

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DETECÇÃO DO RICE STRIPE NECROSIS VIRUS POR RT-PCR EM TEMPO
REAL E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE ARROZ (*Oryza
sativa* L.)

Brenda Moz
Engenheira Agrônoma UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Novembro de 2023

CIP - Catalogação na Publicação

Mos, Brenda
DETECÇÃO DO RICE STRIPE NECROSIS VIRUS POR RT-PCR
EM TEMPO REAL E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS
DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) / Brenda Mos. -- 2023.
67 f.
Orientador: Edson Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

1. Arroz. 2. Rice stripe necrosis virus. 3. RT-PCR
em tempo real. 4. Resistência varietal. I. Bertolini,
Edson, orient. II. Título.

BRENDA MOZ
Engenheira Agrônoma - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 23.11.2023
Pela Banca Examinadora

EDSON BERTOLINI
Orientador - PPG Fitotecnia
UFRGS

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE

Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

DÉBORA FAVERO
Instituto Rio Grandense do
Arroz IRGA / RS

CAMILA LAGE DE ANDRADE
Agrônoma - Laboratório de
Diagnóstico Fitossanitário

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

JOSÉ ANTÔNIO MARTINELLI
PPG - Fitotecnia UFRGS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus e meus pais pela oportunidade, por todo o incentivo e ajuda necessária para realização deste mestrado.

Ao meu orientador, prof. Edson Bertolini, por toda paciência, orientação, ajuda e amizade.

Aos professores Marcelo Gravina de Moraes e Lauri Lourenço Radunz, que contribuíram ativamente neste projeto.

A todos colaboradores do Laboratório Agronômica, em especial da Dana, Camila, Tatiana e Marisa, por toda parceria e ensino desde o estágio.

A todos meus colegas de Pós-graduação e bolsistas de iniciação científica, em especial do laboratório de virologia, por todo companheirismo, força e apoio.

Aos agrônomos e técnicos do IRGA e EPAGRI, em especial a Débora, que nunca mediram esforços e sempre auxiliaram da melhor forma possível.

A todos meus professores desde o fundamental e amigos que cruzaram pelo meu caminho e ajudaram a tornar quem sou hoje.

Muito obrigada!

DETECÇÃO DO RICE STRIPE NECROSIS VIRUS POR RT-PCR EM TEMPO REAL E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA EM GENÓTIPOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Autor: Brenda Moz

Orientador: Prof. Edson Bertolini

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos cereais mais produzidos no mundo. Cultivado em todos os continentes, desempenha papel significativo na nutrição e na segurança alimentar da população. O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais do grão, sendo o primeiro fora do continente Asiático. A ocorrência de doenças limita a produtividade e a qualidade das sementes e grãos da cultura. No Rio Grande do Sul, estado com maior área semeada de arroz, diversas doenças apresentam importância econômica. O enrolamento foliar é uma doença emergente no cultivo do arroz, causado pelo rice stripe necrosis virus (RSNV). O vírus é transmitido exclusivamente pelo plasmodioforomiceto *Polymyxa graminis*, habitante do solo, onde suas estruturas de resistência podem permanecer por décadas. Seus sintomas são facilmente confundidos com fitotoxidez por herbicidas, dificultando a correta diagnose e as recomendações de medidas de manejo e controle. A prevenção é a medida de controle ideal para doenças causadas por vírus e, atualmente, não se conhecem genótipos resistentes ou tolerantes a virose e nem ferramentas de detecção precoces, confiáveis e sensíveis. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi desenvolver um protocolo molecular de RT-PCR em tempo real associado a métodos diretos de preparação de amostras para detectar o vírus, além da identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao vírus. Foram desenhados iniciadores, sonda *TaqMan* e desenvolvido um protocolo de detecção do RSNV utilizando métodos diretos de preparação de amostras. As análises *in silico* e *in vitro* demonstraram a especificidade e correto funcionamento dos iniciadores e da sonda, obtendo amplificação em amostras vegetais naturalmente infectadas e de solo com a presença do vetor. Foram observadas diferenças na resistência ou tolerância ao RSNV entre as cultivares e híbrido testados. Nas cultivares IRGA 424 RI e BRS Pampa CL não foram observados sintomas e nem foi detectada a presença do vírus. As cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura apresentaram maior carga viral. Os trabalhos desenvolvidos foram de fundamental importância para traçar as melhores estratégias de manejo e controle, implicando em redução do uso de insumos de forma inadequada, protegendo o ecossistema e minimizando os custos de produção.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (67 f.) Novembro, 2023.

DETECTION OF RICE STRIPE NECROSIS VIRUS BY REAL TIME RT-PCR AND ASSESSMENT OF RESISTENCE IN RICE (*Oryza sativa* L.)

Author: Brenda Moz

Adviser: Prof. Edson Bertolini

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most produced cereals in the world. Cultivated on all continents, it plays a significant role in nutrition and food security. Brazil is among the ten largest producers in the world, being the first outside the Asian continent. The occurrence of diseases limits the productivity and quality of crop seeds and grains. In Rio Grande do Sul, the state with the largest area sown with rice, several diseases are economically important. Rice crinkle is an emerging disease caused by rice stripe necrosis virus (RSNV). The virus is transmitted exclusively by the plasmodiophoromycete *Polymyxa graminis*, a soil dweller, where its resistance structures can remain for decades. The symptoms are easily confused with phytotoxicity by herbicides, making the correct diagnosis, management recommendations and control measures difficult. Prevention is the ideal control measure for diseases caused by viruses and, currently, no resistant or tolerant genotypes are known nor are early, reliable and sensitive detection methods available. Thus, the main objective of the work was to develop a molecular protocol of real-time RT-PCR associated with direct preparation methods of samples to detect the virus and identify resistant or tolerant genotypes to the virus. Primers and TaqMan probe were designed and an RSNV detection protocol using direct methods of sample preparation was developed. *In silico* and *in vitro* analysis demonstrated the specificity and correct working of the primers and probe, obtaining amplification in naturally infected plant and soil samples with the presence of the vector. Differences in resistance or tolerance to RSNV were observed among the cultivars and hybrid tested. In the cultivars IRGA 424 RI and BRS Pampa CL, no symptoms were observed nor the presence of the virus. The cultivars SCS 121 CL and SCS 122 Miura showed higher viral titer. The results obtained are of fundamental importance to assist in the recommendations of management and control strategies, resulting in reduced use of unnecessary inputs, protecting the ecosystem and minimizing production costs.

² Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (67 p.) November, 2023.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A cultura do arroz.....	3
2.2 Doenças viróticas no arroz.....	7
2.3 Enrolamento foliar do arroz.....	7
2.3.1 Sintomatologia.....	8
2.3.2 Agente causal.....	9
2.3.3 Transmissão.....	11
2.4 Métodos de detecção e diagnóstico.....	14
2.4.1 Métodos sorológicos.....	14
2.4.2 Métodos moleculares.....	15
2.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase.....	16
2.4.2.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	17
2.5 Métodos de manejo e controle.....	18
2.5.1 Controle da dispersão primária.....	18
2.5.2 Controle da dispersão secundária.....	20
2.5.3 Controle do efeito da infecção na planta.....	20
2.6 Referências.....	22
3 CAPÍTULO 1.....	28
Abstract.....	29
References.....	41
4 CAPÍTULO 2.....	43
4.1 Introdução.....	44
4.2 Materiais e métodos.....	45
4.3 Resultados e discussão.....	47
4.4 Referências.....	55
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	57

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Ranking dos dez países maiores produtores de arroz em casca (média de 2015 a 2017). 5
2. Família, gênero e espécie de vírus descritos na cultura do arroz. 7

ARTIGO 1

1. Sensitivity comparison of RT-PCR protocols in the detection of rice stripe necrosis virus, using serial dilutions of different samples (vegetal material and soil) and sample preparation methods (with and without RNA purification)..... 36
2. Comparison of RSNV detection by real-time RT-PCR with and without RNA purification (direct and CTAB) in roots and leaves of naturally infected rice plants 38

CAPÍTULO 2

1. Resultados da observação de sintomas nas folhas, presença do vetor nas raízes e amplificação do RSNV por RT-PCR em tempo real nos diferentes genótipos e repetições. 50
2. Valores da média de Ct da RT-PCR em tempo real e desvio padrão em função do genótipo. 51

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Sintomas do enrolamento foliar em plantas de arroz. Folha com listras cloróticas (A); Folhas com sintoma de enrolamento (B e C); Necrose da planta (D)..... 9
2. Organização genômica do RSNV composto de dois segmentos de RNA, sendo o RNA 1 responsável por codificar a replicase que possui os motivos metil-transferase, helicase, protease e RNA polimerase (tamanho de 6.614 nucleotídeos). O RNA 2 mede 4.634 nt e codifica a proteína do capsídeo (CP), a proteína secundária do capsídeo (RTD), o bloco triplo de genes (TGB1, TGB2 e TGB3) e a proteína rica em cisteína (CRP). A estrela representa o códon de parada supressivo; o ponto, a estrutura conservada m⁷G cap e na região 3' a cauda poly-A..... 10
3. Ciclo de vida de *Polymyxa graminis*, dividido em fase esporogênica para produção do cistossoro (fonte de inóculo no solo) e, fase esporangial, produção de zoósporos. 13

ARTIGO 1

1. Nucleotide alignment of the sequences available in the NCBI of CP gene of RNA 2 of rice stripe necrosis virus in Geneious Prime software. Blue darkened are specific sequences of primers and *TaqMan* probe for RSNV. 33
2. Real-time *TaqMan* RT-PCR. Amplification curves of rice stripe necrosis virus (RSNV) with different type of samples and methods of sample preparation: a) symptomatic leaves with CTAB nucleic acid extraction b) symptomatic leaves with direct sample preparation c) soil with CTAB nucleic acid extraction d) healthy material and/or negative control of amplification. 35

CAPÍTULO 2

1. Presença de sintomas do enrolamento foliar, listras cloróticas e necróticas na cultivar SCS 121 (A); Necrose da planta da cultivar SCS 122 Miura (B); Sintoma

	Página
leve de enrolamento da folha e listras cloróticas na cultivar Guri INTA CL (C); Sintoma de enrolamento e listras cloróticas no híbrido BRH 522 CL (D)..	48
2. Presença do cistossoros de <i>Polymyxa graminis</i> em raiz da cultivar de arroz SCS 121 CL.	48
3. Dendograma com ponto de corte pelo método Mojena (1977), dividindo os genótipos em dois grupos conforme a presença ou ausência de sintomas, presença do vetor e valores do ciclo de amplificação por RT-PCR em tempo real.	52

1 INTRODUÇÃO

Cultivado em todos os continentes, o arroz (*Oryza sativa* L.) desempenha um papel significativo na nutrição e na segurança alimentar da população mundial. A região da Ásia e Oceania, onde se concentra 70% da população total dos países em desenvolvimento, cultiva e consome cerca de 90% do arroz mundial apresentando um consumo médio de 78 kg/habitante/ano (SOSBAI, 2018). Apenas 10 países representam 85% da produção da cultura, sendo o Brasil o único país fora do continente asiático a estar neste ranking e o maior país em produção e área colhida do Mercosul (Wander, 2021). O arroz possui um preço mais acessível quando comparado aos demais cereais e é a base da alimentação de metade da população mundial, fornecendo cerca de 20% da energia diária necessária e 15% da proteína *per capita* (Domene, Ghedini e Steluti, 2021). Com estimativas de crescimento da população mundial, as projeções para o ano de 2050 são de aproximadamente 9.6 bilhões de habitantes (United Nations, 2013), e a demanda pelo alimento aumentará de forma considerável.

A ocorrência de doenças limita o rendimento e a qualidade das sementes e grãos das culturas em geral (SOSBAI, 2018). No Rio Grande do Sul (RS), estado com maior área semeada, diversas doenças como a brusone, o enrolamento foliar e as manchas foliares causam perdas significativas de produtividade. Essas enfermidades podem ocasionar perdas de até 100% quando as condições ambientais são favoráveis (CONAB, 2015). O enrolamento foliar é causado pelo vírus rice stripe necrosis virus (RSNV), sendo transmitido exclusivamente pelo cercozoário *Polymyxa graminis* (Cúndom *et al.*, 2018). Não está clara a importância real desta virose, porém, devido a mudanças climáticas e principalmente nos sistemas de cultivo, essa doença vem ganhando notoriedade nas lavouras do RS. Os sintomas causados pelo vírus são facilmente confundidos com causas de outra natureza, dificultando a adoção de medidas eficazes de manejo e controle. Esse

fato gera preocupação aos produtores, visto que o controle de doenças causadas por vírus é muito difícil de ser realizado ou, até mesmo, ineficaz (Souza, 2006).

Neste cenário, a detecção do vírus e a diagnose correta em lavouras de arroz é de extrema importância. Aliado às dificuldades a campo, atualmente não estão disponíveis comercialmente anticorpos específicos para detecção do RSNV e as técnicas moleculares, portanto, são as mais indicadas. Não foram encontrados na bibliografia protocolos de RT-PCR em tempo real associado a métodos diretos de preparação de amostras para detectar o vírus. Em contrapartida, novos trabalhos estão sendo publicados sobre a variabilidade genética do RSNV no Brasil, o conhecimento da variabilidade genética do vírus permitirá o desenvolvimento e validação de protocolos de RT-PCR em tempo real para uma detecção mais confiável e precisa do vírus, possibilitando o correto diagnóstico da doença, a fim de indicar recomendações mais adequadas de manejo e controle. Devido à sua natureza infecciosa e o pouco conhecimento de sua epidemiologia, o controle do enrolamento foliar é extremamente difícil. As medidas de controle mais almejadas são as preventivas, destacando-se o uso de cultivares ou híbridos resistentes ao vírus. No entanto, são escassas as informações sobre a disponibilidade deste material, assim como sobre metodologias apropriadas para a identificação das fontes de resistência.

Desta forma, os objetivos deste trabalho foram desenvolver um protocolo de detecção através da RT-PCR em tempo real associado a métodos diretos de preparação de amostras e identificar genótipos resistentes ou tolerantes ao RSNV. Os resultados auxiliarão na compreensão de aspectos epidemiológicos da doença, bem como no desenvolvimento de estratégias integradas de manejo, visando o controle preventivo e eficaz, reduzindo os prejuízos econômicos e os impactos ambientais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do arroz

O arroz é pertencente à família Poaceae, do gênero *Oryza*, sendo, entre aproximadamente 20 espécies, a *Oryza sativa* L. a principal. Apresenta sistema fotossintético C3 e aerênquimas nos colmos e raízes, que possibilita a adaptação da planta ao ambiente aquático, viabilizando seu cultivo de forma irrigada (SOSBAI, 2018).

Na antiguidade, o arroz servia de acompanhamento nas refeições em países católicos, dispersando-se por todo mundo através da diáspora africana. No Brasil, em especial, sua introdução se deu através das primeiras embarcações portuguesas, por volta do ano de 1550, sendo oferecido aos índios - que possivelmente já conheciam variedades e espécies locais (Sousa e Ferreira, 2021). A produção de arroz vermelho (conhecido à época como arroz de Veneza) se popularizou no século XVIII no País. O estado do Maranhão recebeu em 1865, originadas de Portugal, uma porção de sementes de arroz branco. Com o passar do tempo, a variedade foi bem aceita, vindo a ser preferida pelo mercado consumidor. Nesse cenário, ampliaram-se as áreas de produção do arroz branco e foi proibido o plantio de arroz de Veneza.

Seu primeiro relato de cultivo em lavouras de subsistência no Brasil foi após 1530. Com destaque ao Rio Grande do Sul, há relatos de que a introdução se deu nas cidades de Santa Cruz do Sul e Taquara. No ano de 1904, em Pelotas/RS, foi semeada a primeira

lavoura irrigada de característica empresarial (Pereira, 2002), e sua rápida expansão foi impulsionada pela irrigação mecânica e pela demanda de exportações (Sousa e Ferreira, 2021). Atualmente, o RS é o maior produtor nacional de arroz, sendo cultivado em aproximadamente 129 municípios (SOSBAI, 2018), na sua grande maioria de forma irrigada. Dentro deste cenário, cabe enfatizar que na década de 60, o sistema de sequeiro era responsável por aproximadamente 80% do arroz nacional produzido. Esse sistema de cultivo acabou por não atender às exigências de qualidade mercadológicas, abrindo espaço para o sistema irrigado (Sousa e Ferreira, 2021).

Antigamente, o preparo do solo era realizado com implementos tracionados por animais; semeadura manual; sem aplicação de fertilizante; a inundação variava de acordo com o aguador e à fonte de água estar situadas a cotas mais altas que a lavoura; e colheita era realizada manualmente. Mesmo com a modernização no passar das décadas, a produtividade se manteve baixa (2 toneladas) por quase 50 anos (CONAB, 2015). A produtividade alavancou a partir da invenção da entaipadeira de base larga, que aumentou a área útil cultivada, reduziu as perdas de fertilizantes e sementes, uso de adubação química de base e de cobertura, curvas de nível, bombas acionadas por motores elétricos que possibilitaram a inundação das lavouras a partir do nível do manancial, e colheita com uso de maquinários modernizados. Estes são apenas alguns dos fatores que possibilitaram atingir altas produtividades.

As maiores produtividades encontradas a nível mundial são de países com áreas diminutas, mas com uso intensivo de mão de obra e maiores cuidados durante todo o ciclo produtivo. Um exemplo é a Austrália, responsável pela maior média de produtividade mundial entre os anos de 2015 e 2017, produzindo cerca de 10 t ha^{-1} (Wander, Silva e Ferreira, 2021). Contudo, mesmo com a maior média de produtividade, o país não se encontra no ranking dos maiores produtores mundiais da cultura. O Brasil não se encontra

entre os 10 países com maiores áreas colhidas, mas ocupa a 9ª posição no ranking dos maiores países produtores de arroz em casca (Tabela 1), evidenciando sua capacidade produtiva, o melhor aproveitamento da área agrícola e sua importância mundial na produtividade de arroz.

TABELA 1. Ranking dos dez países maiores produtores de arroz em casca (média de 2015 a 2017).

Classificação	País	Produção (t)	Participação (%)
1	China	211.970.667	28,00
2	Índia	162.913.333	21,52
3	Indonésia	78.711.614	10,40
4	Bangladesh	50.412.777	6,66
5	Vietnã	43.655.418	5,77
6	Tailândia	29.246.189	3,86
7	Myanmar	25.836.005	3,41
8	Filipinas	18.351.143	2,42
9	Brasil	11.797.635	1,56
10	Paquistão	10.550.013	1,39
Demais países		113.606.524	15,01
Total		757.051.318	100,00

Fonte: Wander, Silva e Ferreira, 2021

Na safra 2022/23, a área semeada no Brasil foi de 1.473,7 mil hectares, produção de 10.015 milhões de toneladas e produtividade média de 6.796 kg ha⁻¹ (CONAB, 2023). O arroz é cultivado praticamente em todas as regiões do país, seja em terras altas ou irrigado por inundação. A região Sul concentra 81% da produção, sendo o Rio Grande do Sul, o estado brasileiro com maior área semeada, com aproximadamente 968,7 mil hectares, representando cerca de 70,5% da produção nacional (CONAB, 2021).

A projeção para expansão da área orizícola mundial indica estabilidade (CONAB, 2021); já para o estado do Rio Grande do Sul, o cenário é pouco esperançoso pois as áreas

de arroz estão sendo trocadas por soja, devido principalmente à fatores econômicos. Todavia, a população mundial está aumentando e, conseqüentemente, a demanda. Esse fato reforça a necessidade de reduzir as perdas de produção em uma mesma área, adequando os manejos realizados na lavoura. Essas práticas devem contemplar todo o ciclo produtivo, desde a pré-semeadura à colheita, visando o aumento da produtividade para atender a demanda futura. Nesse sentido, as doenças do arroz são um dos principais empecilhos para que a cultura possa expressar o seu máximo potencial produtivo.

A pressão de inóculo, a mudança dos sistemas de cultivo e as condições edafoclimáticas vêm contribuindo favoravelmente à incidência de diversas doenças que limitam o potencial produtivo e qualidade de grãos do arroz. Patógenos antes inexpressivos e considerados secundários estão sendo mais observados e relatados pelos produtores com o passar das safras. Algumas doenças que aconteciam de modo endêmico passaram a ser epidêmicas; já outras, de ocorrência esporádica, passaram a representar obstáculos importantes em determinados locais.

No Rio Grande do Sul, diversas doenças como a brusone causada pelo fungo *Pyricularia oryzae* (Cavara) (forma perfeita *Magnaporthe oryzae* B. Couch), o enrolamento foliar e as manchas foliares e de grãos apresentam importância econômica. Essas doenças podem ocasionar perdas de até 100% quando as condições ambientais são favoráveis (CONAB, 2015). Além do clima, práticas culturais adotadas de forma antagônica às recomendadas pela pesquisa favoreceram a ocorrência de doenças (SOSBAI, 2018).

2.2 Doenças viróticas no arroz

Doenças viróticas, nas culturas em geral, são de difícil controle pela natureza e característica dos vírus. Elas podem causar sérios problemas na lavoura principalmente quando a infecção acontece de forma precoce nas plantas. Foram reportados 14 vírus na cultura do arroz ao redor do mundo (Tabela 2). Destes, apenas dois foram relatados na América, o rice hoja blanca virus (RHBV) e o rice stripe necrosis virus (RSNV).

TABELA 2. Família, gênero e espécie de vírus descritos na cultura do arroz.

Família	Gênero	Espécie	Ácido nucleico
<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i>	<i>Rice latent virus 1</i>	ssDNA
<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i>	<i>Rice latent virus 2</i>	ssDNA
<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Rice dwarf virus</i>	dsRNA
<i>Sedoreoviridae</i>	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Rice gall dwarf virus</i>	dsRNA
<i>Spinareoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>	<i>Rice black streaked dwarf virus</i>	dsRNA
<i>Spinareoviridae</i>	<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>	dsRNA
<i>Benyviridae</i>	<i>Benyvirus</i>	<i>Rice stripe necrosis virus</i>	ssRNA(+)
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice grassy stunt tenuivirus</i>	ssRNA(-)
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice hoja blanca tenuivirus</i>	ssRNA(-)
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice stripe tenuivirus</i>	ssRNA(-)
<i>Secoviridae</i>	<i>Waikavirus</i>	<i>Rice tungro spherical virus</i>	ssRNA(+)
<i>Solemoviridae</i>	<i>Sobemovirus</i>	<i>Rice yellow mottle virus</i>	ssRNA(+)
<i>Potyviridae</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Rice necrosis mosaic virus</i>	ssRNA(+)
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Tungrovirus</i>	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	dsDNA-RT

Fonte: Gilmer e Ratti, 2017.

No Brasil, somente há relatos da ocorrência do RSNV. Sua primeira detecção foi realizada na safra 2001/02 no município de Dona Francisca/RS (Maciel *et al.*, 2006).

2.3 Enrolamento foliar do arroz

A doença do enrolamento foliar, causada pelo rice stripe necrosis virus, foi primeiramente descrita na Costa do Marfim, em 1977 (Louvel e Bidaux, 1977). Nas

américas, o primeiro relato foi na Colômbia, em 1991 (Morales *et al.*, 1999) e, posteriormente, em 2001 na Depressão Central do Rio Grande do Sul (Maciel *et al.*, 2006). A ocorrência da doença em lavouras de arroz no Estado foi confirmada após análises. Amostras foliares das plantas sintomáticas foram submetidas ao teste DAS-ELISA contra o RSNV e as raízes foram analisadas em microscópio ótico para observação dos cistossoros do vetor. No Brasil, também foi observada em lavouras nos Estados de Santa Catarina (Scheuermann *et al.*, 2015), Goiás e Tocantins (Mello *et al.*, 2019).

Com relação à incidência da doença, na Costa do Marfim em 1977, foram testadas 30 cultivares frente ao RSNV e a porcentagem de plantas infectadas variou entre 0 e 48% (Louvel e Bidaux, 1977). Em Benin, sob condições de terras baixas, a incidência variou de 0 a 26,6% no ano de 2014 (Pinel-Galzi e Hérbrad, 2015). Já em Burkina Faso, em 2013, a incidência variou entre $80 \pm 5\%$ (Sereme *et al.*, 2014). Por ser uma doença relatada recentemente no Brasil, e ainda pouco estudada, não estão disponíveis dados a respeito da sua prevalência. No entanto, com o passar das safras, tem-se relato de produtores sobre o aumento da incidência. Ademais, segundo Scheuermann *et al.* (2015), em estudos realizados no Brasil, o sistema de semeadura em solo seco predispõe uma maior incidência da doença quando comparado ao pré-germinado com inundação antecipada.

2.3.1 Sintomatologia

O enrolamento foliar é uma doença de ocorrência esporádica e localizada, entretanto, em determinadas condições, tais como: diferentes cultivares, sistemas de cultivo e condições climáticas, que provocam perdas significativas. Os primeiros sintomas da doença são listras foliares cloróticas (Figura 1A) e nanismo, seguidos por listras necróticas, redução do perfilhamento e distorção e enrugamento das folhas (encarquilhamento) (Figura 1B e 1C) (Louvel e Bidaux, 1977), semelhantes aos sintomas

causados por fitotoxidez por herbicidas. Se a infecção ocorrer nos primeiros estádios de desenvolvimento, pode promover necrose de toda planta (Figura 1D) e causar uma significativa redução do estande final de plantas da lavoura, impactando nos componentes de rendimento de grãos de arroz. Já, por outro lado, se a infecção for tardia, não há morte da planta, mas o perfilhamento é drasticamente reduzido e, normalmente, uma única panícula distorcida e praticamente estéril é produzida (Souza *et al.*, 2021).



FIGURA 1. Sintomas do enrolamento foliar em plantas de arroz. Folha com listras cloróticas (A); Folhas com sintoma de enrolamento (B e C); Necrose da planta (D).

2.3.2 Agente causal

O agente causal da doença é o vírus rice stripe necrosis virus (RSNV) pertencente ao gênero *Benyvirus* e à família *Benyviridae*. Membros desta família se caracterizam por apresentarem genoma multipartido de RNA de fita simples de sentido positivo, com uma estrutura conservada chamada cap m⁷G em 5' e uma região poly-A em 3'. Essa característica da extremidade 3' os diferencia de outros vírus de plantas que, assim como estes, apresentam forma de bastonete (Gilmer e Ratti, 2017). Todos os vírus pertencentes a essa família são transmitidos por vetores de solo que pertencem à Ordem Plasmodiophorales.

O RSNV é composto de dois segmentos de RNA de fita simples (ssRNA) com tamanho de 6.614 (RNA - 1) e 4.631 (RNA - 2) nucleotídeos (Figura 2) (Lozano e Morales, 2009).

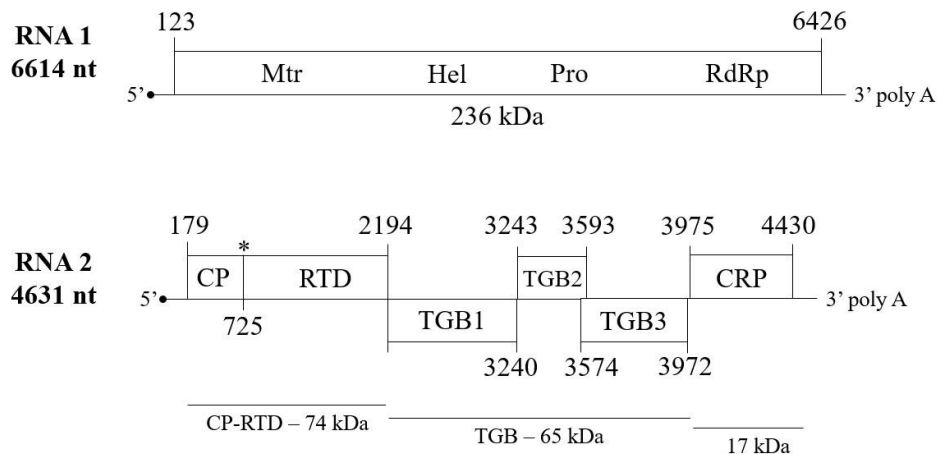


FIGURA 2. Organização genômica do RSNV composto de dois segmentos de RNA, sendo o RNA 1 responsável por codificar a replicase que possui os motivos metil-transferase, helicase, protease e RNA polimerase (tamanho de 6.614 nucleotídeos). O RNA 2 mede 4.634 nt e codifica a proteína do capsídeo (CP), a proteína secundária do capsídeo (RTD), o bloco triplo de genes (TGB1, TGB2 e TGB3) e a proteína rica em cisteína (CRP). A estrela representa o códon de parada supressivo; o ponto, a estrutura conservada M7G cap e na região 3' a cauda poly-A. Adaptado de: Gilmer e Ratti, 2017; Lozano e Morales, 2009.

O RNA 1 possui apenas uma única ORF, responsável por codificar a replicase de 236 kDa que apresenta motivos que permitem a autorreplicação das fitas de RNA. A metil-transferase é responsável pelo aumento da eficiência da replicação viral e pela metilação (Medeiros *et al.*, 2015) e está localizada na posição 222-231 e 414-426. O motivo helicase (Gly-X-X-Gly-X-Gly-Lys-Ser) está localizado na posição 955-962 do RNA1 e é responsável pelo desenrolamento duplex na replicação e transcrição do RNA do vírus (Hall e Matson, 1999). O motivo RdRp se localiza na posição 1922-1924 e tem função de RNA polimerase dependente de RNA (Lozano e Morales, 2009).

O RNA 2 possui seis ORFs putativos, sendo a ORF1 responsável por codificar a proteína do capsídeo viral; a ORF2 codifica a proteína secundária do capsídeo, sendo encontrada uma codificação KTER na região RT (posição 1178-1186 nt). Em seguida, são codificadas pelas três próximas ORFs as proteínas de bloqueio de genes triplo (TGB), envolvidas no movimento viral célula-a-célula (Gilmer *et al.*, 1992). A sexta e última ORF, responsável por clivar uma proteína rica em cisteína de 17 kDa (Lozano e Morales, 2009).

2.3.3 Transmissão

O vírus é transmitido exclusivamente pelo plasmodioforomiceto do reino Protista *Polymyxa graminis* Ledingham, um parasita intracelular biotrófico que infecta raízes de plantas da família Poaceae (Tamada e Asher, 2016). Apresentam estruturas de resistência (cistossoros) que podem permanecer no solo por décadas (Kanyuka *et al.*, 2003). Quando ocorrem condições favoráveis para seu desenvolvimento, essas estruturas induzem a formação de zoósporos primários biflagelados, adquirindo a capacidade de se deslocar pelo solo em altas condições de umidade (Pereira, 2018), penetrando na planta por meio dos pelos radiculares. Devido a existência dessas estruturas, implementos agrícolas, muitas vezes, acabam por disseminar o vetor de áreas contaminadas para áreas isentas (Morales *et al.*, 1999). A transmissão por sementes, nematoides ou pela cochonilha do arroz (*Ripersia oryzae*) não foi demonstrada em trabalhos realizados por Fauquet *et al.* (1998).

Em relação ao ciclo de vida de *P. graminis*, divide-se em primário (fase esporangial) e secundário (fase esporogênica), sempre iniciando com a fixação e penetração dos zoósporos. O zoósporo primário inicia o encistamento e penetração na superfície dos pelos radiculares do hospedeiro. Após a penetração, o zoósporo encistado

se desenvolve, forma uma estrutura tubular de corpo denso em forma de adaga e inicia a produção de um adesivo (adesório) que penetra a membrana plasmática do hospedeiro. Posteriormente, há liberação dos zoósporos através do adesório e liberação do conteúdo da estrutura tubular no citoplasma da célula da raiz da planta (Aist e Williams, 1971). Quando no citoplasma, o zoósporo sofre divisões mitóticas (Braselton, 1995) e desenvolvem-se em plasmódio esporangial multinucleado (zoosporângio), ainda separado do citoplasma por uma parede celular, aumentando em tamanho e número de acordo com o crescimento e alongamento dos pelos radiculares. Este, divide-se em lóbulos através de septos, que formam tubos de saída especializados até a parede celular. Os septos são desintegrados e são gerados os zoósporos secundários que são liberados através dos tubos para fora da raiz (Littlefield *et al.*, 1998), iniciando uma nova fase esporangial ou dando início a fase esporogênica.

Nessa fase, há formação de plasmódios esporogênicos e esporos que, quando maduros, são agrupados (cistossoros) e liberam um zoósporo primário em condições ambientais ideais. Ainda não se sabe quais fatores determinam o desenvolvimento esporangial ou esporogênico (Kanyuka *et al.*, 2003).

Em estágios mais avançados, os plasmódios esporogênicos diferem dos esporangiais por preencherem toda a seção transversal das células hospedeiras (Kanyuka *et al.*, 2003) e por serem separados do citoplasma da célula por uma fina membrana (Littlefield *et al.*, 1998). Já aos esporos de repouso, quando imaturos, apresentam forma angular e são compactos, posteriormente apresentando forma arredondada e com parede celular de várias camadas, agrupando-se e formando os cistossoros.

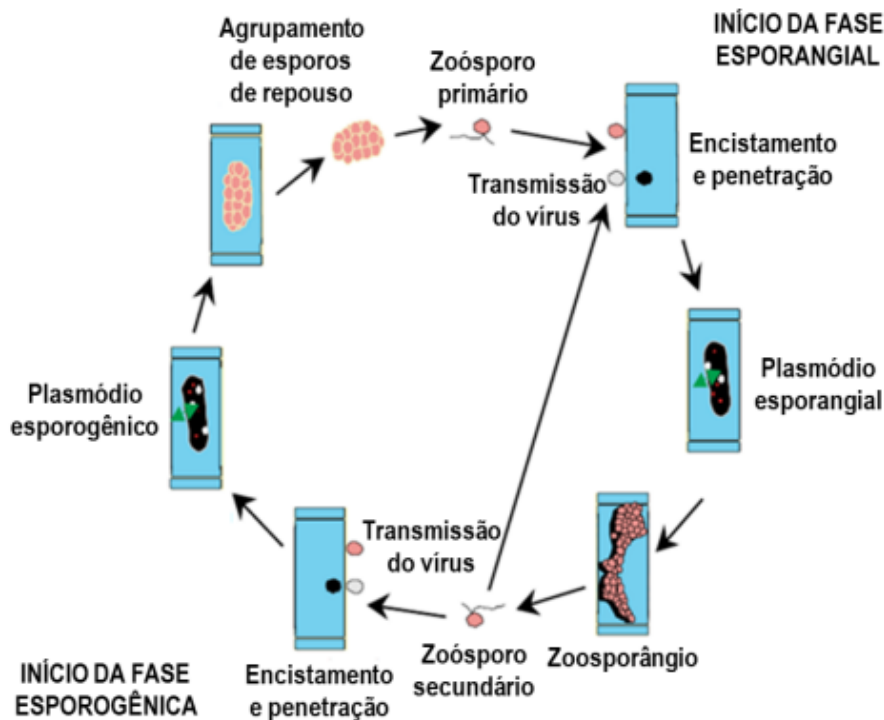


FIGURA 3. Ciclo de vida de *Polymyxa graminis*, dividido em fase esporogênica para produção do cistossoro (fonte de inóculo no solo) e, fase esporangial, produção de zoósporos. Adaptado de Kanyuka *et al.* (2003).

Ainda não se sabe a respeito do processo de aquisição do RSNV pelo vetor e da transmissão para as plantas hospedeiras. Provavelmente ocorre quando o zoósporo penetra e transfere seu conteúdo para a célula ou, quando na fase esporogênica, há apenas uma membrana fina que separa o plasmódio do citoplasma da célula da planta. Sabe-se que a infecção das raízes é favorecida em solos com alta umidade, mas os estudos não contemplaram solos alagados (Rush, 2003). Segundo Chen e Wilson (1995), os sintomas nas plantas são mais visíveis quando a temperatura é inferior a 20 °C. A temperatura ótima para o desenvolvimento do vetor é 18 °C. Já a infecção pelo vírus na planta ocorre favoravelmente na faixa de temperatura de 15 a 18°C.

Além de ser o vetor exclusivo do RSNV, *P. graminis* também é o transmissor de, pelo menos, outras 13 viroses que ocorrem em diferentes hospedeiros pelo mundo

(Kanyuka *et al.*, 2003). Não se sabe como o vetor adquire o vírus e nem se há capacidade de multiplicação dentro de *P. graminis*. No entanto, há evidências que indicam que não ocorre multiplicação no vetor para barley mild mosaic virus (BaMMV). Por outro lado, possivelmente o vírus é transportado no interior dos zoósporos e dos cistossoros, visto que não são removidos dos zoósporos por lavagem e nem inativados por antissoros. Ademais, cistossoros permanecem virulíferos mesmo após tratamento com NaOH e HCl (Rao e Brakke, 1969). Culturas como a aveia, usadas em sucessão com o arroz, servem como reservatório para *P. graminis*.

2.4 Métodos de detecção e diagnóstico

Os métodos de detecção têm evoluído ao longo dos anos e são de extrema importância para garantia da sanidade vegetal, bem como para impedir a disseminação de patógenos. A identificação dos agentes causais na virologia combina diversas técnicas, dentre elas as moleculares, sorológicas, biológicas e clássicas. A diagnose através da indexação biológica em plantas indicadoras evoluiu para testes sorológicos, como a técnica ELISA, até chegar aos métodos moleculares, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) “convencional” e em tempo real. As técnicas devem ser sensíveis, confiáveis, fáceis e rápidas e além do mais, devem permitir a utilização com diversos tipos de materiais (como material vegetal, solo, vetores, etc.). A identificação dos agentes causais na virologia combina diversos métodos de detecção, cada um com suas limitações e/ou vantagens.

2.4.1 Métodos sorológicos

O teste conhecido como ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) surgiu como uma opção revolucionária, possibilitando maior agilidade laboratorial e resultados

precoces na detecção de vírus (López *et al.*, 2003). É muito utilizado para detecção de fitopatógenos pois pode ser utilizado em larga escala em análises de um grande número de amostras simultaneamente (Figueira, 2000; López *et al.*, 2009).

O princípio dessa técnica é o reconhecimento de um antígeno por um anticorpo (imunoglobulina-Ig) e seus resultados são colorimétricos, devido a ação de uma enzima que, em contato com o substrato cromogênico, apresenta uma coloração. A enzima é previamente conjugada à molécula de imunoglobulina (IgG), e a intensidade da coloração deve ser medida em um espectrofotômetro com filtros adequados para o comprimento da onda de 405nm (Clark e Adams, 1977).

Uma das limitações deste teste é a produção e/ou disponibilidade de antissoros específicos para um antígeno. Esse processo é demorado e não pode ser projetado para a variabilidade de um vírus (Rubio *et al.*, 2020). Ademais, a técnica ELISA não é suficientemente sensível na detecção de alguns vírus, principalmente aqueles que ocorrem em baixas concentrações nos tecidos das plantas (Bertolini *et al.*, 2001) e/ou não é adequada para amostras assintomáticas e infecções latentes (López *et al.*, 2009), além da possibilidade de gerar resultados falsos positivos quando utilizado anticorpos policlonais (Bertolini *et al.*, 1998). No caso do RSNV, há produção de antissoro apenas a nível de pesquisa (Maurino *et al.*, 2018) mas não estão disponíveis comercialmente, dificultando a realização do teste para detecção do vírus.

2.4.2 Métodos moleculares

Os métodos moleculares de detecção de patógenos evoluíram e são os mais utilizados atualmente para detecção de vírus. O diagnóstico molecular apresenta maior eficiência e resultados mais confiáveis quando comparados aos demais testes.

2.4.2.1 Reação em cadeia da polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) permite produzir milhões de cópias de um fragmento de DNA ou cDNA em um curto tempo, podendo amplificar teoricamente até uma única molécula de DNA da amostra. Utiliza iniciadores (oligonucleotídeos complementares à sequência do vírus) específicos que se ligam ao terminal amino (5') e terminal carboxi (3') de dada região do genoma e uma DNA polimerase termoestável realiza a síntese de novas fitas de DNA, na presença de solução tampão apropriada à polimerase e desoxinucleotídeos (dNTPs). Para detecção de RNA, utiliza-se a técnica chamada RT (transcrição reversa) -PCR. Ou seja, inicialmente a fita simples de RNA é transformada em cDNA com o uso da enzima transcriptase reversa. Após, é seguida a reação em cadeia da polimerase.

Assim que finalizado o processo de amplificação por PCR ou RT-PCR, é feita a eletroforese em gel de agarose – passo que separa os produtos amplificados de DNA com base no seu tamanho e carga. Adiciona-se o brometo de etídeo ou outro corante que possui alta afinidade por DNA e, após incidir luz ultravioleta, é feita a análise visual das bandas esperadas com o tamanho dos fragmentos amplificados (determinado pela posição relativa dos iniciadores no genoma do vírus) (Moriones, 2016).

Mesmo sendo uma técnica sensível, específica e rápida, apresenta algumas desvantagens como a necessidade do uso de um termociclador, que não está disponível para uso à campo. Além disso, é necessário conhecer o genoma viral, ter profissionais capacitados e custo relativamente mais alto que as demais (López *et al.*, 2009; Moriones, 2016).

Atualmente, a RT-PCR é a técnica mais utilizada para detecção do RSNV, utilizando primers específicos da região da helicase (Oludare *et al.*, 2015) e da região do capsídeo (Sereme *et al.*, 2014).

2.4.2.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

A PCR em tempo real ou qPCR (*quantitative PCR*) é uma técnica adaptada da PCR convencional e foi descrita por Higuchi *et al.* (1993). Utiliza iniciadores conjugados a reagentes químicos fluorescentes e possibilita a leitura dos resultados de acordo com a liberação da fluorescência, sem a necessidade do passo da eletroforese no final. Os produtos para formação de fluorescência utilizados atualmente são os “*Greens*” ou a sonda “*TaqMan*” marcada com fluoróforos específicos. A sonda “*TaqMan*” é desenhada junto dos iniciadores para se anelar na região interna do produto da PCR e é uma sequência específica; já, os “*Greens*”, atuam como intercalantes no DNA (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Para que isso seja possível, há necessidade de um termociclador específico que possui fluorímetros para detecção da fluorescência emitida, que é proporcional a quantidade de amplicons produzidos durante a reação.

A PCR em tempo real apresenta grande sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados (López *et al.*, 2003; Fajardo e Nickel, 2015), conferindo eficácia ao processo de diagnóstico. Além de qualitativa, a técnica RT-PCR em tempo real, com o uso de sondas “*TaqMan*”, permite a quantificação das partículas virais presente nas amostras vegetais e vetores de forma sensível e específica (López *et al.*, 2003). Por utilizar iniciadores e sondas para detecção, a técnica pode ser otimizada para abranger toda variabilidade genética viral – fator primordial na precisão do método e que seu uso possa ser feito em amostras de diversas localidades sem que se tenha falhas (falsos negativos) (Rubio *et al.*, 2020).

Segundo Rubio *et al.* (2020), pode ser utilizada para estudar interações entre vírus e infecções; correlação entre o acúmulo viral e sua transmissão por vetores para compreensão da epidemiologia; uso para avaliar a resistência das plantas em relação ao acúmulo de vírus; e estudos da epidemiologia e durabilidade da resistência. Além disso,

é a técnica mais precisa para analisar a resistência relativa (Gil-Salas *et al.*, 2009; Galipienso *et al.*, 2013; Soler *et al.*, 2015), auxiliando os melhoristas a desenvolverem plantas resistentes ou tolerantes para que, assim, possa se fazer um controle efetivo.

Além da alta sensibilidade e rapidez, é uma técnica simples, específica e altamente eficiente na análise direta de material vegetal, sem a necessidade da purificação de RNA, tornando-a ainda mais rápida e permitindo a análise de um grande número de amostras (Bertolini *et al.*, 2008; 2010; 2023; Osman *et al.*, 2008; Capote *et al.*, 2009;). No entanto, ainda não foram descritos e publicados protocolos de RT-PCR em tempo real com o uso de sondas *TaqMan* para a detecção do RSNV, assim como o uso de métodos diretos de preparação de amostras.

2.5 Métodos de manejo e controle

Devido à redução da área cultivada com arroz e ao aumento da demanda pelo cereal, faz-se necessário buscar por estratégias de manejo e controle eficientes, acessíveis e atrativas aos produtores. O manejo integrado de doenças causadas por vírus (MIV) implica no uso de todas as medidas de controle disponíveis, aplicadas de forma sequencial ou simultânea, antes ou depois da implantação da cultura. Neste trabalho, o MIV será abordado de acordo com Moriones (2016), focando em 3 aspectos básicos: I) limitar a dispersão primária, II) limitar a dispersão secundária e III) reduzir o efeito da infecção.

2.5.1 Controle da dispersão primária

O controle da dispersão primária é uma medida que busca excluir e/ou prevenir a entrada de um patógeno de uma área/região contaminada para uma área isenta. Dessa forma, algumas medidas foram propostas por Whetzel *et al.* (1925, 1929). Entre elas estão

as medidas legislativas com base na legislação fitossanitária e em uma lista de pragas quarentenárias ausentes e presentes (Portaria 617 de 11 de julho de 2022 e IN 38 de 01 de outubro de 2018, respectivamente), fiscalizando e interceptando a entrada de material vegetal ou planta inteira de entrar no Brasil. Esta lista classifica em pragas ausentes no país e pragas presentes no país, mas de forma restrita a determinada região do país, seja plantas daninhas, bactérias, fungos, nematoides, vírus e viroides (Eiras *et al.*, 2018). Um exemplo é o plum pox virus (PPV) que infecta a cultura do pessegueiro e ameixeira causando a *sharka*, uma doença muito importante e devastadora em frutas de caroço, mas ausente no Brasil. Seu controle é feito através de medidas de exclusão, através da inspeção e regulamentação de material importado de locais onde a doença ocorre, para que assim não ingresse no Brasil.

Alguns vírus são transmitidos através de sementes ou material propagativo, tendo que optar por medidas e princípios específicos para que se tenha um controle efetivo da doença. Essa forma de transmissão é uma das formas mais efetivas de introdução de vírus em áreas isentas. No entanto, varia conforme o vírus e a planta hospedeira (Eiras *et al.*, 2018). Nestes casos, deve-se estabelecer sistemas de certificação para a produção de material livre de vírus para o controle eficaz, principalmente para os vírus com dispersão secundária muito eficiente (Moriones, 2016). Até o momento, não se observou transmissão do RSNV através de sementes (Fauquet *et al.*, 1988). No entanto, a introdução do vírus pode ocorrer quando forem utilizadas sementes com baixa qualidade, que contenham partículas de solo com a presença do vetor virulífero.

O inóculo presente em vetores que sobrevivem no solo, também são importantes fontes de dispersão primária de vírus, como é o caso do RSNV. O manejo, com uso de químicos ou solarização, são estratégias que auxiliam a reduzir os riscos de infecção

primária (Moriones, 2016). No entanto, essa forma de controle é de difícil realização e com alto custo (Stapleton, 2000) em cultivos de larga escala.

2.5.2 Controle da dispersão secundária

Se mesmo com as práticas de limitação da dispersão primária o vírus for introduzido em uma área, deve-se buscar formas de limitar a sua dispersão secundária. A erradicação visa impedir que o patógeno recém introduzido se dissemine e se estabeleça, e também reduzir seu inóculo. Isso pode ser feito com práticas de *roguing* e remoção de hospedeiros alternativos. Essa prática foi muito importante para o controle do papaya ringspot virus (PRSV-P) e para o papaya meleira virus (PMeV) (Eiras *et al.*, 2018).

Cistossoros de resistência de *Polymyxa graminis* com a presença do RSNV podem permanecer no solo por anos (Cadle-Davidson *et al.* 2006), dificultando ainda mais o controle e tornando irrelevante medidas de manejo, como rotação de culturas e/ou mudanças na janela de plantio, para evitar a doença. A disseminação de partículas de solo com a presença do vetor através do maquinário agrícola, de áreas infestadas para áreas saudas é, possivelmente, uma forma importante da chegada da doença em locais ainda não contaminados, visto que muitas vezes os maquinários são emprestados entre produtores (Scheuermann *et al.*, 2015).

2.5.3 Controle do efeito da infecção na planta

Quando a doença for introduzida e estiver estabelecida na área, as estratégias de controle mais apropriadas são as que buscam reduzir o efeito da infecção. A resistência genética é a estratégia mais efetiva e desejada para o controle de viroses e também para outros patógenos de plantas. Segundo Moriones (2016), tem-se imunidade quando o vírus

não consegue infectar a planta, resistência se a invasão for restrita e tolerância se o vírus invadir a planta e produzir pouco efeito patogênico. Os programas de melhoramento genético buscam uma resistência ampla, durável e estável. No entanto, a durabilidade está diretamente ligada a variabilidade viral e ao tipo de resistência. Na resposta da planta à doença, esta pode ser sensível quando apresenta sintomas graves ou tolerante quando apresenta sintomas leves. Apesar de plantas tolerantes não apresentarem interferência no rendimento, podem servir de fonte de inóculo e sobrevivência do vetor.

Patógenos virais com genoma de RNA, como é o caso do RSNV, apresentam uma alta variabilidade genética e frequentes recombinações, possibilitando gerar indivíduos que possam superar os genes de resistência (Moriones, 2016). As mudanças nos sistemas agrícolas, como o uso de uma ou poucas cultivares, com os mesmos genes de resistência leva a novos eventos de combinação e recombinação e, assim, facilitando a superação da resistência genética.

Além da facilidade de uso, a resistência genética apresenta outras vantagens, como não exigir intervenção do agricultor para o manejo da doença e também não afetar o meio ambiente ou a saúde humana (Moriones, 2016). No entanto, a resistência pode não ser uma solução definitiva, podendo perder sua eficácia com variantes virais capazes de superá-la ou por manejos inadequados de controle (Moriones, 2016).

Não estão disponíveis cultivares comerciais resistentes ao vírus do enrolamento foliar do arroz. No entanto, segundo Gutierrez *et al.* (2010), a espécie selvagem *Oryza glaberrima* Steud apresenta elevada resistência a essa doença. Híbridos interespecíficos de cruzamentos de *O. sativa* x *O. glaberrima* apresentaram níveis de resistência ao RSNV (Morales, 2004). Ademais, embora com caráter agrônomico favorável a resistência da doença, não há estudos que mostrem seus resultados referente à aspectos comerciais.

Scheuermann *et al.* (2015) avaliaram a incidência do enrolamento em diferentes cultivares e sistemas de cultivos. No sistema pré germinado com inundação do solo sete e 30 dias antes da semeadura, não houve diferença significativa entre as cultivares testadas. Já no sistema de semeadura em solo seco com inundação após 25 dias, as cultivares SCS 115 CL e Epagri 109 foram as que apresentaram as menores incidências de plantas sintomáticas.

A crescente demanda por alimentos exige a manutenção de altas produtividades na cultura do arroz. Esse, dentre outros fatores, faz com que a lavoura de arroz do RS seja semeada com poucas cultivares, aumentando a pressão de seleção sobre os patógenos. Além da importância da busca pela resistência genética das cultivares à doença do enrolamento foliar, o sistema de cultivo empregado também é importante. Scheuermann *et al.* (2015) demonstrou que o sistema pré-germinado, em comparação ao sequeiro, apresentou menor incidência da doença, possivelmente influenciando no ciclo de vida do vetor, reforçando que apenas uma forma de controle não é viável.

2.6 Referências

AIST, J. R.; WILLIAMS, P. H. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmoïphora brassicae*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 49, n. 11, p. 2023-2034, 1971.

BERTOLINI, E. *et al.* Development of TaqMan real-time PCR protocols for simultaneous detection and quantification of the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* and their specific lytic bacteriophages. **Viruses**, Basel, v. 15, n. 4, [art.] 841, 2023.

BERTOLINI, E. *et al.* High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 128. p. 283-287, 2010.

BERTOLINI, E. *et al.* Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, n. 2, p. 177-188, 2008.

- BERTOLINI, E. *et al.* Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 33-41, 2001.
- BERTOLINI, E. *et al.* Viroses del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. **Phytoma**, Paris, v. 102, p. 191–193, 1998.
- BRASELTON, J. P. Current status of the Plasmodiophorids. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 21, n. 4, p. 263-275, 1995.
- CADLE-DAVIDSON, L. *et al.* Identification of small grains genotypes resistant to soil borne wheat mosaic virus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 90, n. 8, p. 1039-1044, 2006.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.
- CHEN, J.; WILSON, T. M. A. Taxonomy of rigid rod-shaped viroses transmitted by fungi. **Agronomie**, Paris, v. 15, p. 421-426, 1995.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplante method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2021/2022. **Perspectivas para a Agropecuária**, Brasília, DF, v. 9, p. 1-85, ago. 2021. Edição grãos.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2022/2023: décimo levantamento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos**, Brasília, DF, v. 10, p. 1-37, jul. 2023.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **A cultura do arroz**. Brasília, DF: CONAB, 2015. 180 p.
- DOMENE, S. M. A.; GHEDINI, N. S. R. V.; STELUTI, J. Importância nutricional do arroz e do feijão. *In*: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. (ed.). **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 8, p. 147-164.
- EIRAS, M. *et al.* Resistência genética de plantas a vírus. *In*: DALLAGNOL, L. J. (coord.). **Resistência genética de plantas a patógenos**. Pelotas: Ed. UFPel, 2018. cap. 7, p. 296-358.
- EPPO GLOBAL DATABASE. **Potyvirus plumpoxi (PPV000)**. [S. l.]: Eppo Global, 2023. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000/distribution..> Acesso em: 22 ago. 2023.
- FAGGIOLI, F. *et al.* Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 87, p. 49-55, 2005.

- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. **Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015. (Comunicado técnico, 179).
- FAUQUET, C. *et al.* Rice stripe necrosis virus: a soil-borne rod-shaped virus. *In*: Cooper, J. I.; ASHER, M. J. C. (ed.). **Developments in applied biology II. Viruses with fungal vectors**. Warwic: Association of Applied Biologists, 1988. cap. 5, p. 71-82.
- FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 99 p.
- GALIPIENSO, L. *et al.* Cucumber vein yellowing virus isolate-specific expression of symptoms and viral RNA accumulation in susceptible and resistant cucumber cultivars. **Crop Protection**, Guildford, v. 43, p. 141–145, 2013.
- GILMER, D. *et al.* Cell-to-cell movement of Beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. **Virology**, London, v. 189, p. 40–47, 1992.
- GILMER, D.; RATTI, C. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Benyviridae. **Journal of General Virology**, London, v. 98, p. 1571-1572, 2017.
- GIL-SALAS, F. M. *et al.* Resistance screening against Cucumber vein yellowing virus using a real-time (Taqman®) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). **Crop Protection**, Guildford, v. 28, p. 109-112, 2009.
- GUTIÉRREZ, A. G. *et al.* Identification of a Rice stripe necrosis virus resistance locus and yield component QTLs using *Oryza sativa* × *O. glaberrima* introgression lines. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, [art.] 6, [p. 1-11], 2010.
- HALL, M. C.; MATSON, S. W. Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 867-877, 1999.
- HIGUCHI, R. *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology**, London, v. 11, p. 1026-1030, 1993.
- KANYUKA, D. *et al.* *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 393-406, 2003.
- LITTLEFIELD, L. J. *et al.* Postinfection development of *Polymyxa graminis* in roots of *Triticum aestivum*. **Mycologia**, Abingdon, v. 90, n. 5, p. 886-882, 1998.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Molecular Biology**, Los Angeles, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 233-243, 2003.
- LOUVEL, D.; BIDAUX, J.M. Observation de nouveaux symptômes pathologiques sur des variétés précoces de riz en Cote-d'Ivoire. **L'Agronomie Tropicale**, Paris, v. 32, p. 257-261, 1977.

LOZANO, I.; MORALES, F. Molecular characterisation of rice stripe necrosis virus as a new species of the genus *Benyvirus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p. 673-680, 2009.

MACIEL, J. L. N. *et al.* Ocorrência do vírus rice stripe necrosis virus em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 209, 2006.

MACKAY, I. M. **Real-time PCR in microbiology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2007. 40 p.

MAURINO, M. F. *et al.* First report of rice stripe necrosis virus in Argentina. **Crop Protection**, Guildford, v. 114, p. 143-147, 2018.

MEDEIROS, R. B. *et al.* **Virologia vegetal – conceitos, fundamentos, classificação e controle**. Brasília, DF: UNB, 2015. 726 p.

MELLO, R. N. *et al.* Vírus que infecta o arroz é encontrado em Goiás. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 11., 2019, Balneário Camboriú. **Anais [...]**. Piracicaba: SOSBAI, 2019.

MORALES, F. J. El ‘entorchamiento’ del arroz. *In*: ROBAYO VANOY, G. (ed.). **Arrocero moderno**. Bogotá: GalRobayo, 2004. p. 163–164.

MORALES, F. J. *et al.* Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 643-650, 1999.

MORIONES, E. Manejo integrado de enfermedades virales. *In*: AYLLÓN, M. A. *et al.* (ed.). **Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides**. Madrid: Sociedad Española de Fitopatología, 2016. cap. 14, p. 391-413.

OLUDARE, A. *et al.* First report of Rice stripe necrosis virus infecting rice in Benin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 101, n. 1, 2015.

OSMAN, F. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 149, p. 292-299, 2008.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Dordrecht: Springer, 2008. 332 p.

PEREIRA, J. A. O arroz no Maranhão e Grão-Pará. *In*: PEREIRA, J. A. **Cultivo do arroz no Brasil: subsídios para a sua história**. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2002. cap. 6, p. 59-106.

PEREIRA, S. P. **Tratamento de sementes para o manejo do mosaico comum do trigo e caracterização do vetor viral *Polymyxa graminis***. 2018. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

- PINEL-GALZI, A.; HÉBRARD, E. First report of rice stripe necrosis virus infecting rice in Benin. **Plant Disease**, St. Paul, v. 99, n. 5, p. 735, 2015.
- RAO, A. S; BRAKKE, M. K. Relation of soil-borne wheat mosaic virus and its fungal vector, *Polymyxa graminis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 581-587, 1969.
- RUBIO, L. *et al.* Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, [art.] 1092, 2020.
- RUSH, C. M. Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 567-592, 2003.
- SCHEUERMANN, K. K. *et al.* Efeito do sistema de cultivo sobre a incidência do enrolamento do arroz, causado pelo vírus RSNV. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ, 9., 2015, Pelotas. **Resumos [...]**. Porto Alegre: SOSBAI, 2015. p. 1-4.
- SEREME, D. *et al.* First report of rice stripe necrosis virus infecting rice in Burkina Faso. **Plant Disease**, St. Paul, v. 98, n. 10, [art.] 1451, 2014.
- SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO - SOSBAI. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Cachoeirinha, RS: SOSBAI, 2018.
- SOLER, S. *et al.* A new *Capsicum baccatum* accession shows tolerance to wild-type and resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. **Annals of Applied Biology**, London, v. 167, n. 3, p. 343-353, 2015.
- SOUSA, I. S. F; FERREIRA, C. M. Aspectos histórico-culturais do arroz e do feijão na sociedade brasileira. *In*: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSSO, J. A. F. (ed.). **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 3, p. 47-70.
- SOUZA, D. D. *et al.* Molecular characterization and sequence analysis of four Brazilian Rice stripe necrosis virus isolates. **Archives of Virology**, Wien, v. 166, n. 6, p. 1763-1767, 2021.
- SOUZA, M. V. D. **Caracterização parcial de um fragmento e detecção por RT-PCR de rice stripe necrosis virus**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- STAPLETON, J. J. Soil solarization in various agricultural production systems. **Crop Protection**, Guildford, v. 19, n. 8/10, p. 837-841, 2000.
- TAMADA, T.; ASHER, M. J. C. The Plasmodiophorid Protist *Polymyxa betae*. *In*: BIANCARDI, E.; TAMADA, T. **Rhizomania**. Cham: Springer Internacional, 2016. p. 135-153.
- UNITED NATIONS - UN. Department of economic and social affairs. **World Population prospects, the 2012 revision**. New York: United Nations, 2021. Disponível

em: <https://www.un.org/en/development/desa/publications/world-population-prospects-the-2012-revision.html>. Acesso em: 24 ago. 2023.

WANDER, A. E.; SILVA, O. F.; FERREIRA, C. M. O arroz e o feijão no Brasil e no mundo. *In*: FERREIRA, C. M.; BARRIGOSI, J. A. F. (ed.). **Arroz e feijão: tradição e segurança alimentar**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. cap. 5, p. 81-100.

WHETZEL, H. H. *et al.* **Laboratory outlines in plant pathology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1925. 231 p.

WHETZEL, H. H. The terminology of plant pathology. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT SCIENCE, 9., 1929, Ithaca. **Proceedings of the** [...]. [S. l.]: International Association for Plant Tissue Culture & Biotechnology, 1929. v. 2, p. 1204-1215.

3 CAPÍTULO 1

Developing a TaqMan real-time RT-PCR protocol for detecting rice stripe necrosis virus in plant material and soil*

Brenda Moz¹, Roberson Diego Souza Almeida¹, Débora Favero², Marcelo Gravina de Moraes¹, Edson Bertolini¹

¹ Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Seção de Melhoramento Genético da Estação Experimental do Arroz, Instituto Rio Grandense do Arroz, 94930-030, Cachoeirinha, RS, Brazil.

Corresponding author: Edson Bertolini (edson.bertolini@ufrgs.br)

*Artigo formatado conforme as normas do Journal of Plant Pathology

Abstract

Rice is one of the main staple foodstuffs for the world's population; however, several diseases caused by phytopathogens cause yield losses in rice crop. Rice crinkle is an emerging disease in rice cultivation, caused by rice stripe necrosis virus (RSNV). RSNV is transmitted by the soil plasmodiophoromycete, *Polymyxa graminis*, which can remain in the soil through resistance structures for decades. The symptoms caused by the virus are often confused with other causes, making a correct diagnosis and the adoption of effective management and control measures difficult. RSNV is detected through tests such as plate trapped antigen – enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) and conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The objective of this study was to develop a protocol for RSNV detection via real-time RT-PCR using a TaqMan probe associated with direct sample preparation methods, which has not been published to date. The RT-qPCR detection protocol developed was 100–1,000 times more sensitive than conventional RT-PCR, allowing for the detection of RSNV in contaminated plant material and soil. The direct sample preparation method associated with RT-qPCR exhibited similar sensitivity to the nucleic acid purification methods.

Keywords: RSNV, diagnosis, direct RNA extraction, *Polymyxa graminis*, viral pathogen

Rice is one of the most important staple foods for the world population (Elert 2014). However, several diseases caused by fungi, bacteria, and viruses cause losses in productivity and grain and seed quality (Wang et al. 2022). Rice crinkle is an emerging disease in rice cultivation, caused by rice stripe necrosis virus (RSNV), which belongs to the genus *Benyvirus* of the family *Benyviridae*. RSNV is a multipartite positive-sense single-stranded RNA virus, with two positive segments of RNAs (RNA1 and RNA2) encapsidated into separate particles. RNA 2 contains six ORFs including the capsid protein (CP) (Gilmer and Ratti 2017). It was initially observed in Africa in 1977 (Louvel and Bidaux 1977), and in South America in 1999 (Morales et al. 1999). In Brazil, its first report was in 2001/02 harvest of Dona Francisca in Rio Grande do Sul (Maciel et al. 2006). The virus has been reported in several countries in South and Central America, causing production losses of up to 33% (Paz et al. 2009). The symptoms caused by RSNV are chlorosis or yellow leaf streaks, stunting, delayed plant growth, necrotic streaks, and reduced tillering and leaf curling (Louvel and Bidaux 1977; Fauquet et al. 1988). The symptoms caused by the virus are easily confused with other causes, making a correct diagnosis and the adoption of effective management and control measures difficult.

Rice stripe necrosis virus is transmitted exclusively by the soil plasmodiophoromycete belonging to the kingdom Protista, *Polymyxa graminis*, a biotrophic intracellular parasite that infects the roots of Poaceae plants (Kanyuka et al. 2003). The vector's resistance structures (cystosores) can remain in the soil for decades (Kanyuka et al. 2003; Tamada and Kondo 2013), and are possible sources of inoculum and dissemination through agricultural equipment, which transits from contaminated to uncontaminated areas (Morales et al. 1999). There is no evidence of transmission by seeds, nematodes, or the rice mealybug (*Ripersia oryzae*) (Fauquet et al. 1988).

Rice stripe necrosis virus is detected through serological tests such as plate trapped antigen – enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) (Fauquet and Thouvenel, 1983; Maurino et al. 2018; Tucker et al. 2020) and conventional reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (Lozano and Morales 2009; Sereme et al. 2014; Oludare et al. 2015). However, the serological technique is limited because there are no commercial antibodies for RSNV detection. RT-PCR is the most widely used method for RSNV detection currently, with different protocols based on primers designed on RNA 1 (Lozano and Morales 2009) and RNA 2 (Sereme et al. 2014). However, even with specific primers, it is a technique with low sensitivity compared to other molecular detection methods such as RT-qPCR (Capote et al. 2009; Rubio et al. 2020).

To date, no detection protocol based on RT-qPCR, with SYBR-Green or TaqMan probe, has been published for RSNV detection. The high specificity and sensitivity of RT-qPCR with TaqMan probes allow analysis using direct methods of sample preparation (without RNA/DNA purification). Several protocols based on the use of TaqMan probes and direct methods have been reported for virus detection in plant material, soil, and vectors (Bertolini et al. 2008; 2014; 2023; Capote et al. 2009; De Boer and López 2012).

The objective of this study was to develop a protocol for detecting RSNV in plant material and infested soil through RT-PCR in real time, with the use of a TaqMan probe associated with direct methods of sample preparation. With this, we aim to improve the results of diagnosis and detection to enable the development of more efficient management and control strategies for RSNV in rice agroecosystems.

Samples of plant material (leaves and roots) were collected from plants of the cultivars SCS121 CL and SCS122 Miura (EPAGRI/SC), with and without symptoms, grown in a conventional system in pots containing naturally infested soil collected in an area with a history of rice crinkle disease in the municipality of Itajaí, SC, Brazil

(26°57'09"S; 48°45'40"W). The pots were kept in a greenhouse at the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (30°04'26"S; 51°08'06"W) under natural environmental conditions from September to December 2022. Soil samples were also collected in areas with a history of rice crinkle disease in the municipalities of Caraá, RS, Brazil (29°47'33"S; 50°26'11"W) and Dom Pedrito, RS, Brazil (30°59'01"S; 54°40'09"W). Soil samples collected in areas with no history of rice crinkle disease was used as negative control. Rice plants cultivated in sterilized substrate were used as negative controls.

Plant material samples were prepared by macerating approximately 1 g of leaf or plant root tissue in individual plastic bags in the presence of 10 mL of Phosphate Buffered Saline - PBS (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ – 7H₂O 2.68 g and KH₂PO₄ 0.24 g in 1L H₂O, pH 7.2). Samples of 1 g of soil were diluted in 10 mL of the same PBS solution. Aliquots of 1.5 mL of the plant extract and soil were transferred to Eppendorf tubes and stored at –20°C.

For sensitivity comparison, serial decimal dilutions (1:10 v:v) of a symptomatic plant leaf extract were prepared in a healthy plant extract and those of naturally infested soil samples were prepared in sterilized soil. For direct amplification (without RNA purification), each dilution performed above was further diluted 100 times in PBS buffer. Nucleic acid purifications from the serial dilutions or from naturally infected samples (plant material and soil) were performed using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Murray and Thompson 1980). Purifications of total RNA from plant material were also performed using the SV Total RNA Isolation System kit (Promega) following the manufacturer's instructions.

To design appropriate primers and probe, nucleotide sequences of RNA 2 of RSNV available in GenBank were used. Alignments of the nucleotide sequences of the RSNV isolates were carried out using Blast tools from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Geneious Prime v2023.0.1 software (Fig. 1). Primer Express software (Applied Biosystems) was used to obtain the sequences of specific primers and TaqMan probe. Specific primers and TaqMan probe were designed in a conserved region of the CP gene in the RNA 2 of RSNV (Fig. 1), that amplify a 76 bp product. TaqMan probe was labeled in 5' with fluorescent dye FAM and 3' with quencher TAMRA.

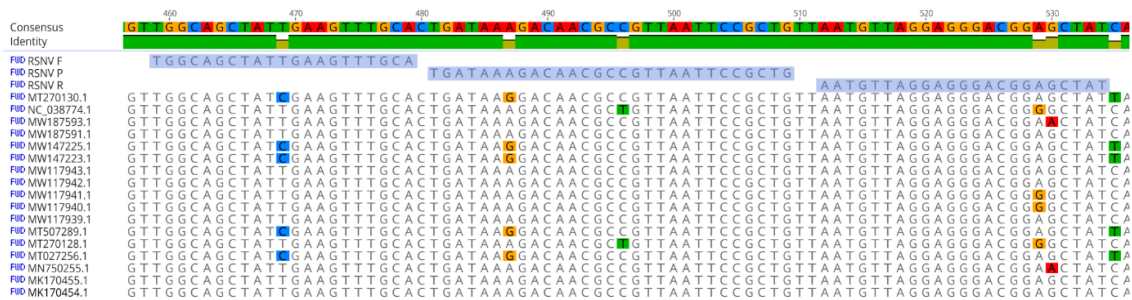


Fig. 1 Nucleotide alignment of the sequences available in the NCBI of CP gene of RNA 2 of rice stripe necrosis virus in Geneious Prime software. Blue darkened are specific sequences of primers and TaqMan probe for RSNV.

Conventional RT-PCR were performed in Veriti 96-well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) in a final volume of 20 μ L consisting of 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM $MgCl_2$, 1.0 μ M of each primer 5'-CATCTTGTGCGAGATGAG-3'/5'-GCGTTGTCTTTATCAGTG-3') (Sereme et al. 2014), 0.4 mM dNTPs, 5 units of AMV-RT (Promega), 5 units of Taq DNA polymerase (Promega), and 2 μ L of sample. RT-PCR amplification consisted of one step at 42 $^{\circ}$ C for 45 followed by 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 10 s; 50 $^{\circ}$ C for 15 s and 72 $^{\circ}$ C for 30 s and a final cycle of 72 $^{\circ}$ C for 5 min. The amplicons were separated by gel electrophoresis and visualized under UV light.

TaqMan assays for RT-qPCR were performed in the 7300 thermal cycler (Applied Biosystems). The individual reaction cocktail in a final volume of 10 μ L contained 2 μ L

of water, 1X of 2X Master Mix and 1X of 50X RT-Mix (GoTaq Probe 1-step RT-qPCR System - Promega), 1 μ M of each designed primer RSNV - F and RSNV- R, 150 nM of designed TaqMan probe, 0,1 μ L of ROX at 100X (Sigma Aldrich), and 2 μ L of sample. RT-qPCR amplification consisted of one step at 45 °C for 15 min and 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 15 s and 60 °C for 45 s. Data acquisition and analysis were performed with the 7300 system SDS software v1.4. The default threshold set by the machine was slightly adjusted above the noise to the linear part of the growth curve, at its narrowest point, according to the manufacturers (Applied Biosystems).

A summarization of the development of the TaqMan RT-PCR protocol for specific detection of RSNV using RNA purification and direct samples preparation methods, and their applications, is represented in Supplementary Figure 1.

From the alignment performed with the RSNV nucleotide sequences it was possible to design the primers RSNV-F 5'-TGGCAGCTATTATTGAAGTTTGCA-3' and RSNV-R 5'-ATAGCTCCGTCCTC CTAACATT-3' and the TaqMan probe RSNV-P 5'- TGATAAAGACAACGCCGTTAATTCCGCTG-3'. *In silico* PCR using a FastPCR Professional software version 6.8.41 demonstrated the specificity of the primers in relation to RSNV. The *in vitro* analysis evidenced the correct functioning of the primers and the TaqMan probe detecting RSNV in samples of symptomatic plant material and naturally infested soil, with typical sigmoid amplification curves (Fig. 2). No amplification curves were observed in healthy plant material and/or soils with no history of vector or rice crinkle disease presence. Despite to some single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the sequence of some isolates of the RSNV, this region of the CP gene was the most appropriate for the design of the primers and probe. No more than one SNP was observed in each primer/probe of the same isolate.

RT-qPCR amplification curves were obtained using both the total RNA purified using the CTAB method from symptomatic leaves (Fig. 2A) and soil (Fig. 2C) as samples and the plant extract from symptomatic leaves diluted in PBS (Fig. 2B). No amplification was observed in healthy material and/or negative control of amplification (Fig. 2D).

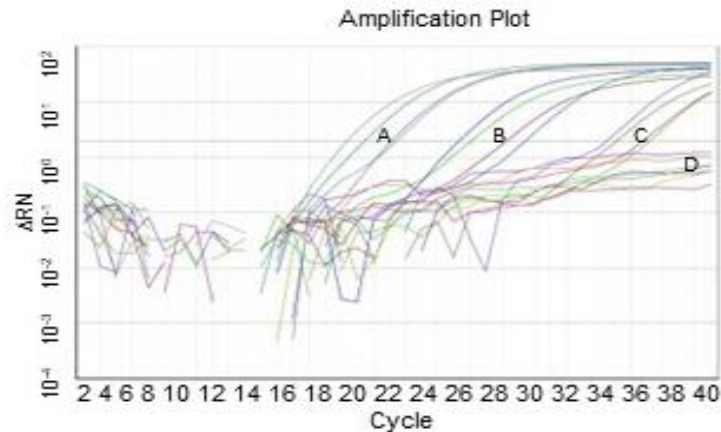


Fig. 2 TaqMan RT-qPCR. Amplification curves of rice stripe necrosis virus (RSNV) with different type of samples and methods of sample preparation: **a**) symptomatic leaves with CTAB nucleic acid extraction **b**) symptomatic leaves with direct sample preparation **c**) soil with CTAB nucleic acid extraction **d**) healthy material and/or negative control of amplification.

A comparison of the sensitivities achieved by RT-PCR and RT-qPCR in the detection of RSNV using serial dilutions of plant material and soil, and different types of sample preparation with (CTAB or Promega) or without (direct samples) RNA purification, is shown in Table 1. The qualitative results of each dilution by conventional RT-PCR were a consensus of three repetitions. The Ct values of each dilution by RT-qPCR were the mean of the three repetitions. Both conventional and real-time RT-PCR were able to detect RSNV using the three different sample preparation methods.

Table 1 Sensitivity comparison of RT-PCR protocols in the detection of rice stripe necrosis virus, using serial dilutions of different samples (vegetal material and soil) and sample preparation methods (with and without RNA purification)

Dilutions	Conventional RT-PCR			Real-time RT-PCR (Ct)		
	Direct	CTAB	SV RNA*	Direct	CTAB	SV RNA*
Veg. Mat.						
10 ⁰	+	+	+	29.80	32.18	35.18
10 ⁻¹	+	-	-	33.01	36.01	38.86
10 ⁻²	-	-	-	35.28	37.71	38.33
10 ⁻³	-	-	-	37.84	Undet.	Undet.
10 ⁻⁴	-	-	-	Undet.	Undet.	Undet.
Neg. control	-	-	-	Undet	Undet	Undet
Soil						
10 ⁰	-	+	Nd	33.38	32.04	nd
10 ⁻¹	-	+	"	34.13	36.32	"
10 ⁻²	-	-	"	36.84	36.80	"
10 ⁻³	-	-	"	37.14	37.31	"
10 ⁻⁴	-	-	"	Undet.	38.81	"
Neg. control	-	-	"	Undet.	Undet.	"

nd = not done. Undet. =Undetermined at 40 cycles. * SV Total RNA Isolation System

RT-PCR detected RSNV by a clear band of 329 bp on gel after electrophoresis following dilution by up to 10⁻¹ in both the plant material and soil samples, whereas RT-qPCR was able to detect the virus following dilution by up to 10⁻⁴ in the soil and 10⁻³ in the plant material. RT-qPCR was 100- and 1000-fold more sensitive than conventional RT-PCR when using plant material and soil, respectively. Similar results for plant material were obtained for plum pox virus (PPV) in *Prunus* spp. by Capote et al. (2009) and for soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV) and *Polymyxa graminis* by Ratti et al. (2004). Besides the higher sensitivity, RT-qPCR with TaqMan probe is more specific, faster, and reproducible (López et al. 2009) and reduces the risks of contamination by avoiding any post-PCR step (Ratti et al. 2004). The high sensitivity and robustness of RT-qPCR allowed for the sensitive detection of RSNV in both plant material and soil.

The Ct values provide a relative indication of the amount of DNA target present in an analyzed sample. Values with a Ct >35 could be an uncomfortable zone for

identifying infected plants when using SYBR Green chemistry, where nonspecific amplifications might appear due to use of melting point similarities. However, the use of TaqMan chemistry solves this drawback. In this case, the presence of a sigmoidal amplification curve is directly related to the presence of the specific product. Bertolini et al. (2008; 2014) demonstrated that Ct values >36 were related to citrus tristeza virus (CTV) and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection in citrus trees respectively. In other models, this value can be increased to up to 65 cycles of amplification without increasing the number of positive results (Osman and Rowhani 2006). In this study, the dilution of an extract from RSNV symptomatic leaves tested positive with Ct values ranging from 29.80 to 38.86. In the case of healthy plants, no amplification was observed. For these reasons, no Ct cut-off < 40 was established for considering a sample as positive.

When sample preparation methods are compared, in the RT-PCR the detection sensitivity of RSNV was similar, regardless of the method used. Using RT-qPCR, both RNA purification methods (CTAB and Promega) have the same detection limit (10^{-2}). However, these purification methods were 10 times less sensitive than the direct sample preparation methods (dilution), which were able to detect the virus until 10^{-3} dilutions. These results may be because of the absence of large amounts of inhibitors in rice plant material and the protocols used in RNA purification. The 1:100 dilution of plant extract in PBS buffer reduced the inhibition effect of polyphenols and polysaccharides and maintained sufficient quantities of virus particles for RT-qPCR amplifications.

When soil samples are analyzed using conventional RT-PCR, RNA purification is necessary and the detection level is usually quite low. However, using the developed real-time RT-PCR protocol, the sensitivity is similar whether using RNA purification or direct sample preparation. The CTAB purification can detect RSNV until 10^{-4} dilution (Ct 38.81), whereas dilution can detect RSNV up to 10^{-3} dilutions (Ct 37.14) (Table 1).

This is particularly interesting in the soil samples, where inhibitors such as humic acids and the microbial diversity cause difficulty in detecting a specific target (Chen et al. 2010).

Twelve naturally infected samples were analyzed using RT-qPCR, comparing the RSNV detection in roots and leaves, with and without RNA purification (Table 2).

Table 2 Comparison of RSNV detection by RT-qPCR with and without RNA purification (direct and CTAB) in roots and leaves of naturally infected rice plants

Samples	Symptoms	Real-time RT-PCR (Ct)			
		Root		Leaf	
		Direct	CTAB	Direct	CTAB
1	+	26.65	24.59	26.84	22.43
2	+	34.16	32.45	36.70	36.00
3	+	34.31	24.93	33.45	35.31
4	+	28.11	27.94	28.56	27.15
5	+	30.47	31.62	25.34	27.60
6	+	23.93	27.15	26.28	21.62
Average	6	29.60	28.11	29.52	28.35
7	-	33.72	31.86	25.78	21.24
8	-	29.78	23.34	30.78	31.91
9	-	35.15	29.43	34.10	29.00
10	-	36.52	31.15	32.56	34.99
11	-	32.90	26.52	33.18	34.70
12	-	37.50	30.32	32.16	30.44
Average	6	34.26	28.77	31.42	30.38
Total	12	31.93	28.44	30.47	29.36

Plants were also evaluated for the presence or absence of rice stripe necrosis symptoms. Symptoms of chlorotic stripes, stunting, and leaf deformation were observed in six of the 12 plants evaluated (Table 2). All samples, with or without symptoms, were positive in leaves and roots of the same plant. Samples from symptomatic leaves exhibited a lower Ct value (29.52), correspond to a higher viral titer, than did the samples from asymptomatic plants (31.42) (Table 2). These results were similar, regardless of the sample preparation method (with or without RNA purification). Although the samples

with symptoms present a lower Ct value, the RT-qPCR protocol developed in this study allows for the detection of RSNV in asymptomatic plants, even without RNA purification, allowing for the early detection of the virus and a precise and reliable diagnosis of other symptoms observed in rice plants, owing to several abiotic causes.

When comparing virus detectability in roots and leaves, the results indicate that there is no difference in viral load in the different tissues, particularly in symptomatic plants. The average Ct value was 29.60 in roots and 29.52 in leaves observed using the direct sample preparation method (Table 2). In contrast, asymptomatic plants had a higher viral load in the leaves (Ct=31.42) than did the roots (34.26) (Table 2). For virus detection in roots, the best results were obtained with RNA purification, likely owing to the higher amount of RT-qPCR inhibitors present in soil particle remnants. The use of leaves to prepare the extract is easier and faster than the use of roots, as it does not require the removal of the plant (nondestructive analysis) and allows for the continuation of future experimental observations. However, the possibility of virus detection in roots allows for analysis during non-vegetative stages of the crop, providing important information about the epidemiology of the disease.

The RT-qPCR protocol, combined with the direct method of sample preparation developed and validated in this study, allows for the fast, precise, and reliable detection of RSNV in plant material and soil, improving the results obtained by conventional RT-PCR. The use of the developed methodology will allow for more precise detection of RSNV and a correct diagnosis of the symptoms observed in the field, which would help in developing management and control strategies. The use of this methodology will also help prevent the spread of the virus to areas that are still uncontaminated and to advance the knowledge of the virus–vector relationship and epidemiological aspects of the disease.

It can also help breeders in the development and evaluation of resistant or tolerant cultivars or hybrids.

References

- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, Luis A, Vidal E, Pérez-Panadés J, Cambra M (2008) Quantitative detection of citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* 120:177–188
- Bertolini E, Felipe RTA, Sauer AV, Lopes SA, Arilla A, Vidal E, Mourão Filho FAA, Nunes WMC, Bové JM, López MM, Cambra M (2014) Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of ‘*Candidatus Liberibacter*’ species in citrus plants and psyllid vector. *Plant Pathol* 63:1149–1158
- Bertolini E, Figàs-Segura À, Álvarez B, Biosca EG (2023) Development of TaqMan real-time PCR protocols for simultaneous detection and quantification of the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* and their specific lytic bacteriophages. *Viruses* 15:841
- Capote N, Bertolini E, Olmos A, Vidal E, Martínez MC, Cambra M (2009) Direct sample preparation methods for the detection of plum pox virus by real-time RT-PCR. *Int microbiol*, 12:1-6
- Chen Y, Zhang WZ, Liu X, Ma ZH, Li B, Allen C, Guo JH (2010) A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in the horticultural soil and plant tissues. *J Microbiol Biotechnol* 20: 193–201
- De Boer S, López MM (2012) New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. *Annu Rev Phytopathol* 50: 197-218
- Elert, E (2014) Rice by the numbers: A good grain. *Nature* 514: 50-51
- Fauquet CR, Thouvenel JC (1983) Association d’un Nouveau virus enbatonnet avec la maladie necrotique a rayure du rizen Cote d’Ivoire. *Comptesrendus de l’Academie des Sciences* 296:575
- Fauquet C, Thouvenel JC, Fargette D, Fishpool LDC (1988) Rice stripe necrosis virus: a soil-borne rod-shaped virus. In: *Developments in Applied Biology II. Viruses with Fungal Vectors*, Cooper, JI, Asher, MJC (Eds.). Association of Applied Biologists, Warwick, UK., pp 71–82
- Gilmer D, Ratti C (2017) ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: *Benyviridae*. *J Gen Virol* 98:1571–1572
- Kanyuka D, Ward E, Michael JA (2003) *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Mol Plant Pathol* 4: 393–406
- Louvel D, Bidaux JM (1977) Observation de nouveaux symptômes pathologiques sur des variétés précoces de rizen Cote-d’Ivoire. *Agron Trop* 32:257–261
- López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E (2009) Are Molecular Tools Solving the Challenges Posed by Detection of Plant Pathogenic Bacteria and Viruses? *Mol biol* 11:13-46
- Lozano I, Morales F (2009) Molecular characterisation of rice stripe necrosis virus as a new species of the genus *Benyvirus*. *Eur J Plant Pathol* 124:673–680
- Maciel JLN, Moraes MG, Almança MAK, Matsumura ATS, Falcade JH (2006) Ocorrência do vírus Rice stripe necrosis virus em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. *Fitopatol Bras* 31: 209-209.
- Maurino MF, Pecci MPG, Kruger RD, Cúndom MA, Gutierrez SA, Celli MG (2018) First report of rice stripe necrosis virus in Argentina. *Crop Prot* 114: 143-147
- Morales FJ, Ward E, Castaño M, Arroyave JA, Lozano I, Adams MJ (1999) Emergence and partial characterization of rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. *Eur J Plant Pathol* 105: 643–650
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325

- Olmos A, Dasi MA, Candresse T, Cambra M (1996) Print-capture PCR: A simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 2192–2193
- Oludare A, Sow M, Afolabi O, Pinel-Galzi A, Hébrard E, Silué D (2015) First report of rice stripe necrosis virus infecting rice in Benin. *Plant Dis* 99:735
- Osman F, Rowhani, A (2006) Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J Virol Meth* 133:130-136
- Paz L, Espinosa A, Amano Y (2009) El virus del "entorchamiento" del arroz en Ecuador. *Boletín Divulgación* 363. INIAP, Estación Experimental Litoral Sur; Guayaquil, Ecuador. Available at: <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3830>. Accessed on 22 March, 2023
- Ratti C, Budge G, Ward L, Clover G, Rubies-Autonell C, Henry C (2004) Detection and relative quantitation of Soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (Taqman). *J Virol Meth* 22:95-103
- Rubio L, Galipienso L, Ferriol I (2020) Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Front Plant Sci* 11:1092
- Sereme D, Neya BJ, Bangratz M, Brugidou C, Ouedraogo I (2014) First report of rice stripe necrosis virus infecting rice in Burkina Faso. *Plant Dis* 98:1451–1451
- Tamada T, Kondo H (2013) Biological and genetic diversity of plasmodiophorid-transmitted viruses and their vectors. *J Gen Plant Pathol* 79:307–320
- Tucker MJ, Celli MG, Conteh AB, Taylor DR, Hébrard E, Poulicard N (2020) First report of rice stripe necrosis virus infecting rice in Sierra Leone. *New Disease Reports* 41:10
- Wang P, Liu J, Lyu Y, Huang Z, Zhang X, Sun B, Li P, Jing X, Li H, Zhang C (2022) A review of vector-borne rice viruses. *Viruses* 14: 225

4 CAPÍTULO 2

**Identificação de genótipos de arroz resistentes ou tolerantes
ao rice stripe necrosis virus**

4.1 Introdução

O Brasil está entre os 10 países com maior produção de arroz no mundo e o estado do Rio Grande do Sul (RS) é responsável por 70,5% da produção nacional (CONAB, 2021). A produção de arroz irrigado no RS sofreu alterações importantes no sistema produtivo nas últimas décadas. O melhoramento genético permitiu a introdução de cultivares mais produtivas, as quais duplicaram a produtividade média nos últimos 40 anos. Outras tecnologias que resultaram na simplificação do manejo de plantas daninhas, de aumento de produtividade, qualidade e rusticidade, acarretaram na concentração de poucas cultivares em uso comercial, sendo as mais semeadas no estado do RS são a IRGA 424 RI (54,3%), seguida da BRS Pampa CL (13,3%), IRGA 431 CL (9,2%) e Guri INTA CL (7,3%) (IRGA, 2023).

Essa dinâmica resultou em uma maior eficiência produtiva, mas teve consequências importantes na sanidade da cultura, devido ao aumento da ocorrência de doenças, que limitam a produtividade e afetam também a qualidade das sementes e grãos (SOSBAI, 2018). Doenças que aconteciam apenas em determinados locais estão sendo cada vez mais relatadas nas lavouras. A ocorrência de doenças consideradas secundárias vem aumentando nas lavouras, principalmente pelas práticas culturais adotadas de forma antagônica às recomendadas pela pesquisa (SOSBAI, 2018). As principais doenças da cultura do arroz, como a brusone, manchas foliares e o enrolamento foliar podem ocasionar perdas de 100% quando em condições ambientais favoráveis (CONAB, 2015).

O enrolamento foliar é causado pelo vírus rice stripe necrosis virus (RSNV), sendo transmitido exclusivamente pelo cercozoário *Polymyxa graminis* (Cúndom *et al*, 2018). Não está clara a importância real desta virose, porém, devido a mudanças climáticas e principalmente nos sistemas de cultivo, esta doença vem ganhando importância nas lavouras do RS. As perdas ocasionadas por esta virose ainda são desconhecidas no Brasil,

porém, em outros países há relatos de que as perdas podem chegar a 20% da produtividade (Pardo e Muñoz, 1994). Os sintomas causados pelo vírus são facilmente confundidos com causas de outra natureza, dificultando a adoção de medidas eficazes de manejo e controle.

O controle de viroses é muito difícil de ser realizado (Souza, 2006), sendo o manejo preventivo a forma mais eficiente de controle (Moriones, 2016). Para o controle do enrolamento foliar do arroz, as medidas recomendadas são a restrição do trânsito de máquinas e equipamentos provenientes de áreas com histórico da doença (Scheuermann *et al.*, 2015). Segundo os mesmos autores, o sistema de cultivo também parece ter influência na ocorrência da doença. O uso de cultivares resistentes ou tolerantes ao vírus seria a medida almejada para o manejo e controle desta doença. Segundo Gutierrez *et al.* (2010), a espécie selvagem *Oryza glaberrima* apresenta elevada resistência a doença e, em trabalhos realizados na Colômbia por Lozano e Morales, (2009), também se encontraram genótipos com diferentes níveis de resistência. Ainda, Scheuermann *et al.* (2015) relataram que as cultivares Epagri 109 e SCS 115 CL apresentaram menor incidência da doença que as cultivares Puitá INTA CL, Epagri 106, SCS 117 CL e SCS 118 Marques, quando semeadas em solo seco.

Não há informações sobre a resistência ou tolerância ao enrolamento foliar dos principais genótipos cultivados no Rio Grande do Sul. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar, entre as principais cultivares ou híbridos semeados na região Sul do Brasil, os genótipos resistentes ou tolerantes ao vírus.

4.2 Materiais e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre/RS (30°04'26"S;

51°08'06"W), iniciado em 04/10/2022 e finalizado em 16/11/2022. Foram testadas as cultivares mais semeadas na região Sul e um híbrido: IRGA 424 RI, IRGA 431 CL, Guri INTA CL, BRS Pampa, SCS 121 CL, SCS 122 Miura e BRH 522 CL. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os resultados foram comparados utilizando o teste Kruskal-Wallis.

A semeadura foi realizada em vasos de 1 L contendo 900g de solo infestado com *Polymyxa graminis* procedente de área com histórico da doença, coletado no município de Itajaí/SC, Brasil (26°57'09"S; 48°45'40"W). A densidade de semeadura (80 kg ha⁻¹) fez uma população de 20 plantas/vaso. A adubação de base foi feita com 56 g da fórmula 5-20-20 e 6 g de ureia. A entrada de lâmina d'água ocorreu no estágio V3 (colar formado na terceira folha do colmo principal) e foi mantida diariamente até o final do experimento.

Avaliaram-se diariamente as plantas para a presença de sintomas característicos da doença como listras cloróticas ou necróticas e enrolamento foliar. Aos 45 dias após a semeadura, foram coletadas 10 plantas de cada uma das 4 repetições de cada cultivar para a detecção do vetor e do vírus.

Para observação das estruturas do vetor nas raízes, utilizou-se a metodologia descrita por Valente *et al.* (2019). Segmentos radiculares com aproximadamente 2 cm foram coletados, lavados em água corrente, imersos em solução de lactofenol-azul de algodão 7% e fervidos por um minuto nesta mesma solução. Após, lavados novamente em água, depositados entre lâmina e lamínula e feita a observação em microscópio óptico Olympus BX41 no aumento de 400x.

Para a quantificação relativa do vírus, utilizou-se a metodologia de RT-PCR em tempo real desenvolvida no primeiro capítulo desta dissertação. Amostras de folhas das

plantas que apresentaram sintomas foram preparadas, macerando aproximadamente 1g de tecido foliar da planta em sacos plásticos individuais na presença de 10 mL de solução salina tamponada com fosfato – PBS (NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ – 7H₂O 2.68 g e KH₂PO₄ 0.24 g em 1L H₂O, pH 7.2). O mesmo procedimento foi realizado para amostras de plantas que não apresentaram sintomas. Alíquotas de 1.5 mL do extrato vegetal foram transferidas para tubos Eppendorf e armazenadas a -20°C. A extração de RNA foi realizada utilizando métodos diretos de preparação de amostras como descrito no primeiro capítulo deste trabalho, diluindo o extrato inicial outras 100 vezes em PBS.

Os resultados obtidos foram comparados utilizando o teste Tukey com nível de significância de 5 % utilizando o programa R versão 3.4.4 (R Core Team, 2018).

4.3 Resultados e discussão

Os primeiros sintomas de enrugamento foliar foram observados aos 30 dias. Aos 37 dias se observaram sintomas de listras cloróticas e necróticas e enrolamento da folha em plantas dos genótipos SCS 121 CL, SCS 122 Miura, BRH 522 CL e Guri INTA CL. Na cultivar SCS 122 Miura foram observados sintomas em três plantas; na SCS 121 CL, duas plantas; e na Guri INTA CL e no BRH 522 CL, uma planta. Não foram observados sintomas característicos nas cultivares IRGA 431 CL, IRGA 424 RI e BRS Pampa. Estes resultados não diferiram estatisticamente.

Os sintomas apresentados pelas plantas das cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura foram: enrolamento foliar (Figura 1), listras cloróticas e necróticas (Figura 1A) e necrose da planta (Figura 1B). A cultivar Guri INTA CL e o híbrido BRH 522 CL apresentaram sintomas de enrolamento foliar e listras cloróticas (Figuras 2C e 2D).



FIGURA 1. Presença de sintomas do enrolamento foliar, listras cloróticas e necróticas na cultivar SCS 121 (A); Necrose da planta da cultivar SCS 122 Miura (B); Sintoma leve de enrolamento da folha e listras cloróticas na cultivar Guri INTA CL (C); Sintoma de enrolamento e listras cloróticas no híbrido BRH 522 CL (D).

Foi observada a presença de estruturas do vetor apenas nas raízes da cultivar SCS 121 CL e do híbrido BRH 522 CL (Tabela 1). Analisaram-se 40 centímetros de raízes e se observou a presença de um único cistossoro de *P. graminis* em uma das 40 plantas da cultivar SCS 121 CL (Figura 2) e dois cistossoros em plantas do híbrido BRH 522 CL. Estes resultados foram comparados utilizando o teste Kruskal-Wallis, não diferindo estatisticamente. As plantas com a presença das estruturas do vetor manifestaram sintomas característicos da doença. A confirmação de que o cistossoro observado era de *P. graminis* se deu através da comparação da estrutura morfológica descrita por Tyagi *et al.* (2016).



FIGURA 2. Presença do cistossoros de *Polymyxa graminis* em raiz da cultivar de arroz SCS 121 CL.

O baixo número de cistossoros encontrados provavelmente tenha sido pela quantidade de raiz avaliada. Por se tratar de um método de observação laborioso, somente foi possível analisar 40 cm de raiz por repetição. Outra possibilidade de detecção e quantificação da presença de *P. graminis* seria com a utilização de métodos moleculares, como a PCR em tempo real descrita por Ratti *et al.* (2004). Devido ao custo das análises não foi possível realizar neste trabalho. A inundação do solo também afeta a população de *P. graminis* pois, segundo Rush (2003), a infecção das raízes por plasmodioforídeos como *P. graminis* é favorecida em solos com alta umidade, porém esses estudos não incluem solos alagados.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, observamos que mesmo com baixa população do vetor, ocorreu a transmissão do vírus nos diferentes genótipos. Porém, segundo Nascimento *et al.* (2023), há um alto grau de correlação entre a carga viral, a quantidade do vetor e a incidência da doença.

O RSNV foi detectado por RT-PCR em tempo real em cinco dos sete genótipos testados, analisando 10 plantas de cada repetição (Tabela 1). O vírus foi detectado em plantas de todas as repetições da cultivar SCS 121 CL e SCS 122 Miura; em plantas de 3 repetições da cultivar IRGA 431 CL e da cultivar Guri INTA CL; e, em plantas de 2 repetições do híbrido BRH 522 CL. O vírus não foi detectado em nenhuma planta das cultivares IRGA 424 RI e da cultivar BRS Pampa (Tabela1).

Também foram observadas diferenças entre os genótipos nas análises quantitativas do RSNV. Para a quantificação relativa, foram comparados os valores das médias dos ciclos de amplificação (Cts) do vírus nos diferentes genótipos (Tabela 2). Os menores valores de Ct (maior título viral) foram obtidos nas cultivares SCS 121 CL (25,01) e SCS 122 Miura (27,63). As cultivares IRGA 431 CL (30,78), Guri INTA (34,27) e o híbrido BRH 522 CL (34,53) apresentaram valores intermediários de Ct, enquanto as

cultivares BRS Pampa (> 40,00) e IRGA 424 RI (> 40,00) não apresentaram valores de Ct ou seja, o vírus não foi detectado até 40 ciclos de amplificação.

TABELA 1. Resultados da observação de sintomas nas folhas, presença do vetor nas raízes e amplificação do RSNV por RT-PCR em tempo real nos diferentes genótipos e repetições.

Genótipo	Repetição	Sintomas em folhas		Vetor (n° esporos/10 cm de raiz)	RT-PCR em tempo real (Ct)
		Presença			
SCS 121 CL	1	Presença	1/10	1	+
		Ausência	9/10	0	+
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	3	Presença	1/10	0	+
		Ausência	9/10	0	+
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
SCS 122 Miura	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	3	Presença	2/10	0	+
		Ausência	8/10	0	+
	4	Presença	1/10	0	+
		Ausência	9/10	0	+
IRGA 431 CL	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	3	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
IRGA 424 RI	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	3	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-

continuação TABELA 1. Resultados da observação de sintomas nas folhas, presença do vetor nas raízes e amplificação do RSNV por RT-PCR em tempo real nos diferentes genótipos e repetições.

Guri INTA CL	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	3	Presença	1/10	0	+
		Ausência	9/10	0	+
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
BRS Pampa	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	3	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
BRH 522 CL	1	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	+
	2	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-
	3	Presença	1/10	2	+
		Ausência	9/10	0	+
	4	Presença	0/10	nd	nd
		Ausência	10/10	0	-

TABELA 2. Valores da média de Ct da RT-PCR em tempo real e desvio padrão em função do genótipo.

Genótipos	RT-PCR em tempo real (\bar{X} Ct) \pm SD
IRGA 424 RI	> 40,00 \pm 1,82 A
BRS Pampa	> 40,00 \pm 1,82 A
BRH 522 CL	34,53 \pm 6,32 AB
Guri INTA CL	34,27 \pm 6,83 AB
IRGA 431 CL	30,78 \pm 6,45 AB
SCS 121 CL	25,01 \pm 5,88 B
SCS 122 Miura	27,63 \pm 1,18 B

* $p= 0.001584$. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura foram as mais suscetíveis e diferiram das cultivares BRS Pampa e IRGA 424 RI que foram resistentes ao vírus. Coincidindo com a maior carga viral (menores valores de Ct), as cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura foram as que apresentaram os sintomas mais severos da doença, como a necrose da planta (Figura 1B), não sendo indicadas para áreas arroseiras que apresentam histórico da doença. Neste caso, as cultivares indicadas seriam a BRS Pampa e a IRGA 424 RI que não apresentaram sintomas da doença e nem a presença do vírus.

Segundo o gráfico de dissimilaridade pela distância euclidiana e método de ligação média entre grupo (UPGMA), observamos a formação de dois grupos (Figura 3): O grupo 1 composto pelas cultivares IRGA 424 RI, Pampa CL, Guri INTA CL e o híbrido BRH 522 CL e, o grupo 2, pelas cultivares SCS 121CL, SCS 122 Miura e IRGA 431 CL.

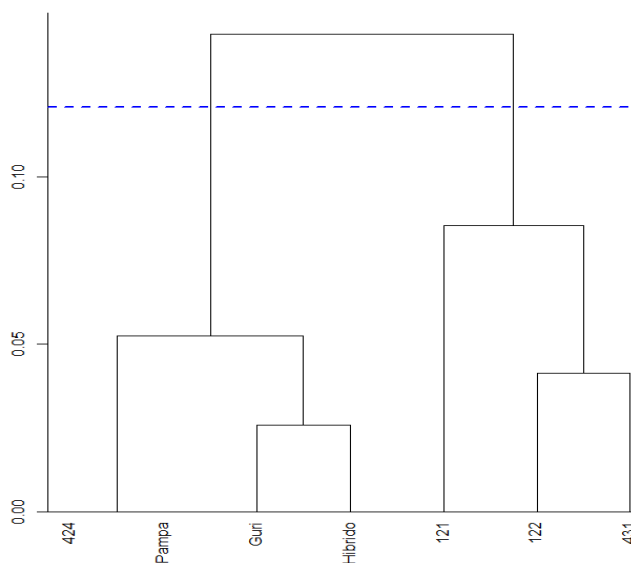


FIGURA 3. Dendrograma com ponto de corte pelo método Mojen (1977), dividindo os genótipos em dois grupos conforme a presença ou ausência de sintomas, presença do vetor e valores do ciclo de amplificação por RT-PCR em tempo real.

Apesar de não ter apresentado sintomas, a cultivar IRGA 431 CL não foi estatisticamente diferente das cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura (que apresentaram

menores valores de Ct) e foi agrupada no mesmo cluster do dendograma destas (Figura 3). Esse comportamento indica um possível grau de tolerância ao vírus na cultivar IRGA 431 CL. Resultados parecidos foram encontrados para dois híbridos de arroz frente ao RSNV, caracterizados como medianamente suscetíveis (Soares *et al.*, 2019).

A cultivar IRGA 431 CL foi agrupada em cluster diferente das cultivares IRGA 424 CL e BRS Pampa, principalmente pelo fato de ter sido observado curvas de amplificação nas três das quatro repetições de plantas assintomáticas (Tabela 1). Mesmo que estatisticamente não tenha sido observada diferença significativa, quando considerada a presença ou ausência de sintomas, a presença do vetor e a RT-qPCR de folhas assintomáticas, ocorreu a separação da IRGA 431 CL das cultivares resistentes.

Devido a não expressão de sintomas, mesmo com a detecção do vírus em três das quatro repetições e com carga viral média, segundo Moriones (2016), podemos classificar a cultivar IRGA 431 CL como tolerante ao RSNV. Essa cultivar, entretanto, pode estar incrementando a fonte de inóculo, não sendo recomendada sua utilização em áreas com histórico da doença.

Apesar de Guri INTA CL e BRH 522 CL estarem no mesmo cluster e não diferirem estatisticamente de IRGA 424 RI e BRS Pampa, foram observados sintomas e curvas de amplificação em, pelo menos, duas repetições com plantas assintomáticas (Tabela 1). Dessa forma, essas cultivares também não deveriam ser indicadas em áreas com histórico da doença, pois apesar de não haver dados concretos sobre as perdas causadas pelo RSNV, em algumas ocasiões, estas podem ser superiores a 20% da produtividade (Pardo e Muñoz, 1994).

Em estudos realizados por Campos do Nascimento *et al.* (2023), observaram-se diferentes graus de resistência de cultivares frente ao RSNV. A cultivar Epagri 106

apresentou a maior carga viral e maior incidência da doença sendo classificada como suscetível. Já a espécie *Oryza glaberrima* apresentou baixa carga viral e não apresentou sintomas. A cultivar SCS 123 Pérola, resultante da hibridização entre *O. glaberrima* e *O. sativa* não diferiu estatisticamente da carga viral de *O. glaberrima*, porém, apresentou 30 % menos incidência da doença que a cultivar Epagri 106. Isso poderia indicar a transferência de algum gene conferindo resistência ao RSNV da espécie *O. glaberrima* para a cultivar Epagri 106.

Os resultados encontrados neste trabalho, a respeito da sintomatologia, da presença dos cistossoros do vetor e da presença do vírus na planta podem ser devidos a fatores genéticos ou a outras características de manejo. Scheuermann *et al.* (2015) realizaram experimentos a respeito do efeito do sistema de cultivo sobre a incidência do enrolamento do arroz e observaram que o cultivo em sistema pré-germinado, com inundação antecipada do solo, predispõe a menor incidência da doença. Provavelmente a inundação do solo seja um fator desfavorável ao vetor e/ou sua infecção nas raízes.

Novos estudos devem ser realizados para identificar os mecanismos envolvidos na resistência da espécie *O. glaberrima*. Essa informação auxiliará no desenvolvimento de novas cultivares, assim como estudos da interferência dos diferentes sistemas de cultivo no desenvolvimento e sobrevivência do vetor no solo.

A identificação de genótipos resistentes ou tolerantes ao RSNV, associados à detecção prévia do vetor virulífero no solo, e o melhor entendimento da epidemiologia da doença do enrolamento foliar auxiliarão no uso de estratégias de manejo integrado, permitindo um controle eficaz da doença. Dessa maneira, poderão ser reduzidos os prejuízos econômicos, com perdas de produtividade e uso desnecessário de insumos, contribuindo também para a preservação do meio ambiente.

4.4 Referências

- BERTOLINI, E. *et al.* Development of TaqMan real-time PCR protocols for simultaneous detection and quantification of the bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* and their specific lytic bacteriophages. **Viruses**, Basel, v. 15, n. 4, [art.] 841, 2023.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2009.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **A cultura do arroz**. Brasília, DF: CONAB, 2015. 180 p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Safra 2021/2022. **Perspectivas para a Agropecuária**, Brasília, DF, v. 9, p. 1-85, ago. 2021. Edição grãos.
- CÚNDOM, M. *et al.* ***Polymyxa graminis* en cultivos de arroz en Argentina**. [Buenos Aires]: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 2018.
- INSTITUTO RIO-GRANDENSE DO ARROZ - IRGA. Relatório final da safra 2022/23. **Boletim de resultados da safra 2022/23 em terras baixas: arroz irrigado, soja e milho em rotação**, Cachoeirinha, p. 1-22, 03 ago. 2023. Disponível em: <https://irga.rs.gov.br/boletim-de-resultados>. Acesso em: 20 set. 2023.
- LEDINGHAM, G. A. Studies on *Polymyxa graminis*, n. Gen. N. Sp., a plasmodiophoraceous root parasite of wheat. **Canadian Journal of Research**. Ottawa, v. 17c, n. 2, p. 40-51, 1939.
- MACIEL, J. L. N. *et al.* Ocorrência do vírus Rice stripe necrosis virus em lavouras de arroz do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 31, p. 209, 2006.
- MOJENA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, Oxford, v. 20, p. 359-363, 1977.
- MORIONES, E. Manejo integrado de enfermedades virales. *In*: AYLLÓN, M. A. *et al* (ed.). **Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides**. Madrid: Sociedad Española de Fitopatología, 2016. cap. 14, p. 391-413.
- NASCIMENTO, S. C. *et al.* Quantificação de rice stripe necrosis virus (RSNV) e do seu vetor *Polymyxa graminis* em diferentes genótipos de arroz. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 53., 2023, Brasília, DF. **Anais [...]**. Brasília, DF: CBFITO, 2023. 702 p.
- PARDO, F.; MUNOZ, D. Agente causal del entorchamiento em el cultivo del arroz en los Llanos Orientales. **Revista Arroz**, Bogotá, v. 43, n. 392, p. 16-22, 1994.

RATTI, C. *et al.* Detection and relative quantification of soil-borne cereal mosaic virus (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 122, p. 95-103, 2004.

SCHEUERMANN, K. K. *et al.* Efeito do sistema de cultivo sobre a incidência do enrolamento do arroz, causado pelo vírus RSNV. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ, 9., 2015, Pelotas. **Resumos** [...]. Porto Alegre: SOSBAI, 2015. p. 1-4.

SOARES, R. C. *et al.* XP117 e XP119: novos híbridos de alta produtividade para o mercosul. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 11., 2019, Balneário Camboriú. **Resumos** [...]. Piracicaba: SOSBAI, 2019.

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Cachoeirinha, RS: SOSBAI, 2018. 209 p.

SOUZA, M. V. D. **Caracterização parcial de um fragmento e detecção por RT-PCR de rice stripe necrosis virus**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TYAGI, S. *et al.* The development of simple methods for the maintenance and quantification of *Polymyxa graminis*. **Indian Journal of Microbiology**, Hyderabad, v. 56, p. 482-490, 2016.

VALENTE, J. B. *et al.* A novel putative member of the family Benyviridae is associated with soil borne wheat mosaic disease in Brazil. *Plant Pathology*, Oxford, v. 68, p. 588-600, 2019.

5 CONCLUSÕES GERAIS

A partir do trabalho desenvolvido, foram desenhados iniciadores e sonda TaqMan específicos e validado um protocolo de detecção por RT-PCR em tempo real para o rice stripe necrosis virus em material vegetal de arroz e no vetor virulífero presente no solo. A sensibilidade do método direto de preparação de amostras foi similar ao de purificação de ácidos nucleicos, nas diferentes matrizes (material vegetal e solo), reduzindo custos e tempo de análise. A sensibilidade do protocolo desenvolvido de RT-PCR em tempo real, associado a preparação direta de amostras foram 100 a 1000 vezes mais sensível que a RT-PCR convencional, na detecção do RSNV em material vegetal e solo, respectivamente. Não houve diferença na carga viral entre folhas e raízes de arroz, permitindo o uso do material vegetal não destrutivo para análise. Esse trabalho permitiu, através do desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas, verificar que as cultivares IRGA 424 RI e BRS Pampa foram as mais resistentes ao RSNV e são indicadas para locais com histórico da doença. Já a cultivar IRGA 431 CL, apesar de testar positivo frente ao RSNV, não apresentou sintomas de enrolamento foliar, indicando uma possível tolerância ao vírus. As cultivares SCS 121 CL e SCS 122 Miura foram as mais suscetíveis ao RSNV e não são indicadas para áreas com histórico da doença. O desenvolvimento de uma ferramenta para detecção precoce do RSNV no campo e os resultados obtidos

auxiliam tanto o produtor na escolha das cultivares ideais para sua área de acordo com o histórico da doença, bem como os melhoristas no desenvolvimento de novas cultivares comerciais. Ademais, por se tratar de uma doença aumenta sua incidência a cada safra, devem-se continuar os estudos e trabalhos para ampliar o conhecimento sobre a doença, que ainda é escasso.