

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E ANÁLISE MULTIPLEX PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE PATÓGENOS DO COMPLEXO DE ENFEZAMENTO DO MILHO EM TECIDOS DE PLANTAS E INSETOS

Vivian Borges de Souza², Fabio Nascimento da Silva³, Eduardo Silva Gorayeb⁴, Matheus Rodrigues Magalhães Albuquerque⁵, Jacson Ferreira⁴, Samara Campos do Nascimento⁵, Thiago da Silva da Silva⁶, Daian Marcos Savaris⁷, Leandro Prado Ribeiro⁷, Maria Cristina Canale⁷

¹Vinculado ao projeto: “Monitoramento espaço-temporal das populações de cigarrinha-do-milho e sua infectividade quanto a patógenos associados ao complexo de enfezamentos no território catarinense”.

²Acadêmico (a) do Curso de Agronomia – CAV – PIVIC

³Orientador, Departamento de Agronomia – CAV – fabio.silva@udesc.br

⁴Bolsista de Pós-Doutorado.

⁵Acadêmico(a) do Curso de Mestrado – CAV.

⁶Acadêmico do Curso de Agronomia – CAV.

⁷Pesquisador(a) CEPAF/EPAGRI.

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado do mundo, com uma produção de mais de 1 bilhão de toneladas em uma área de mais de 200 milhões de hectares. Entre as safras 2019/2020 e 2020/2021, Santa Catarina caiu do oitavo para o décimo lugar entre os maiores produtores de milho no Brasil, devido a um decréscimo de 14,72% na produção. Grande parte desse decréscimo foi impulsionado pela forte estiagem e pelo aumento da incidência da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*. Os principais danos associados com altas incidências desse inseto estão na transmissão dos agentes causais do complexo de enfezamentos do milho, o qual é atualmente considerado uma das principais doenças dessa cultura. Esse complexo inclui o enfezamento vermelho, enfezamento pálido e virose-da-risca, causados por *Candidatus Phytoplasma asteris* conhecido como “maize bushy stunt phytoplasma” (MBSP), corn stunt Spiroplasma (CSS), *Spiroplasma kunkelli* conhecido como “corn stunt Spiroplasma” (CSS) e maize rayado fino virus (MRFV, *Marafivirus*).

Para isso, um par de “primers” específicos para MRFV foi desenhado para uso em conjunto com os primers F2n/R2 e CSSF2/CSSR6 amplamente utilizados para detecção de MBSP e CSS, respectivamente. A extração total de ácidos nucleicos foi realizada utilizando o protocolo baseado em CTAB, o qual permite a extração de DNA e RNA de boa qualidade. O “primer” específico para MRFV foi desenhado usando o software Primer3 e as duas sequências completas de MRFV (dos EUA e Costa Rica) disponíveis no GenBank. Testes *in silico* foram realizados para determinar a especificidade do “primer” e a formação de estrutura secundária usando as ferramentas BLASTn e IDT oligo Analyzer, respectivamente. O novo par de “primers” específico para MRFV foi testado *in vitro* quanto à sua especificidade e sensibilidade e submetido a uma PCR com gradiente de temperatura para ajustar as melhores condições de detecção do vírus. O “primer” MRFV foi então combinado em uma PCR triplex com os “primers” específicos para mollicute usando amostras de diferentes estados brasileiros (Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Goiás) recuperadas de insetos e plantas infectadas. O par de “primers” MRFV desenhados foi específico da espécie, sensível e não formou estruturas secundárias nem dimerizou entre si ou com os outros “primers”

usados para detectar os mollicutes. O “*primer*” foi utilizado para amplificar um fragmento de 270 pares de bases (pb), compreendendo a extremidade 5' do gene da poliproteína de amostras infectadas com MRFV de diferentes localizações geográficas e tecidos (plantas e insetos) em uma reação multiplex. Três bandas positivas compreendendo os três patógenos (com tamanhos de ~270, 500 e 1250 pb, para MRFV, CSS e MBSP, respectivamente) foram visivelmente separadas no gel de agarose, produzindo assim uma interpretação clara dos resultados. Os resultados revelaram que o método proposto foi eficaz, mais barato, mais rápido e mais fácil de executar em relação aos demais métodos relatados na literatura. Portanto, recomenda-se esta ferramenta, que é útil para análises básicas, aplicadas e epidemiológicas e para programas de monitoramento realizados para avaliar a incidência viral no complexo de enfezamento do milho.

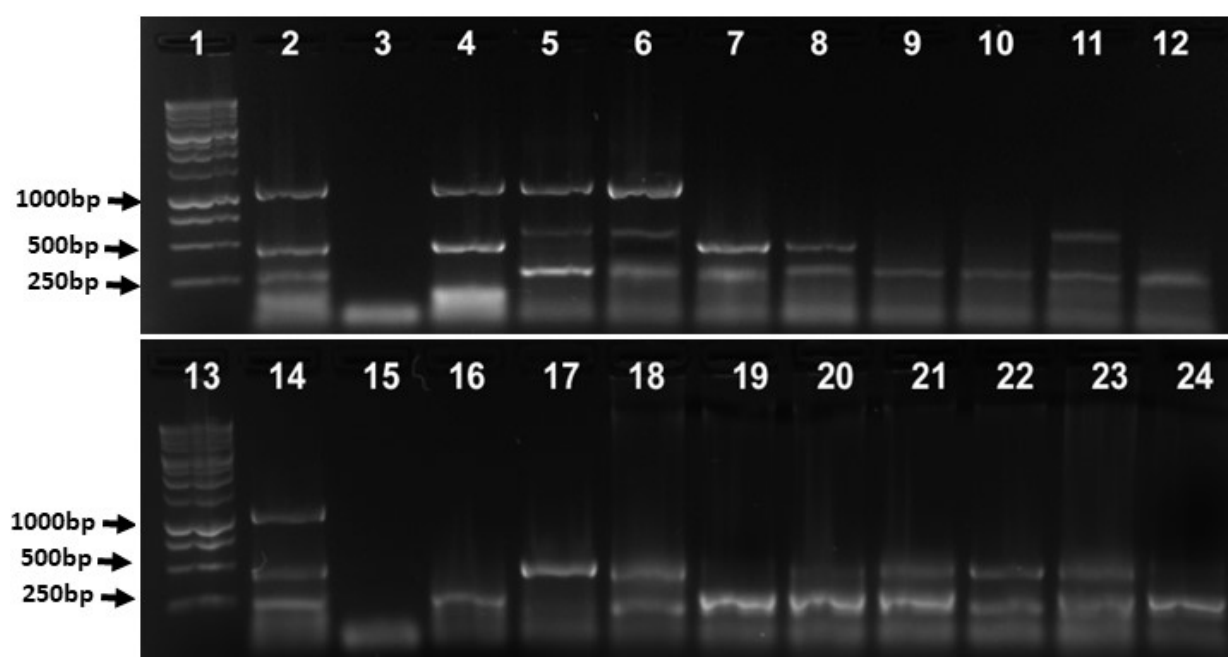


Figura 1. Resultados do teste de validação do “*primer*” (a localização geográfica de cada amostra está entre parênteses). Canaletas 1 e 13: Marcador de DNA 1kb (Promega). Canaletas 2 e 14: controle positivo (extraído de plantas de milho). Canaletas 3 e 15: controle negativo. Amostras nas canaletas 4, 5, 6 [Piracicaba, SP, Brasil (22°42'47,1"S, 47°37'37,6"W)], 7, 8 [Chapecó, SC, Brasil (27°04'24,3"S, 52°44'52,1"W)], 9, 10 [Morro da Fumaça, SC, Brasil (28°38'25,7"S, 49°14'50,6"W)], 11 [Videira, SC, Brasil (27°00'58,9"S, 51°05'00,3"W)] e 12 [São Miguel do Oeste, SC, Brasil (26°46'34,3"S, 53°30'33,8"W)], foram originados de insetos. Amostras nas canaletas 16 [Pinhão, PR, Brasil (25°44'28"S, 51°50'14"W)], 17 [Piracicaba, SP, Brasil (22°42'47,1"S, 47°37'37,6"W)], 18 [Francisco Beltrão, PR, Brasil (26°05'57,7"S, 52°57'35,7"W)], 19 [Caiapônia, GO, Brasil (16°55'25,9"S, 51°47'46,7"W)], 20, 21 [Rio Verde, GO, Brasil (17°50'41,5"S, 50°55'04,4"W)], 22 [Mineiros, GO, Brasil (17°33'24,5"S, 52°35'59,8"W)], 23 e 24 [Chapadão do Sul, MS, Brasil (18°49'08,8"S, 52°39'32,8"W)] foram originados de plantas de milho.

Palavras-chave: Patógenos. Primers. PCR triplo.