

## **IDENTIFICAÇÃO DE VIROSES ASSOCIADAS A CULTURA DO MILHO NAS REGIÕES SUL, SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO *Maize rayado fino virus*<sup>1</sup>**

Douglas Souza do Amaral<sup>2</sup>, Fabio Nascimento da Silva<sup>3</sup>, Matheus Rodrigues Magalhães Albuquerque<sup>4</sup>, Samara Campos do Nascimento<sup>4</sup>, Eduardo Silva Gorayeb<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Vinculado ao projeto “Identificação, caracterização e análise da variabilidade genética de espécies virais associadas a cultura do milho nas regiões sudeste e sul do Brasil”

<sup>2</sup> Acadêmico (a) do Curso de Agronomia – CAV – Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>3</sup> Orientador, Departamento de Agronomia – CAV – fabio.silva@udesc.br

<sup>4</sup> Acadêmicos do Curso de Mestrado em Produção Vegetal – CAV.

<sup>5</sup> Bolsista de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal – CAV.

O milho (*Zea mays*) é uma importante fonte proteica para nutrição humana e animal, bem como fonte bioenergética para produção de etanol, sendo cultivado em todos os estados brasileiros e no Distrito Federal. Entretanto, a produção é diariamente desafiada por fatores bióticos (fungos, bactérias, nematoides, vírus, insetos e plantas daninhas) e abióticos (altas e baixas temperaturas, déficit hídrico, deficiência nutricional, entre outros) que afetam a produtividade das lavouras. Dentre os vírus, as espécies associadas ao milho no Brasil pertencem aos gêneros *Marafivirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Polerovirus*, *Potyvirus* e *Mastrevirus*. Vale destacar que em áreas de produção é comum a observação de alta densidade populacional de insetos, tais como cigarrinhas e afídeos, potenciais vetores desses vírus. O objetivo desse estudo foi realizar a identificação das viroses presentes em lavouras comerciais de milho nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do país, bem como estudar a variabilidade genética da população do vírus prevalente no estado de Santa Catarina. Para isto, durante a safra 2021/2022 e segunda safra 2022, 105 amostras de plantas de milho apresentando sintomas de vírus foram coletadas nos estados do Rio Grande do Sul (8), Santa Catarina (28), Paraná (37), São Paulo (11), Minas Gerais (8), Goiás (10) e Mato Grosso do Sul (3). Para a identificação dos vírus, fragmentos do limbo foliar sintomático foram macerados com nitrogênio líquido e submetidos a extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA) utilizando TRIzol® (Invitrogen, EUA). A qualidade do material genético foi avaliada em espectrofotômetro. O material genético obtido das diferentes amostras foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR, para vírus com genoma de DNA) ou transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR, para vírus com genoma de RNA) utilizando GoTaq® DNA polymerase (Promega, EUA). Foram utilizados iniciadores universais para os gêneros *Nucleorhabdovirus*, *Polerovirus* e *Mastrevirus*, e específicos para *maize rayado fino virus* (MRFV) e *maize striate mosaic virus* (MSMV). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, visualizados e fotografados sob luz ultravioleta. Utilizando os mesmos procedimentos para identificação de vírus com genoma de DNA, também foi realizada a detecção dos mollicutes *Spiroplasma kunkelii* e *Candidatus Phytoplasma asteris*, patógenos comuns em infecções mistas com vírus no milho. As amostras que apresentaram amplificação com tamanho esperado foram enviadas para o sequenciamento Sanger (ACTGene Análises Moleculares, Brasil/RS). As sequências foram comparadas com o banco de dados GenBank utilizando o programa MEGA-X. As sequências parciais da CP foram analisadas para o vírus prevalente em Santa Catarina quanto aos descritores de variabilidade genética, incluindo a diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ); número de sítios segregantes (S); número médio de variação de

nucleotídeos entre as sequências (K); número de haplótipos (H); diversidade haplotípica (Hd); e taxa de mutação escalonada para população ( $\Theta$ -W). O programa DnaSP v6 foi utilizado para a determinação dos descritores descritos acima. Além das sequências de amostras obtidas no estudo nos municípios de Santa Catarina (Lages, Campos Novos, Fraiburgo, Mafra e Abelardo Luz), que compõem a população de Santa Catarina, também foi utilizado sequências disponíveis no GenBank (Global). Os resultados indicaram a presença do MRFV, *Spiroplasma kunkelii*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, sugarcane Mosaic Virus (SCMV), maize yellow mosaic virus (MaYMV) e MSMV nas amostras, sendo que a presença MRFV, SCMV, MaYMV e MSMV não haviam sido relatadas na região sul do país. As análises indicam uma incidência de 32% de MRFV e 27% de MaYMV nas amostras analisadas, sendo comum a ocorrência de infecções mistas com os vírus e os mollicutes. O MRFV é o vírus com maior prevalência em SC, sendo então selecionado para análise de variabilidade genética. Na tabela 1 são apresentados os descritores da variabilidade genética do MRFV, indicando maior variabilidade genética na população Global, Santa Catarina, Lages e Campos Novos, respectivamente. As análises também indicaram uma menor variação nucleotídica nas regiões 5' e 3' da região codificadora da capa proteica (CP), e maior variabilidade entre as posições 250-350 e 450-500 da CP do MRFV. Os dados obtidos mostram uma maior prevalência do MRFV nas regiões de estudo, fomentando informações atuais aos técnicos e pesquisadores da área, auxiliando com maior precisão a tomada de decisões para o manejo adequado.

**Tabela 1.** Descritores da variabilidade genética inferidos com base na região codificadora da capa proteica parcial para as populações de maize rayado fino virus (MRFV).

Amostra	Número de isolados	Tamanho da região	S <sup>a</sup>	K <sup>b</sup>	$\pi^c$	H <sup>d</sup>	Hd <sup>e</sup>	$\theta$ -W <sup>f</sup>
Global	36	564	140	18.852	0,03343±0,0000369	33	0,994	0,05986
Santa Catarina	27	582	52	7.405	0,01272±0,0000011	24	0,989	0,02318
Lages	12	584	34	7.121	0,01219±0,0000021	12	1,000	0,01928
Campos Novos	12	582	29	8.015	0,01377±0,0000020	11	0,985	0,01650

a= Número de sítios segregantes; b= Número médio de diferenças nucleotídicas entre as sequências; c= Diversidade de nucleotídeos; d= Número de haplótipo; e= Diversidade de haplótipos; f= Estimativa de Watterson da taxa de mutação da população com base no número total de locais de segregação.

**Palavras-chave:** *Zea mays* L.. Vírus. Mollicutes. Incidência. Prevalência.