaceae (OLDFIELD & PROESELER, 1996) causando mosaico sistêmico, nanismo e necrose que afetam drasticamente o rendimento (SLYKHUIS, 1955; BRAKKE, 1971; COUTTS et al., 2008b) de culturas como trigo, milho, aveia, cevada e outras gramíneas de importância econômica (OLDFIELD & PROESELER, 1996; OLDFIELD, 1970).

O complexo vírus-vetor está amplamente distribuído em regiões agrícolas do mundo e diferentes estirpes do vírus ocorrem nos Estados Unidos, México e Eurásia (BRAKKE, 1971; CHOI et al., 2001; MCNEIL et al., 1996; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; STENGER et al., 2002). Recentemente o WSMV foi detectado no hemisfério sul, primeiramente na Austrália (ELLIS et al., 2003a,b; ELLIS et al., 2004) e na América do Sul, em 2002, na Argentina (TRUOL et al., 2004). No Brasil, a presença do ácaro vetor *A. tosichella* foi relatada em 2006 (PEREIRA et al., 2009) e, até 2011, a ocorrência do vetor foi confirmada em 18 municípios da região norte e noroeste do Rio Grande do Sul e em um município no oeste de Santa Catarina (PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012).

## 2.1 Transmissão

A transmissão do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) ocorre principalmente por meio do ácaro *A. tosichella*, de maneira circulativa e não-propagativa (SLYKHUIS, 1955; OLDFIELD, 1970; SLYKHUIS, 1976; OLDFIELD & PROESELER, 1996). O vírus é adquirido apenas na fase de ninfa e pode ser transmitido por ninfas e adultos, reduzindo a eficiência conforme a idade do adulto (SLYKHUIS, 1955; DEL ROSARIO & SILL, 1965). Após alimentar-se de plantas infectadas, o vetor permanece virulífero por, pelo menos, 21 dias (DEL ROSARIO & SILL, 1965). O WSMV também pode ser transmitido via semente em pequenas porcentagens 0,1 a 0,2% em trigo (JONES et al., 2005; DWYER et al., 2007; LANOISELET et al., 2008) e em milho em porcentagens ainda menores (HILL et al., 1974).

## 2.2 O vetor

*Aceria tosichella* (Acari, Eriophyidae), também conhecido como ácaro do enrolamento do trigo, foi descrito na Iugoslávia em 1969 ocorrendo em trigo (KEIFER, 1969). Anteriormente o vetor era classificado como *Aceria tulipae* que tinha como hospedeiros o trigo, a cebola, o alho e a tulipa (SLYKHUIS, 1955). Posteriormente foi demonstrado que as espécies que ocorriam nos bulbos eram diferentes das espécies encontradas em trigo (SHEVTCHENKO et al., 1970; FROST & RIDLAND, 1996).

O ácaro pode ser encontrado em várias espécies de gramíneas, principalmente trigo (*Triticum aestivum* L.). Também pode ser encontrado em centeio (*Secale cereale* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), aveia (*Avena sativa* L.), milheto (*Pennisetum americanum*

(L.) Leeke) (SLYKHUIS, 1955; CONNIN, 1956; OLDFIELD, 1970; SOMSEN & SILL, 1970), milho (*Zea mays* L.) (JEPPSON et al., 1975) e gramíneas sem importância econômica como: *Aegilops cylindrica* Host., *Agropyron repens* (L.) Beauv., *Agropyron smithii* Rydb., *Bouteloua hirsuta* Lag., *Bromus japonicus* Thunb. ex Murray, *Bromus tectorum* L., *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm., *Cenchrus pauciflorus* Benth., *Cynodon dactylon* (L.) Pers., *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Digitaria ischaemum* (Schreb.) Muhl., *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv., *Elymus canadensis* L., *Elymus virginicus* L., *Eragrostis cilianensis* (All.) Vignolo ex Janch, *Hordeum pusillum* Nutt., *Oryzopsis hymenoides* (Roem. & Schult.), *Panicum capillare* L., *Poa compressa* L., *Setaria lutescens* (Weigel ex Stuntz) Hubb., *Setaria viridis* (L.) Beauv. e entre outras (SILL & CONNIN, 1953; CONNIN, 1956; DEL ROSARIO & SILL, 1965; SOMSEN & SILL, 1970; OLDFIELD, 1970). Em casa de vegetação se reproduz também em sorgo (*Sorghum* sp.) (SLYKHUIS, 1955; CONNIN, 1956; OLDFIELD, 1970; SOMSEN & SILL, 1970).

Em grandes infestações o ácaro pode causar nanismo, manchas amarelas, enrolamento e arqueamento das folhas jovens que permanecem dentro das folhas mais velhas prejudicando o desenvolvimento da planta (SOMSEN & SILL, 1970; CHANDRAPATYA, 1986; HARVEY et al., 2002). No milho, a saliva tóxica do ácaro pode induzir a expressão de pigmentação vermelha (NAULT et al. 1967; LIU, 2005).

A presença do ácaro geralmente provoca poucos danos no campo. Em casos isolados, em grandes infestações, a sua alimentação pode reduzir a produção de grãos. Em plantações de trigo os prejuízos

podem chegar a 30% (HARVEY et al., 2002). A importância agrícola do *A. tosichella* deve-se, principalmente, a capacidade de transmitir viroses como o WSMV (OLDFIELD & PROESELER, 1996).

O vetor encontra-se distribuído nas principais regiões produtoras de trigo do mundo, América do Norte, Ásia (SMITH, 1972; SLYKHUIS, 1980), Europa, Índia, Jordânia, Nova Zelândia (OLDFIELD, 1970), África do Sul (MEYER, 1981), Austrália (ELLIS et al., 2003), dentre outros locais. Na América do Sul a primeira detecção do ácaro foi em 2004 na Argentina, encontrado em associação com plantas infectadas pelo WSMV (NAVIA et al., 2006). Em 2006, *A. tosichella* foi detectado no Brasil infestando lavouras de trigo em quatro municípios da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1 e Figura 1): Passo Fundo, Palmeira das Missões, São Luiz Gonzaga e Santo Antônio das Missões (PEREIRA et al., 2009). O vetor também foi encontrado no Uruguai em 2007 nas províncias de Colônia e Rio Negro, tendo trigo, azevém e *Bromus unioloides* Kunth como hospedeiros (CASTIGLIONI & NAVIA, 2010).

Desde a primeira detecção no Brasil até 2011 a ocorrência do ácaro foi confirmada em 18 municípios da região norte e noroeste do Rio Grande do Sul e um do oeste de Santa Catarina, ocorrendo em 11 hospedeiros diferentes: trigo (*Triticum aestivum* L.), aveia (*Avena sativa* L.), capim rabo de burro (*Andropogon bicornis* L.), papuã (*Brachiaria plantaginea* (Link) Hitchc.), braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf), capim rhodes (*Chloris polydactyla* (L.) Sw.), capim amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde.), milhã (*Digitaria horizontalis* Willd.), azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), pasto italiano

(*Pennisetum americanum* (L.) Leeke) e capim massambará (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) (PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012).

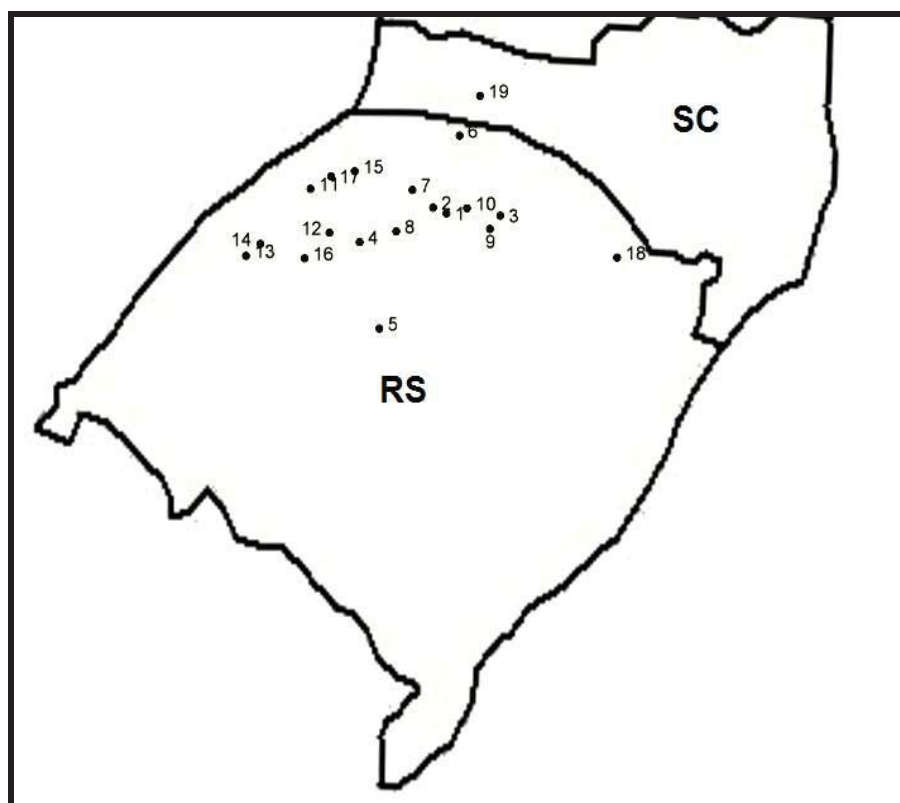


Figura 1 - Localidades de ocorrência do ácaro *Aceria tosichella* no Brasil. Pontos numerados conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Municípios de ocorrência e ano de detecção do ácaro *Aceria tosichella* no Brasil.

Município de ocorrência	Ano de detecção					
	2006 <sup>(1)</sup>	2007 <sup>(2)</sup>	2008 <sup>(2)</sup>	2009 <sup>(2;3)</sup>	2010 <sup>(3)</sup>	2011 <sup>(3)</sup>
1 Alm. Tamandaré do Sul			X	X		
2 Chapada			X			
3 Coxilha				X		
4 Ijuí				X		
5 Julio de Castilhos		X				
6 Nonoai				X		
7 Palmeira das Missões	X	X		X	X	
8 Panambi					X	
9 Passo Fundo	X	X				
10 Pontão					X	
11 Santa Rosa			X	X		X
12 Santo Angelo				X		
13 Sto. Antônio das Missões	X		X	X		
14 São Luiz Gonzaga	X	X	X	X		X
15 São Martinho			X			
16 São Miguel das Missões				X		X
17 Três de Maio			X	X		
18 Vacaria				X		
19 Xaxim				X		

<sup>(1)</sup>PEREIRA et al., 2009 <sup>(2)</sup>NAVIA, 2009 <sup>(3)</sup>LAU, 2012

### 2.3 Taxonomia

O WSMV apresenta genoma monopartido (CHOI et al., 2000), morfologia das partículas e estratégia de tradução típicas da família *Potyviridae* (Figura 2) (NIBLETT et al., 1991) e, foi inicialmente classificado como pertencente ao gênero *Rymovirus* (ZAGULA et al., 1992; SALM et al., 1996a) formando um subgrupo



juntamente com o *Brome streak mosaic virus* (BrSMV) (GÖTZ & MAISS, 1995a; 1995b; SALM et al., 1996b; HALL et al., 1998).

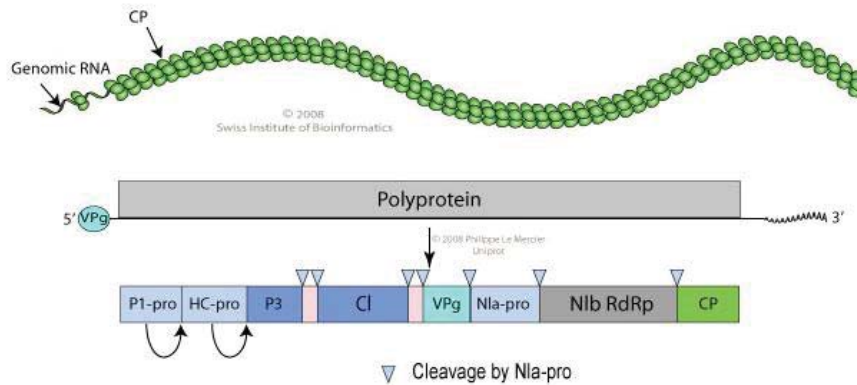


Figura 2 - Partícula viral e organização genômica dos vírus pertencentes à família *Potyviridae*. Representação diagramática do RNA genômico com uma ORF que codifica a poliproteína. Na extremidade 5' localiza-se a proteína VPg e na extremidade 3' a cauda poli A. Sítios de clivagem que dão origem as proteínas maduras representados por triângulos. Fonte: [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/48.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/48.html)

Atualmente WSMV é a espécie tipo do gênero *Tritimovirus* (família *Potyviridae*). Neste gênero também estão classificadas as espécies BrSMV (STENGER et al., 1998) e *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) (STENGER & FRENCH, 2004a), transmitidas pelo ácaro *Aceria tosichella* (CHOI et al. 1999; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; HALL et al., 2001a). Embora os

vírus pertencentes ao gênero *Rymovirus* também sejam transmitidos por ácaros eriofídeos, são filogeneticamente distintos dos *Tritimovirus* (SALM et al., 1996ab; STENGER et al., 1998).

As partículas do WSMV têm simetria helicoidal medindo  $63 \pm 5$  Å de raio (PARKER et al., 2005; MCDONALD et al., 2010), 700 nm de comprimento e 15 nm de diâmetro (BRAKKE, 1971; BRAKKE et al., 1987). O genoma apresenta uma proteína VPg ligada a região 5' terminal e possui cauda poli A na extremidade 3' (DOUGHERTY & CARRINGTON, 1988; REICHMANN et al., 1992; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001). É composto por 9.384 nucleotídeos de RNA fita simples de sentido positivo que são traduzidos em uma única poliproteína (Figura 2) processada por três proteinases gerando de 8 a 10 proteínas maduras (ALLISON et al., 1986; REICHMANN et al., 1992; DOUGHERTY & SEMLER, 1993; STENGER et al., 1998; URCUQUI-INCHIMA et al., 2001; ADAMS et al., 2005; CHUNG et al., 2008).

As principais proteínas derivadas da poliproteína são: P1, HC-Pro (“*Helper component-proteinase*”), P3, CI (“*Cylindrical inclusion protein*”), NIa-Pro (“*nuclear inclusion protein*”), NIb (“*Nuclear inclusion protein b*”) e CP (proteína capsidial).

A proteína P1 é uma serina endopeptidase, derivada da região NH<sub>2</sub>-terminal da poliproteína. Tem função de protease promovendo a clivagem no sítio específico entre si e a proteína auxiliar HC-Pro (VERCHOT et al., 1991; CHOI et al., 2002). Também é requerida na amplificação do genoma (MERITS et al., 1999; VERCHOT & CARRINGTON, 1995).

HC-Pro é uma protease de cisteína (OH & CARRINGTON, 1989; CARRINGTON et al. 1989a; GUO et al., 2011) que promove a clivagem da poliproteína viral por auto-proteólise na sua região terminal (CARRINGTON et al., 1989b; CARRINGTON & HERNDON, 1992). Em *Potyviridae*, a HC-Pro contribui com várias funções como: interações que determinam virulência (ATREYA & PIRONE, 1993) amplificação do genoma (KLEIN et al., 1994; KASSCHAU & CARRINGTON, 1995; KASSCHAU et al., 1997), movimento célula-célula e a longa distância (CRONIN et al., 1995; KASSCHAU et al., 1997; ROJAS et al., 1997) e sinergismo viral (PRUSS et al., 1997; SHI et al., 1997).

Para o gênero *Potyvirus*, a região NH<sub>2</sub>-terminal da proteína HC-Pro é importante na transmissão por afídeos (ATREYA et al., 1992; GRANIER et al., 1993; HUET et al., 1994; LEGRAVRE et al., 1996) sendo a mais divergente entre WSMV e outros *Potyvirus* (STENGER et al., 1998). A proteína HC-Pro também está envolvida na supressão do silenciamento pós transcricional (PTGS) (ANANDALAKSHMI et al., 1998; KASSCHAU & CARRINGTON, 1998; STENGER et al., 2007).

Em infecções com WSMV a HC-Pro exerce função de protease (STENGER et al., 2006a), é essencial na transmissão pelo ácaro (YOUNG et al., 2007; STENGER et al., 2005b; STENGER et al., 2006a), na replicação, no movimento (STENGER et al., 2005a) e também pode afetar a virulência (STENGER & FRENCH, 2004b) e a patogenicidade (STENGER et al., 2006b). Entretanto diferenças na gama de hospedeiros entre os *Tritimovirus* não são determinadas pela HC-Pro (STENGER & FRENCH, 2004b).

A proteína P3 pode estar envolvida na replicação do RNA dos *Potyvirus* (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1993; MERITS et al., 1999). Em infecções com WSMV, a proteína P3 também está envolvida na replicação viral e afeta o movimento do genoma (CHOI et al., 2005). No cistron P3 da poliproteína ocorre uma pequena região conservada entre a família *Potyviridae* nomeada PIPO com forte marcação bioinformática (“*strong bioinformatic coding signature*”) (CHUNG et al., 2008).

A proteína CI promove a hidrólise de ribonucleotídeos necessária para a função de RNA helicase essencial na replicação genômica (LAIN et al., 1990, 1991; FERNANDEZ et al., 1995; FERNANDEZ et al., 1997). Também facilita o movimento célula-célula (LANGENBERG, 1993; CARRINGTON et al., 1998).

Outra proteína com função de protease de cisteína é a NIa-Pro, que promove a clivagem entre si e Nib e CP (CARRINGTON & DOUGHERTY, 1987a, 1987b) e é essencial na expressão do genoma (DOUGHERTY & SEMLER, 1993). A NIa está relacionada a VPg no genoma (SHAHABUDDIN et al., 1988; MURPHY et al., 1990). A região mais conservada da poliproteína viral entre os membros da família *Potyviridae* é a Nib (DOMIER et al., 1986; STENGER et al., 1998) onde está codificada a RNA polimerase (DOMIER et al., 1986; LAIN et al., 1989).

Na região COOH-terminal da poliproteína está codificada a proteína capsidial (CP), seguida da região UTR (*untranslated region*) e cauda poli A (NIBLETT et al., 1991). As divergências entre o genoma do WSMV e membros da família *Potyviridae*, estão

localizadas especialmente na região onde está codificada a proteína capsidial (NIBLETT et al., 1991; CHOI et al., 2000).

Nos *Potyvirus* a proteína capsidial está relacionada com a especificidade de transmissão pelos afideos (ATREYA et al., 1991; GAL-ON et al., 1992; ATREYA et al., 1995) e também contribui no movimento célula-célula e longa distância (DOLJA et al., 1994, 1995; LÓPEZ-MOYA & PIRONE, 1998; ROJAS et al., 1997). A região NH<sub>2</sub>-terminal da proteína capsidial do WSMV está envolvida com especificidade de hospedeiro e movimento a longa distância (TATINENI et al., 2011).

As proteínas dos vírus pertencentes à família *Potyviridae* interagem de diferentes maneiras (RODRIGUEZ-CEREZO et al., 1993; MERITS et al., 1999; HONG et al., 1995; LI et al., 1997; LANGENBERG & ZHANG, 1997; FELLER et al., 1998; ARBATOVA et al., 1998; GUO et al., 1999; URCUQUI-INCHIMA et al., 1999). As proteínas P1, HC-Pro, P3, CI e CP do WSMV têm capacidade de auto-associação e, exceto a CP, possuem a habilidade de ligarem-se umas com as outras em todas as possíveis combinações (CHOI et al., 2000).

## **2.4 Gama de hospedeiros**

O WSMV é capaz de infectar várias espécies de Poaceas (OLDFIELD & PROESELER, 1996) e nenhuma espécie eudicotiledônea (BRAKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001). Comumente causa mosaico severo e nanismo ocasionando perdas na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L., *Triticum durum* L.) (OLDFIELD, 1970; BRAKKE, 1971; CHRISTIAN & WILLIS, 1993;

SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; ELLIS et al., 2003a,b; KAPOORIA & NDUNGURU, 2004) mas também pode ocorrer em centeio (*Secale cereale* L.), aveia (*Avena sativa* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.) (OLDFIELD, 1970; BRAKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001), triticale ( $\times$  *Triticosecale* Witt.) (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001), algumas variedades de milho (*Zea mays* L.) (BRAKKE, 1971) e milhetos (*Panicum*, *Setaria* e *Echinochloa* spp.) (BRAKKE, 1971; CHRISTIAN & WILLIS, 1993; ELLIS et al., 2004).

Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), *Agropyron repens* (L.) Beauv), *Bromus inermis* (Leyss.), *Hordeum jubatum* (L.) (BRAKKE, 1971) e *Panicum maximum* (Jacq.) (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004) também são hospedeiras, mas não ocorre infecção sistêmica. A variedade de sorgo “Sima” apresentou sintomas sistêmicos de mosaico e nanismo quando inoculada mecanicamente (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004). *Pennisetum* spp., *Eragrostis* spp., *Echinochloa colona* (L.), *Sorghum bicolor* (L.) e milho das variedades “Ranchero” e “H-522” mostraram-se imunes ao isolado viral denominado El Batán 3 não sendo possível re-transmiti-lo mecanicamente para plantas de trigo (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001).

Outras gramíneas hospedeiras são: *Aegilops* spp., *Agropyron* spp., *Bouteloua* spp., *Bromus* spp., *Cenchrus* spp., *Digitaria* spp., *Elymus* spp., *Haynaldia* spp., *Hordeum* spp., *Lolium* spp., *Oryzopsis* spp., *Phalaris* spp., *Poa* spp., *Stipa* spp. (BRAKKE, 1971), *Digitaria milangiana* (Rendle) Stapf., *Rottboellia cochinchinensis* (Lour.), *Sorghum halepense* (L.) (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004), *Bromus tectorum* (L.) (MCKINNEY, 1949)

*Eriochloa contracta* (Kunth) Hitchc., *Cenchrus pauciflorus* (Benth.) (CHRISTIAN & WILLIS, 1993), *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop., *Bouteloua hirsuta* (Lag.), *Elymus virginicus* (L.), *Elymus canadensis* (L.), *Eragrostis cilianensis* (All.) Vignolo ex Janch. (SILL & CONNIN, 1953; COUTTS et al., 2008b), *Eragrostis curvula* (Schrad.), *Eleusine tristachya* (Lam.) Lam. (ELLIS et al., 2004), *Lolium rigidum* (Gaudin), *Tragus australianus* (Blake), *Panicum capillare* (L.), *Avena fatua* (L.) (COUTTS et al., 2008b).

Infecções mistas podem ocorrer com outros vírus transmitidos por diferentes vetores. Há relatos de infecções mistas em cevada com *Barley yellow dwarf virus* – PAV (BYDV-PAV) (ACHON & SERRANO, 2006) e em trigo com *Cereal yellow dwarf virus* – RPV (CYDV-RPV), BYDV-PAV, *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV), *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) (BOWEN et al., 2003; KAPOORIA & NDUNGURU, 2004), *Brome mosaic virus* (BMV), *Barley stripe mosaic virus* (BSMV) e *Wheat dwarf virus* (WDV) (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004).

## 2.5 Sintomas

O WSMV geralmente ocorre em reboleiras conforme a distribuição do vetor, causando mosaico sistêmico, nanismo e necrose que afetam drasticamente o rendimento da cultura do trigo (MCKINNEY, 1949; SLYKHUIS, 1955; BRAKKE, 1971; STYLER & NAULT, 1996; COUTTS et al., 2008b).

Os primeiros sintomas da infecção são estrias verdes paralelas as nervuras das folhas, essas estrias tornam-se amarelas formando padrões de amarelo e verde em linhas descontínuas,

chamado de mosaico (Figura 3), seguido da indução de sintomas nas folhas jovens em desenvolvimento. Posteriormente, as riscas tornam-se manchas maiores resultando em clorose cobrindo grande parte da folha, seguida por necrose em plantas severamente afetadas (STYLER & NAULT, 1996; MARTIN, 1978).



Figura 3 - Mosaico causado pelo *Wheat streak mosaic virus* em trigo.

Além da transmissão pelo vetor o WSMV também pode ser inoculado mecanicamente (MCKINNEY, 1949), expressando os sintomas entre 6 a 8 dias após a inoculação quando as plantas são mantidas entre 20 e 25 °C (STYLER & NAULT, 1996). Em geral, como ocorre com a maioria dos vírus, quanto mais precoce a infecção,



mais severos são os sintomas (MCKINNEY, 1949; MARTIN et al., 1984; COUTTS et al., 2008a,b). Em ambos os casos, inoculação pelo vetor ou mecânica, a infecção precoce causa nanismo e a planta pode produzir vários perfilhos pequenos (MCKINNEY, 1949; KAPOORIA & NDUNGURU, 2004).

As plantas infectadas precocemente são severamente atrofiadas, mostram estrias pardas e sintomas de mosaico nas folhas, produzem menos e as sementes são menores. Quando as condições favorecem a infecção precoce, o rendimento fica drasticamente comprometido podendo consistir apenas de uma pequena quantidade de grãos murchos, ou formam apenas espigas estéreis sem sementes (STYLER & NAULT, 1996; COUTTS et al., 2008a,b)

Os sintomas induzidos pelo vírus são influenciados pelo ambiente como solo, fertilidade, temperatura, pluviosidade, radiação solar assim como o estágio da planta quando infectada e o genótipo (MARTIN et al., 1984; COUTTS et al., 2008a). No campo, a direção e intensidade dos ventos são fatores de dispersão do ácaro vetor, podendo também influenciar na distribuição da virose e conseqüentemente dos sintomas (SLYKHUIS, 1955; COUTTS et al., 2008a; COUTTS et al., 2008b).

## **2.6 Danos**

Na região “Great Plains” dos Estados Unidos, onde o WSMV é considerado uma das doenças virais mais importantes para o cultivo de trigo (CHRISTIAN & WILLIS, 1993; FRENCH & STENGER, 2003), as perdas anuais são de 2 a 5%, mas ocasionalmente podem ocorrer surtos que causam perdas de até 100%

(SIM et al., 1988; HUNGER et al.,1992; CHRISTIAN & WILLIS, 1993; MCNEIL et al., 1996; MASUMI et al., 2001; FRENCH & STENGER, 2003; DWYER et al., 2007). O cultivo de trigo durante a primavera nesta região pode ter seu rendimento afetado em 31,9 a 98,7 % com redução no peso de mil grãos entre 10,8 a 49,3% (EDWARDS & MCMULLEN, 1988).

Um dos estados com maior incidência de WSMV é o Kansas nos Estados Unidos. Em 1949, o prejuízo causado pelo vírus foi estimado em 30 milhões de dólares (FELLOWS & SILL, 1955). Em 1974, estimaram-se perdas de 816 mil toneladas e em 1981, 571 mil toneladas (MARTIN et al., 1984; SIM et al., 1988). Entre 1987 e 1991 a virose tornou-se a doença mais importante para a cultura do trigo no estado, causando uma redução de 13% no rendimento da safra em 1988 (SIM et al., 1988; CHRISTIAN & WILLIS, 1993).

Os maiores danos ocorrem quando o trigo é infectado precocemente (MCKINNEY, 1949; MARTIN et al., 1984; COUTTS et al., 2008a,b). Além do estágio da planta no momento da infecção a interação com o ambiente também afeta a severidade (SHAHWAN & HILL, 1984; HUNGER et al.,1992). Dependendo do cultivar os danos podem variar de 50 a 91% (HUNGER et al.,1992), 90% de infecção pode reduzir o rendimento em 40,7% e o peso de mil grãos em 10,6% (SEIFERS & MARTIN, 1988) e 100% pode ocasionar redução aproximada no rendimento de 74% e afetar em até 41% o peso de mil grãos (MASUMI et al., 2001).

## **2.7 Controle (manejo)**

Plantas voluntárias de trigo e hospedeiros alternativos servem de refúgio aos ácaros vetores no intervalo entre os cultivos e são fontes de manutenção e propagação do WSMV (THOMAS & HEIN, 2003; JIANG et al., 2005; COUTTS et al., 2008b). Além disso, o ácaro tem um grande potencial de dispersão pelo vento (SLYKHUIS, 1955; COUTTS et al., 2008b). A sobrevivência e dispersão do ácaro vetor são os principais fatores que influenciam na propagação do WSMV (THOMAS et al., 2004). Essas condições favorecem a infecção precoce nas lavouras que dificultam o controle (SOMSEN & SILL, 1970; SHAHWAN & HILL, 1984; THOMAS & HEIN, 2003; JIANG et al. 2005).

O controle químico é pouco efetivo contra o ácaro (THOMAS et al., 2004). A principal estratégia de manejo do WSMV envolve a redução do número de ácaros através do controle de plantas de trigo voluntárias e hospedeiros alternativos (SLYKHUIS, 1955; SOMSEN & SILL, 1970; SHAHWAN & HILL, 1984; JIANG et al., 2005). As práticas culturais como trocar a época do plantio, destruir as plantas de trigo voluntárias e as gramíneas hospedeiras e o isolamento do plantio são recomendadas (THOMAS et al., 2004).

## **2.8 Distribuição espaço temporal**

O WSMV foi primeiramente descrito no Kansas (Estados Unidos) em 1929 (MCKINNEY, 1937) e atualmente está amplamente distribuído em áreas de cultivo de trigo na América do Norte (BREMER, 1971; SHAHWAN & HILL, 1984; BRAKKE, 1987; SANCHÉZ-SANCHÉZ et al., 2001), Eurasia (RESHETNIK et al.,

1996; NYITRAI & GABORJANYI, 1988), África (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004) e Oriente Médio (MAKKOUK & KUMARI, 1997). Há numerosos relatos de WSMV em diversos locais do mundo, como na América do Norte: Kansas (CHRISTIAN & WILLIS, 1993), Alabama (BOWEN et al., 2003), Colorado (SHAHWAN & HILL, 1984); América Central: México (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001); Eurásia: Turquia (BREMER, 1971), Cazaquistão (DIJEMBOEV, 1956), Rússia (RABENSTEIN et al., 2002); Ásia: Síria (MAKKOUK & KUMARI, 1997), Jordânia (SLYKHUIS & BELL, 1963), China (XIE et al., 1982), Irã (FOULAD & IZADPANAH, 1986); Europa: Alemanha (RABENSTEIN et al., 1982), Eslováquia – (KÚDELA et al., 2008), Roménia (SLYKHUIS & BELL, 1963), Iugoslávia (JURETIC, 1979), Hungria (NYITRAI & GABORJANYI, 1988), Ucrânia (RESHETNIK et al., 1996), Itália (CREDI et al., 1997), Polónia (JEZEWSKA & WIECZOREK, 1998) e África: Zâmbia (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004).

Diferentes estirpes de WSMV ocorrem nos Estados Unidos, México e Eurásia (BRAKKE, 1971; MCNEIL et al., 1996; CHOI et al. 2001; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; STENGER et al., 2002). Recentemente isolados similares aos encontrados na região Noroeste Pacífico Americana (APNW – “*American Pacific Northwest*”) foram detectados no hemisfério sul (DWYER et al., 2007; STENGER & FRENCH, 2009).

Em 2002, o WSMV foi detectado pela primeira vez na Austrália em germoplasma de trigo plantados em casa de vegetação (ELLIS et al., 2003b) e, posteriormente, também foi encontrado em plantações de trigo em Canberra. Um ano depois, disseminou-se para

os estados de New South Wales, South Australia, Queensland e Victoria (ELLIS et al., 2003a,b; ELLIS et al., 2004). Em 2005, infecções generalizadas de WSMV afetaram mais de 5.000 ha no Sul da Austrália (COUTTS et al., 2008b) aumentando para 20.000 ha em 2006 (DWYER et al., 2007). Até 2006 o WSMV estava presente em todos os estados da Austrália, exceto no Western Australia, ano em que foi encontrado em plantas voluntárias de trigo (COUTTS et al., 2008a).

A alta similaridade dos isolados Australianos entre si e com os isolados provenientes da região APNW sugerem que o WSMV entrou no país, entre 15 a 25 anos atrás, em uma introdução única através de sementes infectadas com uma variante genética originada do APNW (DWYER et al., 2007). A introdução inicial pode ter sido realizada através de sementes infectadas, mas a disseminação do vírus na Austrália foi provavelmente devida tanto a transmissão via sementes quanto a transmissão por vetores (HALLIDAY & KNIHINICKI, 2004). Embora o ácaro transmissor não tenha sido detectado, em 2009, o WSMV foi encontrado em diversas localidades e cultivares na Nova Zelândia provavelmente também proveniente de sementes infectadas (LEBAS et al., 2009).

Até dez anos atrás o complexo *A. tosichella* e WSMV não havia sido encontrado na América do Sul, sendo considerado, até então, praga quarentenária. Entretanto, em 2002, foi relatada a presença do WSMV na área central da província de Córdoba na Argentina (TRUOL et al., 2004) e, em 2004 o vetor *A. tosichella* foi detectado em plantas infectadas (NAVIA et al., 2006). Até 2006 o WSMV encontrava-se nas províncias de Tucumán, Entre Rios, La

Pampa, Buenos Aires, Córdoba, Salta, Santa Fé e Santiago del Estero (NAVIA et al., 2006).

Os isolados descritos na Argentina assim como os isolados Australianos são altamente similares aos encontrados na região APNW. A mesma linhagem de WSMV invadiu duas plantações de trigo em dois continentes diferentes. O WSMV pode ter sido introduzido, nesses países, a partir de uma fonte comum e/ou a linhagem introduzida possui maior taxa de transmissão via semente do que as outras (STENGER & FRENCH, 2009). Os isolados de WSMV provenientes da Austrália possuem uma taxa de transmissão via semente entre 0,2 a 0,5% (JONES et al., 2005; DWYER et al., 2007; LANOISELET et al., 2008).

## **2.9 Relações filogenéticas**

Numerosos isolados de WSMV podem ser distinguidos por análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) (MCNEIL et al., 1996), polimorfismo de conformação de fita única (SSCP) (HALL et al., 2001b) e em alguns casos por sorologia (MONTANA et al., 1996).

A manutenção da diversidade genética das populações pode ser facilitada por três distintos mecanismos de isolamento genético: proteção cruzada, subdivisão das populações em plantas infectadas e transmissão por vetor (HALL et al., 2001a). Diferentes estirpes de WSMV ocorrem nos Estados Unidos, México e Eurásia (BRAKKE, 1971; MCNEIL et al., 1996; CHOI et al. 2001; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; STENGER et al., 2002),

sugerindo que o isolamento geográfico das populações alopátricas fomenta as divergências (STENGER & FRENCH, 2002).

As substituições de nucleotídeos entre os isolados de WSMV estão distribuídas principalmente na região do genoma onde estão codificadas as proteínas P1, NIa, HC-Pro e CP, sendo as regiões da P3 e NIB as mais conservadas (CHOI et al., 2001; HALL et al., 2001b). Comparando com o ONMV a P3 também é conservada, sendo a HC-Pro a mais divergente (SENGER & FRENCH, 2004).

As análises das relações filogenéticas (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002) agrupam os isolados do WSMV em quatro clados distintos (Figura 4). O clado A é representado pelo isolado El Batán 3 do México (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2001; STENGER et al., 2002) que difere em sua seqüência de nucleotídeos em 20% dos demais clados (CHOI et al., 2001; STENGER et al., 2002).

Dois isolados da região “Great Plains” americana, Sidney 81 do Kansas (STENGER et al., 1998) e Type de Nebraska (MCKINNEY, 1937) que apresentam 97,6 % de identidade entre si, estão intimamente relacionados a outros isolados provenientes dos Estados Unidos e Canadá (NIBLETT et al., 1991; CHENAULT et al., 1996) e tem apenas 79% de similaridade com o isolado El Batán 3 do México. Os três isolados apresentam relação sorológica (CHOI et al. 2001). Type e Kansas podem ser distinguidos pela habilidade de infectar a linhagem híbrida de milho SDP2 (CHOI et al., 1999).

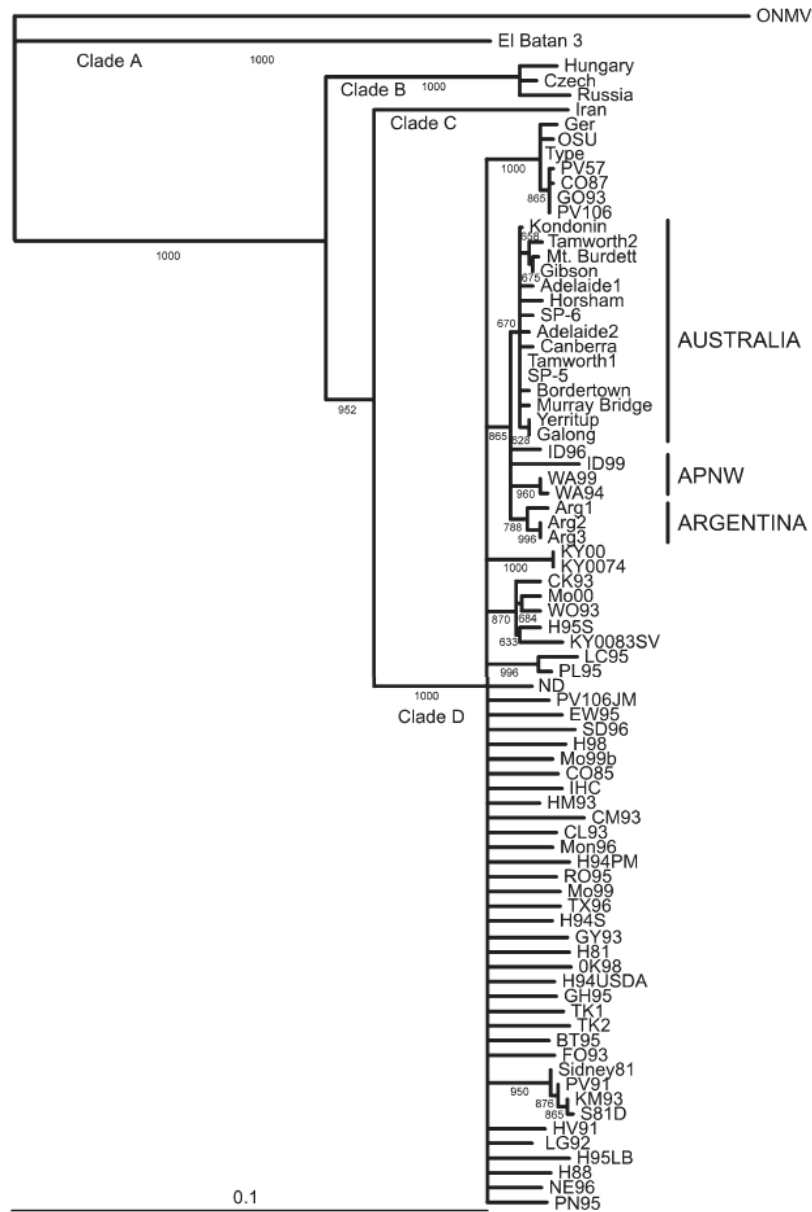


Figura 4 - Relações filogenéticas entre isolados de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) estabelecida por comparação de nucleotídeos da região da proteína capsial (CP). Reproduzido de: STENGER & FRENCH, 2009.



Os isolados provenientes da Europa central e Rússia abrangem o clado B (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002) e diferem em 10 % das sequencias de nucleotídeos dos clados C e D (STENGER & FRENCH, 2009). Comparações entre as sequencias da proteína capsidial de diferentes isolados da Europa provenientes da República Checa, França, Itália, Eslováquia e Turquia mostraram que os isolados Europeus possuem uma deleção de três nucleotídeos excluindo o códon Gly<sub>2761</sub> na região que codifica a proteína capsidial e são designados como WSMV-ΔE. Também diferem de alguns isolados americanos em um códon e uma única deleção na região da proteína capsidial do isolado El Batán 3 do México (GADIOU et al., 2009).

Um isolado do Irã representa o clado C (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002) e difere em 8 % do clado D (STENGER & FRENCH, 2009).

O clado D é composto pelas espécies da América do Norte e dois isolados da Turquia (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002). Os isolados da Austrália (ELLIS et al., 2003a,b) estão relacionados entre si e com certos isolados pertencentes ao clado D provenientes da região Noroeste Pacífico Americana (APNW - *American Pacific Northwest*) (DWYER et al., 2007) assim como os isolados da Nova Zelândia (LEBAS et al., 2009). Os isolados Argentinos (TROUL et al., 2004) estão intimamente relacionados aos isolados provenientes do APNW e Austrália (STENGER & FRENCH, 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de execução

As análises sorológicas (DAS-ELISA) foram realizadas no Laboratório de Entomologia & Virologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo em Passo Fundo – RS. As plantas de trigo utilizadas no diagnóstico biológico foram cultivadas, inoculadas e mantidas em telado com compartimento anti-afídeo pertencente ao Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo – FAMV-UPF. As etapas de detecção e caracterização molecular foram conduzidas no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Trigo e os experimentos realizados para a determinação da gama de hospedeiros foram realizados em telado da Embrapa Trigo.

#### 3.2 Coletas

Entre 2009 e 2011, foram coletadas 954 amostras de plantas sendo trigo (25,8%), aveia (18,8%), azevém (10,7%), milho (7,5%), centeio (0,1%), cevada (0,5%), sorgo (0,2%), triticale (0,4%) e gramíneas hospedeiras voluntárias (36%) em áreas das regiões produtoras de trigo do Rio Grande do Sul (57,2%), Santa Catarina (5,2%), Paraná (32,5%) e Mato Grosso do Sul (5,1%) totalizando 451 pontos amostrados em 93 municípios, sendo 34 do RS, 4 de SC, 47 do PR e 8 do MS (Figura 5).

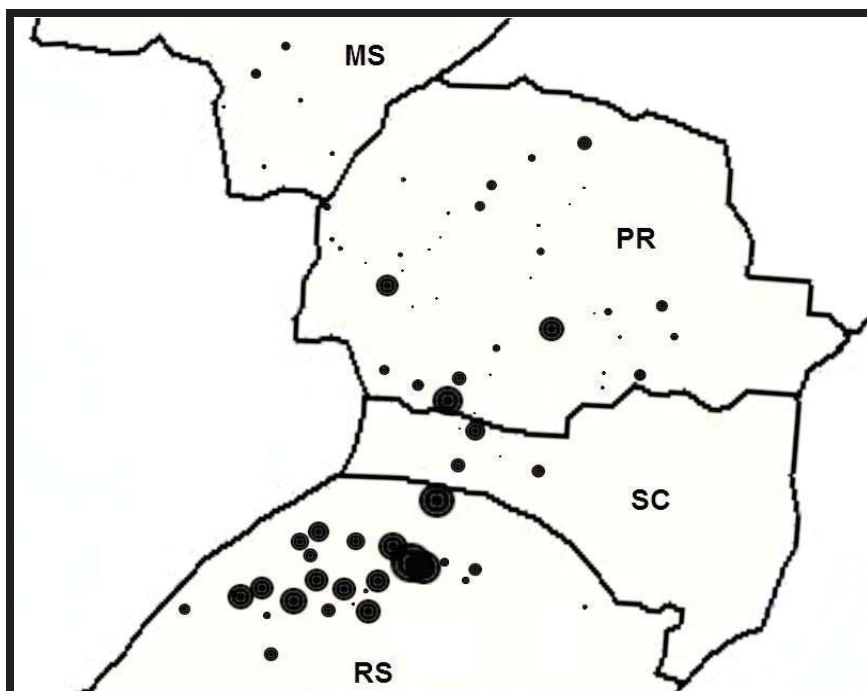


Figura 5 - Municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul amostrados entre 2009 e 2011. O diâmetro de cada ponto é proporcional ao número de coletas realizadas em cada município durante os três anos de pesquisa.

Além das amostras de campo, um conjunto de cinco amostras (485, 486, 912, 915 e 1256) foi coletado nas casas de vegetação da Embrapa Trigo (Apêndice 1), onde desde 2006 surtos de *A. tosichella* vem ocorrendo (PEREIRA et al., 2009) e os sintomas da infestação podem ser observados anualmente entre a primavera e o verão. Três amostras de trigo foram coletadas em janeiro (2010 e 2011) e duas em outubro (2010 e 2011), todas com sintomas de enrolamento e/ou mosaico e presença do ácaro confirmada.

As plantas oriundas de coletas de campo foram transplantadas e mantidas em telado durante as análises biológicas, sorológicas e moleculares e amostras de folhas e colmos foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, transportadas ao laboratório no interior de caixas de isopor com gelo onde foram mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 Detecção sorológica**

A detecção sorológica nas diferentes espécies de gramíneas provenientes das coletas foi realizada para 293 amostras de folhas e colmos coletadas entre julho de 2010 a setembro de 2011.

O DAS-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) foi realizado utilizando anti-soros da Agdia ([www.agdia.com](http://www.agdia.com)) específicos para WSMV diluídos em uma proporção de 1:200 (v/v) em tampão de revestimento ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ , pH 9,6) e adicionado às cavidades de placas de poliestireno. As placas foram incubadas em câmara úmida por 4 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e lavadas com tampão PBS-T ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KCL}$ ,  $\text{NaN}_3$ , Tween 20, pH 7,4).

As amostras foram maceradas na presença de tampão de extração ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ , PVP, pH 9,6), na proporção 1:5 (p/v) e  $100\text{ }\mu\text{L}$  de cada amostra foi adicionado às cavidades das placas de poliestireno sensibilizadas. Após incubação a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 horas, as placas foram lavadas em tampão PBS-T.

Os conjugados, previamente diluídos em tampão de extração (1:200), foram adicionados às placas ( $100\text{ }\mu\text{L}/\text{cavidade}$ ), seguindo-se de incubação por 4 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As placas foram novamente lavadas com PBS-T e adicionou-se  $100\text{ }\mu\text{L}$  de substrato p-

nitrofenilfosfato (10 mg em 10 mL de tampão contendo dietanolamina,  $\text{NaN}_3$ , pH 9,8). Após a reação enzimática, a intensidade da coloração foi medida em espectrofotômetro (TP-Reader - Thermoplate) no comprimento de onda de 405 nm.

### **3.4 Detecção biológica**

Para a detecção biológica 463 amostras foram utilizadas. Quatro amostras de 2009 e 459 coletadas entre julho de 2010 e outubro de 2011, mantidas a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , foram inoculadas via extrato vegetal tamponado (tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 7) em plantas de trigo (cultivar BRS Guabiju), pulverizadas com celite, aos dez dias após a emergência. Utilizou-se o isolado 915 como controle positivo e dois controles negativos (plantas submetidas ao procedimento de inoculação com tampão e celite e plantas não inoculadas) a cada lote de 95 plantas inoculadas. As plantas foram mantidas em telado e observadas quanto à manifestação dos sintomas. Aos 30 dias após a inoculação realizou-se DAS-ELISA conforme protocolo descrito no item 3.2.

### **3.5 Detecção e caracterização molecular**

A detecção molecular foi realizada para 96 amostras (Apêndice 1) de diferentes hospedeiros, principalmente trigo com sintoma de mosaico estriado, coletado entre 2010 e 2011 nas regiões próximas e/ou de ocorrência do ácaro vetor (88,5% das amostras), gramíneas hospedeiras coletadas nas regiões de ocorrência do ácaro vetor e/ou com sintomas (9,3%) e trigo ou outras gramíneas (2,2%).

Após a etapa de inoculação, o RNA do isolado 915, oriundo de casa de vegetação, também foi extraído.

### 3.5.1 Extração de RNA

Das plantas oriundas do campo, transplantadas e mantidas em casa de vegetação, foram coletadas amostras de tecidos de folhas, separadamente com o auxílio de bandeja e tesoura. Cada amostra foi colocada em saco de papel previamente identificado e imediatamente imersa em nitrogênio líquido. Após, foram conduzidas para o laboratório.

Todo o material utilizado para manipulação de RNA foi tratado visando a eliminação de RNAses. A vidraria, almofariz e pistilo foram esterilizados em estufa a 180 °C por 2h e as ponteiras e os tubos foram imersos em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v) por 12 horas e autoclavados.

Procedeu-se a extração do RNA total utilizando o *kit* Rneasy<sup>TM</sup> da QIAGEN, conforme protocolo do fabricante. O tecido coletado foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. Do pó macerado foram transferidos 100 mg para um tubo de 1,5 mL e adicionados 450 µL de buffer RTL com 4,5 µL de beta-mercaptoetanol. O conteúdo do tubo foi imediatamente misturado em vórtex.

O conteúdo foi transferido para coluna de filtragem e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm (Eppendorf 5415 R). A fração filtrada pela coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, adicionando 225 µL de etanol (96-100%), após misturar invertendo gentilmente os tubos, aplicou-se na coluna “Rneasy”, que

posteriormente foi centrifugada por 15 segundos a 10.000 rpm. O filtrado foi descartado e adicionou-se 700  $\mu$ L do tampão de lavagem RW1 na coluna centrifugando novamente por 15 segundos a 10.000 rpm.

O filtrado foi descartado e a coluna lavada pela adição de 500  $\mu$ L de tampão RPE, seguida de centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm. Após o descarte do filtrado, procedeu-se a segunda lavagem com 500  $\mu$ L de tampão RPE, centrifugando-se por 2 minutos a 12.000 rpm. A coluna foi transferida para um novo tubo e centrifugada por 1 minuto a 12.000 rpm, para secagem. Novamente a coluna foi transferida para novo tubo de microcentrífuga previamente identificado, o RNA eluído pela adição de 50  $\mu$ L de água milli-q tratada com DEPC 0,1% (v/v) autoclavada e centrifugado por 60 segundos a 10.000 rpm. As amostras foram armazenadas a -80 °C.

### **3.5.2 Amplificação de seqüências virais por meio de RT-PCR**

O RNA total foi utilizado para síntese de cDNA (DNA complementar) por meio de transcrição reversa e as sequencias das regiões que codificam para a proteína capsidial e VPg-N1a foram amplificadas por meio de reação em cadeia de polimerase.

A síntese do cDNA foi realizada com o auxílio do *Kit* comercial *ImProm-II™* Reverse Transcription System (PROMEGA), segundo protocolo do fabricante. As amostras foram preparadas numa reação contendo 1,5  $\mu$ L de RNA, 4,5  $\mu$ L de água e 2,0  $\mu$ L do primer oligo(dT), totalizando 8  $\mu$ L, e incubadas por 5 minutos a 70 °C, transferindo imediatamente para o gelo e mantidas por 5 minutos.

Adicionou-se 1,5 µL de água, 4 µL de tampão de reação 5X, 4 µL de cloreto de magnésio, 1 µL da mistura de deoxinucleotídeos, 0,5 µL de RNA<sub>sin</sub> e 1 µL da enzima transcriptase reversa. A reação foi incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por uma hora e 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Os conjuntos de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR que amplificam a região VPg-NIa do WSMV (WSMV L2 / WSMV R2), foram descritos por DEB & ANDERSON (2008) e o conjunto para a amplificação da região COOH-terminal da poliproteína onde está codificado a proteína capsidial (CP) (WSMV R / WSMV F) foi desenhado com base em sequências obtidas no banco de dados do GenBank (Tabela 2 e Figura 6). Para confirmar a qualidade do RNA extraído, foi realizada a amplificação de um fragmento correspondente ao gene da actina utilizando os oligonucleotídeos TaActinF (5'-CACGGTATCGTAAGCAACTG-3') e TaActinR (5'-AACTGAGGAGCTGTTCTTGG-3').

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção do WSMV

Oligo	Sequência	Posição	Fragmento amplificado
WSMV L2	5'CGACAATCAGCAAGAGACCA <sup>3'</sup>	5443	198 pb
WSMV R2	5'TGAGGATCGCTGTGTTTCAG <sup>3'</sup>	5641	
WSMV F	5'TCGAGTAGTGGAAGCACTCA <sup>3'</sup>	8248	948 pb
WSMV R	5'CCTCACATCATCTGCATCAT <sup>3'</sup>	9196	



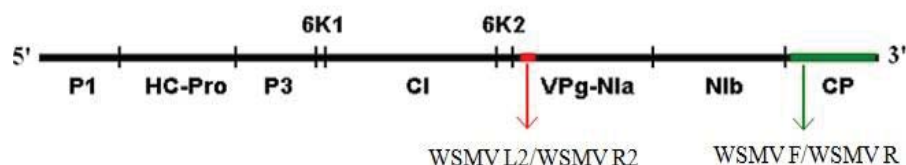


Figura 6 - Representação diagramática do genoma do WSMV com a localização das sequências amplificadas pelos conjuntos de oligonucleotídeos.

Para todos os oligonucleotídeos utilizados, a reação de PCR foi executada em volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima 5X, 1,5  $\mu\text{L}$  de Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$  25 mM), 2,0  $\mu\text{L}$  da mistura de deoxinucleotídeos (2,5 mM cada, dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,125  $\mu\text{L}$  da enzima *Taq* DNA polimerase (5 u/ $\mu\text{L}$  - PROMEGA), 1,0  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo (10  $\mu\text{M}$ ) e 12,375  $\mu\text{L}$  de água milli-q autoclavada para atingir o volume final da reação. A reação foi incubada por 2 minutos a 95  $^\circ\text{C}$  e realizada em 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95  $^\circ\text{C}$ , anelamento por 30 segundos a 55  $^\circ\text{C}$  e extensão por 1 minuto a 72  $^\circ\text{C}$ , seguida de uma extensão final de 7 minutos a 72  $^\circ\text{C}$ .

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5%, preparado em TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M; EDTA 2 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio 10 mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta após corrida eletroforética a 90V por duas horas.

### 3.5.3 Clonagem

Os fragmentos amplificados por RT-PCR foram clonados no vetor pGEM-T easy (PROMEGA), obedecendo as recomendações do fabricante. Para a ligação utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  do produto da PCR, 1  $\mu\text{L}$  de água milli-q autoclavada, 5  $\mu\text{L}$  de tampão da ligase 2X, 1  $\mu\text{L}$  do vetor pGEM-T easy e 1  $\mu\text{L}$  da enzima T4 ligase totalizando 10  $\mu\text{L}$  de reação incubada a 4 °C por 12 horas.

Células competentes foram obtidas, a partir do estoque em glicerol de *E. coli* estirpe DH5 $\alpha$ , crescidas em meio LB sólido (peptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; ágar sólido 15 g/L; pH ajustado para 7,0 com NaOH) mantido em estufa a 37 °C por 12 horas. Colônias isoladas foram selecionadas e colocadas em 2 mL de meio LB líquido para multiplicação por 6 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. O meio foi transferido para tubos de 2 mL e centrifugado a 4°C por 10 segundos a 5.000 rpm. Mantendo o material no gelo, as células foram ressuspensas em 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M e centrifugadas durante 10 segundos a 5.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e novamente as células ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de CaCl<sub>2</sub> 0,1M.

Em 75  $\mu\text{L}$  de células competentes adicionou-se 3  $\mu\text{L}$  de DNA, seguido de incubação no gelo durante 20 minutos, submetidas a um choque-térmico a 42 °C por 50 segundos, devolvidas para o gelo e incubadas durante 2 minutos. Adicionou 0,5 mL de meio LB líquido e as células foram incubadas a 37 °C durante 40 minutos sob agitação constante de 225 rpm. Após centrifugação por 15 segundos a 5.000 rpm, 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi descartado e 200  $\mu\text{L}$  de células

transformadas foram espalhadas, com o auxílio de uma alça de Drigalski, em meio LB sólido contendo ampicilina a 100 µg/mL adicionada ao meio e 40 µL de X-gal a 20 mg/mL e 4 µL de IPTG a 1M aplicados sobre a placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas.

#### **3.5.4 Extração de plasmídeos para confirmação dos clones**

As colônias contendo plasmídeos recombinantes foram identificadas pela coloração branca, transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37 °C por 12 horas sob agitação constante de 180 rpm para crescimento bacteriano. A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo método da lise alcalina.

Uma alíquota de 2 mL foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugada por 2 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA compactado ressuspendido em 250 µL de solução I (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; EDTA 10mM; Rnase I 100 µL/mL) misturando no vórtex. Adicionou-se 250 µL de solução II (NaOH 200mM; SDS 1%) misturando delicadamente, invertendo os tubos dez vezes, e 250 µL da solução III (Acetato de potássio 1,32M; pH ajustado para 4,8 com ácido acético) misturando da mesma forma. Após incubação no gelo por 10 minutos centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. O volume foi completado com etanol absoluto gelado (-20 °C – 750 µL) misturado no vórtex e centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm. O DNA compactado foi lavado com etanol 70 % gelado (-20 °C) e ressuspendido em 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1

mM) + RNase (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) incubado 1 hora em banho-maria a 37 °C. O DNA plasmidal foi armazenado a -20 °C.

Os plasmídeos extraídos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2%, preparado em TBE 1X e corado com brometo de etídio 10 mg/mL. As amostras foram preparadas com 3  $\mu\text{L}$  de DNA, 2  $\mu\text{L}$  de tampão 6X (Azul de bromofenol 0,25%; Xileno cianol FF 0,25%; Glicerol 30%) e 7  $\mu\text{L}$  de água milli-q e visualizadas sob luz ultravioleta após corrida eletroforética a 90V por duas horas.

Para confirmação da presença da seqüência recombinante, os plasmídeos extraídos foram clivados com *EcoRI* numa reação contendo: 3  $\mu\text{L}$  de DNA, 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima 10 X e 10  $\mu\text{L}$  de água milli-q e incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. O DNA clivado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, preparado em TBE 1X e corado com brometo de etídio 10 mg/mL. As amostras foram preparadas com 15  $\mu\text{L}$  de DNA clivado e 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 6X. Após corrida eletroforética em voltagem constante de 90V por 2 horas os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

### **3.5.5 Estocagem em glicerol**

Pelo padrão de bandas apresentado dois clones por isolado foram selecionados para a estocagem em glicerol. Cada clone foi registrado com o número específico da bacterioteca. Para o armazenamento foram colocados em criotubo 750  $\mu\text{L}$  da cultura bacteriana em 750  $\mu\text{L}$  de glicerol 50 % estéril e imersos no nitrogênio para congelamento imediato. Os clones foram armazenados a -80 °C.

### 3.5.6 Extração de plasmídeos para seqüenciamento

Os clones foram multiplicados em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) por 12 horas a 37 °C. Colônias isoladas foram crescidas em 3 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/mL) por 12 horas a 37 °C sob agitação constante de 180 rpm para extração do plasmídeo para seqüenciamento.

A extração dos plasmídeos para seqüenciamento foi realizada utilizando o *Kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (PROMEGA), conforme as orientações do fabricante. Uma alíquota de 2,0 mL da cultura bacteriana foi centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante adicionou-se 250 µL da solução de ressuspensão misturando no vórtex. Após foi adicionado 250 µL de solução de lise, misturando delicadamente invertendo os tubos, e 10 µL de solução de protease alcalina misturada da mesma forma. Após incubação por 5 minutos a temperatura ambiente, 350 µL de solução de neutralização foi adicionada também misturado delicadamente até ocorrer formação do precipitado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante transferido para uma coluna e centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm. Após o descarte do filtrado adicionou-se 750 µL de solução de lavagem centrifugando por 1 minuto a 12.000 rpm. A segunda lavagem foi realizada com 250 µL de solução de lavagem e centrifugada por 2 minutos a 12.000 rpm. A coluna foi encaixada em um novo tubo previamente identificado e o DNA eluído em 100 µL de água livre de nucleases centrifugando por 1 minuto a 12.000 rpm. O material foi armazenado a -20 °C.

Após a extração uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  de DNA foi diluída em 20  $\mu\text{L}$  de água milli-q e realizou-se PCR com os oligonucleotídeos que amplificam a região de 948 pb da proteína capsidial ou 198pb da região VPg-NIa para a confirmação da presença dos fragmentos. A reação foi executada em volume total de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA, 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima 5X, 1,5  $\mu\text{L}$  de Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$  25 mM), 2,0  $\mu\text{L}$  da mistura de deoxinucleotídeos (2,5 mM cada, dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 0,125  $\mu\text{L}$  da enzima *Taq* DNA polimerase (5 u/ $\mu\text{L}$ ), 1,0  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo (10  $\mu\text{M}$ ) e 12,375  $\mu\text{L}$  de água milli-q autoclavada para atingir o volume final da reação. A reação foi incubada por 2 minutos a 95 °C e realizada em 35 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95 °C, anelamento por 30 segundos a 55 °C e extensão por 1 minuto a 72 °C, seguida de uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,2%, preparado em TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; Ácido Bórico 0,09 M; EDTA 2 mM, pH 8,0), corado com brometo de etídio 10 mg/mL e visualizado sob luz ultravioleta após corrida eletroforética a 90V por duas horas.

### **3.5.7 Determinação do padrão de restrição com *Hinf*I**

Para os fragmentos de 948 pb da região da proteína capsidial do WSMV o padrão de restrição com *Hinf*I foi determinado. Após a amplificação por PCR utilizando com DNA molde os plasmídeos recombinantes foi realizada a clivagem do produto de PCR com a enzima de restrição *Hinf*I. A reação contendo: 10  $\mu\text{L}$  de

PCR, 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima, 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima 10 X e 3  $\mu\text{L}$  de água milli-q foi incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos.

O padrão de restrição foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, preparado em TBE 1X e corado com brometo de etídio 10 mg/mL. As amostras foram preparadas com 15  $\mu\text{L}$  de DNA clivado e 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 6X. Após corrida eletroforética em voltagem constante de 90V por 2 horas os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

### 3.5.8 Seqüenciamento

Três clones com o fragmento de 198pb e 16 com o fragmento de 948pb foram seqüenciados. As amostras foram amplificadas utilizando o *Kit* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). O volume total da reação de seqüenciamento foi de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 1  $\mu\text{L}$  de DNA, 0,5  $\mu\text{L}$  de BigDye, 2  $\mu\text{L}$  de tampão de reação 5X, 3,2  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeo SP6 ou T7 (1  $\mu\text{M}$ ) e 3,3  $\mu\text{L}$  de água milli-q para completar o volume. A reação foi incubada por 1 minuto a 96 °C e realizada em 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos a 58°C e extensão por 2 minutos a 60 °C.

Ao final do ciclo, a precipitação foi realizada adicionando 5  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio 7,5 M e 25  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto gelado incubando por 40 minutos a -20 °C e centrifugando a 3.700 rpm por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se ao precipitado 75  $\mu\text{L}$  de etanol 70% incubando por 1 minuto no gelo. Após o descarte do etanol as amostras foram submetidas a secagem em SpeedVac por 20 minutos e ressuspendidas em 10  $\mu\text{L}$  de

formamida Hi-Di durante 12 horas a 4 °C. A desnaturação foi realizada a 94 °C por 5 minutos e imediatamente as amostras foram incubadas no gelo por 3 minutos e centrifugadas (spin) a 1200 rpm. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático modelo ABI 3100.

### 3.5.9 Análise das sequencias

Foram montadas 16 sequencias de 948pb de nove isolados e três sequencias de 198pb de dois isolados. As sequencias foram montadas utilizando o programa CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>) e comparadas com as depositadas no GenBank e EMBL, utilizando o programa BLAST N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>).

Após análise de similaridade e comprovação da qualidade das sequencias, as sequencias de nucleotídeos do gene da proteína capsidial de 10 clones (sete isolados) e da região VPg-NIa de 3 clones (dois isolados) brasileiros foram comparadas com as sequencias de 13 isolados de WSMV descritos (Tabela 3) e um isolado do *Oat necrotic mottle virus* (ONMV; número de acesso no GeneBank AY377938), vírus do gênero *Tritimovirus* mais estreitamente relacionado com as espécies de WSMV (STENGER & FRENCH, 2004a).

Um alinhamento para cada região de interesse (proteína capsidial ou VPg-NIa) foi realizado utilizando o programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). A árvore filogenética comparando as sequencias de nucleotídeos das duas regiões estudadas e a sequencia de aminoácidos da proteína capsidial foi gerada através do método da análise de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*)



com 1.000 bootstraps, os gaps foram excluídos da análise e os demais parâmetros foram definidos para valores padrão. O resultado foi visualizado no programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) designando o ONMV como grupo mais distante.

Tabela 3 - Isolados de *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) utilizados na comparação das sequências

isolado	número de acesso	origem geográfica	referência
Arg2	FJ348359	Argentina	STENGER & FRENCH, 2009
Czech	AF454454	República Checa	RABENSTEIN et al., 2002
El Batán3	AF285170	México	CHOI et al., 2001
H95S	AF511614	Kansas, USA	STENGER & FRENCH, 2009
H98	AF511615	Kansas, USA	STENGER & FRENCH, 2009
ID96	AF511618	Idaho, USA	STENGER & FRENCH, 2009
ID99	AF511619	Idaho, USA	STENGER & FRENCH, 2009
Iran	AF454458	Irã	RABENSTEIN et al., 2002
Mon96	AF511630	Montana, USA	STENGER & FRENCH, 2009
Sidney81	AF057533	Nebraska, USA	STENGER et al., 1998
TK1	AF454455	Turquia	RABENSTEIN et al., 2002
Type	AF285169	Kansas, USA	CHOI et al., 2001
WA94	FJ348358	Washington, USA	STENGER & FRENCH, 2009

### 3.6 Determinação da gama de hospedeiros

Dois isolados, 915 e 1256, que expressaram sintomas típicos de WSMV na detecção biológica, RT-PCR positivo para os

dois oligonucleotídeos testados e seqüências confirmadas de WSMV foram utilizados para a determinação da gama de hospedeiros.

As espécies testadas foram: *Chenopodium amaranthicolor* (L.), *Nicotiana tabacum* (L.), aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), cevada (*Hordeum vulgare* L.), milho (*Zea mays* L.), centeio (*Secale cereale* L. cv. BRS Serrano) três cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva e duas de triticales (× *Triticosecale* Witt.) BRS Saturno e BRS Ulisses.

Cada isolado foi inoculado via extrato vegetal tamponado (tampão fosfato de potássio 0,2M, pH 7 com celite) utilizando quatro repetições (vasos) e dois controles negativos (inoculado com tampão e não inoculado) para cada hospedeiro. As plantas foram mantidas em telado. Aos 15 dias após a inoculação (dpi) foram avaliadas quanto a manifestação dos sintomas sistêmicos e 20 dpi realizou-se RT-PCR para confirmar a presença do vírus.

Também foi realizada a reinoculação do agente patogênico a partir das plantas inoculadas com o isolado 915, exceto *Nicotiana tabacum*, para plantas de trigo (cv. BRS Guabiju). A reinfecção foi confirmada por RT-PCR.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Detecção sorológica

Os resultados dos testes sorológicos (DAS-ELISA) para as 293 amostras de folhas e colmos de diferentes espécies de gramíneas hospedeiras oriundas das coletas de campo foi inconclusivo. Apenas para as amostras oriundas de casa de vegetação foi possível o diagnóstico sorológico inequívoco. Amostras de casa de vegetação com sintomas de mosaico estriado e elevadas populações de *A. tosichella* apresentaram leituras de absorvância até 7 vezes superior ao controle negativo.

### 4.2 Detecção biológica

Das 463 amostras inoculadas em trigo (cv. BRS Guabiju) apenas a amostra 915 (utilizada como controle positivo nas inoculações) e outras duas amostras (912 e 1256), também oriundas de casa de vegetação, foram capazes de causar sintomas de mosaico estriado típico de WSMV nas plantas de trigo inoculadas. Inicialmente, observaram-se lesões cloróticas nas folhas mais jovens, evoluindo para estrias amarelas paralelas às nervuras das folhas e, posteriormente, mosaico estriado cobrindo grande parte da planta (Figura 7).

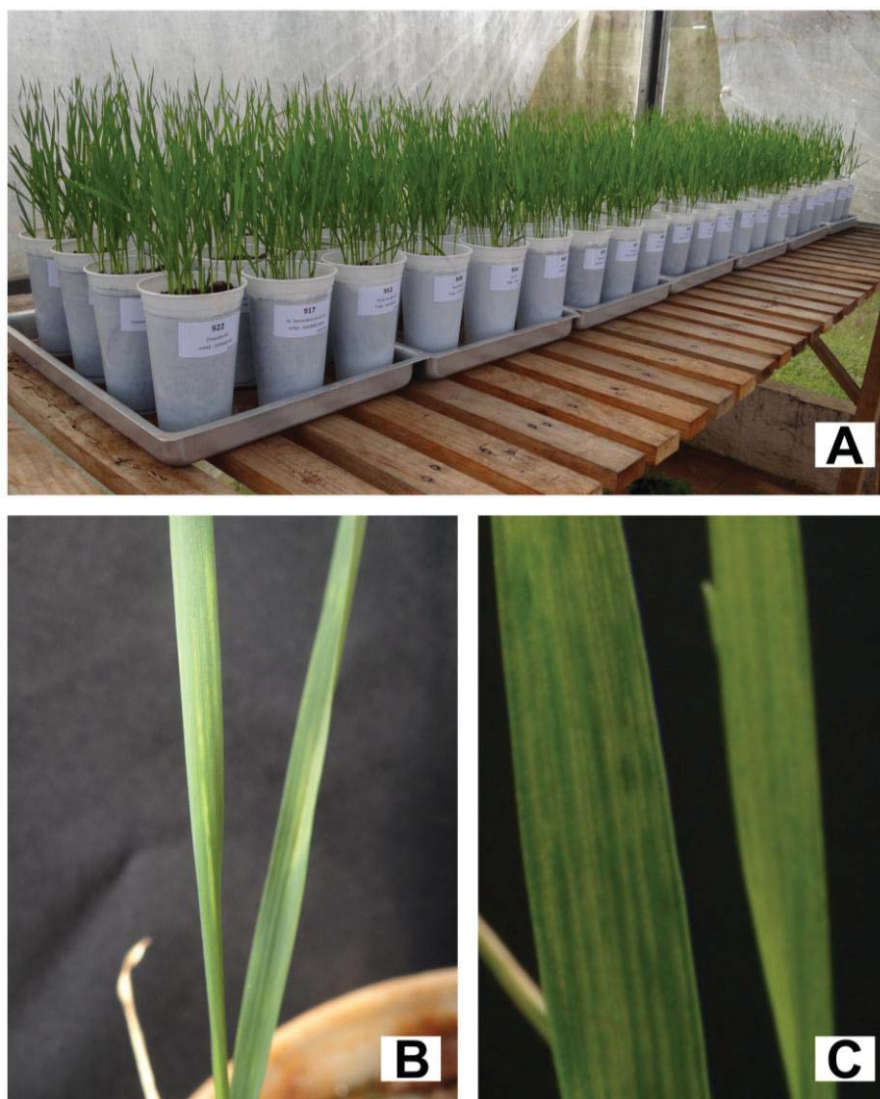


Figura 7 - Detecção biológica de WSMV por inoculação via extrato vegetal tamponado em plantas de trigo (cv. BRS Guabiju). A. Apresentação geral de um ensaio. B. Sintomas iniciais exibidos nas folhas jovens. C. Sintomas aos 15 dpi.

### 4.3 Detecção molecular

A amplificação do fragmento correspondente ao gene da actina comprovou a qualidade do RNA extraído (Figura 8).

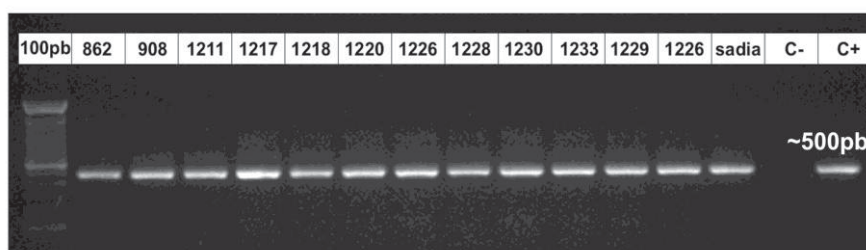


Figura 8 - Perfil eletroforético, dos fragmentos amplificados correspondentes ao gene da actina. Marcador 100pb. 13 amostras testadas, controle negativo e positivo.

Das 96 amostras testadas na detecção molecular, foi possível amplificar o fragmento de 948pb e/ou de 198pb para 25 amostras de trigo que apresentavam sintomas de mosaico (Tabela 4), dessas, 20 eram oriundas de campo e cinco de casa de vegetação. Apenas para as amostras oriundas de casa de vegetação (485, 486, 912, 915 e 1256) e três amostras coletadas em campo no município de Passo Fundo (911, 913 e 1254) foi possível obter bandas “intensas” para ambos os oligonucleotídeos testados. Outras 17 amostras oriundas de coletas de campo, que tiveram amplificação de bandas de “fraca” intensidade, foram consideradas suspeitas de infecção pelo WSMV. Para onze amostras só foi possível amplificar o fragmento de 198pb e para duas apenas o fragmento de 948pb (Tabela 4 e Figura 9).

Tabela 4 - Amostras submetidas a detecção de WSMV por meio de RT-PCR e que foram positivas para pelo menos uma região alvo.

<b>cod.</b>	<b>município</b>	<b>UF</b>	<b>data</b>	<b>hospedeiro</b>	<b><i>A. tosichella</i>*</b>	<b>sintomas**</b>	<b>948pb***</b>	<b>198pb</b>
485	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/10	trigo	+	En	+++	+++
486	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/10	trigo	+	Am; En	+++	NT
817	Alm. Tamarandá do Sul	RS	08/10	trigo	-	Mosaico	-	+
823	Palmeira das Missões	RS	08/10	trigo	-	Mosaico	-	+
826	Três de maio	RS	08/10	trigo	-	Mosaico	-	+
852	Ijuí	RS	08/10	trigo	-	Mosaico; Eb	-	+
862	Palmeira das Missões	RS	10/10	trigo	+	Mosaico	+	+
908	Panambi	RS	10/10	trigo	+	Mosaico	-	+
911	Passo Fundo	RS	10/10	trigo	NA	Mosaico	+++	+++
912	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	10/10	trigo	+	Mosaico	+++	+++
913	Passo Fundo	RS	10/10	trigo	NA	Mosaico	+++	+++
915	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/11	trigo	+	Am; En	+++	+++

continua

1213	Chapada	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	-	+
1220	Santa Rosa	RS	09/11	trigo	+	Mosaico	+	+
1223	Giruá	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	-	++
1227	São Miguel das Missões	RS	09/11	trigo	-	Am	-	+
1230	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	+	Am	-	+
1233	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	+	Mosaico	+	-
1234	Sto. Antônio das Missões	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	-	+
1239	Santiago	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	+	+
1241	Jóia	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	+	-
1244	São João Mirim	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	+	-
1245	Colina	RS	09/11	trigo	-	Mosaico	-	++
1254	Passo Fundo	RS	09/11	trigo	NA	Mosaico	+++	+++
1256	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	10/11	trigo	+	Mosaico	+++	+++

NA – Não avaliada; NT – Não testada

\* *A. tosicHELLa* – presença ou ausência do vetor na amostra analisada

\*\* Am=amarelecimento; En=enrolamento El=estrias longitudinais; Eb=estrias brancas; Ac=aneis concêntricos

\*\*\* Intensidade das bandas no gel: - (negativo); + (fraca); ++ (média); +++ (intensa)

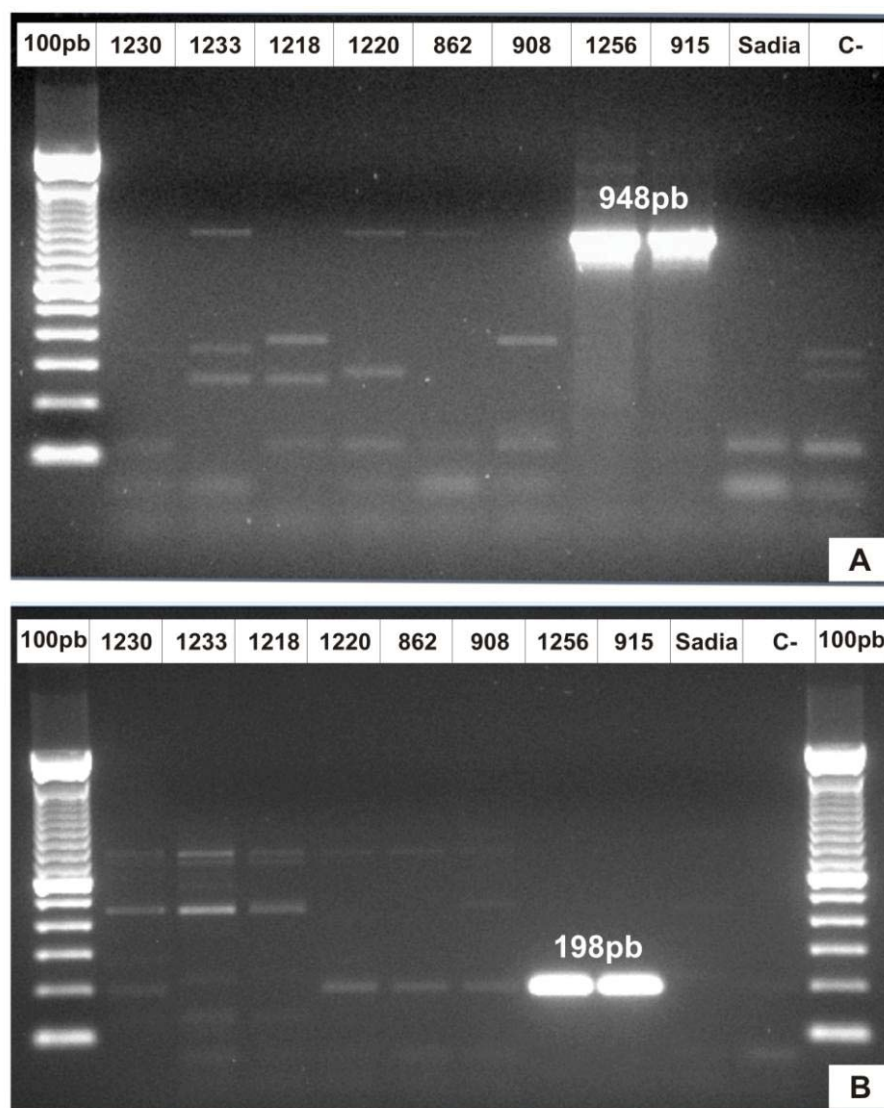


Figura 9 - Perfil eletroforético, em gel de agarose 1,5%, dos fragmentos de (A) 948pb amplificados com os oligonucleotídeos WSMV R/F e (B) 198pb com WSMV L2/R2. Marcador 100pb. Isolados testados, amostra de trigo sadia e controle negativo (c-).



Nove fragmentos de 948pb e dois de 198pb amplificados por RT-PCR foram clonados. Os 16 clones obtidos para a região COOH-terminal da poliproteína, onde está codificada a proteína capsidial (CP), quando submetidos a clivagem do produto de PCR geraram dois padrões distintos (Figura 10). Os 14 clones, que posteriormente foi possível confirmar por análise de similaridade que se tratavam de WSMV, apresentaram um sítio de restrição, clivando o fragmento de 948pb em dois fragmentos de aproximadamente 200 e 750pb. Duas amostras, oriundas de campo coletadas nos municípios de Santiago (1239) e São João Mirim (1244) apresentaram dois sítios de restrição, originando bandas com tamanhos aproximados de 200, 300 e 500pb. Essas amostras, após sequenciamento dos fragmentos amplificados, apresentaram similaridade com o hospedeiro e não com o vírus.

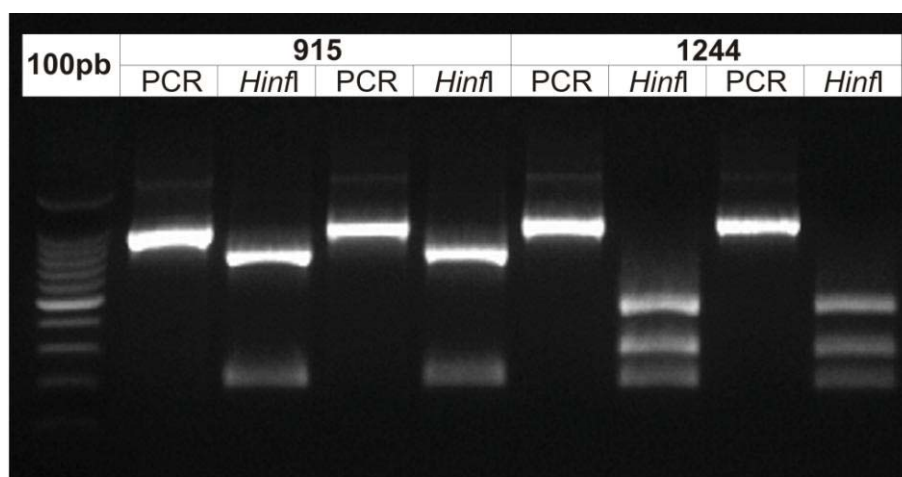


Figura 10 - Análise de restrição com a enzima *HinfI* dos fragmentos de 948pb amplificados com os primers WSMV R / WSMV F, das amostras 915 e 1244.

#### 4.4 Análise filogenética

As sequências das amostras que apresentaram diferenças no padrão de restrição, quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank, apresentaram 99% de similaridade com um receptor proteína-quinase e DNA mitocondrial de trigo e foram excluídas da análise. Quatro clones que apresentaram sequência de baixa qualidade ou que não foi possível traduzir *in silico* a sequência de 316 aminoácidos da região da proteína capsial também foram excluídos da análise.

Através da sequência de nucleotídeos da região COOH-terminal da poliproteína onde está codificada a proteína capsial (CP) e da região VPg-N1a foi possível identificar como WSMV quatro isolados oriundos de casa de vegetação (486, 912, 915 e 1256) e quatro isolados de amostras de campo coletadas nos municípios de São Luiz Gonzaga (1233), Jóia (1241) e Passo Fundo (1254 e 913). Independentemente da região sequenciada ou localidade da coleta, os isolados brasileiros apresentaram 99% de similaridade com o isolado Arg2 (FJ348359) da Argentina, diferindo entre 1 a 9 nucleotídeos para os isolados de casa de vegetação e entre 9 a 13 para os isolados oriundos do campo (Tabela 5).

Quando comparados entre si, os isolados brasileiros apresentaram 99% de similaridade, diferindo em no máximo 8 nucleotídeos nas sequências da região COOH-terminal da poliproteína. Entre clones de um mesmo isolado houve diferenças de 1 a 5 nucleotídeos, exceto para o clone 146 do isolado 1256, que apresentou uma deleção de 37 aminoácidos entre os nucleotídeos 121 e

158 e um fragmento de tamanho total de 911pb, diferindo em 6 nucleotídeos do clone 146 do mesmo isolado.

Os isolados oriundos de casa de vegetação diferiram entre si em 1 a 4 nucleotídeos e entre os isolados oriundos de campo, observou-se diferenças entre 4 a 6 nucleotídeos. Quando comparados os isolados oriundos de casa de vegetação e campo, as diferenças são de 1 até 8 nucleotídeos.

Tabela 5 - Comparação entre as sequencias de nucleotídeos dos isolados brasileiros seqüenciados e o isolado Arg2 (FJ348359) da Argentina

isolado (clone)	localidade	região seqüenciada	similaridade	identidade
486 (150)	Casa de Vegetação	CP	99%	938/947
912 (148)	Casa de Vegetação	CP	99%	938/947
915 (142)	Casa de Vegetação	CP	99%	938/947
915 (143)	Casa de Vegetação	CP	99%	939/947
1233 (140)	São Luiz Gonzaga	CP	99%	934/947
1241 (132)	Jóia	CP	99%	938/947
1254 (137)	Passo Fundo	CP	99%	935/947
1254 (138)	Passo Fundo	CP	99%	936/947
1256 (146)	Casa de Vegetação	CP	99%	794/796
1256 (147)	Casa de Vegetação	CP	99%	934/947
912 (119)	Casa de Vegetação	VPg-NIa	99%	196/198
912 (120)	Casa de Vegetação	VPg-NIa	99%	196/198
913 (121)	Passo Fundo	VPg-NIa	99%	197/198

Quando comparados com sequencias depositadas no GeneBank, as sequencias de nucleotídeos da região COOH-terminal da poliproteína dos isolados brasileiros apresentaram entre 99% a 97%

de similaridade com isolados oriundos da região Noroeste Pacífico Americana (APNW - *American Pacific Northwest*) dos Estados Unidos e outras espécies da América do Norte e Turquia. Diferiram em 8% da sequência do isolado do Irã e entre 9 a 10% do isolado Czech da República Checa (Tabela 6 e 11).

Tabela 6 - Análise de similaridade da sequência de nucleotídeos da proteína capsial (COOH-terminal da poliproteína) dos isolados brasileiros.

isolado (clone)	486 (150)	912 (148)	915 (142)	915 (143)	1233 (140)	1241 (132)	1254 (137)	1254 (138)	1256 (147)
486 (150)	-								
912 (148)	99%	-							
915 (142)	99%	99%	-						
915 (143)	99%	99%	99%	-					
1233 (140)	99%	99%	99%	99%	-				
1241 (132)	99%	99%	99%	99%	99%	-			
1254 (137)	99%	99%	99%	99%	99%	99%	-		
1254 (138)	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	-	
1256 (147)	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	-
Arg2	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%	99%
WA94	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	98%
ID96	98%	98%	98%	99%	98%	98%	98%	98%	98%
MON96	98%	98%	98%	98%	97%	98%	97%	97%	97%
Type	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
H95S	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
H98	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
ID99	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
Sidney 81	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
TK 1	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%	97%
Irã	92%	92%	92%	92%	92%	92%	92%	92%	92%
Czech	91%	90%	91%	91%	90%	91%	90%	90%	91%

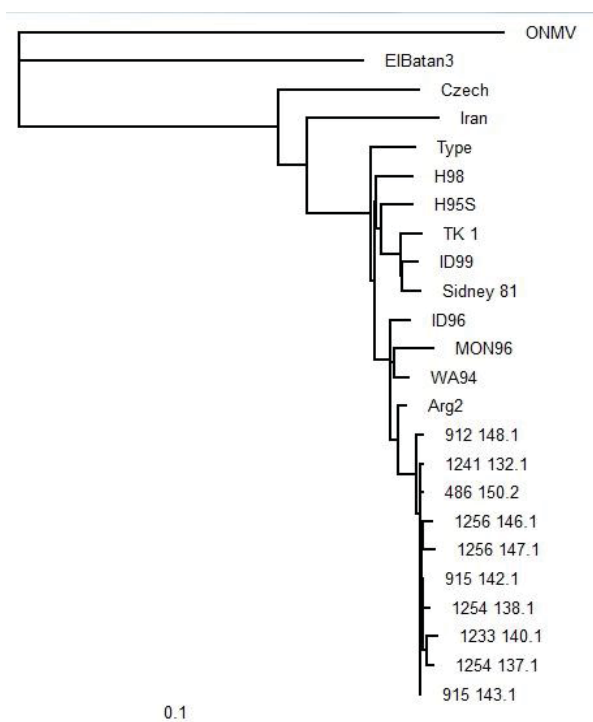


Figura 11 - Árvore filogenética construída para sequência de nucleotídeos de um fragmento da região COOH-terminal da poliproteína, onde está codificada a proteína capsial, de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. São isolados oriundos do Brasil: 486, 912, 915 e 1256 coletados em casa de vegetação e 1233 coletado no municípios de São Luiz Gonzaga, 1241 em Jóia, 1254 e 913 em Passo Fundo.

As sequencias da região VPg-NIa quando comparadas entre si apresentaram 100% de similaridade entre clones e variaram em um nucleotídeo entre o isolado oriundo de casa de vegetação e campo. Quando comparados com as sequencias de outras localidades, apresentaram entre 96% a 98% de similaridade com isolados pertencentes ao clado D, diferindo em no máximo 8 nucleotídeos (Figura 12).

A sequência de 948pb foi traduzida em uma sequência de 316 aminoácidos e foi construída uma árvore filogenética (Figura 13). O clone 146 do isolado 1256 foi excluído da comparação entre as sequências de aminoácidos uma vez que a deleção alterou a ordem da fase aberta de leitura comprometendo a tradução da proteína.

Os isolados brasileiros apresentaram entre 98 a 100% de similaridade quando comparados entre si, diferindo em no máximo 5 aminoácidos. As sequências de aminoácidos entre os clones do isolado 915, oriundo de casa de vegetação, apresentaram 100% de similaridade entre si, e os clones do isolado 1254, oriundo de campo, diferiram em 3 aminoácidos. Entre os isolados oriundos de casa de vegetação, ocorreram diferenças entre 1 a 3 aminoácidos e para os oriundos de campo a maior diferença foi de 5 aminoácidos entre o isolado de Passo Fundo (1254) e de São Luiz Gonzaga (1233). O isolado oriundo de Jóia (1241) apresentou 100% de similaridade com o 915. Quando comparados com as sequencias de outras localidades, apresentaram-se intimamente relacionadas (de 98 a 100% de similaridade) com os isolados pertencentes ao clado D.

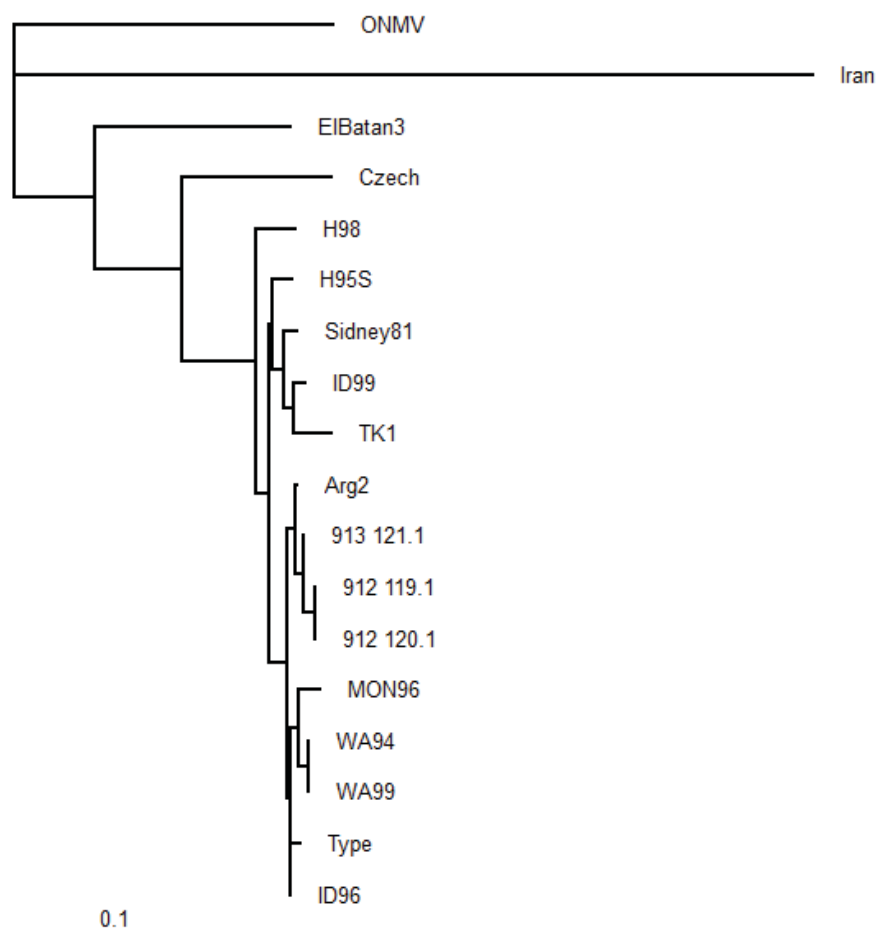


Figura 12 - Árvore filogenética construída para sequência de nucleotídeos de um fragmento do gene VPg-NIa de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. 912 e 913 são isolados oriundos de Passo Fundo – RS (Brasil).

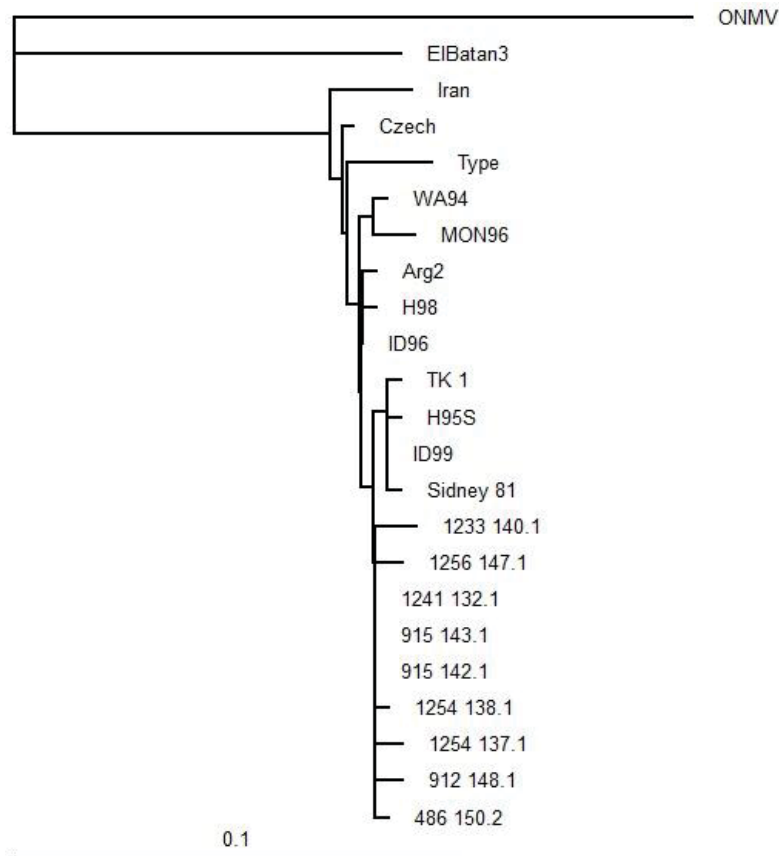


Figura 13 - Árvore filogenética construída para a sequência de aminoácidos da região COOH-terminal da poliproteína (CP) de WSMV utilizando método “neighbor-joining” baseada em 1000 bootstrap e enraizada com sequência de *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) como grupo externo. Comprimento dos ramos proporcional a distância genética; comprimento da barra de escala corresponde a distância genética de 0,1. São isolados brasileiros: 486, 912, 915 e 1256 coletados em casa de vegetação e 1233 coletado no município de São Luiz Gonzaga, 1241 em Jóia, 1254 e 913 em Passo Fundo.



#### 4.5 Gama de hospedeiro

As plantas de *Chenopodium amaranthicolor*, *Nicotiana tabacum* e aveia preta inoculadas com os isolados 915 e 1256 não exibiram sintomas (Tabela 7).

Tabela 7 - Tipo e frequência de sintomas por hospedeiros inoculados com dois isolados de WSMV

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

M = mosaico; LN = lesão necrótica

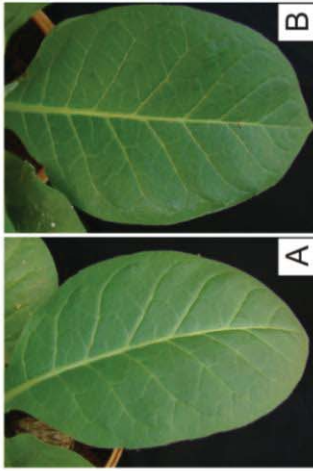
A cevada, o trigo, o centeio, o triticale e o milho independentemente da cultivar exibiram sintomas quando inoculados com pelo menos um dos isolados, ocorrendo variação na expressão dos sintomas entre os dois isolados testados. Nas plantas inoculadas com o isolado 915 os sintomas de mosaico foram observados mais precocemente, sendo mais severos que os observados para o 1256, as estrias longitudinais apresentaram-se em coloração mais intensa, em maior número e mais agrupadas, cobrindo uma parte maior nas folhas.

Nas plantas de trigo e triticales inoculadas, os sintomas apareceram mais precocemente e em maior frequência do que nos outros hospedeiros. As três cultivares de trigo exibiram sintomas em todas as plantas inoculadas. Inicialmente foram observadas pequenas lesões cloróticas nas folhas mais jovens, que evoluíram para estrias amarelas paralelas as nervuras cobrindo grande parte da folha e posteriormente se fundiram formando um padrão de estrias amarelas e verdes em linhas descontínuas, típico de mosaico, distribuindo-se por toda a planta (Figura 14). A intensidade e distribuição do mosaico nas plantas variou entre as cultivares. Na cv. BRS Guabiju as estrias apresentaram-se mais intensas formando um padrão de mosaico estriado distribuído por grande parte das folhas de cada planta inoculada. Os sintomas foram mais brandos e menos evidentes na cv. Embrapa 16 e ainda mais brandos na cv. BRS Timbaúva.

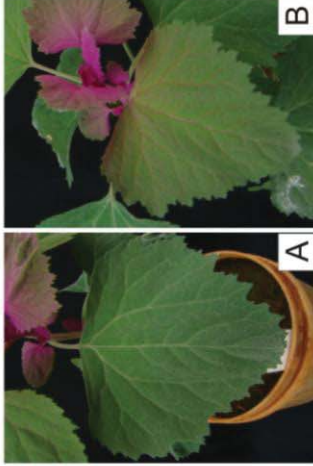
A cevada e o centeio (cv. BRS Serrano) apresentaram lesões cloróticas nas folhas jovens semelhantes as plantas de trigo, porém em menor frequência e mais tardiamente. No centeio as lesões nas folhas mais jovens apresentaram-se mais amplas e difusas. Em ambos os hospedeiros, as estrias evoluíram para um padrão de mosaico suave, com poucas estrias e em menor tamanho, distribuído em poucas folhas de cada planta inoculada.

No milho, apenas quando inoculado com o isolado 915 foi possível observar sintomas. Duas das 14 plantas inoculadas exibiram estrias brancas paralelas as nervuras, no padrão de mosaico, próximas a base das folhas mais jovens.

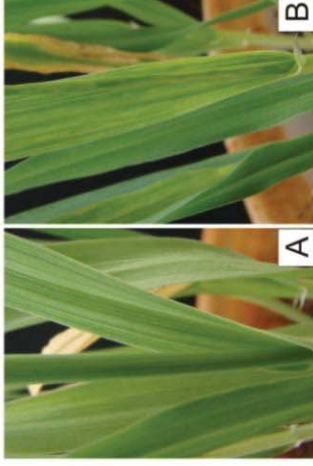
*Nicotiana tabacum*



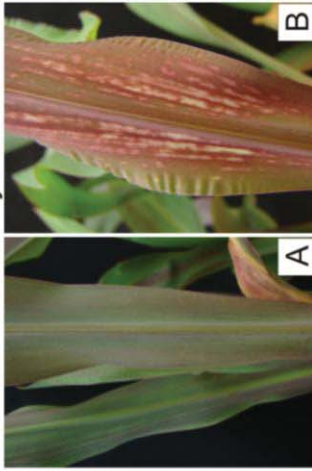
*Chenopodium amaranticolor*



*Hordeum vulgare*



*Zea mays*



*Secale cereale* cv. BRS Serrano



*Avena strigosa*



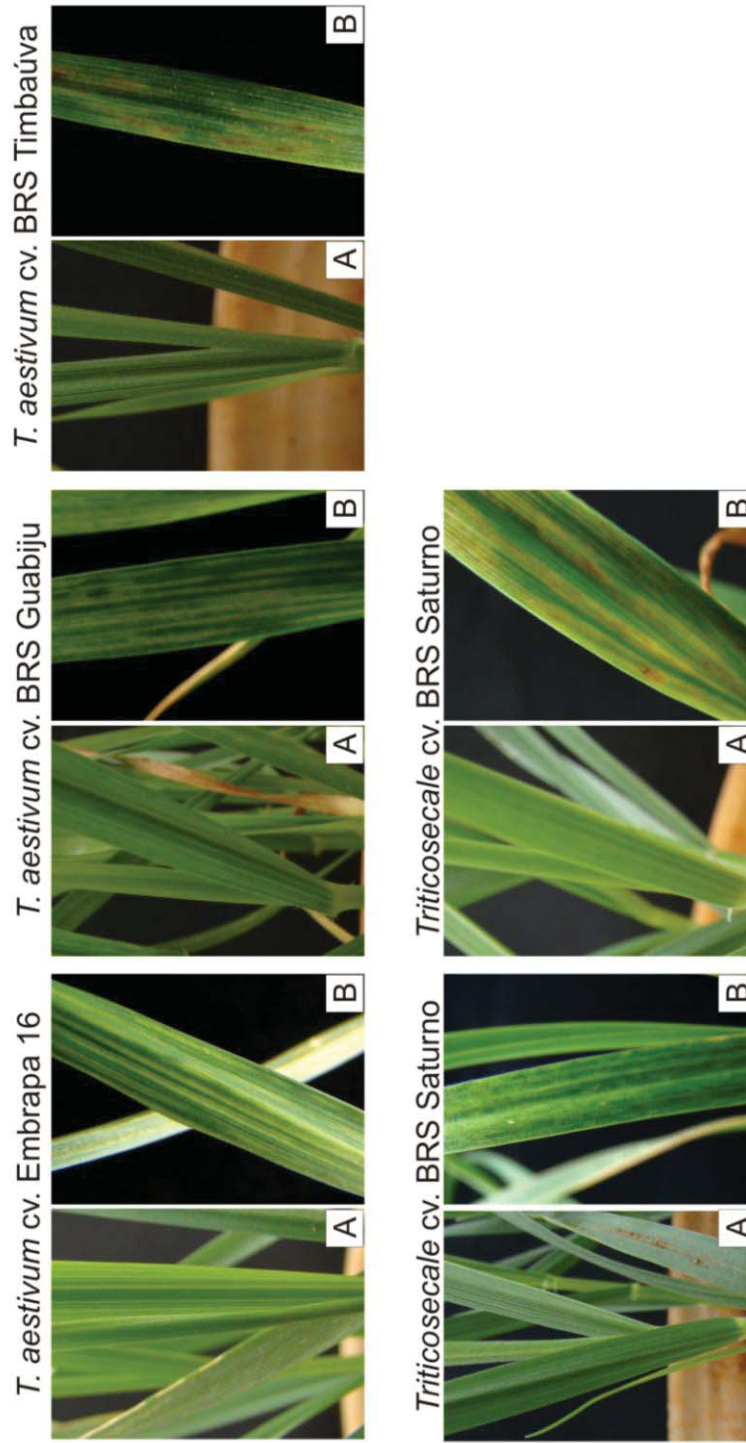


Figura 14 - Sintomas causados por WSMV nas espécies testadas na determinação da gama de hospedeiros. Controle (A) e inoculada (B).

No triticale observou-se grande variação no tipo de sintoma entre as duas cultivares testadas. A cultivar BRS Saturno inoculada com ambos os isolados apresentou em média 44% das plantas inoculadas com sintomas. As estrias apresentaram-se finas e em menor tamanho, cobrindo grande parte das folhas, semelhante ao padrão de mosqueado (Figura 15B). Em 95% das plantas de BRS Ulisses inoculadas com o isolado 1256 observaram-se sintomas semelhantes aos descritos para a cultivar BRS Saturno, porém as estrias apresentaram-se de maneira mais suave, em menor densidade e em poucas folhas de cada planta. Enquanto que quando inoculada com o isolado 915, a cultivar BRS Ulisses exibiu lesões necróticas sistêmicas em todas as plantas (Figura 15A). As lesões apresentam-se alongadas e circundadas por um bordo amarelo com halo interior e exterior cor de palha, distribuindo-se uniformemente por todas as folhas de cada planta.

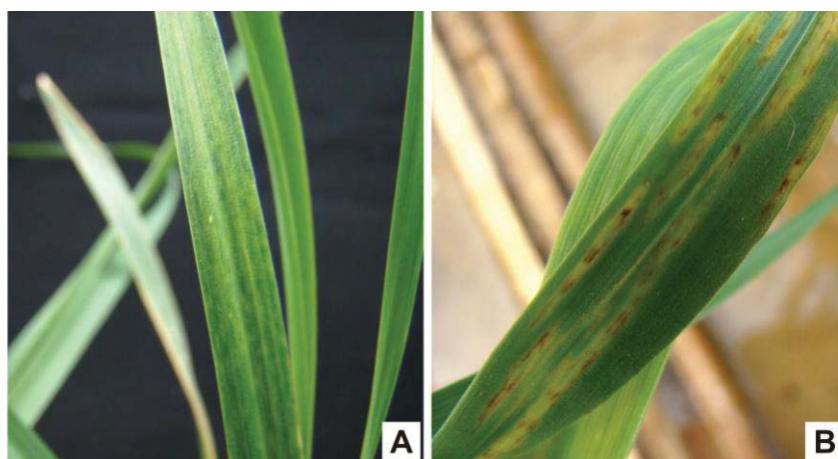


Figura 15 - Comparação entre os sintomas induzidos pelo isolado 915 nas folhas de triticale. Mosaico na cv. BRS Saturno (A) e lesões necróticas na cv. BRS Ulisses (B).

Para todas as plantas que apresentaram sintomas e também para o milho, inoculado com o isolado 1256, e a aveia, foi possível amplificar o fragmento de 948bp da região COOH-terminal da poliproteína (CP), confirmado infecção sistêmica pelo WSMV nessas espécies (Figura 16).

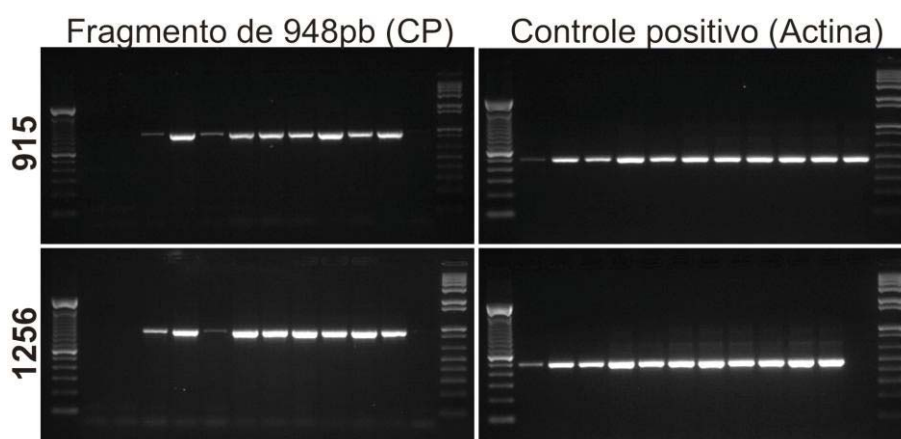


Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% das espécies testadas na determinação da gama de hospedeiros inoculadas com os isolados 915, 1256 e controle negativo não inoculado. Ordem do gel: Marcador 100 pb, *Chenopodium amaranthicolor*, *Nicotiana tabacum*, aveia preta (*Avena strigosa*), cevada (*Hordeum vulgare*), milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum* cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva) centeio (*Secale cereale* cv. BRS Serrano), triticale ( $\times$  *Triticosecale* cv. BRS Saturno e BRS Ulisses), controle negativo da reação e marcador 1 Kb.

Foi possível observar sintomas de mosaico e amplificar o fragmento de 948bp da região COOH-terminal da poliproteína (CP) para os trigos (cv. BRS Guabiju) re-inoculados a partir de extrato vegetal tamponado das plantas de aveia (sintomas e banda de fraca intensidade), cevada, trigo (cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva) centeio (cv. BRS Serrano) e triticales (cv. BRS Saturno e BRS Ulisses) inoculadas com o isolado 915, confirmando a infecção viral. A partir do milho infectado, não foi possível re-transmitir o isolado para o trigo.

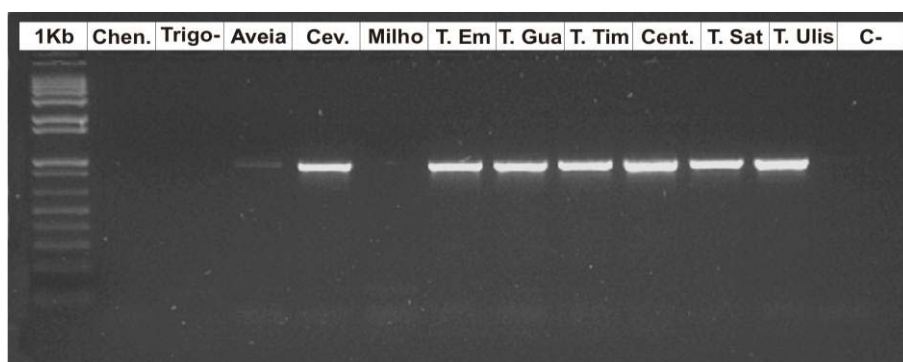


Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% do fragmento de 948pb amplificado de trigo (cv. BRS Guabiju) re-inoculado a partir das plantas inoculadas com o isolado 915 na determinação da gama de hospedeiros. Ordem do gel: Chen. *C. amaranthicolor*; Trigo-. trigo controle negativo; Aveia; Cev. cevada; Milho; T. em. trigo cv. Embrapa 16; T. gua. trigo cv. BRS Guabiju; T.Tim. trigo cv. BRS Timbaúva; Cent. centeio; T. Sat. triticales cv. BRS Saturno; T. Ulis. triticales cv. BRS Ulisses e c-. controle negativo da reação.

## 5 DISCUSSÃO

A ocorrência *Wheat streak mosaic virus* em regiões produtoras de trigo do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul foi investigada utilizando testes sorológicos e biológicos. Para as amostras coletadas nas regiões de ocorrência do ácaro vetor *A. tosichella*, foram aplicados também testes moleculares que permitiram a identificação de oito isolados, caracterizados por métodos moleculares e biológicos.

Por sorologia foi possível identificar a presença de WSMV apenas em plantas crescidas em casa de vegetação do CNPT, nas quais se observavam fortes sintomas de mosaico, enrolamento nas folhas típico de infestações pelo ácaro (SOMSEN & SILL, 1970; HANDRAPATYA, 1986; HARVEY et al., 2002) e altas populações do vetor. Os testes sorológicos realizados a partir de folhas e colmos de diferentes espécies de plantas coletadas em campo foram inconclusivos, com variação nas leituras que poderiam ser atribuídas a reação cruzada.

A fim de uniformizar as análises, as amostras de campo das diferentes espécies foram inoculadas em BRS Guabiju, uma cultivar de trigo suscetível que exibe sintomas evidentes de mosaico estriado. De um total de 473 amostras inoculadas, apenas para as amostras de casa de vegetação, em que a infecção já havia sido confirmada, foi possível reproduzir os sintomas no hospedeiro suscetível e realizar a confirmação de que se tratava de WSMV por sorologia. Na Austrália, o WSMV também foi detectado pela primeira vez em germoplasma de trigo plantados em casa de vegetação (ELLIS



et al., 2003b) onde as condições de temperatura (calor) e umidade são favoráveis ao desenvolvimento do vetor (COUTTS et al. 2008b; SOMSEN & SILL 1970).

Embora a partir de amostras de campo não tenha sido possível reproduzir sintomas via inoculação por extrato vegetal tamponado e o DAS-ELISA dos trigos inoculados tenha sido negativo, a ocorrência de WSMV foi investigada através de testes moleculares (RT-PCR) para 91 amostras coletadas em campo, principalmente trigo que é o principal hospedeiro (MCKINNEY, 1949; SLYKHUIS, 1955; BRAKKE, 1971; STYLER & NAULT, 1996; COUTTS et al., 2008b), com sintoma de mosaico, coletado próximo ou nas regiões onde a presença do ácaro vetor *Aceria tosichella* foi confirmada (PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012).

Considerando o total de plantas analisadas, os métodos biológico e o sorológico foram capazes de detectar o vírus apenas para os isolados expostos a grandes populações do ácaro vetor. Resultados diferentes dos obtidos através da detecção molecular, onde foi possível amplificação positiva para 25 amostras de trigo com sintomas de mosaico. Desses 20 eram oriundos de amostras de campo e 5 eram isolados de casa de vegetação, detectados anteriormente por sorologia. Todas as amostras de campo, exceto as oriundas de coletas no município de Passo Fundo, apresentaram um padrão de bandas, em gel de agarose, de fraca intensidade.

Embora a distribuição do *A. tosichella* no Brasil, desde a sua detecção em 2006, tenha ampliado, até o momento as populações encontradas no campo são pequenas (PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012). É possível que a dificuldade na detecção do

WSMV em condições de campo no Brasil se deva a baixa população do vetor. Proporcionalmente a população do vetor, o título viral nas plantas coletadas no campo pode estar baixo, possivelmente abaixo do limiar passível de detecção por sorologia ou por inoculação mecânica, mas suficiente para ser detectado por RT-PCR. As diferenças de intensidade nas bandas, entre isolados de casa de vegetação e campo, reforçam esta hipótese.

Embora em dois casos as sequências amplificadas a partir das amostras em análise tenham sido derivadas do hospedeiro (uma proteína-quinase e DNA mitocondrial de trigo), o que indica que na ausência de RNA viral, nas condições de PCR utilizadas, pode haver ampliações inespecíficas, o conjunto de evidências hospedeiro, sintoma, amplificação positiva para ambos os oligonucleotídeos e a presença do ácaro na amostra testada permite supor que, além dos isolados cuja comparação de sequências permitiu confirmar a presença de WSMV, as amostras de Palmeira das Missões (862) e Santa Rosa (1220) possivelmente também estivessem infectadas pelo vírus.

É possível que as amostras com sintomas de mosaico cujo o agente etiológico não foi identificado estivessem infectadas pelo *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) e/ou *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV) que são vírus transmitidos por *Polymyxa graminis* (KANYUKA et al., 2003) e ocorrem comumente no Brasil também causando sintomas de mosaico em trigo (CAETANO, 1982; SCHONS et al., 2011).

Através das sequências de nucleotídeos, foi possível identificar oito isolados de WSMV, sendo quatro oriundos de casa de vegetação e quatro de amostras de campo. As maiores divergências

entre o genoma do WSMV e membros da família *Potyviridae*, estão localizadas na CP (NIBLETT et al., 1991; CHOI et al., 2000), uma das regiões onde as substituições de nucleotídeos entre os isolados ocorrem (CHOI et al., 2001; HALL et al., 2001b). Foi demonstrado que a comparação entre a região da CP estimam as relações de maneira tão consistente quanto as baseadas nas sequências completas de *Tritimovirus* (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER & FRENCH, 2009). As sequências da região COOH-terminal da poliproteína onde está codificada a proteína capsidial (CP) (NIBLETT et al., 1991) dos oito isolados brasileiros foram comparadas com 13 isolados de *Tritimovirus* depositados no GeneBank e um isolado de ONMV mais estreitamente relacionado com as espécies de WSMV (STENGER & FRENCH, 2004a). As sequências de nucleotídeos da região da CP e região VPg-N1a e as sequências de aminoácidos da região da CP dos isolados brasileiros de WSMV apresentaram alta similaridade entre si, sendo que o mais divergente foi o isolado oriundo de São Luiz Gonzaga (1233). Os isolados brasileiros estão estreitamente relacionados ao isolado Arg2 oriundo da Argentina, onde a presença do vírus foi relatada recentemente (TRUOL et al., 2004). Este fato permite inferir que o vírus foi introduzido no Brasil recentemente em uma introdução independente a partir de uma fonte comum (por sementes) e/ou por migração direta da Argentina, através do vetor.

Assim como os isolados provenientes da Argentina, os isolados brasileiros pertencem ao clado D que inclui as espécies da América do Norte, dois isolados da Turquia, os isolados Australianos e da Nova Zelândia (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002; ELLIS et al., 2003a,b; TROUL et al., 2004; DWYER et al.,

2007; LEBAS et al., 2009; STENGER & FRENCH, 2009). Diferindo em 8% da sequência do isolado oriundo do Irã, representante do clado C (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002) que difere em 8% do clado D (STENGER & FRENCH, 2009). E entre 9 a 10% do isolado Czech oriundo da República Checa que representa os isolados provenientes da Europa central e Rússia que abrangem o clado B (RABENSTEIN et al., 2002; STENGER et al., 2002) que diferem em 10% das sequências de nucleotídeos dos cladros C e D (STENGER & FRENCH, 2009).

O WSMV é capaz de infectar várias espécies de Poaceas (OLDFIELD & PROESELER, 1996) e nenhuma espécie eudicotiledônea (BRAKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001). Nenhuma das eudicotiledôneas inoculadas com os isolados brasileiros foram infectadas.

Dentre as Poaceae, o trigo é o principal hospedeiro (OLDFIELD, 1970; BRAKKE, 1971; CHRISTIAN & WILLIS, 1993; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001; ELLIS et al., 2003a,b; KAPOORIA & NDUNGURU, 2004). Mas também pode ocorrer em centeio, aveia, cevada (OLDFIELD, 1970; BRAKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001), triticales (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001) e algumas variedades de milho (BRAKKE, 1971; MARÇON et al., 1997). Os isolados brasileiros foram capazes de infectar trigo, cevada, aveia, centeio, triticales e pelo menos um dos isolados infectou o milho, embora a frequência de infecção e os títulos virais tenham sido baixos.

Nas plantas inoculadas com o isolado 915 os sintomas foram mais visíveis em todas as espécies quando comparados com os

sintomas expressos nas plantas inoculadas com o isolado 1256. Um dos clones do isolado 1256 apresentou uma deleção de 37 aminoácidos na região NH<sub>2</sub>-terminal da proteína capsidial, que está envolvida com especificidade de hospedeiro e movimento a longa distância (TATINENI et al., 2011). É possível que a deleção tenha alterado a ordem da fase aberta de leitura comprometendo a tradução da poliproteína que mesmo truncada pode permanecer competindo por sítios na célula atenuando os sintomas. Este fenômeno é conhecido como transdominância negativa, muito estudado em algumas relações vírus-hospedeiro (BRUNETTI et al., 2001) e poderia estar acontecendo neste caso.

O trigo quando infectado inicialmente exibe listras verdes paralelas as nervuras das folhas mais jovens, evoluindo para mosaico em toda a planta (STYLER & NAULT, 1996; MARTIN, 1978). Esses sintomas foram observados em todas as cultivares de trigo testadas, sendo mais intensos na cultivar BRS Guabiju do que na cv. Embrapa 16 e BRS Timbaúva respectivamente, indicando diferenças na resposta a infecção entre essas cultivares.

Apenas o trigo e o triticle expressaram sintomas de mosaico entre 6 a 8 dias após a inoculação conforme descrito na literatura (STYLER & NAULT, 1996). Sintomas similares aos expressos em trigo, embora em menor frequência e mais tardiamente, foram observados na cevada e no centeio que também são descritos como hospedeiros (OLDFIELD, 1970; BRAKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001). A expressão dos sintomas pode ser influenciada pelas condições ambientais (MARTIN et al., 1984; COUTTS et al., 2008a).

Sintomas necróticos já foram observados em trigo (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004; ELLIS et al., 2003; CHRISTIAN & WILLIS, 1993) em plantas severamente afetadas (STYLER & NAULT, 1996; MARTIN, 1978), aveia, cevada (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001), sorgo, *Digitaria milangiana* (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004), *Rottboellia cochinchinensis* e *Setaria verticillata* (KAPOORIA & NDUNGURU, 2004; ELLIS et al., 2004). Dentre as plantas testadas, na avaliação até 15 dpi, apenas o triticale cv. BRS Ulisses apresentou sintomas necróticos.

A aveia branca (*Avena sativa*) quando infectada exibe estrias finas que podem se tornar necróticas (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001). No presente trabalho, a cultivar de aveia preta (*Avena strigosa*) empregada não manifestou sintomas, porém foi hospedeira do vírus posto, que foi possível detectar RNA viral na planta inoculada. Em conjunto, a ausência de sintomas e a fraca intensidade da banda amplificada sugerem que pelo menos a cultivar analisada não é uma boa hospedeira.

Algumas variedades de milho são descritas como hospedeiras do WSMV (BRÄKKE, 1971; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001). Alguns autores consideram o milho como um hospedeiro suscetível (HOW, 1963) ou imune (LANE & SKOPP, 1983). Porém já foi demonstrado que existe variação entre as linhagens de milho na resposta a infecção pelo WSMV (MARÇON et al., 1997). No presente ensaio, os sintomas em milho foram vistos em baixa frequência e a intensidade de amplificação do RNA viral também foi baixa. Ainda, testes de re-inoculação a partir de plantas de milho para trigo não foram bem sucedidos. Assim, a luz do que já foi observado por outros

autores (SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2001) é possível que o híbrido de milho utilizado não seja um bom hospedeiro, o que não exclui a possibilidade de outras cultivares serem boas multiplicadoras e suscetíveis aos isolados presentes no Brasil

Do ponto de vista epidemiológico, o fato do híbrido de milho e a cultivar de aveia testados não serem bons hospedeiros é importante, pois ambos são hospedeiros que atuam como ponte verde para a cultura do trigo (THOMAS & HEIN, 2003; JIANG et al., 2005; COUTTS et al., 2008b).

A variação observada na severidade e frequência dos sintomas entre as cultivares de trigo e triticales testadas indica que há variação na interação entre vírus e hospedeiro. Este fato abre a possibilidade do uso da resistência genética como ferramenta de manejo para este patossistema. Contrariamente, pode ser preocupante que em uma população viral recentemente introduzida e bastante homogênea sejam observadas intensas reações diferenciais com seus hospedeiros, pois pode indicar que pequenas mutações na população viral também poderão conferir habilidade de quebra rápida da resistência.

## 6 CONCLUSÕES

- a) Os resultados confirmaram a presença do *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) em regiões produtoras de trigo no Brasil;
- b) A técnica de PCR é mais eficiente quando comparada com os métodos biológicos e sorológicos na detecção do WSMV em amostras de campo.
- c) Os isolados brasileiros são muito próximos entre si, pertencem ao clado D e estão intimamente relacionados ao isolado Argentino Arg2 (FJ348359). Podem ter sido introduzidos a partir de um fonte comum e/ou por migração direta da Argentina.
- d) Os isolados brasileiros causam mosaico no trigo (*Triticum aestivum* cv. Embrapa 16, BRS Guabiju e BRS Timbaúva), cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale* cv. BRS Serrano), triticale ( $\times$  *Triticosecale* cv. BRS Saturno e BRS Ulisses) e milho (*Zea mays*) e são capazes de infectar a aveia (*Avena strigosa*);
- e) A reação diferencial das cultivares indica que há variação na interação vírus hospedeiro que pode ser explorada para seleção de genótipos mais resistentes/tolerantes.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BEAUDOIN, F. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p. 471-487, 2005.

ACHON, M. A.; SERRANO, L. First Detection of *Wheat dwarf virus* in Barley in Spain Associated with an Outbreak of *Barley yellow dwarf*. *Disease Notes*, v. 90, n. 7, p. 970, 2006.

ALLISON, R.; JOHNSTON, R.; DOUGHERTY, W. The nucleotide sequence of the coding region of *Tobacco etch virus* genomic RNA: Evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology*, v. 154, n. 1, p. 9-20, 1986.

ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, G. J.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, A. C.; SMITH, T. H.; VANCE, V. B. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 95, p. 13079-13084, 1998.

ARBATOVA, J.; LEHTO, K.; PEHU, E.; PEHU, T. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2319-2323, 1998.

ATREYA, P. L.; ATREYA, C. D.; PIRONE, T. P. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 88, p. 7887-7891, 1991.

ATREYA, C. D.; ATREYA, P. L.; THORNBURY, D. W.; PIRONE, T. P. Site-directed mutations in the Potyvirus HC-PRO gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology*, v. 191, p. 106-111, 1992.

ATREYA, P. L.; LOPEZ-MOYA, J. J.; CHU, M.; ATREYA, C. D.; PIRONE, T. P. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in *Potyvirus* transmission by aphids. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 265-270, 1995.

ATREYA, C. D.; PIRONE, T. P. Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a Potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 90, p.11919-11923, 1993.

BOWEN, K. L.; MURPHY, J. F.; FLANDERS, K. L.; MASK, P. L.; LI, R. Incidence of viruses infecting winter wheat in Alabama. *Plant Disease*, v.87, p. 288-293, 2003.

BRAKKE, M. K.; BALL, E. M.; HSU, Y. H.; LANGENBERG, W. G. Wheat Streak Mosaic Virus Cylindrical Inclusion Body Protein. *Journal of General Virology*, v. 68, p. 281-287, 1987.

BRAKKE, M. K. Virus disease in wheat. In: HEYNE, E. G. (Ed.). *Wheat and wheat improvement*. 2 ed. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 1987. p. 585–603.

\_\_\_\_\_. *Wheat streak mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, N. 48. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists, 1971. Disponível em: <<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=48>>. Acesso em: 26 abril 2011.

BREMER, K. *Wheat streak mosaic virus* in Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, v. 10, p. 280-82, 1971.

BRUNETTI, A.; TAVAZZA, R.; NORIS, E.; LUCIOLI, A.; ACCOTTO, G. P.; TAVAZZA, M. Transgenically Expressed T-Rep of Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus Acts as a *trans-Dominant-Negative* Mutant, Inhibiting Viral Transcription and Replication. *Journal of Virology*, v.75, n.22, 2001.

CAETANO, V. R. Mosaico do trigo transmitido pelo solo "*Wheat soilborne mosaic virus*" Tobamovirus. In: Osório, E.A. (Ed.) Fundação Cargill. Trigo no Brasil. Campinas, v.2, p.563-570, 1982.

CARRINGTON, J. C.; CARY, S. M.; PARKS, T. D.; DOUGHERTY, W. G. A second proteinase encoded by a plant Potyvirus genome. *The EMBO Journal*, v. 8, n. 2, p. 365-370, 1989a.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. Processing of the tobacco etch virus 49K protease requires autoproteolysis. *Virology*, v. 160, p. 355-362, 1987a.

\_\_\_\_\_. Small Nuclear Inclusion Protein Encoded by a Plant Potyvirus Genome Is a Protease. *Journal of Virology*, v. 61, n. 8, p. 2540-2548, 1987b.

CARRINGTON, J. C.; FREED, D. D.; SANDERS, T. C. Autocatalytic Processing of the Potyvirus Helper Component Proteinase in *Escherichia coli* and In Vitro. *Journal of Virology*, v. 63, n.10, p. 4459-4463, 1989b.

CARRINGTON, J. C.; HERNDON, K. L. Characterization of the potyviral HC-pro autoproteolytic cleavage site. *Virology*, v. 187, n. 1, p. 308-315, 1992.

CARRINGTON, C. J.; JENSEN, P. E.; SCHAAD, M. C. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell to cell movement. *Plant Journal*, v. 14, p. 393-400, 1998.

CASTIGLIONI, E.; NAVIA, D. Prospección de *Aceria tosichella* em gramíneas de Uruguay. In: Workshop en virosis de cereales transmitidas por el ácaro *Aceria tosichella* – *Wheat streak mosaic virus* y *High plains virus* – en los países del Cono Sur: situación, detección y manejo, 2008. Argentina: Libro de Resúmenes, 2008, p.25-26.

CHANDRAPATYA, A. External Morphology of *Aceria tulipae* Keifer, a Galc Pest in Thailand (Prastigmata: Eriophyidae). *Natural Science*, v.20, p. 217-220, 1986.

CHENAULT, K. D.; HUNGER, R. M.; SHERWOOD, J. L. Comparison of the nucleotide sequence of the coat protein open reading frame of nine isolates of *Wheat streak mosaic* rymovirus. *Virus Genes*, v. 13, p.187-188, 1996.

CHOI, I. R.; FRENCH, R.; HEIN, G. L.; STENGER, D. C. Fully biologically active in vitro transcripts of the eriophyid mite-transmitted *Wheat streak mosaic* tritimovirus. *Phytopathology*, v. 89, p. 1182-1185, 1999.

CHOI, I. R.; HALL, J. S.; HENRY, M.; ZHANG, L.; HEIN, G. L.; FRENCH, R.; STENGER, D. C. Contributions of genetic drift and negative selection on the evolution of three strains of *Wheat streak mosaic* tritimovirus. *Archives of Virology*, v. 146, p. 619- 628, 2001.

CHOI, I. R.; HORKEN, K. M.; STENGER, D. C.; FRENCH, R. An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *Journal of General Virology*, n. 86, p. 2605-2614, 2005.

\_\_\_\_\_. Mapping of the P1 proteinase cleavage site in the polyprotein of *Wheat streak mosaic virus* (genus *Tritimovirus*). *Journal of General Virology*, v. 83, p. 443–540, 2002.

CHOI, I. R.; STENGER, D. C.; FRENCH, R. Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritimovirus. *Virology*, v. 267, p. 185–198 , 2000.

CHRISTIAN, M. L. WILLIS, W. G. Survival of *Wheat streak mosaic virus* in grass hosts in Kansas from wheat harvest to fall wheat emergence. *Plant Disease*, v. 77, p. 239-242, 1993.

CHUNG, B. Y-W.; MILLER, W. A.; ATKINS, J. F.; FIRTH, A. E. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 15, p. 5897–5902, 2008.

CONNIN, R. V. The host range of the wheat curl mite, vector of Wheat streak mosaic. *Journal of Economic Entomology*, v. 49, p. 1-4, 1956.

COUTTS, B. A. ; HAMMOND, N. E. B.; KEHOE, M. A.; JONES, R. A. C. Finding *Wheat streak mosaic virus* in south-west Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 59, p. 836-843, 2008a.

COUTTS, B. A.; STRICKLAND, G. R.; KEHOE, M. A.; SEVERTSON, D. L.; JONES, R. A. C. The epidemiology of *Wheat streak mosaic virus* in Australia: case histories, gradients, mite vectors, and alternative hosts. *Australian Journal of Agricultural Research*, v. 59, p. 844-853, 2008b.

CREDI, R.; GIUNCHEDI, L.; BISSANI, R.; POLLINI, C. P. Presenza della virosi 'mosaico striato del frumento' in Emilia-Romagna e Lombardia. *Informatore Fitopatologico*, v. 47, p. 59-63, 1997.

CRONIN, S.; VERCHOT, J.; HALDEMAN-CAHILL, R.; SCHAAD, M. C.; CARRINGTON, J. C. Long distance movement factor: a novel transport function of the Potyvirus helper component-proteinase. *Plant Cell*, v. 7, p. 549-559, 1995.

DEB, M.; ANDERSON, J. M. Development of a multiplexed PCR detection method for *Barley and Cereal yellow dwarf viruses*, *Wheat spindle streak virus*, *Wheat streak mosaic virus* and *Soil-borne wheat mosaic virus*. *Journal of Virological Methods*, v. 148, p. 17-24, 2008.

DEL ROSARIO, M. S. E.; SILL, W. H. JR. Physiological strains of *Aceria tulipae* and their relationship to the transmission of *Wheat streak mosaic virus*. *Phytopathology*, v. 55, p. 1168-1175, 1965.

DJIEMBOEV, J. T. Disease of hard wheat in north Kazakh, S. S. R. and their control. *Review of Applied Mycology*, v. 37, p. 344-345, 1956.

DOLJA, V. V.; HALDEMAN-CAHILL, R.; MONTGOMERY, A. E.; VANDENBOSCH, K. A.; CARRINGTON, J. C. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, v. 206, p. 1007-1016, 1995.

DOLJA, V. V.; HALDEMAN, RUTH; ROBERTSON, N. L.; DOUGHERTY, W. G. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *Tobacco etch potyvirus* in plants. *The EMBO Journal*, v.13, n.6, p.1482- 1491, 1994.

DOMIER, L. L.; FRANKLIN, K. M.; SHAHABUDDIN, M.; HELLMANN, G. M.; OVERMEYER, J. H.; HIREMATH, S. T.; SIAW, M., F.; LOMONOSSOFF, G. P.; SHAW, J. G.; RHOADS, R. E. The nucleotide sequence of *Tobacco vein mottling virus* RNA. *Nucleic Acids Research*, v. 14, p. 5417-5430, 1986.

DOUGHERTY, W. G.; CARRINGTON, J. C. Expression and function of Potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology*, v. 26, p. 123-143, 1988.

DOUGHERTY, W. G.; SEMLER, B. L. Expression of virus-encoded proteinase: Functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews*, v. 57, p. 781-822, 1993.

DWYER, G. I.; GIBBS, M. J.; GIBBS, A. J.; JONES, R. A. C. *Wheat streak mosaic virus* in Australia: Relationship to isolates from the Pacific Northwest of the USA and its dispersion via seed transmission. *Plant Disease*, v. 91, p. 164-170, 2007.

EDWARDS, M. C.; MCMULLEN, M. P. Variation in tolerance to *Wheat streak mosaic virus* among cultivars of hard red spring wheat. *Plant Disease*, v. 72, p. 705-707, 1988.

ELLIS, M. H., REBETZKE, G. J., CHU, P. First report of *Wheat streak mosaic virus* in Australia. *Plant Pathology*, v. 52, p. 808, 2003a.

ELLIS, M. H.; REBETZKE, G. J.; MAGO, R.; CHU, P. First report of *Wheat streak mosaic virus* in Australia. *Australasian Plant Pathology*, v. 32, p. 551-553, 2003b.

ELLIS, M. H.; REBETZKE, G. J.; KELMAN, W. M.; MOORE, C. S.; HYLES, J. E. Detection of *Wheat streak mosaic virus* in four pasture grass species in Australia. *Plant Pathology*, v. 53, p. 239, 2004.

FELLER, J.; WAN, J.; HONG, Y.; COLLINS, G. B.; HUNT, A. G. In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome linked proteins and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 2043-2049, 1998.

FELLOWS, H.; SILL, W. H. JR. Predicting *Wheat streak mosaic* epiphytotics in winter wheat. *Plant Disease Reporter*, V. 39, p. 291-295, 1955.

FERNANDEZ, A.; GUO, H. S.; SAENZ, P.; SIMON-BUELA, L.; GOMEZ DE CEDRON, M.; GARCIA, J. A. The motif V of plum pox

Potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. v. 25, n. 22, p. 4474-4480, 1997.

FERNANDEZ, A.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. RNA helicase activity of the plum pox Potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*: Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 1327-1332, 1995.

FOULAD, R.; IZADPANA, K. Identification of *Wheat streak mosaic virus* in Iran. *Iran Agricultural Research*, v. 5, p. 73-84, 1986.

FRENCH, R.; STENGER, D. C. Evolution of *Wheat streak mosaic virus*: Dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 199-214, 2003.

FROST, W. E.; RIDLAND, P. M. Grasses. (pp. 619–629). In: LINDQUIST, E. E.; SABELIS, M. W.; BRUIN, J. *Eriophyoid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam: The Netherlands, Elsevier Science B.V., 1996.

GADIOU, S.; KÚDELA, O.; RIPL, J.; RABENSTEIN, F.; KUNDU, J. K.; GLASA, M. An amino acid deletion in *Wheat streak mosaic virus* capsid protein distinguishes a homogeneous group of European isolates and facilitates their specific detection. *Plant Disease*, v. 93, p. 1209-1213, 2009.

GAL-ON, A., ANTIGNUS, Y., ROSNER, A., AND RACCAH, B. A *Zucchini yellow mosaic virus* coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. *Journal of General Virology*, v. 73, p. 2183-2187, 1992.

GRANIER, F.; DURAND-TARDIF, M.; CASSE-DELBART, F.; LECOQ, H.; ROBAGLIA, C. Mutations in *Zucchini yellow mosaic virus* helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2737-2742, 1993.

GÖTZ, R.; MAISS, E. Molecular analyses of the coat protein region of different viruses on *Poaceae* belonging to the *Potyviridae*. *Agronomie*, v. 15, p. 491-494, 1995a.

\_\_\_\_\_. The complete nucleotide sequence and genome organization of the mite-transmitted *Brome streak mosaic rymovirus* in comparison with those of potyviruses. *Journal of General Virology*, v. 76, p. 2035-2042, 1995b.

GUO, B.; LIN, J.; YE, K. Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2011.

GUO, D.; MERITS, A.; SAARMA, M. Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of Potato A potyvirus. *Journal of General Virology*, v. 80, p. 1127-1131, 1999.

HALL, S. J.; ADAMS, B.; PARSONS, T. J.; FRENCH, R.; LANE, L. C.; JENSEN, S. G. Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationships of a new Potyvirus: *Sugarcane Streak Mosaic Virus*, and a Reevaluation of the Classification of the *Potyviridae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 10, n. 3, p. 323-332, 1998.

HALL, J. S.; FRENCH, R.; HEIN, G. L.; MORRIS, T. J.; STENGER, D. C. Three distinct mechanisms facilitate genetic isolation of sympatric *Wheat streak mosaic virus* lineages. *Virology*, v. 282, p. 230-236, 2001a.

HALL, J. S.; FRENCH, R.; MORRIS, T. J.; STENGER, D. C. Structure and Temporal Dynamics of Populations within *Wheat streak mosaic virus* Isolates. *Journal of Virology*, v. 75, n.21, p. 10231-10243, 2001b.

HALLIDAY, R. B.; KNIHINICKI, D. K. The occurrence of *Aceria tulipae* (Keifer) and *Aceria tosichella* 'Keifer' in Australia (Acari: Eriophyidae). *International Journal of Acarology*, v. 30, p. 113-118, 2004.

HARVEY, T.L.; MARTIN, T.J.; SEIFERS, D.L. Wheat yield reduction due to wheat curl mite (Acari: Eriophyidae) infestations. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, v.19, p. 9-13, 2002.

HILL, J. H. ; MARTINSON, C. A.; RUSSELL, W. A. Seed transmission of *Maize dwarf mosaic* and *Wheat streak mosaic viruses*



in maize and responses of inbred lines. *Crop Science*, v. 14, p. 232–235, 1974.

HONG, Y.; LEAVY, K.; MURPHY, J. F.; KLEIN, P. G.; SHAW, J. G.; HUNT, A. G. A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology*, v. 214, p. 159-166, 1995.

HOW, S. C. *Wheat streak mosaic virus* on corn in Nebraska. *Phytopathology*, v. 53, p. 279-280, 1963.

HUET, H.; GAL-ON, A.; MEIR, E.; LECOQ, H.; RACCAH, B. Mutations in the helper component protease gene of *Zucchini yellow mosaic virus* affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology*, v. 75, p. 1407-1414, 1994.

HUNGER, R. M.; SHERWOOD, J. L.; EVANS, C. K.; MONTANA, J. R. Effects of planting date and inoculation date on severity of wheat streak mosaic in hard red winter wheat cultivars. *Plant Disease*, v. 76, p. 1056-1060, 1992.

JEPPSON, L. R.; KEIFER, H. H.; BAKER, E. W. *Mites injurious to economic plants*. Los Angeles: University of California Press, 1975.

JEZEWSKA, M.; WIECZOREK, M. Nowe wirusy występujące na psenicy w Polsce. *Progress in Plant Protection*, v. 38, p. 93-100, 1998.

JIANG, W.; GARRETT, K. A.; PETERSON, D. E.; HARVEY, T. L.; BOWDEN, R. L.; FANG, L. The window of risk for emigration of *Wheat streak mosaic virus* varies with host eradication method. *Plant Disease*, v. 89, p. 853-858, 2005.

JONES, R. A. C.; COUTTS, B. A.; MACKIE, A. E.; DWYER, G. I. Seed transmission of *Wheat streak mosaic virus* shown unequivocally in wheat. *Plant Disease*, v. 89, p. 1048-1050, 2005.

JURETIC, N. *Wheat streak mosaic virus* in northern and southern regions of Yugoslavia. *Acta Botanica Croatica*, v. 38, p. 13-18, 1979.

KANYUKA, K.; WARD, E.; ADAMS, M. J. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 393-406, 2003.

KAPOORIA, R. G.; NDUNGURU, J. Occurrence of viruses in irrigated wheat in Zambia. *Bulletin OEPP/EPPO*, v. 34, p. 413-419, 2004.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counterdefensive strategy of plant viruses: Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, v. 95, p. 461-470, 1998.

\_\_\_\_\_. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch Potyvirus. *Virology*, v. 209, p. 268-273, 1995.

KASSCHAU, K. D.; CRONIN, S.; CARRINGTON, J. C. Genome Amplification and Long-Distance Movement Functions Associated with the Central Domain of Tobacco Etch Potyvirus Helper Component-Proteinase. *Virology*, v. 228, p. 251-262, 1997.

KEIFER, H.H. Eriophyid studies C-3. *Agricultural Research Service C series*, v. 27, p. 1-24, 1969.

KLEIN, P. G.; KLEIN, R. R.; RODRIGUEZ-CEREZO, E.; HUNT, A. G.; SHAW, J. G. Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology*, v. 204, p. 759-769, 1994.

KÚDELA, O.; KÚDELOVÁ, M.; NOVÁKOVÁ, S.; GLASA, M. First Report of *Wheat streak mosaic virus* in Slovakia. *Disease Notes*, v. 92, n. 9, p.1365, 2008.

LAIN, S.; MARTIN, M. T.; RIECHMANN, J. L.; GARCIA, J. A. Novel catalytic activity associated with positive strand RNA virus infection: Nucleic acid-stimulated ATPase activity of the *Plum pox potyvirus* helicase-like protein. *Journal of Virology*, v. 63, p. 1-6, 1991.

LAIN, S.; RIECHMANN, J. L.; GARCIA, J. A. The complete nucleotide sequence of plum pox Potyvirus RNA. *Virus Research*, v. 13, p. 157-172, 1989.

\_\_\_\_\_. RNA helicase: A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Research*, v. 18, p. 7003-7006, 1990.

LANE, L. C.; SKOPP, R. The coat protein of *Wheat streak mosaic virus*. *Phytopathology*, v. 73, p. 791, 1983.

LANGENBERG, W. G. Structural Proteins of Three Viruses in the *Potiviridae* Adhere Only to their Homologous Cylindrical Inclusions in Mixed Infections. *Journal of Structural Biology*, v. 110, p. 188-195, 1993.

LANGENBERG, W. G.; ZHANG, L. Immunocytochemistry shows the presence of *Tobacco etch virus* P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, v. 118, p. 243-247, 1997.

LANOISELET, V. M.; HIND-LANOISELET, T. L.; MURRAY, G. M. Studies on the seed transmission of *Wheat streak mosaic virus*. *Australasian Plant Pathology*, v. 37, p. 584-588, 2008.

LAU, D. Monitoramento e diagnose do complexo *Aceria tosichella* e vírus transmitidos (*Wheat streak mosaic virus*, *High plains virus*) no Brasil e avaliação da resistência de cultivares para estimar o seu impacto na triticultura nacional. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012 (Relatório Técnico enviado ao CNPq/MAPA/SDA)

LEBAS, B. S. M.; OCHOA-CORONA, F. M.; ALEXANDER, B. J. R.; LISTER, R. A.; FLETCHER, J. D. F.; BITHELL, S. L.; BURNIP, G. M. First report of *Wheat streak mosaic virus* on wheat in New Zealand. *Plant Disease*, v. 93, n. 4, p. 430, 2009.

LEGAVRE, T.; MAIA, I. G.; CASSE-DELBART, F.; BERNARDI, F.; ROBAGLIA, C. Switches in the mode of transmission select for or against a poorly aphid-transmissible strain of *Potato virus Y* with reduced helper component and virus accumulation. *Journal of General Virology*, v. 77, p. 1343-1347, 1996.

LI, X. H.; VALDEZ, P.; OLEVERA, R. E.; CARRINGTON, J. C. Functions of the *Tobacco etch virus* RNA polymerase (NIb): Subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, v.71, p. 1598-1607, 1997.

LIU, J.; LEE, E. A.; SEARS, M. K.; SCHAAFSMA, A. W. Wheat Curl Mite (Acari: Eriophyidae) Dispersal and Its Relationship with Kernel Red Streaking in Maize *Journal of Economic Entomology*, v. 98, n. 5, p. 1580-1586, 2005.

LÓPEZ-MOYA, J. J.; PIRONE, T. P. Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *Journal of General Virology*, v.79, p. 161–165, 1998.

MARCON, A.; KAEPLER, S. M.; JENSEN, S. G. Genetic variability among maize inbred lines for resistance to the *High plains virus-Wheat streak mosaic virus* complex. *Plant Disease*, n. 81, p. 195-198, 1997.

MAHMOOD, T.; HEIN, G.L.; JENSEN, S. G. Mixed infection of hard red winter wheat with *High Plains Virus* and *Wheat Streak Mosaic Virus* from Wheat Curl Mites in Nebraska. *Plant Disease*, v.82, n. 3, p. 311-315, 1998.

MAKKOUK, K. M.; KUMARI, S. G. Natural occurrence of *Wheat streak mosaic virus* on wheat in Syria. *Rachis Newsletter*, v. 16, p. 74-76, 1997.

MARTIN, T. J. Procedure for evaluating *Wheat streak mosaic virus* resistance. *Plant Disease*, v. 62, p. 1062-1066, 1978.

MARTIN, T. J.; HARVEY, T. L.; BENDER, C. G.; SEIFERS, D. L. Control of *Wheat streak mosaic virus* with vector resistance in wheat. *Phytopathology*, v. 74, p. 963-964, 1984.

MASUMI, M.; IZADPANA, K. A.; JOUKAR, L.; KHERADNAM, M. Assessment of losses by *Wheat streak mosaic virus*. *Iranian Journal Of Plant Pathology*. v. 37, p. 221-232, 2001.

MCDONALD, M.; KENDALL, A.; BIAN, W.; MCCULLOUGH, I; LIO, E.; HAVENS, W. M.; GHABRIAL, S. A.; STUBBS, G. Architecture of the potyviruses. *Virology*, v. 405, p. 309-313, 2010.

MCKINNEY, H. H. Mosaic diseases of wheat and related cereals. *US Department of Agriculture*, Circular n. 442, 1937.

\_\_\_\_\_. Virus isolates from mosaic wheat in the hard red winter wheat area. *Plant Disease*, v. 33, p. 346-349, 1949.

MCNEIL, J.E.; FRENCH, R.; HEIN, G.L.; BAENZIGER, P. S.; ESKRIDGE, K.M. Characterization of genetic variability among natural populations of *Wheat streak mosaic virus*. *Phytopathology*, v. 86, p. 1222–1227, 1996.

MERITS, A.; GUO, D.; JÄRVEKÜLG, L. SAARMA, M. Biochemical and Genetic Evidence for Interactions between Potato A Potyvirus-Encoded Proteins P1 and P3 and Proteins of the Putative Replication Complex. *Virology*, v. 263, p. 15-22, 1999.

MEYER, M.K.P. South Africa Eriophyidae (Acari): the genus *Aceria* Keifer, 1944. *Phytophylactica*, v. 13, p. 117-126, 1981.

MONTANA, J.R.; HUNGER, R.M.; SHERWOOD, J.L. Serological characterization of *Wheat streak mosaic virus isolates*. *Plant Disease*, v. 80, p. 1239–1244, 1996.

MURPHY, J. F.; RHOADES, R. E.; HUNT, A. G.; SHAW, J. G. The VPg of *Tobacco etch virus* RNA is the 49 kDa proteinase or the N-terminal 24 kDa part of the proteinase. *Virology*, v. 178, p. 285-288, 1990.

NAULT, L. R.; BRIONES, M. L.; WILLIAMS, L. E.; BARRY, B. D. Relation of the wheat curl mite to kernel red steak of corn. *Phytopathology*, v. 57, p. 986-989, 1967.

NAVIA, D.; TRUOL, G.; MENDONÇA, R. S. SAGADÍN, M. *Aceria tosichella* Keifer (Acari: Eriophyidae) from *Wheat streak mosaic virus* - infected plants in Argentina. *International Journal of Acarology*, v. 32, n.2, p. 1-5, 2006.

NAVIA, D. *Ácaro Aceria tosichella Keifer e Viroses Transmitidas Wheat streak mosaic virus e High plain virus, uma Nova Ameaça aos Cultivos de Cereais na América do Sul – Análise de Risco de Pragas, Distribuição Geográfica, Hospedeiros, Caracterização e Controle*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009 (Relatório Técnico enviado ao CNPq/MAPA/SDA)

NIBLETT, C. L.; ZAGNLA, K. R.; CALVERT, L. A.; KENDALL, T. L.; STARK, D. M.; SMITH, C. E.; BEACHY, R. N.; LOMMEL, S. A. cDNA cloning and nucleotide sequence of the *Wheat streak mosaic virus* capsid protein gene. *Journal of General Virology*, v. 72, p. 499-504, 1991.

NYITRAI, A.; GABORJANYI, R. Wheat streak mosaic a new virus disease for Hungary. *Cereal Research Communications*, v. 16, p. 261-263, 1988.

OH, C.; CARRINGTON, J. C. Identification of essential residues in Potyvirus proteinase HC-pro by site-directed mutagenesis. *Virology*, v. 173, n. 2, p. 692-699, 1989.

OLDFIELD, G. N. Mite transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology*, v. 15, p. 343-380, 1970.

OLDFIELD, G. N.; PROESELER, G. Eriophyoid mites as vectors of plant pathogens. In: LINDQUIST, E.E.; SABELIS, M.W.; BRUIN, J. (Eds.) *Eriophyoid Mites: their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam: Elsevier Science, 1996. p. 259-275.

PARKER, L.; KENDALL, A.; BERGER, P.H.; SHIEL, P. J.; STUBBS, G. *Wheat streak mosaic virus* - Structural parameters for a Potyvirus. *Virology*, v. 340, p. 64-69, 2005.

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

PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X. M.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Plant viral synergism: The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, n. 9, p. 859-868, 1997.

RABENSTEIN, F; SEIFERS, D.L.; SCHUBERT, J.; FRENCH, R.; STENGER, D.C. Phylogenetic relationships, strain diversity, and biogeography of tritimoviruses. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 895-906, 2002.

RABENSTEIN, F.; STANARIUS, A.; PROESELER, G. Identifizierung des Weizenstrichelmosaik-Virus (*Wheat streak mosaic virus*) an *Hordeum murinum* L. in der DDR. *Archiv fuer Phytopathologie und Pflanzenschutz Berlin*, v. 18, p. 301-318, 1982.

REICHMANN, J. L.; LAIN, S.; GARCIA, J. A. Highlights and prospects of Potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, v 73, p. 1-16, 1992.

RESHETNIK, G. V.; MISHCHENKO, L. T.; KOLESNIK, L. V.; BOIKO, A. L. Detection of *Wheat streak mosaic virus* in some regions of the Ukraine. *Mikrobiologicheskii zhurnal*, v. 58, p. 39-45, 1996.

RODRIGUEZ-CEREZO, E.; AMMAR, E. D.; PIRONE, T. P.; SHAW, J. G. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells *Journal of General Virology*, v. 74, p. 1945-1949, 1993.

ROJAS, M. R.; ZERBINI, F. M.; ALLISON, R. F.; GILBERTSON, R. L.; LUCAS, W. J. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, v. 237, p. 283-295, 1997.

SALM, S. N.; REY, M. E.; ROBERTSON, N. L.; FRENCH, R.; RABENSTEIN, F.; SCHUBERT, J. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the partial genomes of *Agropyron* and *Hordeum mosaic viruses*, two members of the *Rymovirus* genus in the taxonomic family *Potyviridae*. *c*, v. 141, n. 11, p. 2115-2127, 1996a.

SALM, S. N.; REY, M. E. C.; RYBICKI, E. P. Phylogenetic justification for splitting the *Rymovirus* genus of the taxonomic family *Potyviridae* - brief report. *Archives of Virology*, v. 141, p. 2237-2242, 1996b.

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

SCHONS, J.; OLIVEIRA, C.; TOLEDO, K. G. Primeiro relato do *Wheat spindle streak mosaic virus* em plantas de trigo no Brasil. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 44., 2011, Bento Gonçalves. *Tropical Plant Pathology*, v. 36, 2011.

SEIFERS, D. L.; MARTIN, T. J. Correlation of low level *Wheat streak mosaic virus* resistance in Triumph 64 wheat with low virus titer. *Phytopathology*, v. 78, p. 703-707, 1988.

SHAHABUDDIN, M.; SHAW, J. G.; RHOADES, R. E. Mapping the *Tobacco vein mottling virus* VPg cistron. *Virology*, v. 163, p. 635-637, 1988.

SHAHWAN, I. M.; HILL, J. P. Identification and occurrence of *Wheat streak mosaic virus* in winter wheat in Colorado and its effects on several wheat cultivars. *Plant Disease*, v. 68, p. 579-581, 1984.

SHEVTCHENKO, V. G.; DE-MILLO, A. P.; RAZVYAZKINA, G. M.; KAPKOVA, E. A. Taxonomic bordering of closely related mites *Aceria tulipae* Keif. and *A. tritici* sp. n. (Acarina: Eriophyidae) – vectors of the onion and wheat viruses. *Zoologicheskii Zhurnal*, v. 49, p. 224-235, 1970.

SHI, X. M.; MILLER, H.; VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C.; VANCE, V. B. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate *Potato virus X* potyviral synergism. *Virology*, v. 231, p. 35-42, 1997.

SILL, W. H.; CONNIN, R. V. Summary of the known host range of the *Wheat streak mosaic virus*. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, v. 56, p. 411-417, 1953.

SIM, T.; WILLIS, W. O.; EVERSMEYER, M. G. Kansas Plant Disease Survey. *Plant Disease*, v. 72, n. 10, p. 832-836, 1988.

SLYKHUIS, J. T. *Aceria tulipae* Keifer (Acarina: Eriophyidae) in relation to the spread of wheat streak mosaic. *Phytopathology*, v. 45, p. 116-128, 1955.

\_\_\_\_\_. Virus and Virus-Like Diseases of Cereal Crops. *Annual Review of Plant Pathology*, v. 14, p. 187-210, 1976.

\_\_\_\_\_. *Mites*. In: *Vectors of Plant Pathogens*. Ed. by HARRIS, K.F.; MARAMOROSCH, K. New York: Academic Press, 325-356. 1980.



SLYKHUIS, J. T.; BELL, W. New evidence on the distribution of *Wheat streak mosaic virus* and relation of isolates from Rumania, Jordan, and Canada. *Phytopathology*, v. 53, p. 236-237, 1963.

SMITH, K. M. *A Textbook of Plant Virus Diseases*. New York: Academic Press. 1972.

SOMSEN, H. W.; SILL, W. H. *The wheat curl mite, Aceria tulipae Keifer, in relation to epidemiology and control of Wheat streak mosaic*. n. 162. Kansas: Agricultural Experiment Station Research Publication, 1970. 24p.

STENGER, D. C.; HALL, J. S.; CHOI, I. R.; FRENCH, R. Phylogenetic relationships within the family *Potyviridae*: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus*. *Phytopathology*, v. 88, p. 782-787, 1998.

STENGER, D. C.; FRENCH, R. Complete nucleotide sequence of *Oat necrotic mottle virus*: A distinct *Tritimovirus* species (family *Potyviridae*) most closely related to *Wheat streak mosaic virus*. *Archives of Virology*, v. 149, p. 633–640, 2004a.

\_\_\_\_\_. Functional replacement of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro with the corresponding cistron from a diverse array of viruses in the family *Potyviridae*. *Virology*, v. 323, p. 257–267, 2004b.

\_\_\_\_\_. *Wheat streak mosaic virus* genotypes introduced to Argentina are closely related to isolates from the American Pacific Northwest and Australia. *Archives of Virology*, v. 154, p. 331-336, 2009.

STENGER, D. C.; FRENCH, R.; GILDOW, F. E. Complete Deletion of *Wheat Streak Mosaic Virus* HC-Pro: a Null Mutant Is Viable for Systemic Infection. *Journal of Virology*, v. 79, n. 18, p. 12077–12080, 2005a.

STENGER, D. C.; HALL, J. S.; CHOI, I. R.; FRENCH, R. Phylogenetic relationships within the family *Potyviridae*: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus *Rymovirus*. *Phytopathology*, v. 88, p. 782-787, 1998.

STENGER, D. C.; HEIN, G. L.; FRENCH, R. Nested deletion analysis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission. *Virology*, v. 350, p. 465-474, 2006a.

STENGER, D. C.; HEIN, G. L.; GILDOW, F. E.; HORKEN, K. M.; FRENCH, R. Plant Virus HC-Pro Is a Determinant of Eriophyid Mite Transmission. *Journal of Virology*, v. 79, n.14, p. 9054–9061, 2005b.

STENGER, D.C.; SEIFERS, D.L.; FRENCH, R. Patterns of polymorphism in *Wheat streak mosaic virus*: sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology*, v. 302, p. 58-70, 2002.

STENGER, D.C.; YOUNG, B. A.; FRENCH, R. Random mutagenesis of *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro: non-infectious interfering mutations in a gene dispensable for systemic infection of plants. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 2741–2747, 2006b.

STENGER, D. C.; YOUNG, B. A.; QU, F.; MORRIS, T. J.; FRENCH, R. *Wheat streak mosaic virus* lacking helper component-proteinase is competent to produce disease synergism in double infections with *Maize chlorotic mottle virus*. *Phytopathology*, v. 97, p. 1213-1221, 2007.

STYER, W. E.; NAULT, L.R. Corn and Grain Plants (pp. 611–618). In: LINDQUIST, E. E.; SABELIS, M. W.; BRUIN, J. *Eriophyid Mites – Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam: The Netherlands, Elsevier Science B.V., 1996

SOMSEN, H. W.; SILL, W. H. Jr. The Wheat Curl Mite, *Aceria tulipae* Keifer, in Relation to Epidemiology and Control of *Wheat Streak Mosaic*. Kansas Agricultural Experiment Station, *Research Publication* 162, 1970. Disponível em: <<http://www.ksre.ksu.edu/library/plant2/stb162.pdf>>. Acesso em: 26 abril 2011.

TATINENI, S.; VAN WINKLE, D. H.; FRENCH, R. The N-terminal region of wheat streak mosaic virus coat protein is a host- and strain-specific long-distance transport factor. *Journal of Virology*, v. 85, n. 4, p. 1718-1731, 2011.

THOMAS, J. A.; HEIN, G. L. Influence of volunteer wheat plant condition on movement of the wheat curl mite, *Aceria tosichella*, in winter wheat. *Experimental & Applied Acarology*, v. 31, p. 253–268, 2003.

THOMAS, J. A.; HEIN, G. L.; LYON, D. J. Spread of wheat curl mite and *Wheat streak mosaic virus* is influenced by volunteer wheat control methods. *Plant Health Progress*, 2004. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/wheat/>>. Acesso em: 26 abril 2011.

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

URCUQUI-INCHIMA, S.; HAENNI, A.; BERNARDI, F. *Potyvirus* proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, v. 74, p. 157–175, 2001.

URCUQUI-INCHIMA, S.; WALTER, J.; DRUGEON, G.; GERMAN-RETANA, S.; HAENNI, A.-L.; CANDRESSE, T.; BERNARDI, F.; LE GALL, O. Potyvirus helpercomponent-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology*, v.258, p. 95-99, 1999.

VERCHOT, J.; CARRINGTON, J. C. Evidence that the Potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, v. 69, p. 3687-3674, 1995.

VERCHOT, J.; KOONIN, E. V.; CARRINGTON, J. C. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology*, v. 185, p. 527-535, 1991.

XIE, H.; WANG, Z.; LI, W.; NI, S. Studies of *Wheat streak mosaic virus* in Xinjiang. *Acta Phytopathologica Sinica*, v. 12, p. 7-12, 1982.

ZAGULA, K. R.; NIBLETT, C. L.; ROBERTSON, N. L.; FRENCH, R.; LOMMEL, S. A. *Potyviridae*: genus *Rymovirus*. *Archives of Virology*, Supplement, v. 5, p. 269-276, 1992.

YOUNG, B. A.; HEIN, G. L.; FRENCH, R.; STENGER, D. C.  
Substitution of conserved cysteine residues in *Wheat streak mosaic virus* HC-Pro abolishes virus transmission by the wheat curl mite.  
*Archives of Virology*, v. 152, p. 2107–2111, 2007.

## **APÊNDICES**

APÊNDICE 1 - Conjunto de amostras utilizadas na caracterização molecular.

cod.	município	UF	data	hospedeiro	deteção do vetor*	sintomas**
269	Dourados	MS	06/09	aveia		
293	Ponta Grossa	PR	06/09	trigo		espigas brancas
329	São Luiz Gonzaga	RS	07/09	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
358	Nonoai	RS	08/09	trigo	2009	Mos
363	Nonoai	RS	08/09	trigo	2009	Mos
379	Cafelândia	PR	08/09	trigo		Mos
451	São Luiz Gonzaga	RS	09/09	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
466	São Miguel das Missões	RS	09/09	trigo	2009; 2011	Mos
485	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/10	trigo	surtos anuais	En
486	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/10	trigo	surtos anuais	Am; En
487	Passo Fundo	RS	01/10	papuã	2006; 2007	Ac
654	Ampere	PR	06/10	c. favorito		Mos
656	Ampere	PR	06/10	azevém		
664	Cascavel	PR	06/10	aveia		
671	Cascavel	PR	06/10	papuã		Ac
674	Toledo	PR	06/10	papuã		EI
700	Dourados	MS	06/10	gramínea		EI
725	Guaira	PR	06/10	milhã		

763	Nonoai	RS	08/10	trigo	2009	Mos
765	Nonoai	RS	08/10	trigo	2009	Mos; Am
780	Ubiratã	PR	08/10	aveia		
781	Mamborê	PR	08/10	aveia		
795	Mauá da Serra	PR	08/10	aveia		
817	Alm. Tamandaré do Sul	RS	08/10	trigo	2008; 2009	Mos
823	Palmeira das Missões	RS	08/10	trigo	2006; 2007; 2009; 2010	Mos
824	Palmeira das Missões	RS	08/10	azevém	2006; 2007; 2009; 2010	Mos
825	Santo Augusto	RS	08/10	trigo		Mos
826	Três de maio	RS	08/10	trigo	2008; 2009	Mos
837	São Miguel das Missões	RS	08/10	trigo	2009; 2011	Mos; Am; En
839	São Luiz Gonzaga	RS	08/10	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos; Am
844	Itaroquém	RS	08/10	trigo		Mos
845	São Borja	RS	08/10	trigo		Mos
849	Jóia	RS	08/10	trigo		Mos
850	Jóia	RS	08/10	trigo		Mos
852	Ijuí	RS	08/10	trigo	2009	Mos; Eb
854	Pejuçara	RS	08/10	trigo		Mos
855	Panambi	RS	08/10	trigo		Mos
861	Chapada	RS	10/10	milho	2008	Eb

862	Palmeira das Missões	RS	10/10	trigo	2006; 2007; 2009; 2010	Mos
864	Santo Augusto	RS	10/10	trigo		Mos; Am; En
871	Giruá	RS	10/10	trigo		M
879	São Luiz Gonzaga	RS	10/10	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
882	Itaroquém	RS	10/10	trigo		Mos
885	São Borja	RS	10/10	milho		Mos
891	Santiago	RS	10/10	aveia		Mos
902	Joiá	RS	10/10	trigo		Mos
905	Cruz Alta	RS	10/10	aveia		
908	Panambi	RS	10/10	trigo		Mos
910	Passo Fundo	RS		trigo	2006; 2007	Mos
911	Passo Fundo	RS	10/10	trigo	2006; 2007	Mos
912	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	10/10	trigo	surtos anuais	Mos
913	Passo Fundo	RS	10/10	trigo	2006; 2007	Mos
914	Passo Fundo	RS	10/10	trigo	2006; 2007	Mos
915	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	01/11	trigo	surtos anuais	Am; En
1211	Alm. Tamandaré do Sul	RS	09/11	trigo	2008; 2009	Am
1212	Alm. Tamandaré do Sul	RS	09/11	trigo	2008; 2009	Mos
1213	Chapada	RS	09/11	trigo	2008	Mos
1214	Chapada	RS	09/11	trigo	2008	Am



1215	Palmeira das Missões	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2009; 2010	Mos
1216	Palmeira das Missões	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2009; 2010	Am
1217	Palmeira das Missões	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2009; 2010	Mos
1218	Santo Augusto	RS	09/11	trigo		Mos
1219	Três de Maio	RS	09/11	trigo	2008; 2009	
1220	Santa Rosa	RS	09/11	trigo	2008; 2009; 2011	Mos
1221	Giruá	RS	09/11	trigo		Mos
1222	Giruá	RS	09/11	trigo		Mos
1223	Giruá	RS	09/11	trigo		Mos
1225	Santo Angelo	RS	09/11	trigo	2009	
1226	São Miguel das Missões	RS	09/11	trigo	2009; 2011	Mos
1227	São Miguel das Missões	RS	09/11	trigo	2009; 2011	Am
1228	São Miguel das Missões	RS	09/11	trigo	2009; 2011	Mos
1229	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
1230	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Am
1231	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
1232	Bossoroca	RS	09/11	trigo		
1233	São Luiz Gonzaga	RS	09/11	trigo	2006; 2007; 2008; 2009; 2011	Mos
1234	Sto. Antônio das Missões	RS	09/11	trigo	2006; 2008; 2009	Mos
1235	Sto. Antônio das Missões	RS	09/11	trigo	2006; 2008; 2009	

1236	Itaroquém	RS	09/11	trigo		
1237	São Borja	RS	09/11	trigo		Am
1238	Santiago	RS	09/11	trigo		Mos
1239	Santiago	RS	09/11	trigo		Mos
1240	Santiago	RS	09/11	trigo		Mos
1241	Jóia	RS	09/11	trigo		Mos
1242	Jóia	RS	09/11	trigo		Mos
1243	Jóia	RS	09/11	trigo		Am
1244	São João Mirim	RS	09/11	trigo		Mos
1245	Colina	RS	09/11	trigo		Mos
1246	Ijuí	RS	09/11	trigo	2009	
1247	Cruz Alta	RS	09/11	trigo		Mos
1248	Pejuçara	RS	09/11	trigo		Mos
1249	Panamby	RS	09/11	trigo		Mos
1250	Carazinho	RS	09/11	trigo		
1251	Passo Fundo	RS	09/11	trigo	2006; 2007	Mos
1254	Passo Fundo	RS	09/11	trigo	2006; 2007	Mos
1256	Passo Fundo (Casa Veg.)	RS	10/11	trigo	surtos anuais	Mos

\* PEREIRA et al., 2009; NAVIA, 2009; LAU, 2012

\*\* Mos=mosaico; Am=amarelecimento; En=enrolamento El=Estrias longitudinais; Eb= estrias brancas; Ac=anéis concêntricos