

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – MESTRADO EM PRODUÇÃO
VEGETAL

MATHEUS RODRIGUES MAGALHÃES ALBUQUERQUE

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE ESPÉCIES VIRAIS NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL

LAGES

2023

MATHEUS RODRIGUES MAGALHÃES ALBUQUERQUE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE ESPÉCIES VIRAIS NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina – Udesc.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva

LAGES

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Rodrigues Magalhães Albuquerque, Matheus
IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES VIRAIS NA
CULTURA DO MILHO NO BRASIL / Matheus Rodrigues
Magalhães Albuquerque. -- 2023.
100 p.

Orientador: Fabio Nascimento da Silva
Coorientador: Giselle Camargo Mendes
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2023.

1. Variabilidade genética. 2. Levantamento de Populações
virais. 3. Complexo de enfezamento do milho. 4. Vírus
associados ao milho. I. Nascimento da Silva, Fabio. II.
Camargo Mendes, Giselle. III. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV.

MATHEUS RODRIGUES MAGALHÃES ALBUQUERQUE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DE ESPÉCIES VIRAIS NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Fabio Nascimento Da Silva
Universidade Do Estado De Santa Catarina

MEMBROS:

Dr. Vinicius de Moura Stock
Bayer

Prof. PhD. Amauri Bogo
Universidade Do Estado De Santa Catarina

Lages, 16 de fevereiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela minha vida e ter permitido meu aprimoramento pessoal e profissional, por ter sempre me protegido e acima de tudo, me amado.

Agradeço aos meus pais, Arnaldo Batista de Albuquerque e Marilda Rodrigues P. Albuquerque, ao meu irmão, Gustavo Rodrigues Albuquerque, e a minha cunhada, Emily Karoline Silva Moreira, por todo incentivo e apoio, por todas as orações, todas as palavras de amor, sem vocês não seria possível realizar meus sonhos, amo vocês incondicionalmente, e agora, com a chegada da mais nova integrante, Emanuely, que alegrará mais ainda nossas vidas.

Aos meus avós, Sr. Moacir, Sra. Zilfa, Sra. Silvestre e Sra. Lica, que em todo o tempo me apoiaram e oraram diariamente pelo meu bem, amo vocês.

Aos meus caros amigos, hoje família, Dinorá, Jerônimo e Maria, obrigado por todo apoio e orações, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus familiares, que sempre me encorajaram, estiveram acompanhando minha jornada de longe, mas sempre presente em orações, meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador e a minha coorientadora, Dr. Fábio Nascimento da Silva e Dra. Giselle Camargo Mendes, meus mais sinceros agradecimentos por toda dedicação e ensinamentos, por terem me acolhido e permitido o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus colegas do laboratório de Virologia Vegetal, Dr. Eduardo, Douglas, Alba e Pedro, por todo auxílio nas atividades e companheirismo, meus sinceros agradecimentos.

Às minhas amigas, Jidleiny, Anna Vitória e Samara, obrigado pelo companheirismo, por sempre estarem comigo me apoiando, sem vocês seria impossível estar aqui, amo vocês.

Aos meus amigos, Anderson, Dahise, Ricardo, Vinicius, Arthur, Ângela, Leonardo L., Leonardo M., Yasmin, Paulo Sérgio e Juliana, serei eternamente grato por todos momentos de trabalho e lazer, meus mais sinceros agradecimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial ao Centro de Ciências Agroveterinárias juntamente ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPGPV-UDESC), pela estrutura, recursos e a oportunidade de cursar o mestrado, meus agradecimentos.

À toda equipe Bayer, pelo financiamento do projeto e coleta das amostras, em especial ao Dr. Vinicius e Dra. Meiryele, meus sinceros agradecimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o mestrado.

E a todos, que diretamente ou indiretamente se fez necessário para a conclusão deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

In memoriam de Maria Margarida Pinto e Moacir Alves de Oliveira Junior, tios queridos que jamais serão esquecidos, sentimos saudades.

A voz de Deus nos diz constantemente: uma falsa ciência faz um homem ateu, mas uma verdadeira ciência leva o homem a Deus.

(Voltaire)

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor do grão. Contudo, fatores abióticos (temperatura, luminosidade, água e nutrientes) e bióticos (plantas daninhas, insetos e patógenos) podem acarretar em reduções drásticas na produção, onde se destaca as doenças. Dentro das doenças de etiologia viral, importantes gêneros, tais como *Marafivirus*, *Polerovirus*, *Potyvirus*, *Mastrevirus* e *Nuclerhabdovirus* já foram relatados no Brasil, e juntamente com o complexo de enfezamento do milho, composto por dois mollicutes (*Spiroplasma kunkelli* e *Candidatus Phytoplasma asteris*) e um vírus (*maize rayado fino virus*; Genero: *Marafivirus*; Família: *Tymoviridae*) vem sendo motivo de preocupação no setor de produção de milho, visto que não há estudos sobre a distribuição geográfica desses patógenos. Assim, o objetivo deste estudo foi a identificação, caracterização e análise da variabilidade genética de espécies virais associadas a cultura do milho no Brasil. Para isto, amostras de milho foram coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul e Bahia, sendo os ácidos nucleicos totais (DNA e RNA) extraídos pelo protocolo de TRIzol, posteriormente submetidos a PCR ou RT-PCR, em seguida a eletroforese para constatar a presença ou ausência dos patógenos em estudo. As amostras virais que apresentaram ampliações com o tamanho esperado foram enviadas para sequenciamento. As sequências consenso foram geradas com auxílio do software MEGA-X e comparadas com o banco de dados do *Genbank*, confirmando a presença de maize rayado fino virus (MRFV), maize yellow mosaic virus (MaYMV), maize striate mosaic virus (MSMV) e sugarcane mosaic virus (SCMV) nos estados em estudo. Este é o primeiro relato de MRFV, *S. kunkelli* e *Ca. Phytoplasma asteris* no estado de Santa Catarina, e concomitantemente o primeiro relato de MaYMV e MSMV no Sul do Brasil, sendo o MRFV o patógeno mais prevalente dentre os vírus avaliados. As análises de variabilidade genética do MRFV indicaram maior variabilidade genética dos isolados obtidos no estado do Paraná e Goiás e uma maior variabilidade na região 3' terminal da região codificadora da CP na maioria dos isolados analisados.

Palavras-chave: Variabilidade genética; Levantamento de Populações virais; Complexo de enfezamento do milho; Vírus associados ao milho;

ABSTRACT

Corn (*Zea mays* L.) is the most produced cereal in the world, and Brazil is the third largest grain producer. However, abiotic factors (temperature, light, water and nutrients) and biotic factors (weeds, insects, and pathogens) can lead to drastic reductions in production, and diseases stand out. Among the diseases of viral etiology, important genera, such as *Marafivirus*, *Polerovirus*, *Potyvirus*, *Mastrevirus*, and *Nuclerhabdovirus* have already been reported in Brazil, and together with the corn stunting complex, composed of two bacteria (*Spiroplasma kunkelli* and *Candidatus phytoplasma asteris*) and one virus (*maize rayado fino virus*; Genus: *Marafivirus*; Family: *Tymoviridae*) has been a cause for concern in the corn production sector, since there is no study of the geographical distribution of these pathogens. Thus, this study aimed to identify, characterize and analyzed the genetic variability of viral species associated with corn culture in Brazil. For this, corn samples were collected in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, and Bahia. Total nucleic acids (DNA and RNA) were extracted using the TRIzol protocol, and later submitted to PCR or RT-PCR, followed by electrophoresis to verify the presence or absence of the pathogens under study. The viral samples that presented amplifications with the expected size were sent for sequencing. The consensus sequences were generated by MEGA-X and compared with the *Genbank* database, confirming the presence of maize rayado fino virus (MRFV), maize yellow mosaic virus (MaYMV), maize striate mosaic virus (MSMV), and sugarcane mosaic virus (SCMV) in the states under study, being the first report of MRFV, *S. kunkelli* and *Ca. Phytoplasma asteris* in the state of Santa Catarina, and concomitantly the first report of MaYMV and MSMV in southern Brazil, being MRFV the most prevalent pathogen among the evaluated viruses. The sequences were submitted to MRFV genetic variability analysis, which indicated higher genetic variability of the isolates from Paraná and Goiás states and higher variability in the 3' terminal region of the CP coding sequence in most of the analyzed isolates.

Keywords: Genetic variability; Viral Populations Survey; Corn Stunt Disease; Maize-associated viroses;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Organização genômica de *Maize rayado fino virus*. Guanina metilada (Cap); Metiltransferase (MTR); Proteína de autoproteólise no sítio de clivagem (PRO); RNA helicase (HEL); Polimerase (POL); Capa proteica (CP); P 43;24
- Figura 2 – Organização genômica de *Maize yellow mosaic virus*. Proteína viral do genoma (VPg); Em vermelho: Proteína de supressão de silenciamento (P0); Protease de serina (P1); Proteína de fusão da RNA polimerase dependente de RNA (P1-P2); Capa proteica (P3); Proteína de movimento (P4); Proteína do domínio de leitura (P5);....25
- Figura 3 – Organização genômica de *Sugarcane mosaic virus*. Região não traduzida (URT); Proteína P1 (P1); Componente auxiliar da protease (HC-Pro); Proteína P3 (P3); Proteína PIPO (PIPO); Proteína 6K1 (6K1); Proteína de inclusão cilíndrica (CI); Proteína de inclusão nuclear de A-VPgn (Nia-VPg); Proteína de inclusão nuclear A (NIa); Proteína de inclusão nuclear B (NIb); Capa proteica (CP);27
- Figura 4 – Organização genômica de *Maize streak virus*. Proteína de movimento Coat protein expression strategy of maize rayado fino virus and evidence for requirement of CP1 for leafhopper transmission (MP); Capa proteica (CP); Região intergênica curta (SIR); Proteína associada a replicação (Rep - RepA); Região intergênica longa (LIR); Leitura dos codons sentido horário (V1-V2); Leitura dos códons sentido anti-horário (C1-C2);.....28
- Figura 5 – Organização genômica de *Maize Iranian mosaic virus*. Capa proteica (N); Cofator da polimerase (P); Proteína de movimento (P3); Proteína matriz (M); Glicoproteína (G); RNA polimerase dependente de RNA (L);.....29
- Figura 6 – (A) Mapa do Brasil com destaque para o estado de Santa Catarina; (B) Mapa do estado de Santa Catarina com os municípios com pontos de coleta, onde: (1) Abelardo Luz; (2) Campos Novos; (3) Fraiburgo; (4) Lages; e (5) Mafra; (C, D e E) Estrias cloróticas paralelo as nervuras e avermelhamento das bordas, sintomas típicos do

complexo de enfezamento do milho em folhas de milho (*Zea mays*).....37

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de *maize rayado fino virus*, com as amostras de milho (*Zea mays*) de B1 à B30. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com *maize rayado fino virus* - 633 pb).....43

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e fitoplasma (*Candidatus Phytoplasma asteris*), em amostras de milho (*Zea mays*) de B1 à B30. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com mollicutes - 500 pb para o espiroplasma e 1.300 pb para o fitoplasma).....44

Figura 9 – (A) Mapa do estado de Santa Catarina com os municípios: (1) Abelardo Luz; (2) Campos Novos; (3) Fraiburgo; (4) Lages; e (5) Mafra; (B) Gráfico com a distribuição das diferentes configurações de infecções; (C) Gráfico com distribuição de infecções isoladas por *maize rayado fino virus*, *Spiroplasma kunkelli* (Corn stunt spiroplasma - CSS) e *Candidatus Phytoplasma asteris* (Maize bushy stunt phytoplasma - MSBP), respectivamente. Os números indicados em B e C representam o número de amostras.....45

Figura 10 – (A) Mapa do Brasil com destaque para os estados com amostras coletadas em vermelho. (B) Municípios coletados nos estados de Santa Catarina (Roxo), Rio Grande do Sul (Verde), Paraná (Azul), Minas Gerais (Laranja), Goiás (Rosa), Mato Grosso do Sul (Preto) e Bahia (Marrom). (C) Estrias cloróticas paralelo as nervuras em folhas de plantas de milho (*Zea mays* L.). (D) Avermelhamento das bordas do limbo foliar em plantas de milho. (E) Variação de tonalidades verde claro e verde escuro em folhas de planta de milho.....50

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e fitoplasma (*Candidatus Phytoplasma asteris*), em amostras de milho (*Zea mays* L.) de B1 à B136. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com mollicutes).....62

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de *Maize rayado fino virus*, com as amostras de milho (*Zea mays* L.) de B1 à B136. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com *Maize rayado fino virus*).....64

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de *Maize yellow mosaic virus*, com as amostras de milho (*Zea mays* L.) de B1 à B136. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com maize yellow mosaic virus (MaYMV).....65

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da RT-PCR para a detecção de *Sugarcane mosaic virus*, com as amostras de milho (*Zea mays*) de B1 à B136. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+: Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com sugarcane mosaic virus (SCMV).....66

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose (1,0%) dos produtos da PCR para a detecção de *Maize striate mosaic virus*, com as amostras de milho (*Zea mays*) de B1 à B136. MM: Marcador molecular 1kb (Promega, EUA); Br: Branco (PCR sem material genético); C-: Controle negativo (PCR com material genético de planta sabidamente sadia); C+:

Controle positivo (PCR com material genético de planta infectada com *maize striate mosaic virus*).....68

Figura 16 – Detalhamento da incidência por patógeno associados a cultura do milho nos estados brasileiros coletados, onde: (Vermelho) Maize rayado fino virus (MRFV); (Amarelo) *Spiroplasma kunkelli*; (Azul) *Candidatus Phytoplasma asteris*; (Laranja) Maize yellow mosaic virus (MaYMV); (Verde) Maize striate mosaic virus (MSMV); (Roxo) Sugarcane mosaic virus (SCMV);.....69

Figura 17 – Relacionamento filogenético baseado no alinhamento das sequências de nucleotídeos da capa proteica (CP) de *maize rayado fino virus*.....81

Figura 18 – Número médio de nucleotídeos diferentes por sítio (diversidade de nucleotídeos - π) na região da capa proteica (CP) nas populações de *maize rayado fino virus*.....86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coletas das amostras, município de coleta, identificação da amostra, data de coleta e coordenadas geográficas. (Lages,SC, 2023).....	39
Tabela 2 - Municípios de coleta das amostras, identificação, data de coleta e coordenadas geográficas. (Lages,SC, 2023).....	51
Tabela 3 – Tabela 3 – Análise de recombinação utilizando o programa RDP4 dos isolados de maize rayado fino virus (MRFV) caracterizados neste estudo e dos disponíveis no <i>GenBank</i> . Os métodos utilizados foram: RDP (R); Geneconv (G); Bootscan/Redscan (B); Maxchi (M); Ciamera (C); 3seq (S); Siscan (T).....	83
Tabela 4 – Tabela 4 – Descritores de variabilidade genética para o vírus maize rayado fino virus (MRFV), onde: (a) Número total de sítios segregantes (S); (b) Diferenças médias de nucleotídeos entre sequências (K); (c) Diversidade de nucleotídeos (π); (d) Número de haplótipos (H); (e) Diversidade haplotípica (Hd); (f) Estimadores de 'Watterson' para a taxa de mutação em escala populacional.....	85

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
2.REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A cultura do milho	20
2.2 A produção do milho	21
2.3 Viroses na cultura do milho.....	23
2.3.1 Principais gêneros que acometem o milho no Brasil	24
2.3.1.1 O gênero Marafivirus	24
2.3.1.2 O gênero Polerovirus	25
2.3.1.3 O gênero Potyvirus	27
2.3.1.4 O gênero Mastrevirus	28
2.3.1.5 O gênero Nucleorhabdovirus	29
2.3.2 Principais vetores de virus em milho.....	30
2.3.2.1 Cigarrinha do milho.....	32
2.3.2.2 Pulgão do milho	33
2.4 Variabilidade genética.....	33
3 CAPÍTULO 1 – PRIMEIRO RELATO DE <i>Maize rayado fino virus</i> EM LAVOURAS COMERCIAIS NO ESTADO DE SANTA CATARINA	36
3.1 RESUMO	36
3.2 Introdução	37
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.3.1 Coleta das amostras	38
3.3.2 Extração de ácidos nucleicos totais.....	40
3.3.3 PCR e RT-PCR.....	41
3.3.4 Sequenciamento Sanger e análise das sequências	42
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.5 CONCLUSÕES	47

4 CAPÍTULO 2 – LEVANTAMENTO DE MOLÍCUTES E ESPÉCIES VIRAIS ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL	48
4.1 RESUMO	48
4.2 INTRODUÇÃO	49
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.3.1 Coleta das amostras	50
4.3.2 Extração de ácidos nucleicos totais	59
4.3.3 PCR e RT-PCR.....	60
4.3.4 Sequenciamento Sanger e análise das sequências	62
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.5 CONCLUSÕES	73
5 CAPÍTULO 3 – VARIABILIDADE GENÉTICA DO MAIZE RAYADO FINO VIRUS (MRFV), VÍRUS PREVALENTE NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL	75
5.1 RESUMO	75
5.2 INTRODUÇÃO	76
5.3 MATERIAL E METODOS	77
5.3.1 Extração de ácidos nucleicos totais	77
5.3.2. RT-PCR	77
5.3.3 Sequenciamento Sanger e análise das sequências	79
5.3.4 Amostras para os estudos de variabilidade genética.....	79
5.3.5 Análise filogenética.....	79
5.3.6 Análise de Recombinação	80
5.3.7 Descritores da variabilidade genética	80
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.5 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89

3 CAPÍTULO 1 – PRIMEIRO RELATO DE *Maize rayado fino virus* EM LAVOURAS COMERCIAIS NO ESTADO DE SANTA CATARINA¹

3.1 RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é cultivado em todos os estados brasileiros, possuindo expressiva importância econômica e alimentar, podendo ser cultivado em até três safras, sendo os estados do Sul do país a segunda maior região produtora do grão. Porém, a produção é constantemente ameaçada por diversos fatores, que inclui as doenças bióticas, das quais se destaca o complexo de enfezamento do milho que pode reduzir a produção em até 100%, composto por três patógenos, dois mollicutes (*Spiroplasma kunkelli* e *Candidatus Phytoplasma asteris*) e um vírus (*Maize rayado fino virus*). Sintomas típicos do complexo foram observados nas lavouras comerciais de milho no estado de Santa Catarina, associado a altas densidades populacionais da cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*, Hemiptera: Cicadellidae), vetor dos patógenos descritos anteriormente, dificultando assim a tomada de decisões devido à ausência de estudos que comprovem a presença destes patógenos no estado. Assim, objetiva-se com este estudo verificar a incidência e prevalência dos patógenos do complexo de enfezamento do milho em lavouras comerciais no estado de Santa Catarina. Para isto, 30 amostras coletadas em cinco municípios de Santa Catarina (Abelardo Luz, Campos Novos, Fraiburgo, Mafra e Lages), estas foram submetidas a extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA) pelo protocolo de TRIzol, posteriormente sintetizado o DNA complementar (cDNA) para o vírus de RNA, e realizado PCR ou RT-PCR, seguidos por eletroforese para detectar a presença ou ausência dos patógenos. As amostras que apresentaram amplificação para MRFV, 633 pb, foram enviadas para sequenciamento Sanger. Os resultados deste trabalho constataram a presença dos três patógenos do complexo de enfezamento do milho em configurações de infecções mistas e isoladas, sendo o MRFV o patógeno mais prevalente, com 93,33%, assim este é o primeiro relato do vírus em Santa Catarina.

Palavras-chave: Complexo de enfezamento do milho; MRFV; CSS; MSBP; Incidência e prevalência;

¹ Artigo publicado na revista Plant Disease (<https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1011-PDN>)

4 CAPÍTULO 2 – LEVANTAMENTO DE MOLICUTES E ESPÉCIES VIRAIS ASSOCIADAS AO MILHO EM DIFERENTES REGIÕES PRODUTORAS DO BRASIL

4.1 RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é amplamente cultivado em todo o mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor do grão. Todos os estados brasileiros produzem milho, sendo a segunda safra responsável pelo maior volume de grãos produzidos. Entretanto, a cultura é frequentemente ameaçada por doenças, sendo o complexo de enfezamento do milho vem se sobressaindo nas últimas safras devido à alta densidade populacionais da cigarrinha do milho (*Dalbulus maidis*, Hemiptera: Cicadellidae), vetor dos três patógenos do complexo. Este complexo é composto por dois mollicutes (*Spiroplasma kunkelli* e *Candidatus Phytoplasma asteris*) e um vírus (*maize rayado fino virus*). Não há levantamentos da distribuição geográfica destes patógenos, bem como demais vírus associados a cultura do milho já relatados em Santa Catarina, sendo essas informações importante para tomada de decisões no manejo da cultura. O objetivo do presente estudo é realizar o levantamento das espécies virais associados a cultura do milho, bem como os mollicutes associados ao complexo de enfezamento do milho nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Assim, 136 amostras foram coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Bahia, sendo estas submetidas a extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA) pelo protocolo de TRIzol. Para os vírus com genoma de RNA foram sintetizados o DNA complementar (cDNA), prosseguindo assim para RT-PCR ou PCR quando patógenos com genoma de DNA, seguidos por eletroforese para constatar a presença ou ausência dos patógenos. Os vírus que apresentaram amplificação no tamanho esperado foram enviados para sequenciamento Sanger. Os resultados obtidos mostram a presença de MRFV, *S. kunkelli*, *Ca. Phytoplasma asteris*, Maize yellow mosaic virus (MaYMV), Maize striate mosaic virus (MSMV) e Sugarcane mosaic virus (SCMV) nos estados estudados, bem como a prevalência de MRFV, com 64,70% de incidência, apresentando ampla distribuição geográfica de MRFV, MaYMV e MSMV.

Palavras-chave: Complexo de enfezamento do milho; *Maize rayado fino virus*; *Maize yellow mosaic virus*; *Maize striate mosaic virus*; *Sugarcane mosaic virus*; Levantamento de viroses;

4.2 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) apresenta inúmeras utilizações, mas vem se destacando como promissor matéria prima de biocombustível, porém, sua principal finalidade é para a alimentação humana e animal, por apresentar alto teor nutritivo, contendo em média 66,2% de carboidratos, 11,1% de proteínas, 3,6% de lipídeo, 3,6% de vitaminas/minerais (complexo B, vitamina C e vitamina E) e 2,7% de fibras (NUSS *et al.*, 2010; KAUSHAL, 2022; CONTINI *et al.*, 2019).

O Brasil é o terceiro maior produtor do grão e segundo maior exportador, sendo um importante componente do pilar econômico junto ao produto nacional bruto (PIB) (FIESP, 2022). Os maiores estados produtores em quantidade de milho estão localizados nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, sendo que estes representam juntos mais de 80% da produção nacional (CONAB, 2022). Entretanto, a produção é constantemente ameaçada por fatores que podem vir a ocasionar sua redução, sendo estes fatores de ordem edafoclimáticas (abióticos) ou biológica (biótico). Dentro dos fatores bióticos, os vírus vêm se destacando nos últimos anos em diversas culturas de interesse econômico, incluindo o milho, visto que a principal forma de disseminação desses patógenos são insetos vetores. A contínua presença de plantas de milho ao longo do ano, devido às três safras agrícolas, intensifica tal problemática, ocorrendo assim a ponte verde, permitindo a presença do hospedeiro principal da cigarrinha do milho e dos vírus (CASELA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2018).

Vale destacar que o complexo de enfezamento no milho vem ganhando destaque nos últimos anos, podendo causar redução de até 100% da produção. Esta doença está associada com três patógenos, o vírus da risca do milho (*maize rayado fino virus*) e dois mollicutes, agentes causais do enfezamento pálido do milho (*Spiroplasma kunkelli*) e enfezamento vermelho do milho (*Candidatus Phytoplasma asteris*) (OLIVEIRA *et al.*, 1995). Os patógenos associados ao complexo de enfezamento do milho possuem o mesmo vetor (responsável pela

5 CAPÍTULO 3 – VARIABILIDADE GENÉTICA DO MAIZE RAYADO FINO VIRUS (MRFV), VÍRUS PREVALENTE NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL

5.1 RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho (*Zea mays* L.), sendo produzido em todos os estados brasileiros em até três safras. Entretanto, inúmeros fatores podem vir a causar redução na produção, devido ao alto risco que a atividade agrícola apresenta, principalmente pela imprevisibilidade das condições climáticas e surtos populacionais de pragas (plantas daninhas, insetos e doenças). Inúmeros microrganismos podem provocar doenças em plantas, dentre estes destaca-se os vírus. Espécies virais pertencentes aos gêneros *Marafivirus*, *Polerovirus*, *Nucleorhabdovirus* e *Potyvirus* já foram relatadas no Brasil associadas a cultura do milho. Entretanto, não há estudos referentes a variabilidade genética desses patógenos. O estudo da variabilidade genética permite avaliar a origem e distribuição geográfica das populações virais, bem como estabelecer ações de médio e longo prazo para o controle das doenças virais, como a seleção de híbridos resistentes às populações virais prevalentes. Assim, objetivou-se com este estudo a análise da variabilidade genética da região codificadora da capa proteica (CP) do maize rayado fino virus (MRFV), vírus prevalente nas regiões produtoras de milho do Brasil. Amostras sintomáticas foram coletadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Bahia, sendo estas amostras submetidas a extração de ácidos nucleicos totais seguido por RT-PCR e eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras que apresentaram ampliações no tamanho esperado foram enviadas para sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados do *GenBank*. Foram realizadas análises filogenéticas, de recombinação e dos descritores de variabilidade genética. Em geral, as análises filogenéticas não indicaram separação por região geográfica para os isolados do MRFV caracterizados neste estudo. Eventos de recombinação foram detectados em isolados de Minas Gerais, Santa Catarina e São Paulo. Os resultados apresentados também indicaram maior variabilidade genética dos isolados obtidos no estado do Paraná

e Goiás e uma maior variabilidade na região 3' terminal da região codificadora da CP na maioria dos isolados analisados.

Palavras-chave: Recombinação genética; Descritores de variabilidade genética; *Maize rayado fino virus*;

5.2 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é a cultura agrícola mais cultivada no mundo, e no Brasil o cultivo pode ser realizado em até três safras agrícolas no mesmo ano (CONTINI *et al.*, 2019; CONAB, 2022). O consumo dos grãos tem destaque devido ao alto teor nutritivo, contendo em média 66,2% de carboidratos, 11,1% de proteínas, 3,6% de lipídeo, 3,6% de vitaminas/minerais (complexo B, vitamina C e vitamina E) e 2,7% de fibras (NUSS *et al.*, 2010; KAUSHAL, 2022; CONTINI *et al.*, 2019). Contudo, a produção é constantemente ameaçada por doenças, as quais englobam fungos, bactérias, nematoides e vírus (CASELA *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2018).

Os vírus são constituídos por uma molécula de DNA ou RNA, capa proteica e em alguns casos a presença de um envelope lipoproteico que envolve a capa proteica, podendo a partícula viral apresentar variações em sua morfologia quando observadas por microscópio eletrônico (REZENDE *et al.*, 2018). As reduções na produção estão relacionadas ao processo de infecção e colonização, onde o vírus utiliza a maquinaria celular do hospedeiro e demais recursos disponíveis na célula, ocasionando alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (CHAVES, 2002; REZENDE *et al.*, 2018)

Assim, conhecendo os mecanismos da biologia dos vírus é possível integrar práticas no manejo das doenças virais (MCLEISH *et al.*, 2019). Entretanto, os vírus estão sujeitos a alterações em suas bases nitrogenadas, que podem ser geradas por mutação, recombinação ou pseudorecombinação, e que representam importantes fontes de variabilidade genética (GARCÍA-ARENAL *et al.*, 2003; SEAL *et al.*, 2006). O entendimento da variabilidade genética das populações virais é de extrema importância permitindo acompanhar a adaptação