

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES VIRAIS NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL¹

Pedro Anibal Dambroz de Oliveira², Fabio Nascimento da Silva³, Matheus Rodrigues Magalhães Albuquerque⁴, Samara Campos do Nascimento⁴, Vanucci Marcos Santi⁴, Eduardo Silva Gorayeb⁵

¹Vinculado ao projeto “Identificação, caracterização e análise da variabilidade genética de espécies virais associadas a cultura do milho nas regiões Sudeste e Sul do Brasil”.

²Acadêmico do Curso de Agronomia – CAV – Bolsista PIBIC/CNPq.

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

⁴ Acadêmicos do Curso de Mestrado em Produção Vegetal – CAV.

⁵ Bolsista de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal – CAV.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas agrícolas cultivadas no mundo, isso se dá principalmente pela sua ampla adaptação edafoclimática, permitindo o cultivo em diversas partes do globo. Outro fator importante, é seu valor na alimentação humana e animal, uma vez que os grãos são de alto valor energético, possuindo fibras, vitaminas, minerais e proteínas na sua composição. No Brasil seu cultivo pode ser dividido em até três safras. A segunda safra (conhecida como safrinha) é responsável por mais de 50% do volume total de milho produzido em território nacional. Entretanto distúrbios fisiológicos e patógenos podem comprometer a produtividade afetando seu desenvolvimento e depreciando o valor final do produto. Inúmeros vírus podem estar associados ao milho, sendo as espécies relatadas no Brasil pertencentes aos gêneros *Marafivirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Polerovirus*, *Potyvirus* e *Mastrevirus*. Além disto, os molicutes (fitoplasma e espiroplasma), associados ao complexo enfezamento do milho, podem ser encontrados em infecção mista ou isoladamente em plantas de milho, visto que o vetor (*Dalbulus maidis*) também pode transmitir vírus pertencentes aos gêneros *Marafivirus* e *Mastrevirus*. O objetivo geral deste estudo foi a identificação, caracterização e análise da variabilidade genética de espécies virais associados a cultura do milho no Brasil, possibilitando melhor entendimento e gerando informações importantes aos pesquisadores, técnicos e produtores envolvidos neste setor.

Até o momento foram recebidas 350 amostras com sintomas de viroses e molicutes, sendo coletadas nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia e Distrito Federal, sendo enviadas ao Laboratório de Virologia Vegetal - CAV/UDESC. Deste total foram processadas e tabuladas 267 e 136 amostras, respectivamente. Para identificação dos patógenos, fragmentos da folha foram retirados da planta e macerados com nitrogênio líquido, seguido pela extração dos ácidos nucleicos totais (DNA e RNA) com o uso de TRIzol® (Invitrogen, EUA), seguida da aferição de qualidade no espectrofotômetro e síntese do DNA complementar (cDNA, utilizado para vírus com genoma de RNA). Posteriormente, todas as amostras foram submetidas a PCR (molicutes e mastrevírus) ou RT-PCR [maize rayado fino virus (MRFV, marafivírus), polerovírus, potyvírus e nucleorhabdovirus] utilizando a enzima GoTaq® DNA polymerase (Promega, EUA) e *primers* degenerados e específicos para amplificação de fragmentos dos patógenos seguido por eletroforese e visualizados sob luz ultravioleta. Amostras com resultado negativo para os patógenos avaliados foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando a plataforma Illumina Hiseq 2500. As sequências parciais da região codificadora da capa proteica viral do vírus foram analisadas para o vírus prevalente quanto aos descritores de variabilidade

genética, incluindo a diversidade de nucleotídeos (π); 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 (Θ -W).

Das 136 amostras, 27 amostras (19,85%) não apresentaram amplificação para nenhum dos patógenos testados, as análises de bioinformática dos dados do NGS estão em andamento e permitirão verificar a presença de um patógeno novo ou mesmo escapes das reações de PCR/RT-PCR. As demais 109 amostras (80,14%) havia ao menos um patógeno presente. As infecções simples foram detectadas em 32 amostras (23,52%), sendo: (i) 24 amostras com MRFV; (ii) 2 amostras com espiroplasma; (iii) 5 amostras com o polerovírus maize yellow mosaic virus (MaYMV); e (iv) 1 amostra com o mastrevírus maize striate mosaic virus (MSMV). Além disso, 77 amostras (56,61%) apresentaram infecções mistas, sendo observado 21 configurações distintas. Nucleorhabdovírus não foi detectado nas amostras avaliadas. Na figura 1 são sumarizadas as infecções detectadas em diferentes estados brasileiros. Quanto a variabilidade genética do vírus prevalente (MRFV), verificou-se que os isolados de Santa Catarina apresentam menor variabilidade genética quando comparados com demais populações estudadas. Os dados apresentados neste estudo são fundamentais para a recomendação correta de manejo e para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico mais específicas.

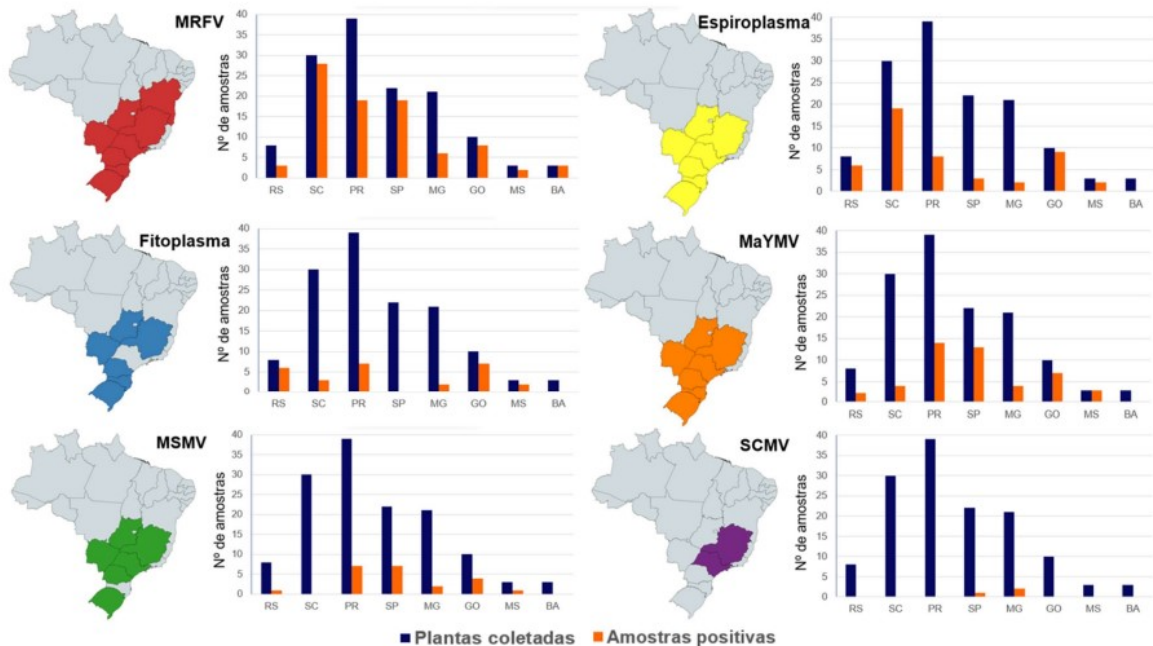


Figura 1. Levantamento de viroses no Brasil. Maize rayado fino virus (MRFV); Spiroplasma kunkelii (espiroplasma); Candidatus Phytoplasma asteris (Fitoplasma); maize yellow mosaic virus (MaYMV); maize striate mosaic virus (MSMV); e sugarcane mosaic virus (SCMV, potyvirus).

Palavras-chave: Milho. Vírus. Caracterização.