

Efeito do *Soil-borne wheat mosaic virus* sobre o Metabolismo de Cinco Genótipos de Trigo com Diferentes Níveis de Resistência à Doença*

Rocheli de Souza¹, Jurema Schons¹, Sandra P. Brammer², Ariano M. Prestes², Pedro L. Scheeren²,
Fernanda Nicolini-Teixeira¹, Dileta Cecchetti¹ & Ariane C. Lanzarini¹

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Km 171, Cx. Postal 611, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, e-mail: rochelisouza@yahoo.com.br, schons@upf.br; ²Embrapa Trigo, BR 285, Km 174, Cx. Postal 451, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, e-mail: sandra@cnp.embrapa.br

(Aceito para publicação em 06/06/2005)

Autor para correspondência: Jurema Schons

SOUZA, R., SCHONS, J., BRAMMER, S.P., PRESTES, A.M., SCHEEREN, P.L., NICOLINI-TEIXEIRA, F., CECCHETTI, D. & LANZARINI, A.C. Efeito do *Soil-borne wheat mosaic virus* sobre o metabolismo de cinco genótipos de trigo com diferentes níveis de resistência à doença. *Fitopatologia Brasileira* 30:400-403. 2005.

RESUMO

Com o objetivo de conhecer as alterações metabólicas promovidas pelo *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), um dos vírus economicamente mais importantes da cultura do trigo (*Triticum aestivum*), foram analisados os níveis de proteínas solúveis e determinadas as atividades da peroxidase e da protease em quatro cultivares (BRS Guabiju, BRS 194, BRS 179, BR 23) e uma linhagem (PF 980524) de trigo com diferentes níveis de resistência ao vírus. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, comparando-se as médias, pelo Teste de Duncan a 5%. Os níveis de proteínas solúveis foram mais elevados nas plantas sem sintomas, enquanto que as atividades da peroxidase e da protease foram maiores em plantas com sintoma de mosaico do que em plantas assintomáticas. Além disso, pode-se constatar que quanto maior a suscetibilidade do genótipo, maior o nível de atividade da protease. Estes resultados são promissores para estudos de inibição da protease para controle de viroses.

Palavras-chave adicionais: proteínas solúveis, peroxidase, protease, *Furovirus*.

ABSTRACT

Effect of the *Soil-borne wheat mosaic virus* on the metabolism of five wheat genotypes with different levels of resistance to the disease

The objective of this study was to verify the metabolic alterations induced by *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), one of the most economically harmful viruses infecting wheat (*Triticum aestivum*) farming. The study analyzed the levels of soluble proteins and determined the activities of peroxidase and protease in four wheat cultivars (BRS Guabiju, BR 23, BRS 179, BRS 194) and one line (PF 980524) with different levels of resistance to the virus. The data obtained were submitted to analysis of variance, and averages were compared by Duncan's Test at 5%. Soluble protein levels were higher in plants without symptoms, while peroxidase and protease activities were higher in plants with mosaic symptoms than in asymptomatic plants. Moreover, it appeared that genotypes with high susceptibility to SBWMV have high protease activity. These results could help in the design of future studies aimed at controlling the virus through inhibition of protease.

Additional keywords: soluble proteins, peroxidase, protease, *Furovirus*.

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivado no estado do Rio Grande do Sul (Brasil) está sujeito ao ataque de diversas doenças, entre as quais se destacam a podridão da semente, podridão radicular, mal-do-pé, oídio, ferrugens, helmintosporioses, septorioses e as causadas por vírus, como o *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e o *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), gênero *Furovirus*. O SBWMV se destaca como o agente causal de uma das mais importantes viroses da cultura do trigo no Brasil. O SBWMV é naturalmente

transmitido através de zoósporos do fungo *Polymyxa graminis* Led, (Caetano *et al.*, 1971). Ocorre, principalmente, no planalto do Rio Grande do Sul e no Sul do Paraná, causando danos elevados no rendimento de grãos. Lavouras inteiras podem estar infetadas embora a ocorrência em reboleiras e/ou em linhas seja mais comum (Reis *et al.*, 1997).

A virose causada pelo SBWMV foi primeiramente observada em poucas plantas no município de Eral, no Rio Grande do Sul, em 1968 e, posteriormente, foi constatada em outros locais do estado. Em 1971, a expansão da doença já era alarmante, mostrada em levantamento realizado nas nove regiões tritícolas do Estado, constatando-se sua ocorrência em 25 municípios (Prestes *et al.*, 1972 *apud* Caetano, 1982).

*Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, Agronomia – Área de Fitopatologia, Universidade de Passo Fundo (2004). Bolsista capes

Em trigo, os sintomas induzidos pelo SBWMV variam do mosaico verde ao amarelo, ocorrendo mais facilmente em plantas cultivadas em áreas mais baixas e, conseqüentemente, mais úmidas. Dessa forma, em função do amarelecimento em reboleiras, as áreas infetadas são reconhecidas de uma certa distância, especialmente durante extensos períodos de frio e alta umidade, mas os sintomas tornam-se pouco visíveis quando ocorre a maturação das plantas ou quando há aumento da temperatura (Nyzaka *et al.*, 1979).

Os principais distúrbios causados por vírus na célula do hospedeiro podem ser atribuídos às modificações da síntese protéica e, também, da atividade enzimática, especialmente da peroxidase (Abu-Jawdah & Kummert, 1983).

O presente trabalho teve como objetivo verificar alterações no metabolismo de plantas de cinco genótipos de trigo, infetadas com o SBWMV, através das determinações dos níveis de proteínas solúveis e das atividades da peroxidase e protease.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e local de execução

Foram utilizados cinco genótipos de trigo, com diferentes níveis de resistência ao SBWMV, sendo: BRS Guabiju - moderadamente resistente; BRS 194 - resistente; BRS 179 - moderadamente suscetível; BR 23 - suscetível; PF 980524 - altamente suscetível (Indicações Técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2003).

Amostras dos cinco genótipos de trigo foram coletadas em experimento conduzido na área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Trigo, e as análises foram realizadas no Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três blocos. Cada parcela constituiu-se de cinco linhas de 5 m de comprimento, e com espaçamento de 0,2 m entre as linhas.

Na semeadura foram distribuídas 330 sementes viáveis/m² e a adubação foi efetuada com 450 kg/ha da fórmula NPK 5:25:25. A adubação de cobertura constou de 45 kg/ha de N, na forma de uréia. Os tratamentos fitossanitários foram realizados de acordo com o recomendado para a cultura de trigo. Em cada parcela, 45 dias após a emergência das plantas, foram coletadas aleatoriamente cinco plantas com sintomas e cinco sem sintomas da virose. A identificação das plantas sintomáticas foi feita visualmente, tendo em vista que os anti-soros testados por Elisa não apresentaram resultados satisfatórios. Considerou-se infetadas com o SBWMV as plantas com sintomas característicos de mosaico, aliado a presença de esporos de resistência do *P. graminis* nas raízes. Também das plantas assintomáticas confirmou-se a ausência do vetor no sistema radicular.

Determinação da atividade da peroxidase

Para a determinação da atividade da peroxidase foi utilizado o método descrito por Schons (1997).

O extrato enzimático foi obtido triturando-se 400 mg de tecido foliar fresco em 4 ml de tampão Fosfato de potássio 0,2 M pH 6,7 (gelado), seguido de centrifugação por 5 min a 5600 g a 4 °C.

O sistema de reação continha 0,1 ml do sobrenadante do extrato enzimático, 0,9 ml de tampão, 0,5 ml de solução de peróxido de hidrogênio a 30% e 0,5 ml de solução de diclorofenol e aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 ml de água destilada). Os tubos de ensaio, contendo o sistema de reação, foram mantidos em banho-maria a 30 °C por 5 min; a reação foi interrompida pela adição de 2 ml de álcool etílico. A leitura de absorbância foi realizada imediatamente em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade da peroxidase foi expressa em μM de H₂O₂ decomposto/min.mg de proteína.

Determinação da quantidade de proteínas solúveis

A quantidade de proteínas solúveis foi analisada no extrato enzimático, descrito no item anterior, de acordo com o método de Bradford (1976).

O meio de reação continha 0,1 ml de extrato enzimático e 5 ml do reativo de Bradford. Após repouso de 5 min, realizaram-se as leituras de absorbância, em espectrofotômetro a 595 nm, as quais foram comparadas com a curva padrão de caseína. Os resultados foram expressos em mg de proteínas/g de matéria fresca (MF).

Determinação da atividade da protease

A atividade da protease foi analisada usando caseína como substrato, de acordo com o método descrito por Pai & Gaur (1981).

Triturou-se em almofariz gelado contendo areia previamente lavada, autoclavada e seca, 500 mg de tecido foliar em 10 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0. Centrifugou-se a 10.000 g, durante 30 min, a 4 °C, e utilizou-se o sobrenadante para determinar a atividade da enzima.

O meio de reação continha: 1 ml de extrato enzimático, 2 ml de solução de caseína a 0,5% pH 6,0 e 3 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,0. O sistema de reação foi incubado a 40 °C, em banho-maria, por 2 h. Após esse período, foram adicionados 2 ml de ácido tricloroacético a 15%, gelado.

A mistura foi resfriada em banho de gelo, para completa precipitação da proteína, e centrifugada a 5.000 g por 20 min. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para reação colorimétrica com o reagente Folin-Ciocalteu. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 660 nm e comparadas com a curva padrão de tirosina. A atividade da protease foi expressa em μM de tirosina . mg de proteína/min.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e

as diferenças entre as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo como os dados da atividade específica da peroxidase referentes à infecção com o SBWMV (Tabela 1), pode-se observar que os cinco genótipos de trigo mantiveram a mesma tendência, ou seja, a atividade da peroxidase aumentou em função do aparecimento do sintoma da doença. As cultivares BRS 179, BR 23 e a linhagem PF 980524 apresentaram maior atividade da enzima, fato este que pareceu estar associado aos níveis de resistência das plantas ao SBWMV. Estes resultados corroboram o observado por Milicevic (1988), que relacionou a atividade da enzima ao grau de resistência de plantas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) ao *Broccoli necrotic yellow virus* (BNYV), gênero *Cytorhabdovirus*. A atividade da peroxidase apresenta-se como um possível indicador bioquímico de resistência a diversas viroses, podendo ser utilizada em programas de melhoramento genético de plantas.

De acordo com Nicolini (2002), plantas de aveia (*Avena sativa* L.), infetadas com o BYDV, apresentaram a atividade da enzima maior quando comparadas às plantas sadias. Assim, vários autores relataram o aumento na atividade da peroxidase em plantas infetadas por vírus, sugerindo a utilização desta enzima como indicadora deste tipo de estresse (Andreeva, 1989).

Diferenças significativas nos teores de proteínas solúveis foram observadas quando comparou-se plantas sem e com sintomas de mosaico (Tabela 2). De um modo geral as plantas sem sintomas apresentaram níveis maiores de proteínas quando comparadas às com sintomas. Os resultados demonstraram que a virose reduziu os níveis de proteínas em todas as cultivares. Enquanto que Leal & Lastra (1984) observaram o mesmo efeito em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infetadas com *Tomato yellow mosaic virus*, Schons *et al.* (1995) obtiveram resultados diferentes quando utilizaram plantas de melancia [*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsumy & Nakai] infetada com o *Papaya ringspot virus* – type W. Esta diferença nos resultados, provavelmente, é devida ao tipo de relação que cada vírus tem com as plantas hospedeiras. Do mesmo modo, quando folhas de *Nicotiana tabacum* L. são inoculadas com o *Tobacco mosaic virus*, surgem lesões locais e os níveis de proteínas aparecem aumentados (Van Loon, 1970).

Os dados referentes à atividade da protease em folhas de trigo com e sem sintomas de mosaico estão apresentados na Tabela 3. Os resultados evidenciaram diferenças significativas na comparação de plantas sem e com sintomas, observando-se uma tendência de aumento na atividade enzimática nas plantas com sintomas. As maiores atividades da protease foram observadas na cultivar BR 23 e na linhagem PF 980524, devido, talvez, à maior suscetibilidade destes genótipos ao SBWMV. Destaca-se que quanto mais suscetível é o genótipo ao vírus, maior a atividade da protease,

TABELA 1 - Atividade da peroxidase (média de três repetições), em diferentes genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) com e sem sintomas de mosaico induzida por *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV)

Genótipo	Atividade da peroxidase (μ M H ₂ O ₂ decomposto . min/mg de proteína)		Média
	Plantas com sintomas	Plantas sem sintomas	
BRS Guabiju	A 0,074	B 0,026	0,050 b
BRS 194	A 0,072	B 0,032	0,052 b
BRS 179	A 0,097	B 0,056	0,077 a
Trigo BR 23	A 0,096	B 0,064	0,080 a
PF 980524	A 0,095	B 0,046	0,070 a
Média	0,087	0,045	
CV% 14,03			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e precedidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferiram entre si pelo Teste de Duncan, a 5% de significância

**CV = coeficiente de variação

TABELA 2 - Teores de proteínas solúveis (média de três repetições), em diferentes genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) com e sem sintomas de mosaico induzidos por *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV)

Genótipo	Teores de proteínas (mg de proteínas/g de MF)		Média
	Plantas com sintomas	Plantas sem sintomas	
BRS Guabiju	B 7,62	B 7,93	7,77 c
BRS 194	B 8,95	A 9,81	9,38 a b
BRS 179	B 8,37	A 9,96	9,17 a b
Trigo BR 23	B 7,34	A 9,71	8,53 b c
PF 980524	B 9,51	A 10,66	10,08 a
Média	8,36	9,61	
CV% 10,63			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e precedidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferiram entre si pelo Teste de Duncan, a 5%, de significância

**CV = coeficiente de variação

podendo sua determinação ser utilizada na detecção de suscetibilidade ao vírus.

Conforme Estelle (2001), pouco se conhece sobre os mecanismos regulatórios e a identidade das proteases vegetais. Sabe-se, porém, que o período de atividade da maior parte das proteínas é significativamente mais curto do que o tempo de vida dos organismos que a produzem. Este fato é de extrema importância, pois assim as plantas conseguem, através da proteólise, controlar aspectos da regulação como fotomorfogênese, ciclo celular, fotossíntese, morte celular programada e respostas de defesa.

Pesquisas sobre o mecanismo de resposta da planta ao vírus têm revelado a indução de um grupo de proteínas relacionada à patogênese, entre as quais destaca-se uma única proteína endoproteolítica ativa, ou seja, uma protease (Vera

TABELA 3 - Atividade da protease (média de três repetições) em diferentes genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) com e sem sintomas de mosaico induzidos pelo *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV)

Genótipo	Atividade da protease (μM de tirosina/mg de proteína . min)		
	Plantas com sintomas	Plantas sem sintomas	Média
BRS Guabiju	A 0,0099	B 0,0075	0,008 b
BRS 194	A 0,0110	B 0,0091	0,010 b
BRS 179	A 0,0097	B 0,0077	0,008 b
Trigo BR 23	A 0,0145	B 0,0104	0,012 a
PF 980524	A 0,0169	B 0,0108	0,013 a
Média	0,012	0,009	
CV% 14,66			

*Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e precedidas de mesma letra maiúscula na linha, não diferiram entre si pelo Teste de Duncan, a 5% de significância

**CV = coeficiente de variação

& Conejero, 1988).

Resultados referentes à atividade da protease, quando comparadas às plantas de tomateiro sadias e infetadas com o *Tomato mosaic virus* (ToMV), gênero *Tobamovirus*, demonstraram que a expressão desta enzima foi maior nas plantas com sintomas da virose (Wojahn 2003). No presente estudo, as plantas com sintomas também apresentaram maior atividade da protease em relação às sem sintomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-JAWDAH, H. & KUMMERT, J. Effect of Aliette on AMV infection of bean leaves and on the resultant alterations in the patterns of proteins and peroxidase. *Phytopathology* 108:294-303. 1983.

ANDREEVA, I.V. Membrane permeability and peroxidase activity in cultivars differing in resistance to mosaic virus. *Fiziologiya Rasteni* 36:810-817. 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72:48-54. 1976.

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

CAETANO, V.R., PIEROBON, C.R., LUZZARDI, G.C. & PRESTES, A.M. Mosaico do trigo começa a causar problema.

Pelotas. Instituto de Pesquisa Agropecuária do Sul (IPEAS. Indicação de pesquisa, 13). 1971.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4:254-260. 2001.

INDICAÇÕES TÉCNICAS DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA EM TRIGO. Anais, XXXV Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo. Passo Fundo. 2003. p.119.

LEAL, N. & LASTRA, R. Altered metabolism of tomato plants infected with tomato yellow virus. *Physiological Plant Pathology* 14:1-7. 1984.

MILICEVIC, N.B. Peroxidase activity in the root of sugarbeet infected by beet necrotic yellow vein virus. *Glas Zastite-Bilja* 39:401-406. 1988.

NICOLINI, F. Incidência, severidade e danos causados pela virose do nanismo amarelo da cevada em aveia. (Dissertação de Mestrado). Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo. 2002.

NYKAZA, S.M., HEYNE, E.G. & NIBLETT, C.L. Effects of Wheat soilborne mosaic on several plant characters of winter wheat. *Plant Disease* 63:594-598. 1979.

PAI, K.V. & GAUR, B.K. Effect of pH of the assay medium on protease activity in germinating barley seeds. *Indian Journal of Plant Physiology* 24:168-170. 1981.

REIS, E.M., CASA, R.T. & FORCELINI, C.A. Doenças do Trigo. In: Filho, A.B., Kimati, H. & Amorin, L. (Eds.) *Manual de Fitopatologia – Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo. Agronômica Ceres Ltda. 1997. pp.725-735.

SCHONS, J. Efeito do vírus do enrolamento da folha da batata sobre os teores de poliaminas, proteínas, açúcares e atividade da peroxidase em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) com diferentes níveis de resistência. (Tese de Doutorado). Botucatu. Universidade Estadual de São Paulo. 1997.

SCHONS, J., PAVAN, M.A. & BRASIL, O.G. Efeito do PRSV-W sobre os níveis de proteínas solúveis e atividade da peroxidase em melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.). *Fitopatologia Brasileira* 20:302. 1995 (Resumo).

VAN LOON, L.C. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Sansum" and "Sansum NN". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 4:199-211. 1970.

VERA, P. & CONEJERO, V. Pathogenesis-related proteins of tomato. *Plant Physiology* 87:58-63. 1988.

WOJAHN, D. Efeito de diferentes doses do ácido acetil salicílico e do ácido salicílico sobre a atividade da protease, teores de proteínas e do crescimento em função do tratamento preventivo e curativo de plantas em tomateiro infetado com o *Tomato mosaic virus*. (Dissertação de Mestrado). Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo. 2003.