



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**Desenvolvimento de protocolos de detecção de vírus
patógenos de milho (*Zea mays*) por RT-PCR e RT-qPCR a
partir da análise de viroma por HTS**

PRISCILA RAYANE DE MENEZES SILVA MACHADO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BRASÍLIA – DF
NOVEMBRO/2024**

PRISCILA RAYANE DE MENEZES SILVA MACHADO

**Desenvolvimento de protocolos de detecção de vírus
patógenos de milho (*Zea mays*) por RT-PCR e RT-qPCR a
partir da análise de viroma por HTS**

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília como requisito parcial para a obtenção de
título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de
Pós-Graduação em Fitopatologia.

Orientador:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

BRASÍLIA – DF

2024

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Doutor Tatsuya Nagata**.

Desenvolvimento de protocolos de detecção de vírus patógenos de milho (*Zea mays*) por RT-PCR e RT-qPCR a partir da análise de viroma por HTS

PRISCILA RAYANE DE MENEZES SILVA MACHADO

DISSERTAÇÃO APROVADA em 26/11/2024 por:

Prof. Dr. Tatsuya Nagata

Departamento de Biologia Celular – Universidade de Brasília
(Orientador e Presidente da banca)

Dr. Maurício Rossato

Departamento de Fitopatologia – Universidade de Brasília
(Examinador interno)

Dr. Erich Yukio Tempel Nakasu

Embrapa Hortaliças
(Examinador externo)

Dr. Renato de Oliveira Resende

Professor Aposentado – Universidade de Brasília
(Suplente)

DEDICATÓRIA

A meu amado esposo Ricardo Machado e nossas obras-primas, Gustavo e Guilherme, pela paciência e compreensão durante os momentos ausentes,

Com amor, dedico.

"Un peu de science éloigne de Dieu, mais beaucoup y ramène."

(Um pouco de ciência nos afasta de Deus, mas muito nos aproxima.)

Louis Pasteur, pai da microbiologia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, criador e sustentador do universo, por ter renovado minhas forças a cada manhã. Sem Ele nada poderia fazer;

Aos meus pais, Francisco Atanázio (*in memoriam*) e Ivanira de Menezes, dos quais herdei a ousadia de sonhar e a coragem de buscar. Mãe, obrigada por se dedicar incondicionalmente;

A toda minha família, minha irmã, meu irmão, minhas sobrinhas e sobrinho, sogro e sogra, cunhados e cunhadas, e aos amigos e amigas pela torcida e pelas orações;

Ao meu orientador, Tatsuya Nagata, muito obrigada por me ensinar tantas, tantas coisas, pela paciência, compreensão, confiança e acolhimento. Serei eternamente grata!

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, aos professores que ensinam sempre com dedicação e excelência, em especial à Prof.^a Dr.^a Alice Nagata pela inspiração, ao Prof.^o Dr.^o Maurício Rossato pela atenciosa recepção, à Prof.^a Dr.^a Marisa Álvares pela recomendação e por ter guiado meus primeiros passos na ciência e ao Prof.^o Dr.^o José Ricardo Peixoto por acreditar em mim e me motivar a voltar à vida acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Biologia Celular e do PGG-Fitopatologia por compartilhar momentos de aprendizado, sofrimento e superação. Em especial à Alice Carvalho, que desde o primeiro dia sempre esteve disposta a me ajudar (você é uma anja!) e ao Márcio Júnior que, mesmo chegando no finalzinho, rapidamente se mostrou um bom amigo salvando meu almoço diversas vezes.

Aos meus amigos/chefes do ministério, Kadu e Léo, obrigada por me apoiarem e viabilizarem as condições para que eu me dedicasse a este trabalho.

Por fim, e não menos importante, à minha cachorrinha Seda Maria, que sempre escolhe ficar ao meu lado, literalmente, e até nas madrugadas frias me acompanhou nessa saga.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO GERAL	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. A CULTURA DO MILHO.....	15
2.2. PRINCIPAIS VIROSES DO MILHO	17
2.2.1. <i>Maize rayado fino virus</i>	18
2.2.2. <i>Maize striate mosaic virus</i>	20
2.2.3. <i>Sugarcane mosaic virus</i>	22
2.2.4. <i>Maize yellow mosaic virus</i>	26
2.2.5. <i>Maize umbra-like virus</i>	28
2.3. TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE VÍRUS VEGETAIS	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. OBJETIVO GERAL	35
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1. SEQUENCIAMENTO DE ALTO DESEMPENHO (HTS).....	35
5.2. DESENHO DE <i>PRIMERS</i> PARA DETECÇÃO	37
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS HOSPEDEIROS POR RT-PCR	39
5.4. PRODUÇÃO DE CONTROLES POSITIVOS E SEQUENCIAMENTO	40
5.5. ELABORAÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO E DAS CURVAS DE DISSOCIAÇÃO	42
5.6. TESTE COM AMOSTRAS DE CAMPO	43
6. RESULTADOS	44
6.1. ANÁLISES DOS DADOS GERADOS POR HTS	44
6.2. DETECÇÃO DE MAIZE UMBRA-LIKE VIRUS NO BRASIL	45
6.3. VÍRUS DETECTADOS NAS AMOSTRAS INDIVIDUAIS POR RT-PCR	47
6.4. DOS CONTROLES POSITIVOS PRODUZIDOS	50
6.5. ANÁLISE DAS CURVAS-PADRÃO E DAS CURVAS DE DISSOCIAÇÃO.....	50
6.6. VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE RT-QPCR COM AMOSTRAS DE CAMPO	55
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÃO	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

APÊNDICE A - LEVANTAMENTO DE ACESSOS DE GENOMA COMPLETO E PARCIAL REGISTRADOS NO NCBI COMO VÍRUS PATÓGENOS DE MILHO.....	71
APÊNDICE B. LISTA DOS ISOLADOS DEPOSITADOS NO BANCO DE DADOS DO NCBI UTILIZADOS NO ALINHAMENTO MÚLTIPLO COM AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS NO HTS PARA ESCOLHA DAS REGIÕES MAIS CONSERVADAS.....	74
APÊNDICE C. GRÁFICOS DE AMPLIFICAÇÃO MOSTRANDO TRIPLICATAS DE CINCO DILUIÇÕES SERIADAS 1:10 DE CADA VÍRUS.	76
APÊNDICE D. GÉIS DE AGAROSE DAS REAÇÕES DE RT-PCR PARA CONFIRMAÇÃO DA PLANTA HOSPEDEIRA.	78

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema da organização genômica de maize rayado fino virus (MRFV). Mtr = metiltransferase, Pro = protease, Hel = helicase, Pol = polimerase de RNA dependente de RNA, CP = capa proteica, p43 = proteína rica em prolina. Fonte: ICTV (2011c).....	18
FIGURA 2. Folhas de milho com sintomas de listras ou riscas e mosaico. Autor: Tatsuya Nagata.....	20
FIGURA 3. Organização genômica dos mastrevírus. ORF V1 = codifica proteína do capsídeo; ORF V2 = codifica proteína de movimento; ORF C1 = Rep; ORF C1:C2 = RepA por <i>splicing</i> de transcrição. Rep e RepA = proteínas envolvidas na replicação; LIR = região intergênica longa; SIR = região intergênica curta. Fonte: https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae/mastrevirus	21
FIGURA 4. Sintoma de espessamento das nervuras (esquerda) e amarelecimento interneval (direita). Fonte: Ruiz Posse et al. (2023).....	22
FIGURA 5. Esquema da organização genômica do SCMV. P1 = P1 protease, HC-Pro = <i>Helper component-Protease</i> , P3 = P3 <i>protein</i> (envolvida na replicação e movimento), 6K1 = 6 kDa <i>protein 1</i> (peptídeo 1 de 6 kDa, de função desconhecida), CI = <i>Cylindrical inclusion</i> (proteína de inclusão cilíndrica), 6K2 = 6 kDa <i>protein 2</i> (peptídeo 2 de 6 kDa, que provavelmente participa na ancoragem do complexo de replicação ao RE), VPg = <i>Viral protein genome-linked</i> (proteína viral ligada ao genoma), NIa-Pro = <i>Nuclear inclusion a - Protease</i> (protease e inclusão nuclear a), NIb = <i>Nuclear inclusion b</i> (inclusão nuclear b) e CP = <i>coat protein</i> (capa proteica). Fonte: Lu et al. (2021).....	23
FIGURA 6. Sintoma de mosaico causado por SCMV (esq.) e sintomas de mosaico, amarelecimento e necrose em planta com infecção mista (SCMV e MaYMV) (dir.). Fonte: Gonçalves, 2021.....	25
FIGURA 7. Representação esquemática da organização genômica de MaYMV.	27
FIGURA 8. Sintomas foliares de plantas de milho inoculadas com infecção simples e mista. (a) sugarcane mosaic virus (SCMV); (b) maize yellow mosaic virus (MaYMV); (c) SCMV e MaYMV; (d) planta controle não inoculada. Fonte: Gonçalves et al., 2020.	28
FIGURA 9. Organização genômica dos umbravírus. ORF1 = proteína de 31k cuja função é desconhecida; ORF2 = RdRp a partir do mecanismo de ribossomal frameshift das ORF1/ORF2; ORF3 = proteína envolvida na proteção do RNA viral (supressor NMD) e no movimento a longa distância (floema); ORF4 = proteína de movimento célula-a-célula. Fonte: https://viralzone.expasy.org/645	29
FIGURA 10. Representação esquemática da organização genômica da MULV. ORF1= codifica uma proteína de 195 aa (22kDa) de função desconhecida; ORF2 codifica RdRp, por	

meio do mecanismo <i>frameshift</i> ; ORF3 = codifica proteína putativa de 178 aa (20,4 kDa) e ORF4 = codifica proteína putativa 212 aa (23,6 kDa).	30
FIGURA 11. Mapa dos locais de coleta das amostras de folhas de milho.....	36
FIGURA 12. Organização genômica de maize umbra-like virus montado por HTS da amostra (<i>pool</i> HM_2022).	46
FIGURA 13. Amostras individuais de milho oriundo do DF (numeradas de 1 a 6) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.....	48
FIGURA 14. Amostras individuais de milho oriundo de Juazeiro/BA (numeradas de 1 a 12) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.	48
FIGURA 15. Amostras individuais de milho oriundo de MG (numeradas 1 a 10) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.....	49
FIGURA 16. Curvas-padrão de cinco diluições seriadas (1:10) geradas a partir do log 10 do número de cópias do DNA plasmidial recombinante contendo a sequência alvo específica de cada vírus versus ciclo de quantificação (Cq). A - SCMV = sugarcane mosaic virus; B - MRFV = maize rayado fino virus; C - MaYMV = maize yellow mosaic virus; D - MSMV = maize striate mosaic virus; e E - MULV = maize umbra-like virus.	53
FIGURA 17. Curvas de dissociação (melting curve) com T _m específica para o amplicon de cada vírus. A - SCMV = sugarcane mosaic virus; B - MRFV = maize rayado fino virus; C - MaYMV = maize yellow mosaic virus; D - MSMV = maize striate mosaic virus; e E - MULV = maize umbra-like virus.	54
FIGURA 18. Exemplo de análise da curva de dissociação para diferenciar amplificação verdadeiras de falsos positivos. A) Amostras de planta sadia e do estado de PE com pico de T _m menor que T _m média do <i>amplicon</i> e amostra de MG com baixa amplificação, mas como T _m igual à T _m do <i>amplicon</i> ; B) Gel de agarose (1,5%) das reações de RT-qPCR. Marcadores GeneRuler 1 kb DNA ladder e GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific™).	57
FIGURA 19. Validação do resultado de RT-qPCR por RT-PCR para cada espécie viral. Marcador GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific™).	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Maiores estados produtores de milho no Brasil.	15
TABELA 2. Lista de vírus infectando milho com relato no Brasil.	17
TABELA 3. Lista de <i>primers</i> desenhados e usados neste estudo.	38
TABELA 4. Lista de vírus detectados em plantas de milho de cada <i>pool</i> confirmados por RT-PCR.	45
TABELA 5 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre o isolado brasileiro e os isolados do México e Equador.	46
TABELA 6. Tamanhos de cada ORF de MULV e percentual de identidade de aminoácido e nucleotídeos entre o isolado de MULV identificado neste estudo e os isolados do México e Equador.	47
TABELA 7. Resultado da RT-PCR das amostras individuais utilizadas no HTS.	47
TABELA 8. Lista dos acessos das sequências parciais de cada vírus depositadas no NCBI.	50
TABELA 9. Avaliação da curva-padrão de RT-qPCR e limite mínimo de detecção de cada espécie viral (nº de cópias) para menor diluição testada (0,1 pg).	51
TABELA 10. Resultado da análise de possibilidade de formação de dímeros realizada no OligoAnalyzer Tool IDT.	51
TABELA 11. Resultado dos ensaios de RT-qPCR com <i>primers</i> específicos para cada alvo e validação adicional por RT-PCR.	56

RESUMO GERAL

MACHADO, Priscila R. M. S. **Desenvolvimento de protocolos de detecção de vírus patógenos de milho (*Zea mays*) por RT-PCR e RT-qPCR a partir da análise de viroma por HTS.** 2024. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de grãos mais importantes no mundo, com demanda crescente para alimentação humana, ração animal, matéria-prima para indústria e produção de etanol. O Brasil ocupa a terceira posição entre os maiores produtores de milho do mundo, respondendo por 10% da produção global, contudo, sua produtividade (5.495 kg/ha) é significativamente menor quando comparada à produtividade dos EUA (12.344 Kg/ha). A baixa eficiência de manejo de pragas e doenças, que causam cerca de 23% de perdas de produtividade mundial, pode ser um dos fatores responsáveis por essa baixa produtividade. No Brasil, até o momento, há o relato de dez vírus infectando milho, no entanto, apenas cinco têm suas sequências genômicas confirmadas. São eles: maize rayado fino virus - MRFFV, gênero *Marafivirus*, sugarcane mosaic virus – SCMV, gênero *Potyvirus*, barley yellow dwarf virus PAV – BYDV-PAV, gênero *Luteovirus*, maize yellow mosaic virus – MaYMV, gênero *Polerovirus* e maize striate mosaic virus – MSMV, gênero *Mastrevirus*. Apesar da importância econômica do milho, no Brasil, há uma lacuna nos estudos sobre os vírus que afetam essa cultura (levantamentos de ocorrência e incidência), principalmente devido à falta de métodos padronizados para detecção e identificação dos vírus. Nesse contexto, o presente estudo propõe desenvolver protocolos de detecção para os vírus de milho por RT-PCR e RT-qPCR baseado em SYBR Green, utilizando a base de dados das sequências virais obtidas por *high-throughput sequencing* (HTS) a fim de garantir a compatibilidade de *primers* com os isolados circulantes. Inicialmente, amostras foliares de milho de três regiões do Brasil foram analisadas por HTS a fim de determinar a diversidade viral presente na cultura, inclusive com a detecção de potenciais novos vírus ou variantes. A partir desses dados, *primers* para RT-PCR e RT-qPCR foram desenhados com base nas regiões mais conservadas e controles positivos foram produzidos em vetores plasmidiais. O resultado do HTS apontou a presença de cinco vírus, dos quais quatro são conhecidos

no Brasil (MRFV, SCMV, MaYMV e MSMV) e um trata-se do primeiro relato, um vírus de milho *umbra-like*. Todos foram confirmados por RT-PCR em amostras individuais de milho. Os *primers* de RT-qPCR foram testados *in silico* quanto à especificidade, temperatura de desnaturação e probabilidade de “self-dimer” e “hetero-dimer”. Após confirmação das sequências dos controles positivos pelo método Sanger, curvas-padrão de RT-qPCR para cada alvo viral foram produzidas, o número de cópias calculado e o ensaio de RT-qPCR baseado em SYBR Green foi validado com amostras de campo. A análise da curva de dissociação permitiu discriminar os resultados positivos de eventuais ampliações não específicas. A especificidade dos *primers* também foi confirmada pela visualização de bandas nos tamanhos esperados em gel de agarose. A avaliação das amostras juntamente com o uso de controles negativos e controle interno (gene de referência) permitiu a detecção precisa dos alvos. Assim, os protocolos desenvolvidos podem ser usados para detecção dos patógenos (aplicação qualitativa), em estudos de levantamento e incidência dessas viroses, podendo posteriormente ser testados para fins de quantificação de carga viral.

Palavras-chave: milho; SCMV; MaYMV; MSMV; MRFV; umbra-like; RT-qPCR; SYBR Green.

ABSTRACT

MACHADO, Priscila R. M. S. **Development of protocols for the detection of maize viruses (*Zea mays*) by RT-PCR and RT-qPCR from virome analysis by HTS.** 2024. 79 p. Dissertation (Master in Phytopathology) – University of Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Maize (*Zea mays* L.) is one of the most important grain crops in the world, with increasing demand for food, animal feed, raw material for industry, and ethanol production. Brazil ranks third among the largest maize producers, accounting for 10% of global production; however, its productivity (5,495 kg/ha) is significantly lower when compared to the US productivity (12,344 kg/ha). The low efficiency of pest and disease management, which cause approximately 23% of global productivity losses, may be one of the factors responsible for this low productivity. In Brazil, to date, ten species of viruses have been reported infecting maize. However, only five of these species have their genome sequences confirmed. These are: maize rayado fino virus - MRFV, genus *Marafivirus*, sugarcane mosaic virus - SCMV, genus *Potyvirus*, barley yellow dwarf virus PAV - BYDV-PAV, genus *Luteovirus*, maize yellow mosaic virus - MaYMV, genus *Polerovirus* and maize striate mosaic virus - MSMV, genus *Mastrevirus*. Despite the economic importance of maize, in Brazil, there is a gap in studies on the viruses that affect this crop (occurrence and incidence surveys), mainly due to the lack of standardized methods for virus detection and identification. In this context, the present study proposes to develop detection protocols for maize viruses by RT-PCR and RT-qPCR based on SYBR Green, using the database of viral sequences obtained by high-throughput sequencing (HTS) to ensure the compatibility of *primers* with circulating isolates. Maize samples from three regions of Brazil were analyzed by HTS to determine the viral diversity present in the crop, including potential new viruses or variants. From these data, *primers* for RT-PCR and RT-qPCR were designed based on the most conserved regions and positive controls were produced in plasmid vectors. The HTS result indicated the presence of five viruses, of which four are known in Brazil (MRFV, SCMV, MaYMV and MSMV) and one is the first report, an maize umbra-like virus. All were confirmed by RT-PCR in individual maize samples. The RT-qPCR *primers* were tested *in silico* for specificity, denaturation temperature, and probability

of self-dimer and hetero-dimer. After confirmation of the positive control sequences by the Sanger method, RT-qPCR standard curves for each viral target were prepared, the copy number was calculated, and the SYBR Green-based RT-qPCR assay was validated with field samples. The analysis of the dissociation curve allowed the discrimination of positive results from possible nonspecific amplifications. The specificity of the *primers* was also confirmed by visualization of bands in the expected sizes on an agarose gel. The evaluation of the samples together with the use of negative controls and internal control (reference gene) allowed the accurate detection of the targets. Thus, the protocols developed can be used to detection pathogens (qualitative application), in studies on the survey and incidence of these viruses, and can subsequently be tested for the purpose of quantifying viral load.

Keywords: maize; SCMV; MaYMV; MSMV; MRFV; umbra-like; RT-qPCR; SYBR Green

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas de grãos mais importantes no mundo e o seu cultivo ocupa cerca de 200 milhões de hectares, o que representa 13% da área global cultivada (Berger, 2024). Segundo relatório do USDA (2023/2024), o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, responsável por 10% da produção global. Contudo, sua produtividade média é disparadamente menor (5.495 kg/ha) quando comparada à produtividade dos EUA (12.344 Kg/ha) (USDA, 2024ab; Conab, 2024). Para Cruz et al. (2008), essa baixa produtividade não reflete o bom nível tecnológico já alcançado por boa parte dos produtores que exploram de lavouras comerciais.

Além disso, o aquecimento global tem alterado o agroecossistema, ocasionando o surgimento de pandemias de doenças virais, que podem se disseminar para diferentes regiões do mundo, devido facilidades do comércio internacional, como a doença necrose letal do milho, que devastou quase 1,2 milhão de Km² das lavouras da África Oriental e Central (Jones, 2021).

Segundo Ávila et al. (2022), desde 2015, elevadas populações de cigarrinha *Dalbulus maidis*, importante vetor de vírus e mollicutes, têm sido observadas em diferentes regiões produtoras no Brasil. Berger (2024) registra que as perdas de produtividade mundial devido a pragas e doenças do milho são estimadas em 23%, com os patógenos respondendo por 14% da perda total, sendo que os fungos, espiroplamas, fitoplasmas e vírus são os principais agentes causais.

Nesse contexto, a identificação precisa dos vírus presentes nas lavouras de milho é a base para um manejo eficiente que evite perdas de safra devido a doenças virais subdiagnosticadas (Jeong, 2014). No Brasil, até o momento, há o relato de dez vírus infectando milho (Mar et al., 2013, Fontenele et al., 2018; Kitajima, 2020), mas apenas cinco com confirmação molecular e ainda não há um método geral para diagnosticar esses vírus com o objetivo de levantamento.

Nesse cenário, este estudo visa identificar, por meio de sequenciamento de alto desempenho (HTS), os vírus circulantes (novos ou já conhecidos) que estão afetando o milho e, a partir da variabilidade genética verificada, desenvolver protocolos de rotina para detecção molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do milho

O milho é uma planta da família *Poaceae* (também conhecida como *Gramineae*), domesticada há mais de 7.000 anos pelos nativos americanos a partir do teosinto, uma subespécie mexicana (*Zea mays* ssp. Mexicana) (Schrader) Iltis (Berger, 2024). As principais evidências para a origem mexicana incluem pólen fóssil da região e espigas de milho datadas de 5.000 anos em cavernas locais. Estudos genéticos recentes têm revelado a base molecular da domesticação do milho a partir do teosinto. Nesses estudos, as mudanças identificadas incluem a perda de ramificação, a produção das espigas nos caules, grãos macios e numerosos e a presença de uma casca ao redor da espiga que protege contra danos causados por pássaros (Berger, 2024).

Composto por 72% de amido, 10% de proteína e 4% de gordura, o grão de milho é considerado um alimento básico essencial, principalmente no México, América Central e África Subsaariana; já nos Estados Unidos, o milho amarelo é amplamente utilizado como ração animal e na produção industrial de biocombustíveis (etanol), adoçantes, bebidas, óleos e cola (Berger, 2024).

No Brasil, o milho é plantado em todo território nacional, sendo os estados de Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, e Minas Gerais, respectivamente, os maiores produtores em 2022/2023 (Tabela 1), destacando-se o estado de Santa Catarina pela maior produtividade (8.164 kg/ha) (Conab, 2024b).

TABELA 1. Maiores estados produtores de milho no Brasil.

Estado	Área (em mil ha)	Produção (em mil ton)	Produtividade (kg/ha)
MT	7.428,1	51.240,6	6.898
PR	2.855,8	18.509,2	6.720
MS	2.262,6	13.112,2	5.795
GO	1.903,7	12.641,1	6.640
MG	1.289,1	7.942,1	6.161
SC	312,0	2.547,2	8.164

Fonte: Conab, 2024b.

A produção de milho, no Brasil, é caracterizada pela divisão em duas ou até três épocas de plantio (Conab, 2024a). Os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, entre o fim de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. Já a safrinha se refere ao milho sequeiro ou safra de inverno, plantado extemporaneamente, entre janeiro e abril, quase sempre depois da soja precoce (Cruz et al., 2008). Mais recentemente, tem surgido uma terceira safra, entre abril e junho, em algumas regiões específicas do país (Da Costa et al., 2023).

O cultivo do milho, em pequenas e grandes áreas e em diferentes safras, favorece a incidência de pragas que podem causar perdas expressivas se não forem controladas adequadamente. Segundo Ávila et al. (2022), desde 2015, elevadas populações de cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong e Wolcott 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) (Wolcott 1923) têm sido observadas em diferentes regiões produtoras no Brasil, particularmente nos cultivos de segunda época ou safrinha, impactando de forma significativa o rendimento e a qualidade dos grãos, não apenas pelo dano direto (sucção contínua da seiva), mas principalmente pela capacidade de transmitir patógenos.

Os fungos, espiroplasmas/fitoplasmas e os vírus, são os principais patógenos que afetam o milho, podendo a interação entre eles resultar em aumento de suscetibilidade da planta. Por exemplo, Hull (2014) registra que a esporulação de *Helminthosporium maydis* em folhas de milho começou mais cedo e foi mais abundante em lesões formadas em folhas infectadas com maize dwarf mosaic virus (MDMV) e a infecção por MDMV e sugarcane mosaic virus (SCMV) aumentou substancialmente a gravidade de cinco doenças fúngicas no milho, mas teve pouco efeito em três outras doenças. Da Costa et al. (2023) relatou que o complexo de doenças do enfezamento do milho (*corn stunt disease complex*) causado por maize bushy stunt phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris'), *Spiroplasma kunkelii* e vírus aumentou a podridão do carvão em condições de campo.

2.2. Principais viroses do milho

No mundo, cerca de 71 vírus diferentes estão registrados no GenBank do NCBI com o milho como hospedeira natural (Apêndice A). Já no Brasil, a literatura registra 10 espécies (Mar et al. 2013; Fontenele et al., 2018; Kitajima, 2020), sendo que apenas cinco possuem confirmação de sua sequência genômica, seja de forma parcial ou total (Tabela 2). São elas: maize rayado fino virus – MRFV (Hammond & Bedendo, 2005), sugarcane mosaic virus – SCMV (Gonçalves et al., 2011), barley yellow dwarf virus PAV (Mar et al., 2013), maize yellow mosaic virus – MaYMV (Gonçalves et al., 2017; 2020) e maize striate mosaic virus – MSMV (Fontenele et al., 2018).

TABELA 2. Lista de vírus infectando milho com relato no Brasil.

Nome	Família	Gênero	Confirmação molecular no Brasil
Cucumber mosaic virus – CMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	não tem
Maize striate mosaic virus – MSMV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i>	Genoma completo
Maize yellow mosaic virus - MaYMV	<i>Luteoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>	Genoma completo
Johnsongrass mosaic virus – JGMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	não tem
Maize dwarf mosaic virus – MDMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	não tem
Sugarcane mosaic virus – SCMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	Genoma parcial
Mal de Rio Cuarto virus – MRCV	<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>	não tem
Maize chlorotic vein banding virus - MCVBV	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	não tem
Maize rayado fino virus - MRFV	<i>Tymoviridae</i>	<i>Marafivirus</i>	Genoma parcial
Barley yellow dwarf virus – BYDV-RAV	<i>Tombusviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	Genoma parcial

*CMV, MDMV, MRCV, MCVBV e BYDV-RAV, apesar de já relatados no Brasil, não foram encontrados no HTS realizado, e JGMV não foi identificado nas amostras de milho analisadas.

O presente trabalho, ao realizar a análise do viroma do milho por sequenciamento de alta performance (HTS), detectou a presença de cinco vírus diferentes, dos quais quatro estão na lista acima mencionada e um ainda não relatado no Brasil. A seguir será apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre os vírus detectados.

2.2.1. Maize rayado fino virus

Maize rayado fino virus (MRFV) é classificado na espécie *Marafivirus maydis*, do gênero *Marafivirus*, da família *Tymoviridae*. Ele está amplamente distribuído no continente americano, desde a Argentina e Uruguai até o Texas (EUA), sendo considerado um dos vírus de milho mais importantes da América do Sul (Canale et al., 2023).

Os vírions de MRFV são isométricos, não envelopados, com aproximadamente 30 nm de diâmetro. Seu genoma de RNA fita simples senso positivo possui 6.305 nucleotídeos de comprimento, com duas ORFs, a maior (97-6180 nt) codifica uma poliproteína de 224 kDa e a menor sobreposta (302-1561 nt) codifica uma proteína de 43 kDa de função desconhecida (similar a proteínas de movimento de tymovírus). A extremidade 5' possui *Cap* e a extremidade 3' apresenta cauda poliA (Figura 1) (Hammond & Ramirez, 2001).



FIGURA 1. Esquema da organização genômica de maize rayado fino virus (MRFV). Mtr = metiltransferase, Pro = protease, Hel = helicase, Pol = polimerase de RNA dependente de RNA, CP = capa proteica, p43 = proteína rica em prolina. Fonte: ICTV (2011c).

O MRFV foi reconhecido pela primeira vez em 1961, na Costa Rica e em El Salvador (Bradfute, 1980; Ramirez et al., 1997). No Brasil, apesar de MRFV ter sido relatado pela primeira vez em 1970 (Costa et. al., 1971), somente em 2005 ocorreu sua confirmação molecular por RT-PCR e hibridização de ácido nucleico (Hammond & Bedendo, 2005).

MRFV integra o complexo de doenças conhecido como enfezamento do milho, juntamente com “maize bushy stunt phytoplasma” ou

"*Candidatus Phytoplasma asteris*" (Subgrupo 16Srl-B) e o *Spiroplasma kunkelii*, sendo que, recentemente, MSMV também foi relatado como parte desse patossistema. Todos esses patógenos são transmitidos pela cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* em uma relação propagativa-persistente com esse inseto vetor, com exceção do MSMV, que provavelmente exibe uma relação circulativa-persistente com a cigarrinha do milho (Canale et al., 2023).

D. maidis é o principal vetor de MRFV e o único vetor natural no Brasil, embora outras cigarrinhas transmitam experimentalmente o vírus (Hammond et al., 1997). Segundo o ICTV (2011c), ocorrem associações específicas vírus-vetor para espécies de marafivírus, ou seja, MRFV é transmitido por insetos do gênero *Dalbulus* spp., oat blue dwarf virus (OBDV) por *Macrostelus* sp. e bermuda grass etched-line virus (BELV) por *Aconurella* sp.. Esses vírus são transmitidos de forma persistente-propagativa. Os marafivírus estão estritamente confinados ao floema dos hospedeiros infectados e não são facilmente transmissíveis pela inoculação de seiva, embora MRFV tenha sido transmitido experimentalmente por punção vascular (Ibidem).

Tanto o MRFV como o seu vetor têm uma estreita e sobreposta gama de hospedeiros, tornando a suscetibilidade do hospedeiro um importante critério de identificação dos marafivírus (ICTV, 2011b). Milho, teosinto e espécies perenes de *Zea* spp. são os únicos hospedeiros naturais conhecidos, sendo proposto que o MRFV, seu inseto vetor e seu hospedeiro milho co-evoluíram em uma tríade na qual os membros parasitas (inseto e vírus) exibiram interações altamente especializadas (Signoret, 2010). De 48 espécies e subespécies de gramíneas em 25 gêneros testados, apenas *Zea mays* e subespécies de teosinto (*Z. luxurians*, *Z. diploperennis*, *Tripsacum australe*, *Rottboellia exaltata* e híbridos de *Z. mays* x *T. dactyloides*) foram suscetíveis a MRFV (Nault et al., 1980).

Segundo Canale et al. (2023), a doença do complexo de enfezamento do milho tem sido um grande problema para a produção de milho no Brasil, com surtos persistentes ocorrendo no país desde 2015. E, embora MRFV faça parte desse importante complexo de doenças, ele é menos estudado cientificamente em comparação com os mollicutes associados a doença, possivelmente devido aos sintomas que induz serem geralmente mais sutis e as perdas de produção não tão evidentes.

Os sintomas de planta de milho infectada por MRFV podem ser percebidos como longas listras cloróticas pontilhadas ao longo das nervuras das folhas de milho (Figura 2), que podem ser observadas visualmente geralmente entre 7 e 14 dias após a inoculação (Kogel et al. 1996; Zambrano et al. 2013). À medida que a planta envelhece, os sintomas se tornam menos visíveis e podem desaparecer quando a planta atinge a maturidade (Signoret, 2010). Os sintomas da risca são claramente visíveis nas folhas de plântulas e de plantas adultas de milho, tornando-se bem claras quando a folha é observada contra a luz do sol (Sabato, 2018).



FIGURA 2. Folhas de milho com sintomas de listras ou riscas e mosaico. Autor: Tatsuya Nagata.

2.2.2. Maize striate mosaic virus

Maize striate mosaic virus (MSMV), classificado na espécie *Mastrevirus striatis*, é um geminivírus pertencente ao gênero *Mastrevirus*, cujos membros são transmitidos por cigarrinhas de forma circulativa-persistente (ordem *Hemiptera*, família *Cicadellidae*) (ICTV, 2024). A família *Geminiviridae* é composta por vírus de DNA circular de fita simples, não envelopados, com vírions tipicamente geminados (icosaedros incompletos), distribuídos em 14 gêneros que alcançam diferentes faixas de hospedeiros, insetos vetores e organizações genômicas (Ibidem).

O gênero *Mastrevirus* é composto por vírus monopartidos que infectam tanto mono quanto dicotiledôneas (ICTV, 2024). Seus genomas

codificam pelo menos 4 ORFs, duas presentes na fita de sentido viral codificam a proteína de movimento (MP) e a proteína do capsídeo (CP), e as outras duas, na fita de sentido complementar, codificam a proteína associada à replicação (Rep) e a RepA (Figura 3). MSMV possui um genoma de 2.746 nucleotídeos. (Fontenele et al., 2018).

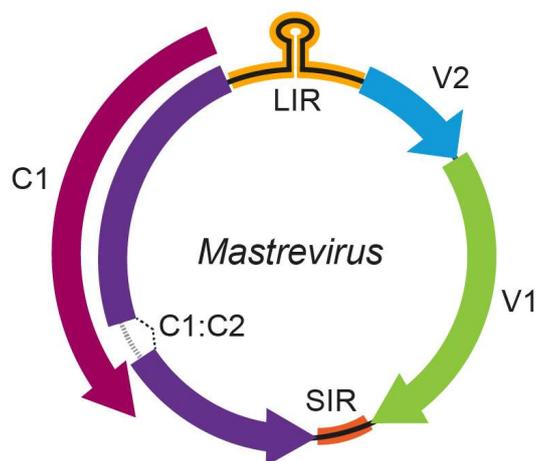


FIGURA 3. Organização genômica dos mastrevírus. ORF V1 = codifica proteína do capsídeo; ORF V2 = codifica proteína de movimento; ORF C1 = Rep; ORF C1:C2 = RepA por *splicing* de transcrição. Rep e RepA = proteínas envolvidas na replicação; LIR = região intergênica longa; SIR = região intergênica curta. Fonte: <https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae/mastrevirus>.

MSMV é o primeiro mastrevírus identificado em monocotiledônea no Brasil e na América do Sul, sendo detectado em plantas de milho no Estado de Goiás, usando abordagem VEM (*vector-enabled metagenomics*) (Fontenele et al., 2018). Contudo, nas Américas, o primeiro mastrevírus reportado foi em *Panicum virgatum* L. (“switchgrass”) nos EUA (Agindotan et al. 2015) e, em batata-doce, primeiramente no Peru e Uruguai (Cao et al. 2017) e posteriormente no Brasil (Souza et al., 2018).

Em 2021, MSMV também foi identificado em plantas de cana-de-açúcar apresentando estrias foliares cloróticas, coletadas em Brasília, entre 2016 e 2018 (Batista et al., 2021). Segundo Vilanova et al. (2022), essa descoberta sugere que o MSMV pode ter outras cigarrinhas realizando sua disseminação para outras culturas diferentes do milho, considerando que *D. maidis* é conhecido por ser especializado nessa planta. Outra hipótese é que o

próprio *D. maidis* possa transmitir o MSMV a outros hospedeiros durante a entressafra do milho, uma vez que relatórios recentes indicam que *D. maidis* utiliza a cana-de-açúcar como hospedeiro de abrigo.

Mais recentemente, Ruiz Posse et al. (2023) relatou a presença de MSMV em plantas de milho doce em Santa Fé, Argentina, por meio de sequenciamento nanopore (MinION Mk1B – Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido). Essas plantas foram coletadas em 2021 apresentando sintomas severos (Figura 4), como nanismo acentuado, deformação, amarelecimento interneval ou nas nervuras, anéis cloróticos e clorose ao longo das bordas das folhas, além de espessamento das nervuras.



FIGURA 4. Sintoma de espessamento das nervuras (esquerda) e amarelecimento interneval (direita). Fonte: Ruiz Posse et al. (2023).

2.2.3. Sugarcane mosaic virus

Sugarcane mosaic virus (SCMV), classificado na espécie *Potyvirus sacchari*, pertence ao gênero *Potyvirus*, da família *Potyviridae*, uma das famílias de vírus de plantas mais importantes economicamente. Sua morfologia é caracterizada por vírions filamentosos flexíveis, com 700 a 900 nm de comprimento e 11 nm de diâmetro, com simetria helicoidal. Todos os membros da família *Potyviridae* formam corpos de inclusão citoplasmática durante a infecção, tornando-se uma característica distintiva (Wu et al., 2012; ICTV, 2018).

SCMV é um vírus de RNA linear de fita simples senso positivo e, assim como outros potyvírus, possui uma região não traduzida (UTR) em cada extremidade. A extremidade 5' apresenta uma proteína VPg e a extremidade 3' uma cauda poli(A). Seu genoma de aproximadamente 10 kb de tamanho codifica uma grande poliproteína, que após processamento proteolítico, é clivada em dez produtos: P1 (protease 1); HC-Pro (helper componente-protease); P3 (envolvida na replicação e movimento); 6K1 (peptídeo 1 de 6 kDa, de função desconhecida); CI (proteína de inclusão cilíndrica); 6K2 (peptídeo 2 de 6 kDa, que provavelmente participa na ancoragem do complexo de replicação ao RE); VPg (proteína viral ligada ao genoma); Nla-Pro (protease e inclusão nuclear a); Nlb (inclusão nuclear b e polimerase viral); e CP (capa proteica). Adicionalmente, uma segunda ORF pequena, por mecanismo de deslizamento de polimerase, codifica a proteína PIPO que desempenha, juntamente com a proteína P3 (P3-PIPO), a função de facilitar o movimento célula-a-célula do vírus dentro da planta (Figura 5) (Wu et al., 2012; Lu et al., 2021).

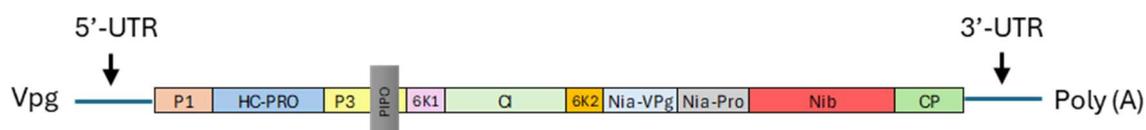


FIGURA 5. Esquema da organização genômica do SCMV. P1 = P1 protease, HC-Pro = *Helper component-Protease*, P3 = P3 *protein* (envolvida na replicação e movimento), 6K1 = 6 kDa *protein 1* (peptídeo 1 de 6 kDa, de função desconhecida), CI = *Cylindrical inclusion* (proteína de inclusão cilíndrica), 6K2 = 6 kDa *protein 2* (peptídeo 2 de 6 kDa, que provavelmente participa na ancoragem do complexo de replicação ao RE), VPg = *Viral protein genome-linked* (proteína viral ligada ao genoma), Nla-Pro = *Nuclear inclusion a - Protease* (protease e inclusão nuclear a), Nlb = *Nuclear inclusion b* (inclusão nuclear b) e CP = *coat protein* (capa proteica). Fonte: Lu et al. (2021).

SCMV foi descrito a primeira vez em 1963, em Ohio, EUA, afetando plantas de milho, embora a doença do mosaico da cana-de-açúcar tenha sido noticiada antes, em 1916, em Porto Rico, mas sem a determinação de seu patógeno (Wu et al., 2012). Inicialmente, os isolados identificados em cana-de-açúcar foram designados como SCMV e aqueles encontrados em milho como MDMV, contudo, como compartilhavam muitas características comuns como morfologia do vírion, gama de hospedeiras, modos de transmissão, propriedades físicas e químicas, MDMV foi considerado um isolado de SCMV (Ibidem).

Shukla et al. (1992) propuseram novos critérios para classificação dos potyvírus de cereais, baseados na semelhança na sequência de aminoácidos da CP e as relações sorológicas com anticorpos derivados de epítomos no terminal amino, ao invés da região central da CP. Com base nesses novos critérios, os vírus que antes eram considerados isolados de SCMV ou MDMV foram reclassificados em quatro vírus distintos: o próprio SCMV, MDMV, johnsongrass mosaic virus (JGMV) e sorghum mosaic virus (SrMV).

SCMV é transmitido de forma não persistente pelos pulgões *Hysteroneura setariae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii* e *Myzus persicae* (Hasan et al., 2003). Além disso, SCMV pode ser transmitido por sementes e por meio de inoculação mecânica (Li et al., 2004).

Amplamente distribuído, SCMV possui ocorrência relatada na maioria dos principais países produtores de cana-de-açúcar do mundo, cerca de 80 países em seis continentes (EPPO, 2019). Contudo, muitos desses relatos são baseados em sintomas, indexação biológica, microscopia eletrônica e diagnóstico sorológico. Essas técnicas têm limitações, pois não conseguem distinguir com precisão SCMV de outros potyvírus que causam sintomas semelhantes como MDMV, JGMV, SrMV, zea mosaic virus, pennisetum mosaic virus e cocksfoot streak virus (Wu et al., 2012).

No Brasil, casos de infecção de milho por SCMV foram reportados no estado do Rio Grande do Sul, na década de 60, por Caetano & Siqueira (1969); Hagedorn et al. (1969) apud Kitajima (2020) e por ensaios biológicos, inclusive por transmissão por pulgões, no estado de São Paulo (Costa et al., 1971 apud Kitajima, 2020). SCMV foi responsável por uma severa epidemia na década de 20 em lavouras de cana-de-açúcar, o que forçou a substituição de variedades nobres por variedades mais resistentes, não sendo mais um grande problema atualmente (Matusoka & Costa, 1974; Gonçalves et al., 2007; Barbosa et al., 2007 apud Kitajima, 2020).

Segundo Gonçalves et al. (2011), não há relatos de grande impacto econômico de SCMV e MDMV em milho no Brasil. Na Europa, entretanto, esses dois vírus são importantes agentes causadores de doenças em milho, levando a severas perdas de rendimento de grãos e forragem animal em variedades

suscetíveis, sendo que a incidência de SCMV prevalece sobre MDMV (Snihur, 2021).

SCMV infecta cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e milho (*Zea mays* L.), além de hospedeiros naturais como panicum (*Panicum miliaceum* L.), milheto (*Setaria italica* L.), capim-cerdas verdes (*Setaria viridis* L.), capim-Johnson (*Sorghum halepense* L.), capim-sudão [*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf.] e mais de 100 espécies em 40 gêneros da família *Gramineae*. (Lu et al., 2021). No Brasil, além de milho e sorgo, também há registro de SCMV infectando citronela (*Cymbopogon winterianus* Joowitt) (Costa et al., 1950 apud Kitajima, 2020).

De acordo com Wu et al. (2012), os sintomas da infecção por SCMV em milho iniciam-se nas folhas mais jovens aparecendo como um mosaico ou como manchas irregulares, verde-clara ou escura, que podem evoluir para estrias estreitas e amareladas ao longo das nervuras (Figura 6). A infecção precoce, antes do estágio da quarta ou quinta folha, pode causar retardo de crescimento moderado a grave e má formação de sementes, dependendo da linhagem infectada. No milho doce, é comum a falta de grãos na extremidade das espigas. À medida que o milho infectado cresce e a temperatura aumenta, o mosaico tende a desaparecer, mas as folhas novas ficam mais amarelas. Os sintomas por si só não são suficientes para permitir uma identificação precisa do agente causal, pois geralmente ocorrem na presença de mais de um vírus, e vários vírus diferentes podem causar sintomas semelhantes (Ibidem).



FIGURA 6. Sintoma de mosaico causado por SCMV (esq.) e sintomas de mosaico, amarelecimento e necrose em planta com infecção mista (SCMV e MaYMV) (dir.). Fonte: Gonçalves, 2021.

2.2.4. Maize yellow mosaic virus

Maize yellow mosaic virus (MaYMV) foi descrito pela primeira vez na China, entre 2013-2014, em milho apresentando sintomas leves de mosaico e amarelecimento nas folhas (Chen et al., 2016). Posteriormente também foi registrado no Brasil (Gonçalves et al. 2017), Equador (Bernreiter et al. 2017) e África (Yahaya et al. 2017; Palanga et al. 2017), indicando que o vírus está potencialmente emergindo.

O gênero *Polerovirus* juntamente com *Enamovirus*, *Polemovirus* e *Sobemovirus* formam a família *Solemoviridae*, anteriormente denominada *Luteoviridae*. Os polerovírus possuem genomas de RNA monopartido, senso positivo, com cerca de 5–6 kb de comprimento, que normalmente contêm seis quadros de leitura abertos denominados ORF0 a ORF5, com duas regiões não traduzidas (UTRs) localizadas nas extremidades 5' e 3' (Bernreiter et al., 2017; Chen et al., 2016).

Conforme verificado por Chen et al. (2016), a proteína codificada pela ORF0 atua como um supressor de silenciamento de RNA; a ORF1, sobreposta às ORF0 e ORF2, codifica uma serina protease (P1); e uma proteína de fusão P1–P2 putativa, contendo domínios RNA-polimerase dependentes de RNA viral (RdRp), é produzida pelas ORF1 e ORF2 por meio de um evento de *ribosomal frameshift* (-1) de baixa frequência. As ORF3 e o ORF4 codificam, respectivamente, a proteína do revestimento viral (CP) e a proteína de movimento (MP). Já a ORF5 é expressa como uma proteína fusionada P3–P5 por meio do mecanismo de “read-through” e está envolvida na transmissão por pulgões e no direcionamento específico do vírus para o floema. Recentemente, uma nova ORF, denominada ORF3a, foi encontrada à montante da ORF3 e traduzida de um códon de início não padrão (não AUG) (Smirnova et al., 2015). A proteína codificada pela ORF3a foi relatada como necessária para o movimento de longa distância do vírus na planta (Figura 7).

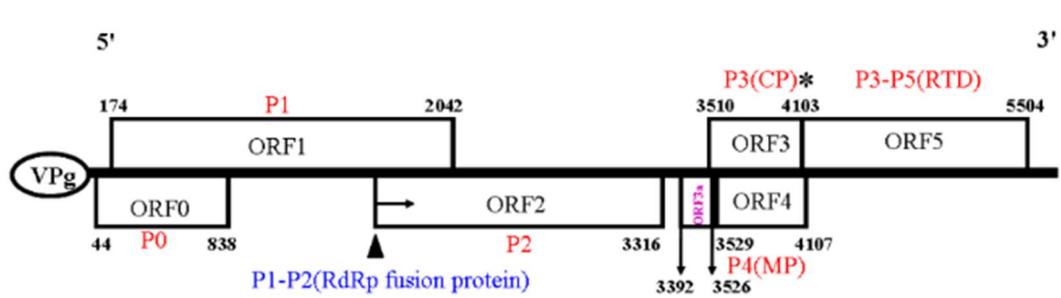


FIGURA 7. Representação esquemática da organização genômica de MaYMV. VPg = proteína viral ligada ao genoma; ORF0 = codifica P0, proteína que atua como supressor de silenciamento de RNA; ORF1 = codifica P1, uma serina protease; ORF2 = codifica uma proteína P2 que fusionada à P1, por meio do mecanismo de *ribosomal frameshift*, apresenta os domínios da RdRp; ORF3 = codifica CP; ORF3a = codifica uma proteína de 45 aminoácidos, necessária para o movimento de longa distância do vírus na planta; ORF4 = codifica proteína de movimento; e ORF5 = codifica uma proteína fusionada P3-P5 (RTD) envolvida na transmissão do vírus por afídeos e no movimento dentro da hospedeira, por meio do mecanismo *translational read-through*. Fonte: Chen et al. (2016).

Os membros do gênero *Polerovirus* são vírus de plantas de RNA restritos ao floema, também considerados transmitidos exclusivamente por pulgões em modo circulativo; no entanto, há novos relatos de polerovírus transmitidos pela mosca-branca *Bemisia tabaci*, impactando o estudo das interações vírus-vetor no gênero *Polerovirus* (Ghosh et al., 2019; Costa et al., 2020).

No Brasil, MaYMV foi identificado em plantas de milho localizadas na zona rural de Casa Branca, no estado de São Paulo, onde foram observados sintomas de mosaico amarelo e nanismo (isolado MaYMV-SP1 depositado sob nº de acesso KY940544) (Gonçalves et al., 2017). Esse isolado possui uma organização genômica típica dos polerovírus com sete quadros de leitura abertos (ORFs) e duas regiões não traduzidas (UTRs). Segundo Gonçalves et al. (2017), a importância econômica da infecção por MaYMV no milho não é conhecida atualmente, no entanto, a presença generalizada de *Rhopalosiphum maidis*, vetor de MaYMV e SCMV, em campos de milho no Brasil, implica que o MaYMV pode representar uma ameaça potencial à produção de milho. Logo, estudos estão em andamento para entender melhor a incidência, distribuição e possíveis interações do MaYMV com outros vírus patógenos de milho conhecidos no Brasil.

Na China, MaYMV geralmente tem sido relatado em infecções mistas com outros vírus, incluindo maize chlorotic mottle virus, southern rice black-streaked dwarf virus e SCMV, mas também tem sido encontrado em infecções simples, sendo estimada uma perda de 10-30% de produtividade do milho (Bernreiter et al., 2017). No Brasil, Gonçalves (2020) verificou sintomas específicos do mosaico causado por MaYMV em infecção única no milho e um efeito sinérgico de sua infecção mista com o SCMV, intensificando os sintomas e reproduzindo uma condição severa originalmente observada no campo (Figura 8).

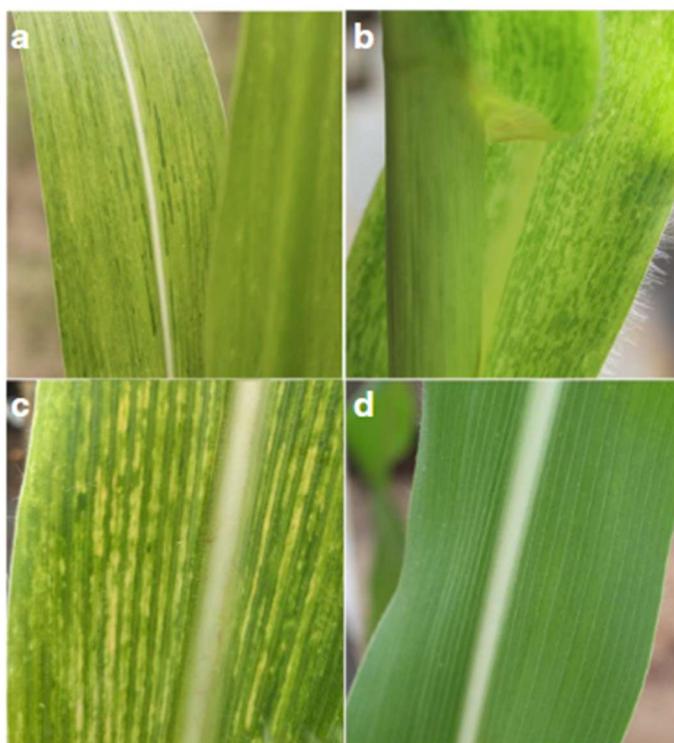


FIGURA 8. Sintomas foliares de plantas de milho inoculadas com infecção simples e mista. (a) sugarcane mosaic virus (SCMV); (b) maize yellow mosaic virus (MaYMV); (c) SCMV e MaYMV; (d) planta controle não inoculada. Fonte: Gonçalves et al., 2020.

2.2.5. Maize umbra-like virus

Maize umbra-like virus (MULV) ou maize-associated umbra-like virus (MaUV) faz parte de uma nova categoria de RNAs virais semelhantes a umbravírus, pertencente à família *Tombusviridae*, uma família viral diversa com genomas de RNA de fita simples, de sentido positivo, que codificam de quatro a sete ORFs (Cornejo-Franco et al., 2021; Lappe et al., 2022). Este grupo de vírus

(umbraviridae) ainda não está classificado em um gênero estabelecido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV).

A característica distintiva e unificadora dos membros da família *Tombusviridae* é a presença do gene da RdRp conservado e traduzido da ORF2 pela supressão da terminação em um códon de parada ou por um *frameshift* -1 que ignora o códon de parada, gerando fusões das proteínas codificadas pelas ORF1 e ORF2 (ICTV, 2011a).

No caso dos umbravírus, o gênero apresenta vírus com genoma constituído de ORFs 1 e 2 traduzidas do RNA genômico, enquanto as ORFs 3 e 4 são traduzidas de RNAs subgenômicos que codificam, respectivamente, uma proteína para movimento a longa distância e outra para movimento célula a célula (Figura 9) (Liu et al., 2021).

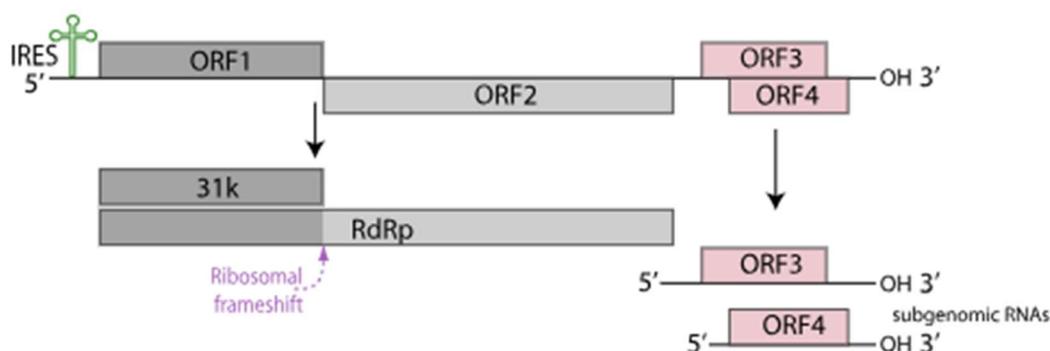


FIGURA 9. Organização genômica dos umbravírus. ORF1 = proteína de 31k cuja função é desconhecida; ORF2 = RdRp a partir do mecanismo de ribossomal frameshift das ORF1/ORF2; ORF3 = proteína envolvida na proteção do RNA viral (supressor NMD) e no movimento a longa distância (floema); ORF4 = proteína de movimento célula-a-célula. Fonte: <https://viralzone.expasy.org/645> .

Os umbravírus, diferentemente da maioria dos vírus, não possuem gene para codificar a CP e, portanto, não formam partículas virais convencionais. Eles dependem de uma coinfeção com um membro dos gêneros *Luteovirus*, *Enamovirus* ou *Polerovirus* para fornecer a CP para encapsidação do genoma e transmissão pelo vetor biológico (Taliensky & Robinson 2003). Em troca, o vírus auxiliar se beneficia do compartilhamento do produto da ORF3 do umbravírus que é responsável pela proteção do RNA viral e transporte através do floema. Trata-se de uma associação mutualística (Liu et al. 2021).

Nos últimos anos, vários RNAs virais identificados em diferentes hospedeiros (mamão, citrus, opuntia, milho, figo e cana-de-açúcar) foram

considerados vírus semelhantes a umbravírus por apresentarem significativa identidade de sequência com a RdRp de umbravírus, além da ausência de genes que codificam a CP (Quito-Avila et al., 2022). No entanto, diferenças biológicas e genômicas os têm distinguido dos umbravírus “verdadeiros” (Cornejo-Franco et al., 2021).

Genomicamente, os umbravirus-like associated RNAs (ulaRNAs) ou “umbrav-like virus”, assim como os umbravírus, codificam a RdRp por meio do mecanismo de *ribosomal frame-shifting* (Quito-Avila et al., 2022). No caso, MULV contém quatro ORFs e UTRs na extremidade 5' e 3'; a ORF1 codifica uma proteína de 195 aa (22kDa) cuja função é desconhecida; a ORF2 codifica RdRp, uma proteína de 717 aa (82,5 kDa), por meio do mecanismo de mudança de quadro (*frameshift*); as ORFs 3 e 4, sobrepostas, codificam proteínas putativas de 178 aa (20,4 kDa) e 212 aa (23,6 kDa), respectivamente (Figura 10) (Ibidem).

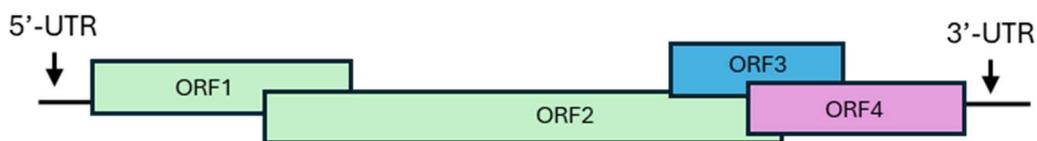


FIGURA 10. Representação esquemática da organização genômica da MULV. ORF1= codifica uma proteína de 195 aa (22kDa) de função desconhecida; ORF2 codifica RdRp, por meio do mecanismo *frameshift*; ORF3 = codifica proteína putativa de 178 aa (20,4 kDa) e ORF4 = codifica proteína putativa 212 aa (23,6 kDa).

Biologicamente, embora os umbravírus estejam exclusivamente associados a vírus dos gêneros *Luteovirus*, *Polerovirus* e *Enamovirus*, alguns estudos com ulaRNAs não identificaram nenhum vírus auxiliar pertencentes a esses três gêneros em infecção mista (Quito-Avila et al. 2022). Por exemplo, umbravirus-like associated RNA (ulaRNA) papaya meleira virus 2 (PMeV2) encontra-se associado ao vírus auxiliar papaya meleira virus (PMeV), um vírus de RNA fita dupla do gênero *Totivirus* (Antunes et al., 2016). Já papaya virus Q (PpVQ) ou papaya umbravirus foi encontrado quase sempre em plantas de mamão com o papaya ringspot virus, um potyvírus (Quito-Avila et al. 2015). No caso de maize umbrav-like virus (MULV), o polerovírus MYDV foi detectado no RNA do *pool* de amostras, mas não na amostra individual em que MULV foi detectado, sendo necessário, portanto, mais estudos para determinar como ocorre a transmissão natural de MULV (Cornejo-Franco et al. 2018).

Os RNAs subvirais podem influenciar consideravelmente os sintomas das doenças associadas ao vírus auxiliar, seja atenuando ou exacerbando os sintomas, a depender do hospedeiro (Liu et al., 2021).

O primeiro relato de MULV foi em 2022, por Lappe et al. (2022), em folhas de milho coletadas em 2017 no México, e por Quito-Avila et al. (2022), em Santa Ana, no Equador, ambos depositados no GenBank sob o número de acesso OM937759 e OK018180, respectivamente. No Brasil, a ocorrência desse vírus, foi confirmada pela primeira vez, por nossa equipe, em folhas de milho plantado em Juazeiro/BA, coletado no ano de 2023, conforme descrito no item 6.2 deste documento.

2.3. Técnicas de detecção de vírus vegetais

Jeong et al. (2016) ao revisar os métodos de detecção de vírus de plantas discute sobre a importância da identificação precisa do agente etiológico para elaboração de uma estratégia eficiente de manejo de viroses. Além disso, destaca que a globalização e as mudanças climáticas têm alterado o agroecossistema e há expectativa de aumento da disseminação de vírus e mudança na ocorrência dos vírus circulantes, tornando o diagnóstico de doenças virais ainda mais crucial. Comenta também que os sintomas das doenças virais são bastante semelhantes entre si e podem ser confundidos com estresses abióticos como condições climáticas desfavoráveis e desequilíbrios nutricionais, o que torna o diagnóstico baseado em sintomas muito complexo. Somado a isso, deve-se considerar que a infecção pode não causar sintomas visíveis e haver infecções mistas.

Os sistemas de detecção sorológica se baseiam no uso de anticorpos específicos desenvolvidos em animais em resposta a antígenos. Apesar de terem sido amplamente usados como método diagnóstico de rotina, apresentam limitações, como disponibilidade de anticorpos, custo e tempo em desenvolvimento de anticorpos, além de falsos positivos decorrentes de reações inespecíficas ou reatividade cruzada (Jeong et al., 2014). Espécies virais muito relacionadas não podem ser diferenciadas corretamente por testes como ELISA devido à ocorrência de reação cruzada, além de ser menos sensível quando comparado à Reação em Cadeia de polimerase (PCR), a ferramenta mais

popular para o diagnóstico de vírus, que, igualmente ao ELISA, é padronizável em nível industrial (Ibidem).

A PCR possui várias aplicações na pesquisa, como clonagem, manipulação de genes, análise de expressão gênica, genotipagem, sequenciamento e mutagênese, contudo carece da informação genética previamente disponível. A necessidade de aperfeiçoar a eficiência e a especificidade da técnica incentivou a criação de uma variedade de abordagens, como PCR com transcrição reversa (RT-PCR), PCR Multiplex, Nested PCR, PCR de imunocaptura (IC-PCR), PCR em tempo real, PCR digital, amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), entre outras (Jeong et al., 2014). Essas técnicas de detecção molecular têm alta sensibilidade e especificidade, permitindo uma identificação rápida e precisa (Lu et al., 2021).

Para este trabalho, as técnicas de RT-PCR e RT-qPCR baseado em SYBR Green foram selecionadas com o objetivo de desenvolver protocolos de detecção de vírus de milho que sejam eficientes, rápidos e de baixo custo, que poderão ser utilizados para realização de levantamentos de incidência e ocorrência das viroses circulantes.

A PCR em tempo real pode ser utilizada também para estimar a taxa de infecção (r), complementando ou até mesmo substituindo a estimativas de intensidade de doenças e inóculo. Trata-se de um componente importante para epidemiologia de doenças de plantas, pois permite a identificação e quantificação de inóculo (Del Ponte & Mizubuti, 2024).

Descrita pela primeira vez por Higuchi et al. (1992), a PCR em tempo real foi desenvolvida com o objetivo de aprimorar a reação em cadeia de polimerase de modo que as sequências amplificadas fossem detectadas sem a necessidade de abrir o tubo da reação. A ideia consistiu em adicionar brometo de etídeo na reação e monitorar externamente o aumento de sua fluorescência ao se anelar ao DNA de fita dupla, possibilitando acompanhar o progresso da amplificação em tempo real.

Já a abordagem de RT-qPCR foi desenvolvida por Gibson et al. (1996), no contexto de um projeto de terapia genética voltada para o tratamento de fibrose cística, em que se buscava quantificar o mRNA do regulador de transmembrana da fibrose cística (CFTR), usando uma sonda fluorogênica e um

controle interno construído a partir da inserção de uma sequência específica no plasmídeo pGEM-3Z.

Na agricultura, a RT-qPCR tem sido usada na detecção de inúmeros fitovírus, como tomato spotted wil virus (Roberts et al., 2000), plum pox virus (Varga & James, 2005), citrus tristeza virus (Bertolini et al., 2008), citrus leaf blotch virus (Ruiz-Ruiz et al., 2009), vírus de cucurbitáceas (Abrahamian et al., 2013; Torre et al., 2020), vírus de videira (Poojari et al., 2016), citrus ringspot virus (Kokane et al., 2021), vírus de trigo (Gauthier et al., 2024), entre outros. De igual forma, tem sido amplamente empregada no contexto da segurança alimentar para detecção de contaminantes de alimentos (como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*) e de alimentos geneticamente modificados, por meio dos sistemas de fluorescência como SYBR Green e sondas TaqMan (Levin, 2004).

Os sistemas detecção usados na PCR em tempo real podem ser do tipo sonda de hidrólise (TaqMan®, FRET) ou agente intercalante (SYBR Green®) (Thermo Fisher, 2014). O sistema TaqMan consiste em um oligonucleotídeo (sonda) marcado com corante repórter fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3', que é liberado quando a sonda se anela ao alvo, aumentando o sinal do corante repórter. Esse tipo de sistema garante maior especificidade e permite ensaios multiplex, porém é mais oneroso e as configurações do ensaio são mais complexas. Já o SYBR Green é um agente intercalante que se liga a todo tipo de DNA de fita dupla presente na amostra, sendo uma solução genérica, simples e de menor custo, porém pode gerar sinais falso-positivos, que podem ser discriminados por meio da análise da curva de dissociação.

As aplicações da PCR em tempo real podem ser classificadas como (i) quantitativa (absoluta, para determinação de carga viral/nº de cópias; ou relativa, para estudos de expressão gênica); e (ii) qualitativa (usada para genotipagem, detecção de patógeno (presença/ausência) e de organismos geneticamente modificados) (Levin, 2004; Thermo Fisher, 2014).

Embora a técnica de PCR quantitativa apresente várias vantagens, como alta sensibilidade, especificidade, capacidade de quantificação em tempo real, baixo potencial de contaminação e menor tempo de processamento (Cockerill & Uhl, 2002), o método ainda apresenta alguns desafios a serem

superados. Bustin (2024) lista algumas limitações ainda presentes, das quais destacam-se:

- Dificuldades com reprodutibilidade: diferenças entre reagentes e instrumentos podem levar a resultados irreproduzíveis e dificultar comparações entre estudos;
- Limitações de detecção: a detecção simultânea de múltiplos alvos em uma única reação pode ser limitada pela sobreposição espectral dos corantes fluorescentes utilizados, o que pode restringir a capacidade de quantificar alvos que estão em concentrações muito diferentes;
- Contaminação de amostras: embora a técnica elimine o risco de contaminação na etapa pós-PCR, ainda existe a possibilidade de contaminação cruzada durante a extração de RNA ou na preparação da amostra, o que torna essencial a inclusão de controles apropriados; e
- Limitações da amostra: a presença de inibidores de PCR nas amostras pode afetar a eficiência da amplificação, resultando em quantificações imprecisas.

3. JUSTIFICATIVA

Apesar da importância econômica do milho no Brasil, há uma lacuna nos estudos sobre os vírus que afetam essa cultura (levantamentos de incidência e ocorrência), principalmente devido à falta de métodos padronizados para detecção e identificação dos vírus. Os sintomas das doenças virais muitas vezes se assemelham, exigindo métodos diagnósticos mais precisos para o alcance de um manejo eficaz, inclusive para o desenvolvimento de estratégias de controle baseadas em variedades tolerantes e resistentes.

Nesse contexto, o presente estudo propõe desenvolver protocolos de detecção para os vírus de milho por RT-PCR e RT-qPCR baseado em SYBR Green, utilizando a base de dados das sequências virais obtidas por HTS a fim de aumentar a eficiência e especificidade desses métodos com o desenho de *primers* capazes de detectar a amplitude da diversidade dos isolados circulantes. A escolha pelo sistema SYBR Green decorreu de sua melhor relação custo-efetividade e simplicidade em comparação com o sistema de sondas TaqMan. Como o experimento envolve múltiplos alvos virais, o uso de sondas específicas

para cada um aumentaria significativamente os custos, a complexidade do ensaio e o tempo de desenvolvimento. Além disso, a literatura disponível evidencia que SYBR Green possui sensibilidade suficiente para a detecção de patógenos de maneira ampla e robusta.

A partir dos dados obtidos com este trabalho, estudos mais aprofundados sobre os vírus circulantes poderão ser realizados, melhorando a compreensão da epidemiologia desses patógenos e a formulação de recomendações de manejo mais assertivas, o que contribuirá para a segurança alimentar e a sustentabilidade da agricultura no país.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolver protocolos de detecção de vírus de milho por RT-PCR e RT-qPCR que sejam eficientes, rápidos, genéricos e de baixo custo, a partir da análise do viroma de milho utilizando a técnica HTS.

4.2. Objetivos específicos

1. Realizar o levantamento bibliográfico dos vírus de milho relatados no Brasil e a revisão de literatura dos vírus encontrados no HTS;
2. Estudar o viroma da cultura do milho a fim de conhecer a diversidade dos vírus circulantes (conhecidos e novos);
3. Desenhar *primers* de RT-PCR e RT-qPCR específicos para detecção a partir da seleção de regiões conservadas;
4. Produzir clones de cada vírus-alvo com sequências de genomas parciais para uso como controles positivos a partir de clonagem em vetores plasmidiais; e
5. Avaliar a eficiência dos *primers* de RT-qPCR com amostras de campo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Sequenciamento de alto desempenho (HTS)

Durante o ano de 2022, amostras de milho apresentando sintomas de listra (estriado) fraco a forte e folhas arroxeadas foram coletadas em

diferentes regiões (Riacho Fundo/DF, Juazeiro/BA e Uberlândia/MG) e misturadas em um *pool*, combinando 1-2 g de cada amostra individual. Foi realizada semi-purificação das partículas virais utilizando protocolo de centrifugação diferencial e concentração de partículas virais com centrifugação em colchão de sacarose a 20%, seguindo o protocolo de Blawid et al. (2017) com modificações. Em seguida, procedeu-se a extração de RNA total usando o Kit Quick-RNA Plant Miniprep (Zymo Research) e então armazenou-se a -70 °C. Estas amostras de RNA extraído de milho foram enviadas para sequenciamento em plataforma HTS em dois lotes juntamente com RNA viral extraído de outras plantas, objeto de estudo de outros projetos. O primeiro lote consistiu em RNA total de vírus semi-purificados de folhas de milho combinado com RNA de vírus semi-purificados de cucurbitáceas, feijoeiro e bananeira (nome do *pool*: CH_2022-05) e o segundo lote com RNA total de vírus semi-purificados de milho combinado com RNA de vírus semi-purificados *Brachiaria* spp. e *Panicum* spp, do Campo experimental da Embrapa Gado de Corte (maio/2022 e dezembro/2022), e *Paspalum* spp., *Brachiaria* spp. da Universidade de Brasília (dezembro/2022) (nome do *pool*: HM_2022) (Figura 11).



FIGURA 11. Mapa dos locais de coleta das amostras de folhas de milho.

Estas amostras de RNA total de vírus semi-purificados foram sequenciadas por HTS na plataforma Illumina NovaSeq6000, na escala de 10 G, com 150 nt-*pairedends*. As sequências foram analisadas por bioinformática conforme descrito em Blawid et al. (2017) com modificações. Primeiramente os reads foram aparados com BBDuk (<https://github.com/BioInfoTools/BBMap>)

para remoção das sequências de baixa qualidade, em seguida, foi realizada a montagem “de novo” com MEGAHIT (<https://github.com/voutcn/megahit>), e os *contigs* montados foram submetidos a Blastx no software Geneious Prime (Kearse et al., 2012).

As sequências genômicas relacionadas a vírus de gramíneas ou possíveis novos vírus (viral hits) foram confirmadas usando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Tool) (Altschul et al., 1990) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível no site <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, pela comparação com as sequências depositadas no GenBank e os *contigs* estendidos usando a função “Map to reference” do Geneious Prime.

5.2. Desenho de *primers* para detecção

Os *primers* para RT-PCR e RT-qPCR foram desenhados com base na seleção de regiões mais conservadas de cada vírus a fim de reduzir as possibilidades de falsos negativos (Tabela 3). Primeiramente, foi realizado o alinhamento múltiplo (ClustalW no Geneious Prime) das sequências de genoma completo de cada vírus detectado depositadas no banco de dados do NCBI (Apêndice B) e as sequências-consenso, obtidas pelo HTS, a fim de identificar regiões mais conservadas. Após desenho dos *primers*, suas sequências tiveram suas identidades confirmadas com os *reads* que foram montados com base na sequência genômica de referência, ou seja, os *reads* foram analisados para avaliar a diversidade de sequências na região onde os *primers* foram desenhados.

Os *primers* para RT-PCR abrangeram uma região genômica conservada maior que a dos *primers* de RT-qPCR de modo que seus produtos fossem usados para clonagem em vetor plasmidial bem como para testes de validação posteriores.

Os *primers* foram analisados *in silico* (OligoAnalyzer™ Tool IDT, <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) quanto à temperatura de desnaturação e probabilidade de “self-dimer” e “hetero-dimer”. Para controle interno, foram usados *primers* do gene do fator de alongação 1 α validados por Zang et al (2013) por ser um gene de referência adequado para milho em testes de qPCR.

TABELA 3. Lista de *primers* desenhados e usados neste estudo.

Primer	Gene alvo	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)
MRFV_BR_F	replicase	TTTTCGGCTCCTGGAAAGCTT	410
MRFV_BR_R*	replicase	GGCGATGTTGTARTCGGTGTT	
SCMV_BR_F*	HC-PRO	AAACCAGCATACTCTGARATAATA CC	1075
SCMV_BR_R	P3	CGCCTAAATCTACGCTTTTTTCTCA C	
JGMV_BR_F*	P3	TTCRACTAGAAATATGCCATTGAC AAA	516
JGMV_BR_R	P3	TACTGAATTGTATGTGGATTGGAG T	
MSMV_2094_F	RepA	CCTAGAGGTGGCAGAAGACATG	447
MSMV_2540_R	RepA	ATGTCTCACACAAGCTTCCGTT	
MaYMV_Pol_BR_F*	P2	CAATCGCGAGAGTTYGTGCA	668
MaYMV_Pol_BR_R	P2	GGAGATACCAGCCACTTGTACAG	
Maize_Umbra_F	ORF2	CGAAAATACAAGATCCAACCGA	593
Maize_Umbra_R	ORF2	ATCCGTCTGCCTTCAACCTC	
MRFV_qPCR_R	replicase	TCTTGTAGCGCTCGAAGACAAC	117
MRFV_qPCR_F	replicase	TTCGAGATGGCCGACTGGT	
SCMV_qPCR_F*	P3	ATGGAAAAAAGTTAYGTAGATCAA TTAAACCA	85
SCMV_qPCR_R	P3	ACACACGCCATATTGCTGAAAATT	
MSMV_qPCR_F	RepA	AATACGTAGGATCGAAAGTGCTG	145
MSMV-qPCR_R	RepA	CTTTGTGATCATCTCTGGAACCT	
MaYMV_Pol_qPCR_F	P2	GAGTAACTCTCGGATTCGGGTGA	45
MaYMV_Pol_qPCR_R	P2	TTGTTTGGAAACCTCGACTTTGAA	
Maize_Umbra_qPCR_F	ORF2	AGCCGTGGAGCAATTGAGTC	60
Maize_Umbra_qPCR_R	ORF2	CATCGACCGACTTCAGCCAA	
EF-1 α -F	Fator de elongação 1- α	GTCAGATTGGCAACGGCTACGC	124
EF-1 α -R	Fator de elongação 1- α	TTGGGCTCCTTCTCCAGCTCCT	

**primers* degenerados.

5.3. Identificação dos hospedeiros por RT-PCR

Para validação dos resultados obtidos no HTS, amostras individuais de milho foram testadas para confirmar a detecção dos vírus encontrados. Para isso, foi extraído o RNA total de amostras de folhas individuais de milho estocadas a -70 °C e executada a RT-PCR com *primers* específicos desenhados para as sequências encontradas (Tabela 3). Os vírus alvos foram: MRFV, SCMV, MaYMV, MULV e MSMV.

Visando obter uma metodologia única para todos os vírus, foi realizada extração de RNA, RT-PCR e RT-qPCR inclusive para detecção de MSMV, apesar deste ser vírus de DNA. Pelo observado, o método de extração de RNA usado e a reação de RT não excluiu o DNA de MSMV. Destaca-se que não foi realizado tratamento com DNases na extração de RNA. De outro modo, pode-se ter amplificado o mRNA.

Para extração de ácido nucleicos, cada amostra foliar foi triturada com nitrogênio líquido e processada usando kit RNA total (Cellco Biotec), de acordo com as orientações do fabricante. O DNA complementar foi sintetizado utilizando 10 µl do RNA extraído, 1 µl de Oligo DT (50 µM), 1 µl de primer randômico (50 µM), 1 µl de dNTP (10 mM), submetido a incubação a 75 °C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 µl de buffer first strand 5X, 2 µl de DTT (0,1 M) e 1 µl de M-MLV RT (200 U, Thermo Fisher Scientific). As condições da reação foram: 25 °C por 10 minutos para anelamento e extensão dos *primers*, 37 °C por 50 minutos para polimerização da fita complementar e 80 °C por 10 minutos para inativação da enzima.

As reações de PCR foram realizadas utilizando 18,25 µl de água Milli-Q autoclavada, 2,5 µl de 10 x Buffer Taq, 1,0 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de cada primer (concentração final de 400 nM), 0,25 µl de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µl, Sinapse Biotecnologia) e 1 µl de cDNA. As condições da reação empregadas foram 95 °C por 2 minutos para desnaturação prévia do cDNA e 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto para desnaturação, 50 °C por 30 segundos para pareamento dos *primers*, e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos para extensão. Ao final dos ciclos, a temperatura foi mantida por 72 °C por 7 minutos para extensão final das fitas. Alíquotas de 2 µl dos *amplicons* foram processadas em gel de

agarose 1% corado com brometo de etídeo e visualizadas em transiluminador UV para confirmação da amplificação.

5.4. Produção de controles positivos e sequenciamento

Clonagem em vetor plasmidial

Após a confirmação dos hospedeiros, as amostras positivas com cDNA apresentando melhor rendimento (qualidade e integridade avaliadas pela presença de banda específica no gel de agarose) foram selecionadas para a obtenção do clone. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando Illustra GFX PCR DNA and Gel Band purification kit (GE Life Technologies), seguindo as orientações do fabricante. A concentração de ácidos nucleicos foi estimada pela intensidade da banda no gel de eletroforese (agarose 1%) e a quantidade de *amplicon* a ser utilizada na reação de ligação foi calculada usando a fórmula $(50 \text{ ng do vector} \times 0,5 \text{ kb de inserto}) / (3 \text{ kb do vetor}) \times 3$. A razão molar do produto de PCR e do vetor foi de 3:1.

As reações de ligação foram realizadas utilizando-se 2,5 µl de 2x Rapid Ligation Buffer, 0,5 ng/µl de pGEM®-T Easy Vector (50ng/µl, Promega), 1 µl do produto de PCR diluído (25 ng/µl), 0,5 µl de T4 DNA Ligase (Promega) e 0,5 µl de água Milli-Q, permanecendo a temperatura ambiente por 1 hora.

O produto da reação foi dialisado em água Milli-Q por 15 minutos antes da transformação. Dois microlitros do produto da diálise foram adicionados a um tubo contendo 50 µl de células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH10B (Thermo Fisher Scientific), homogeneizados manualmente e transferidos para cubeta para eletroporação. Às reações de transformação, foram adicionados 500 µl de meio SOC, permanecendo incubadas sob agitação por 1h30min. Em seguida, 200 µl foram transferidos para placas de LB com 20µl de ampicilina (100 mg/ml), 20µl de IPTG (100 mg/ml) e 10µl de X-Gal (80 mg/ml). As placas contendo as células transformadas foram mantidas em estufa a 37 °C overnight.

O controle positivo de SCMV foi produzido em pCR4-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific) devido a dificuldades de inserção do fragmento amplificado em pGEM®-T Easy Vector. Para isso, foram utilizados 0,5 µl do

produto de PCR (cerca de 20 ng), 0,5 µl de salt solution, 0,5 µl pCR4 TOPO vector e água para completar o volume final de 3 µl, conforme orientações do fabricante (pCR4.TOPO TA Cloning kit, Thermo Fisher Scientific). A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A eletroporação foi realizada com 1 µl da reação de ligação em células competentes de *E. coli* DH10B, incubado com 500 µl de meio SOC por 1h30min. Em seguida, 20 µl foram transferidos para placas de LB com 20µl de canamicina (50 mg/ml) e mantidas em estufa a 37 °C overnight.

Extração de DNA plasmidial e sequenciamento

Os clones obtidos foram selecionados para repicagem e posterior extração de DNA plasmidial a fim de verificar a clonagem dos insertos no vetor. Para isso, colônias brancas foram repicadas em placas de LB tratadas com 20 µl de ampicilina (100 mg/ml) e posteriormente inoculadas em 5 ml de meio líquido LB com 5 µl ampicilina (100 mg/ml) durante 24 horas aproximadamente, sob agitação (180 rpm), a temperatura ambiente.

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 ml de meio líquido LB com 5 µl de ampicilina (100 mg/ml) (pGEM-T Easy) ou 5 µl (50 mg/ml) de canamicina (pCR4), sob agitação (180 rpm), durante 24 horas aproximadamente, a temperatura ambiente. Para armazenamento dos controles positivos, 200 µl da solução bacteriana foram estocadas com a adição de 300 µl de glicerol (80%) a -70 °C.

As purificações de DNA plasmidial foram realizadas usando o kit Wizard Plus SV Miniprep DNA purification (Promega), segundo orientações do fabricante. Alíquotas de 2 µl das minipreparações foram processadas em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo, para confirmar a obtenção dos plasmídeos. Os insertos foram cortados com a enzima de restrição *EcoRI*, 37 °C, overnight, e confirmados por eletroforese pelo tamanho das bandas observadas. Somente os clones de SCMV em pGEM-T Easy não apresentaram o inserto, sendo posteriormente obtidos com vetor pCR4. Para confirmação da sequência do inserto, os DNA plasmidiais purificados com fragmento de cada vírus foram sequenciados por método Sanger utilizando *primer* T7 promoter.

5.5. Elaboração das curvas-padrão e das curvas de dissociação

A curva-padrão nos ensaios de qPCR é um parâmetro importante apenas em aplicações de quantificação, uma vez que a determinação precisa do DNA ou RNA alvo das amostras se dará pela comparação dos valores de ciclo de quantificação (Cq) das amostras desconhecidas com os valores de Cq de uma série de diluições conhecidas. Para análises qualitativas, a curva-padrão é opcional, uma vez que o objetivo é simplesmente verificar a presença ou a ausência de um alvo específico.

Assim sendo, foram elaboradas curvas-padrão usando o DNA plasmidial recombinante de cada vírus (controles positivos). Para isso, o DNA dos plasmídeos foi quantificado (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) e o número de cópias foi calculado usando 5 diluições seriadas de dez vezes de cada padrão (1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg e 0,1 pg).

O número de cópias foi calculado usando a seguinte fórmula: (quantidade de DNA plasmidial em nanogramas) x (constante de Avogadro = 6.0221×10^{23}) / comprimento do plasmídeo recombinante (bp) x peso médio dsDNA (660 g/mol) x (fator de conversão = 1×10^9).

As reações foram efetuadas em triplicata com 10 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,8 µl de *primer* mix (5 µM), 0,2 µl corante CXR suplementar e água nuclease-free para completar 20 µl, utilizando máquina de PCR em tempo real, Step One Plus (Thermo Fisher Scientific). As condições de ciclagem foram 95 °C por 2 min para ativação da GoTaq® Hot Start Polymerase seguindo de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação das fitas, 60 °C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e extensão da fita complementar e execução da curva de *melting* (ou curva de dissociação) conforme a configuração padrão do software utilizado (StepOne v2.3). Nesse processo, os *amplicons* foram aquecidos gradualmente a uma taxa de 0,3 °C/ segundo, de 60 °C a 95 °C, e os picos de fusão calculados automaticamente, resultando em um gráfico da derivada negativa da fluorescência para cada incremento de temperatura.

Os *primers* foram avaliados quanto à eficiência da reação (inclinação da curva-padrão, coeficiente de correlação e faixa dinâmica) e especificidade pela análise da curva de dissociação.

5.6. Teste com amostras de campo

Para validação dos protocolos, novas amostras de folhas de milho oriundas de Petrolina/PE, apresentando sintomas de infecções virais, juntamente com amostras do Riacho Fundo/DF, Juazeiro/BA e Uberlândia/MG, anteriormente utilizadas no HTS, armazenadas a - 70 °C, foram testadas para presença de SCMV, MRFV, MSMV, MaYMV e MULV.

As novas amostras foram submetidas à extração de RNA e transcrição reversa, conforme descrito anteriormente. Todas as reações de RT foram realizadas com 500 ng/μl de RNA. Como controle das reações foram realizados os seguintes tratamentos: (i) teste de planta sadia com *primers* dos alvos (controle negativo), (ii) controle sem molde (NTC), (iii) controle interno com *primers* do gene do fator de alongação EF1- α (Zhang et al., 2013) e (iv) controle positivo (1 pg/μl de plasmídeo recombinante contendo a sequência alvo do patógeno). As mesmas amostras foram testadas por RT-PCR.

As reações de qPCR seguiram as seguintes condições: 10 μl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 0,8 μl de primer mix (5 μM) e água nuclease-free para completar 20 μl. As condições de ciclagem foram 95 °C por 2 min para ativação da GoTaq® Hot Start Polymerase seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos para desnaturação das fitas e 60 °C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e extensão da fita complementar. Ao final, foi executada a curva de dissociação.

Os resultados foram avaliados segundo os seguintes critérios: (i) presença de pico único na curva de dissociação com T_m próxima à T_m do controle positivo (diferença de 1 °C); (ii) ausência de sinal de amplificação nos controles de amostra sem modelo e de planta sadia ou T_m diferente da T_m padronizada; (iii) visualização de bandas nos tamanhos esperados usando eletroforese em gel de agarose e (iv) amplificação dos genes de controle endógeno. Todas as reações, inclusive controles positivos e negativos, foram realizadas em duplicata.

6. RESULTADOS

6.1. Análises dos dados gerados por HTS

Para obter informações sobre os vírus associados ao milho e sua diversidade genética no Brasil, amostras de milho de três localidades (Figura 11) foram analisadas por sequenciamento de alto desempenho.

O sequenciamento do primeiro *pool* (CH_2022-05) contendo RNA extraído de folhas de milho do Riacho Fundo/DF, Juazeiro/BA e Uberlândia/MG, coletadas no mês de maio de 2022, juntamente com RNA de cucurbitáceas, feijoeiro e bananeira, resultou em um total de 58.393.052 *reads*, de tamanho de ~150 pares de base, formando 2.367 *contigs*.

O sequenciamento do segundo *pool* (HM_2022) contendo RNA extraído de folhas de milho do Riacho Fundo/DF, Juazeiro/BA e Uberlândia/MG, coletadas no mês de dezembro de 2022, juntamente com RNA de gramíneas, resultou em um total de 87.630.010 *reads*, formando 45.215 *contigs*.

A análise de Blastx dos *contigs* obtidos contra base de dados do GenBank revelou a presença de seis vírus diferentes, dos quais cinco foram posteriormente confirmados nas amostras de milho por RT-PCR, conforme Tabela 4.

Embora johnsongrass mosaic virus (JGMV) tenha sido detectado nos dados de HTS do *pool* de segunda amostra (HM_2022), a RT-PCR de amostras individuais não revelou sua presença em plantas de milho. Por isso, JGMV não foi incluído nas próximas etapas deste trabalho que visou apenas viroses de milho. Até o momento, não há confirmação de JGMV ocorrendo em milho no Brasil, mas em *Pennisetum purpureum* (Silva et al., 2013) e sorgo (Souza et al., 2017).

Os resultados apresentaram alta identidade entre os *contigs* e as leituras (*reads*) e boa cobertura para os cinco principais vírus analisados, indicando que não houve montagem quimérica na sequência consenso.

TABELA 4. Lista de vírus detectados em plantas de milho de cada *pool* confirmados por RT-PCR.

<i>Pool</i>	Vírus	Tamanho do <i>contig</i> (nt)	Nº de <i>reads</i>	<i>Pairwise % de identidade*</i>	Cobertura média
CH_2022-05					
	Maize rayado fino virus	6.455	3.775	97,8	88,3
	Sugarcane mosaic virus	9.656	5.148.148	99,3	80.506,4
	Maize yellow mosaic virus	5.761	505.418	98,4	13.247,3
	Maize striate mosaic virus	2.746	31.209	99,1	1.716,1
HM_2022					
	Maize rayado fino virus	4459	2.323	97,7	78,6
	Sugarcane mosaic virus	9.592	5.098.007	99,4	80.254,3
	Maize yellow mosaic virus	5.788	657.204	96,7	17.601,8
	Maize striate mosaic virus	2.919	33.218	98,4	1.830
	Maize umbra-like virus	2.470	2.171	98,8	132,7

* alinhamento do *contig* com os *reads*.

6.2. Detecção de maize umbra-like virus no Brasil

Um *contig* de 2470 nucleotídeos de comprimento do *pool* HM_2022 foi montado a partir de 2.171 *reads*, com uma cobertura média de 132,7x (Tabela 4). Reações de RT-PCR foram realizadas utilizando *primers* desenhados para amplificar um fragmento de 593 nucleotídeos da ORF2 de MULV (gene da RdRp, acesso não depositado, aguardando autorização), na posição 868_For e 1460_Rev. O RNA extraído das amostras individuais avaliado primeiramente em *pool* de cada região apresentou resultado positivo apenas para o *pool* de Juazeiro/BA. Em seguida, o teste individual das amostras indicou a presença de MULV em duas amostras das 12 amostras de Juazeiro/BA. Os *pools* do RNA das amostras de Riacho Fundo/DF e Uberlândia/MG apresentaram resultado negativo para MULV.

A sequência-consenso foi montada a partir de 2.171 *reads* com 98,8% de identidade de *reads*. Após a extensão de *contig*, a sequência genômica do isolado de maize umbra-like virus (MULV) de Juazeiro/BA recuperada por HTS apresentou 3.062 nucleotídeos, com 97,41% de identidade com isolado do México (OK018180), que apresenta 3.068 bp, e com 95,52% de identidade com o isolado do Equador (OM937759), que apresenta 3.053 bp (Tabela 5). Essas sequências são as únicas sequências de MULV depositadas até o momento.

TABELA 5 - Percentual de identidade de nucleotídeos entre o isolado brasileiro e os isolados do México e Equador.

Vírus	MULV BR	MULV MX OK018180	MULV EC OM937759
Maize umbra-like virus BR	100	97,41	95,52
Maize umbra-like virus MX OK018180	97,41	100	95,37
Maize umbra-like virus EC OM937759	95,52	95,37	100

A organização genômica do MULV identificado neste estudo possui, semelhantemente ao isolado mexicano, quatro ORFs, com a RNA-polimerase dependente de RNA viral – RdRp traduzida por *frameshift* ribossômico -1 das ORFs 1 e 2, característica distintiva e unificadora da família *Tombusviridae* (Figura 9; Figura 12).

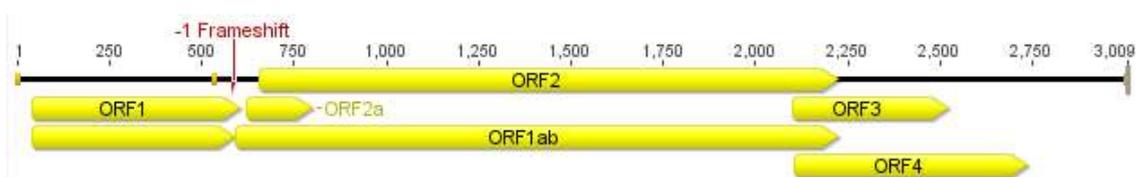


FIGURA 12. Organização genômica de maize umbra-like virus montado por HTS da amostra (*pool* HM_2022).

O isolado brasileiro apresentou alta identidade de nucleotídeo e de aminoácido com os isolados mexicano e equatoriano para todas as regiões do genoma comparadas (Tabela 6), mostrando que se trata da mesma espécie.

TABELA 6. Tamanhos de cada ORF de MULV e percentual de identidade de aminoácido e nucleotídeos entre o isolado de MULV identificado neste estudo e os isolados do México e Equador.

Região do genoma	Tamanho (nt)	MULV – EC (acesso OM937759)		MULV – MX (acesso OK018180)	
		% identidade		% identidade	
		aa.	nt	aa.	nt
ORF1	194	97,87	97,00%	97,34%	97,35%
ORF1-2	736	99,04	96,12%	99,18%	97,40%
ORF3	177	95,00	97,87%	93,57%	98,44%
ORF4	211	97,63	97,33%	99,05%	98,11%

ORF 1 = proteína associada a replicação; ORF 1-2 = RdRp; ORF3 = MP de longa distância; ORF4 = MP célula a célula.

6.3. Vírus detectados nas amostras individuais por RT-PCR

Para confirmar a presença dos vírus identificados por HTS e determinar seus hospedeiros, as amostras individuais de cada região de coleta, armazenadas a -70°C, foram testadas por RT-PCR. Todas as amostras analisadas eram sintomáticas. O resultado obtido encontra-se consolidado na Tabela 7 e as imagens dos géis de agarose no Apêndice D.

As reações positivas de RT-PCR para cada alvo produziram *amplicons* nos tamanhos esperados para cada vírus (MRFV – 410 bp; SCMV – 1075 bp; MSMV – 447 bp; MaYMV – 668 bp; MULV – 593 bp).

TABELA 7. Resultado da RT-PCR das amostras individuais utilizadas no HTS.

Região	Planta	Vírus (nº de positivos/total de amostras analisadas)				
		MRFV	SCMV	MSMV	MaYMV	MULV
DF	Milho	3/6	5/6	5/6	6/6	0/6
BA	Milho	12/12	1/12	10/12	0/12	2/12
MG	Milho	9/10	6/10	10/10	8/10	0/10
Total geral		24/28	12/28	25/28	14/28	2/28

As amostras individuais oriundas do DF apresentaram alto nível de infecção mista, com maior incidência de MaYMV, MSMV, SCMV e MRFV, nessa ordem. Do total de 6 amostras, metade apresentou os quatro vírus simultaneamente, duas apresentaram três vírus simultaneamente e apenas uma apresentou infecção simples de MaYMV. Não foi detectado MULV no DF (Figura 13).



FIGURA 13. Amostras individuais de milho oriundo do DF (numeradas de 1 a 6) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.

Enquanto isso, as amostras de milho de Juazeiro/BA apresentaram maior incidência de MRFV (100% das amostras individuais analisadas) e MSMV (cerca de 83%, 10 de 12 amostras). SCMV foi detectado em apenas uma amostra que também testou positivo para MRFV, MSMV e MULV. A maioria das amostras (10) apresentaram infecção mista de MRFV e MSMV, enquanto uma amostras apresentou quatro vírus simultaneamente e outra, três vírus. MULV foi detectado em Juazeiro/BA em 2 das 12 amostras individuais analisadas que também testaram positivo para MRFV e MSMV (Figura 14).

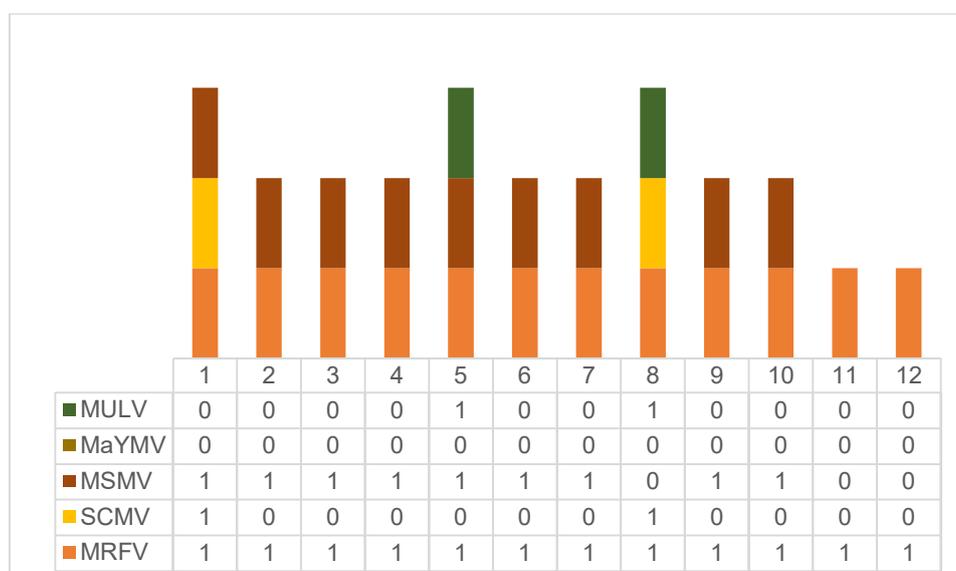


FIGURA 14. Amostras individuais de milho oriundo de Juazeiro/BA (numeradas de 1 a 12) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.

Em Uberlândia/MG, todas as amostras analisadas apresentam MSMV, enquanto MRFV, MaYMV e SCMV estavam presentes em 90%, 80% e 60% das amostras, respectivamente. Também houve alto nível de infecção mista nas amostras de milho de MG: seis amostras apresentaram 4 vírus ao mesmo tempo, duas, 3 vírus, uma, dois vírus, enquanto apenas uma amostra apresentou infecção simples de MSMV. MULV não foi identificado nas amostras de milho oriundas de MG (Figura 15).

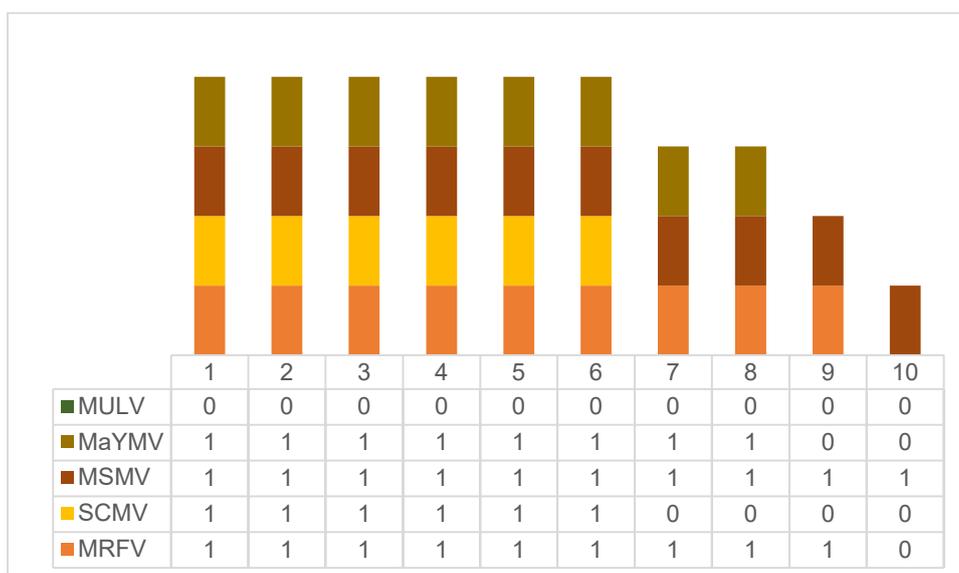


FIGURA 15. Amostras individuais de milho oriundo de MG (numeradas 1 a 10) com indicação dos vírus detectados. 1 = positivo; 0 = negativo.

O resultado do HTS apresentou um alto número de *reads* referentes a SCMV, tanto no primeiro *pool* (5.148.148 *reads*) quanto no segundo *pool* (5.098.007 *reads*) em relação aos *reads* dos demais vírus: MaYMV: 505.418 e 657.204 *reads* no 1º e 2º *pool* respectivamente; MSMV: 31.209 e 33.218 *reads* no 1º e 2º *pool* respectivamente; MRFV: 3.755 e 2.323 *reads* no 1º e 2º *pool* respectivamente; MULV: 2.171 *reads* no 2º *pool* (Tabela 4). Entretanto, o teste individual de amostras evidenciou que SCMV não foi predominante em Juazeiro/BA, estando presente apenas em uma das doze amostras analisadas. Além disso, MRFV, que apresentou o menor número de *reads*, predominou nas três regiões, indicando que não há uma correlação entre os dados (Tabela 7). O elevado número de *reads* de SCMV pode estar relacionado a um alto nível de

replicação em amostras específicas bem como à presença de outras gramíneas hospedeiras, além do milho.

6.4. Dos controles positivos produzidos

Para construção dos controles positivos, as regiões alvo conservadas foram clonadas em vetores plasmidiais próprios para pequenos insertos (pGEM-T Easy e pCR.4TOPO). Ambos os vetores utilizam a técnica de clonagem TA, em que a adenina (A) dos produtos de PCR gerados pela *Taq* DNA polimerase se liga à timina (T) do vetor. Inicialmente, a clonagem foi realizada usando o vetor pGEM-T Easy para todos os vírus e o DNA plasmidial purificado foi enviado para sequenciamento. O controle positivo com a sequência alvo de SCMV foi o único que a inserção não ocorreu adequadamente. Considerando que mesmo após repetir o processo, a clonagem permaneceu sem êxito, optou-se por utilizar o vetor plasmidial pCR.4 TOPO que diferentemente de pGEM-T Easy já possui a enzima topoisomerase I incorporada, o que facilita a ligação.

O resultado do sequenciamento foi comparado com as sequências de vírus correspondentes disponíveis no GenBank para confirmação da identidade dos insertos clonados. As sequências parciais obtidas foram depositadas no banco de dados do NCBI, conforme registro abaixo:

TABELA 8. Lista dos acessos das sequências parciais de cada vírus depositadas no NCBI.

Vírus	Isolado	CDS	Nº de acesso
Sugarcane mosaic virus	-	HC-PRO e P3 (parcial)	Nd
Maize rayado fino virus	CH_1-1	poliproteína (parcial)	LC843765
Maize striate mosaic virus	CH_1-4	RepA (parcial)	LC843766
Maize yellow mosaic virus	CH_1-3	P2 (parcial)	LC843767
Maize umbra-like virus	-	ORF 2	Nd

* Maize umbra-like virus aguarda autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para que seja depositado no banco de dados do NCBI. Nd = não depositado.

6.5. Análise das curvas-padrão e das curvas de dissociação

Para avaliar a *performance* das reações da PCR quantitativa, foi produzida para cada vírus uma curva-padrão com base no log 10 do nº de cópias

de cada diluição (eixo x) e seus respectivos valores de Cq (eixo y), utilizando cinco diluições seriadas 1:10 (1 ng, 0,1 ng, 10 pg, 1 pg e 0,1 pg) em triplicata.

O coeficiente de regressão linear próximo de 0,999 para todos os vírus indicou uma forte relação linear positiva entre as variáveis. A eficiência das reações foi calculada pela fórmula “Eficiência da PCR = $(10^{(-1/\text{inclinação})} - 1) \times 100$ ” e a faixa dinâmica de detecção variou de 4 a 8 unidades de log 10 do nº cópias do DNA plasmidial, com limite mínimo de detecção na ordem de 10^4 cópias para menor concentração testada, 0,1 pg (Tabela 9; Figura 16; Apêndice C).

TABELA 9. Avaliação da curva-padrão de RT-qPCR e limite mínimo de detecção de cada espécie viral (nº de cópias) para menor diluição testada (0,1 pg).

Vírus	Tamanho do DNA plasmidial (bp)	Eficiência (%)	R ²	Tm média (°C)	Limite teórico testado	Valor de Cq
SCMV	5.031	98,87	0,995	76,13	18.100	23,15
MRFV	3.425	93,93	0,995	87,78	26.600	25,57
MaYMV	3.683	134,43	0,999	85,39	26.400	22,25
MSMV	3.462	79,45	0,999	82,40	24.800	28,41
MULV	3.608	115,29	0,993	84,94	25.300	25,59

A análise *in silico* dos *primers* realizada no OligoAnalyzer™ Tool IDT também mostrou atender aos parâmetros-padrão para não ocorrência de dímeros, com ΔG maiores que -9 kcal/mol, com exceção de MRFV, o que não prejudicou a especificidade da Tm da curva-padrão uma vez que apresentou pico único (Tabela 10 e Figura 17).

TABELA 10. Resultado da análise de possibilidade de formação de dímeros realizada no OligoAnalyzer Tool IDT.

Primer RTqPCR	Hetero-dimer (ΔG)	Homo-dimer (ΔG)
SCMV	-6,5 a -0,96	-7,46 a -0,96
MSMV	-5,49 a -1,34	-8,22 a -0,96
MaYMV	-5,19 a -1,34	-4,52 a -0,96
MRFV	-10,3 a -1,34	-13,09 a -0,96
MULV	-5,02 a -1,47	-9,27 a -1,57
EF-1 α -F	-5,02 a -1,57	-3,9 a -0,96

A diferença de Tm dentre os pares de *primers* ficou dentro da margem indicada (< 1 °C). Apesar dos resultados obtidos para MaYMV, MSMV

e MULV, o protocolo pode ser utilizado para fins de detecção (presença/ausência do patógeno), pois a curva padrão não é obrigatória para ensaios qualitativos.

A especificidade das reações foi avaliada pelas curvas de dissociação (*melting curve*) que apresentaram pico único para cada conjunto de primers (Figura 16) bem como pela visualização de bandas específicas em gel de agarose de 1,5% (Figura 18).

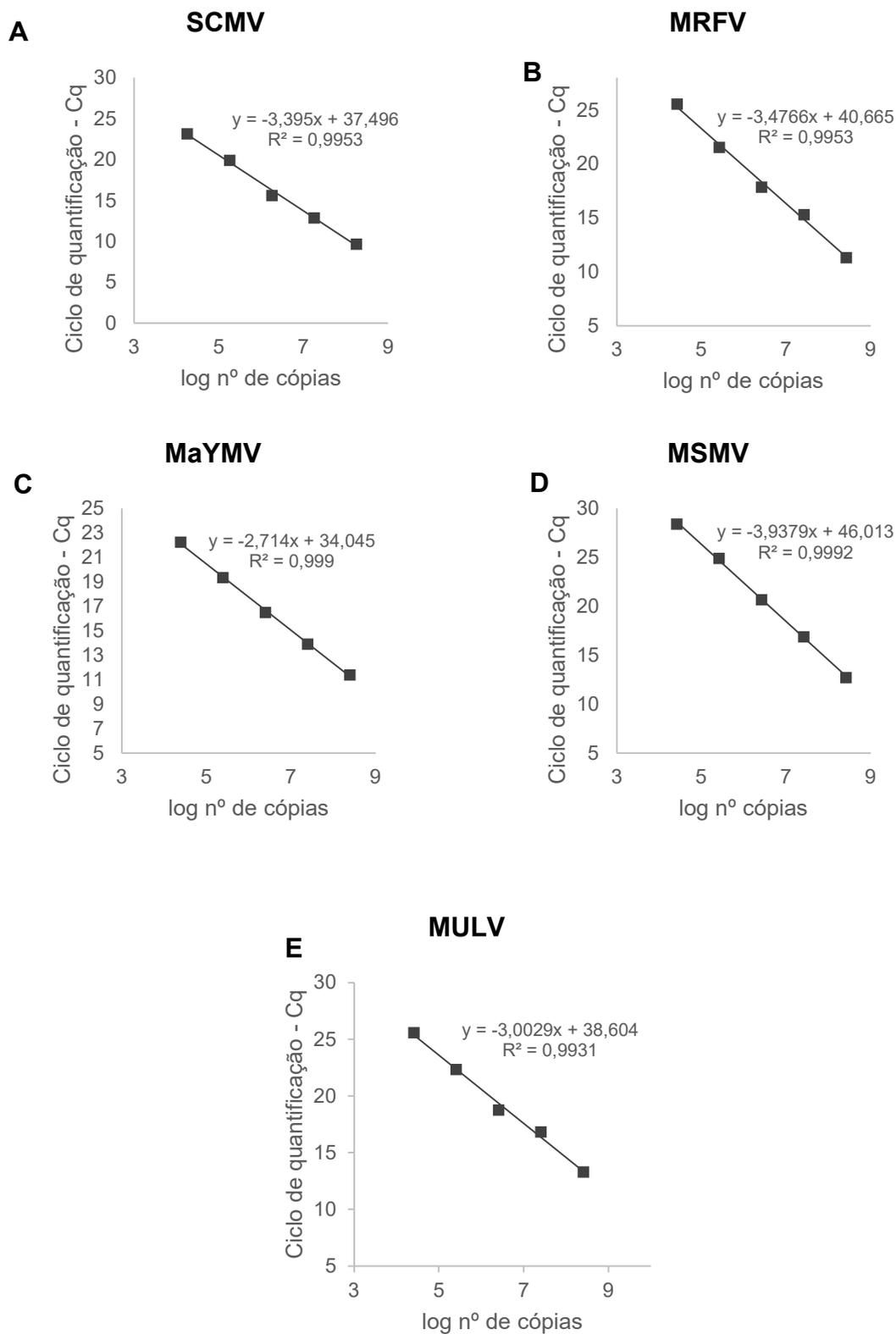


FIGURA 16. Curvas-padrão de cinco diluições seriadas (1:10) geradas a partir do log 10 do número de cópias do DNA plasmidial recombinante contendo a sequência alvo específica de cada vírus versus ciclo de quantificação (Cq). A - SCMV = sugarcane mosaic virus; B - MRFV = maize rayado fino virus; C - MaYMV = maize yellow mosaic virus; D - MSMV = maize striate mosaic virus; e E - MULV = maize umbra-like virus.

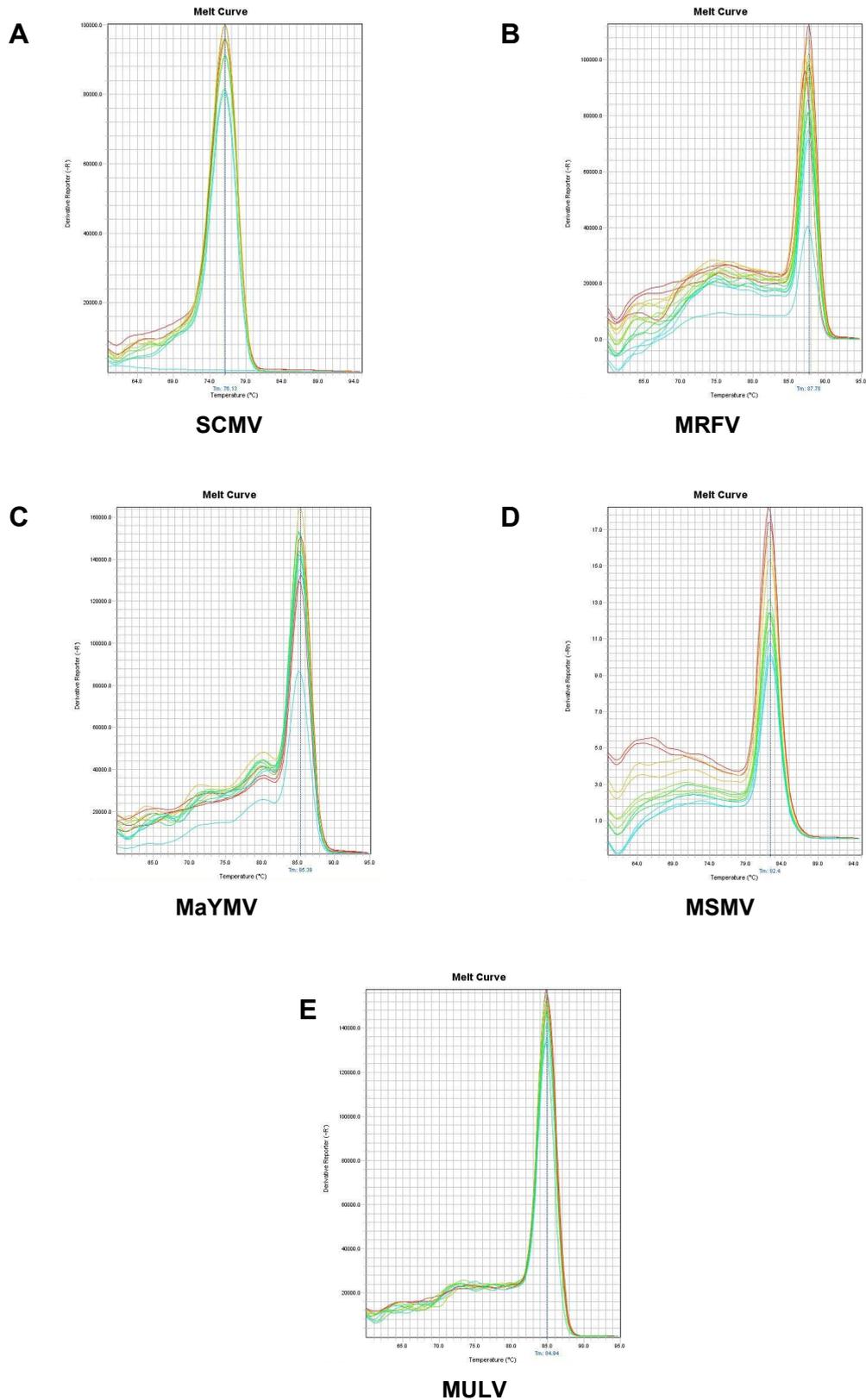


FIGURA 17. Curvas de dissociação (melting curve) com Tm específica para o amplicon de cada vírus. A - SCMV = sugarcane mosaic virus; B - MRFV = maize rayado fino virus; C - MaYMV = maize yellow mosaic virus; D - MSMV = maize striate mosaic virus; e E - MULV = maize umbra-like virus.

6.6. Validação do ensaio de RT-qPCR com amostras de campo

Amostras de milho do DF, MG, BA e PE foram testadas por RT-qPCR individualmente quanto à presença de cada um dos vírus (SCMV, MRFV, MSMV, MaYMV e MULV). Foi escolhida uma ou duas amostras aleatórias de cada região para qual determinado vírus foi identificado, totalizando 14 amostras. Por exemplo, os testes de RT-qPCR para MULV, foram usadas amostras apenas de Juazeiro/BA, pois nas demais localidades este vírus não foi identificado.

Na RT-qPCR de cada vírus, todas as reações com controles positivos amplificaram e apresentaram uma T_m média esperada para *amplicon* de cada vírus (SCMV ~ 76,13 °C; MRFV ~ 87,78 °C; MaYMV ~ 85,39 °C; MSMV ~ 82,40 °C e MULV ~ 84,94 °C) (Tabela 11). Não houve amplificação para os controles negativos, com exceção de MULV que apresentou valores de C_q de 30 e 32 para ambas as réplicas. Esse alto valor de C_q poderia indicar um resultado negativo, mas quando avaliado juntamente da curva de dissociação que apresentou T_m média para o tamanho do *amplicon* do alvo, infere-se que a amplificação foi positiva com baixa concentração de material de partida. Ou seja, houve contaminação dos reagentes. O teste deverá ser repetido para confirmação do resultado (Tabela 11).

As reações com plantas saudas, embora tenham apresentado amplificação, obtiveram uma T_m diferente da T_m da curva-padrão, indicando que se trata de amplificação não específica (fora do alvo), o que poderia facilmente ser mal interpretado como positivo. Reações de RT-PCR confirmaram o resultado negativo para as amostras de plantas saudas (Tabela 11; Figura 19), bem como a eletroforese em gel de agarose das amostras de RT-qPCR (Figura 18). As reações com os *primers* de controle interno (gene do fator de alongação 1- α) tiveram amplificação positiva com T_m de 85,5 °C \pm 1 °C, afastando a possibilidade de falsos negativos. Os resultados obtidos para as amostras de campo por RT-qPCR foram validados por RT-PCR (Figura 19).

TABELA 11. Resultado dos ensaios de RT-qPCR com *primers* específicos para cada alvo e validação adicional por RT-PCR.

Alvo	Amostra	Cq	Tm (°C)	RT-PCR
SCMV	DF 1-4	12,45	76,58	+
	MG 4	32,64	76,43	+
	C+	15,21	76,65	n/a
	NCT	-	-	-
	Sadia	32,90	72,47	-
	Controle interno	18,89	86,24	n/a
MRFV	DF 1-1	13,24	87,34	+
	CE 3.10	8,82	87,34	+
	MG 4	36,98	87,63	+
	PE 5	21,53	77,63	-
	C+	16,45	87,34	n/a
	NCT	-	-	-
	Sadia	22,76	75,98	-
Controle interno	15,93	85,09	n/a	
MaYMV	DF 1-4	15,37	85,24	+
	MG 3	21,05	85,61	+
	PE 5	21,21	85,16	+
	C+	11,76	85,16	n/a
	NCT	-	61,34	-
	Sadia	28,72	74,86	-
Controle interno	17,19	85,16	n/a	
MSMV	DF 1-4	19,10	83,2	+
	CE 3.10	20,89	83,35	+
	MG 9	28,87	70,32	-
	C+	21,84	83,12	n/a
	NCT	-	70,30	-
	Sadia	26,57	80	-
Controle interno	18,89	86,24	n/a	
MULV	CE 3.1	18,74	84,42	+
	CE 3.4	18,65	84,94	+
	C+	16,35	84,64	n/a
	NCT	31,58	84,94	-
	Sadia	20,01	80,08	-
Controle interno	18,35	85,31	n/a	

C+ = controle positivo; NCT = amostra sem molde; n/a = não se aplica; Controle interno = reação com *primers* do gene de referência.

A título exemplificativo, a figura 18 apresenta a comparação da curva de dissociação das amostras testados para MRFV e o respectivo gel de agarose das reações. A amostra P5, de Petrolina/PE, testada com *primers* de MRFV, da mesma forma que as plantas sadias, apresentou valor de Cq dentro da faixa considerada positiva, entretanto um valor da Tm diferente da Tm esperada para o *amplicon* do alvo (Tabela 11). Isso indica que houve amplificação fora do alvo, isto é, um resultado negativo que poderia ser confundido com positivo se interpretado sem a curva de dissociação. Esse

resultado foi confirmado pela eletroforese da reação em gel de agarose e na RT-PCR (Figuras 18 e 19).

Ao contrário, a amostra MG4 apresentou alto valor de Cq (36,98), o que poderia ser interpretado como negativo, mas ao analisar a curva de dissociação, a Tm obtida foi muito próxima da Tm do *amplicon* alvo (controle positivo e demais resultados positivos), sendo, portanto, um resultado positivo. Isso pode ser indício de que a amostra apresenta baixa titulação viral ou que houve alguma falha na leitura da reação. Tanto eletroforese da reação de RT-qPCR quanto a RT-PCR da amostra confirmaram a presença de MRFV na amostra (Figuras 18 e 19).

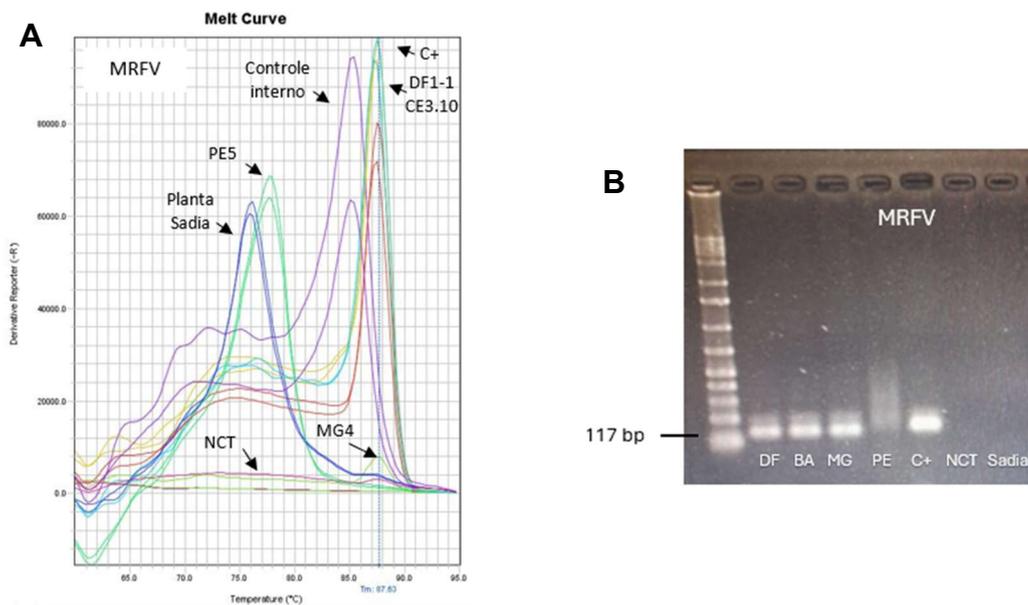


FIGURA 18. Exemplo de análise da curva de dissociação para diferenciar amplificação verdadeiras de falsos positivos. A) Amostras de planta sadia e do estado de PE com pico de Tm menor que Tm média do *amplicon* e amostra de MG com baixa amplificação, mas como Tm igual à Tm do *amplicon*; B) Gel de agarose (1,5%) das reações de RT-qPCR. Marcadores GeneRuler 1 kb DNA ladder e GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Scientific™).

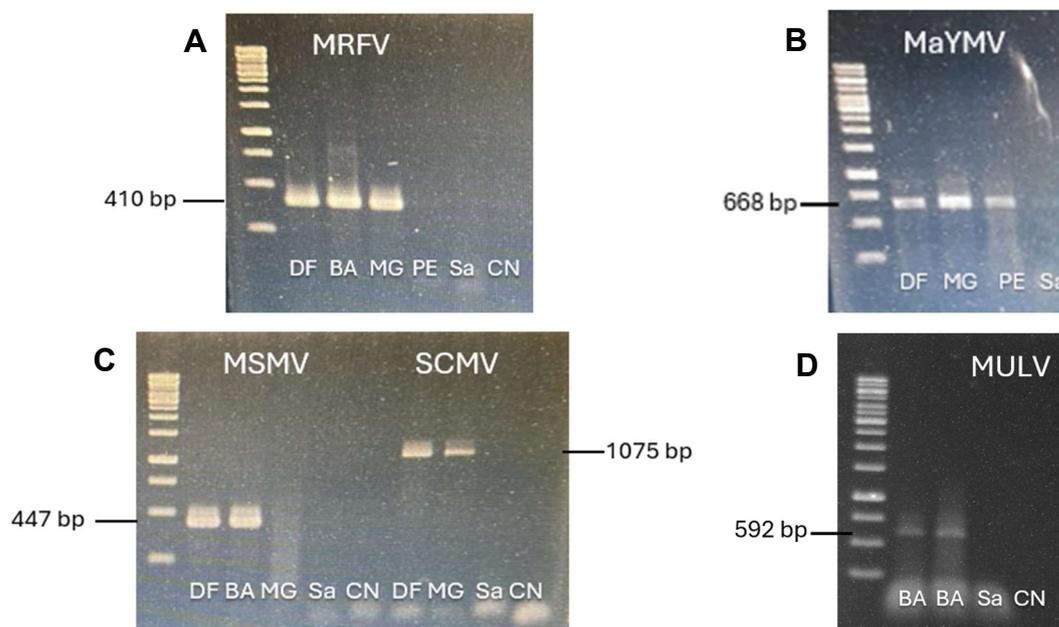


FIGURA 19. Validação do resultado de RT-qPCR por RT-PCR para cada espécie viral. Marcador GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific TM).

7. DISCUSSÃO

Este trabalho trata do desenvolvimento de protocolos de detecção de vírus patogênicos de milho por RT-PCR e RT-qPCR a partir da análise do viroma por HTS. Nesse sentido, buscou-se primeiramente conhecer as espécies virais presentes no milho por meio de uma metodologia não seletiva, o sequenciamento de alto desempenho ou HTS.

Dos dez vírus relatados no Brasil, os resultados do HTS corroboram a presença de quatro (MRFV, SCMV, MaYMV e MSMV) e ainda uma nova ocorrência de MULV, relatado pela primeira vez no Brasil.

Embora johnsongrass mosaic virus (JGMV) tenha sido detectado nos dados de HTS, a RT-PCR de amostras individuais não revelou sua presença em plantas de milho. Destaca-se que o *pool* da qual a sequência-consenso foi recuperada (HM_2022) continha RNA total de vírus semi-purificado de *Brachiaria* spp. e *Panicum* spp., do Campo experimental da Embrapa Gado de Corte e *Paspalum* spp. e *Brachiaria* spp. da Universidade de Brasília.

A ocorrência de JGMV em milho já foi confirmada em vários países, incluindo Austrália, Estados Unidos, Venezuela e África Oriental (Stewart et al.,

2017). Kitajima (2020) levantou relato da presença de JGMV em milho em Ribeirão Preto/SP (2001, por sorodiagnóstico), no entanto, até agora, a confirmação genômica de JGMV no Brasil ocorreu apenas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (Silva et al. 2013), *Panicum maximum* (Camelo-García et al., 2016) e sorgo (Souza et al., 2017).

O JGMV isolado de *P. maximum* não infectou oito variedades de milho por inoculação mecânica (Camelo-García et al., 2016), o que é coerente com o resultado obtido neste estudo. Além disso, as sequências genômicas dos isolados brasileiros de JGMV, coletados na Bahia e em São Paulo (Silva et al., 2013; Camelo-García et al., 2016), mostram baixa identidade de sequência quando comparadas aos isolados de milho em EUA e Argentina. Infere-se, portanto, que o isolados de JGMV no Brasil muito provavelmente não são patógenos importantes nas lavouras de milho. Considerando que é comum encontrar gramíneas forrageiras nas proximidades das plantações de milho, existe um risco potencial de isolados brasileiros de JGMV sofrerem mutações e “saltarem” para o milho, tornando-se infeciosos. Diante dessa ameaça, estudos sobre a diversidade genética dos isolados brasileiros de JGMV estão em andamento por nosso grupo a fim de esclarecer as razões pelas quais os isolados de JGMV atualmente circulantes não infectam milho.

Quanto ao MULV, este foi detectado por RT-PCR em duas amostras de Juazeiro/BA, ambas com infecção mista. A amostra CE 3.1 apresentou resultado positivo para MRFV e MSMV, enquanto a amostra CE 3.4 apresentou resultado positivo para MRFV e SCMV. Apesar do polerovírus MaYMV ter sido detectado no *pool* do HTS, nas amostras de Juazeiro/BA positivas para MULV não foi detectado. A ausência de identificação de vírus auxiliares pertencentes aos gêneros *Luteovirus*, *Enamovirus* e *Polerovirus* também tem sido observada para outros umbra-like, como PMeV2, que se encontra associado ao totivírus PMeV, e o PpVQ, associado ao potyvírus PRSV (Cornejo-Franco et al., 2021). No estudo de Quito-Avila (2022), o MULV detectado no Equador também não foi associado a nenhum polerovírus, apesar de MYDV ter sido detectado no RNA do *pool* de amostras, mas não na amostra individual em que MULV foi identificado. Diante desses resultados, são

necessários mais estudos para entender como ocorre a transmissão natural de MULV.

Tanto as amostras de Juazeiro/BA quanto as do Riacho Fundo/DF e Uberlândia/MG apresentaram uma proporção aproximada de amostras infectadas por MRFV e MSMV simultaneamente (Tabela 7), e ambas apresentavam sintomas de listra (estriado) fraco a forte e folhas arroxeadas. Essa associação de MRFV e MSMV pode ocorrer possivelmente devido ao compartilhamento do mesmo vetor viral, a cigarrinha do milho *Dalbulus maidis*. Canale et al. (2023) relataram a presença de MRFV, e mais recentemente de MSMV, integrando o patossistema do enfezamento do milho, juntamente com "Maize bushy stunt phytoplasma" ou "*Candidatus* Phytoplasma asteris" (Subgrupo 16Srl-B) e o *Spiroplasma kunkelii*.

Os resultados da RT-PCR também apontaram para uma proporção aproximada da presença de SCMV e MaYMV nas mesmas amostras de Uberlândia/MG e Riacho Fundo/DF, mas ausente nas amostras de Juazeiro/BA (Tabela 7). Gonçalves et al. (2020) relataram o efeito sinérgico dessa infecção mista de MaYMV e SCMV, na intensificação de sintomas, reproduzindo experimentalmente uma condição grave originalmente observada em campo. Na China, o agravamento dos sintomas pela infecção mista de MaYMV e SCMV também foi registrado por Bernreiter et al. (2017).

SCMV e MaYMV também possuem em comum o mesmo vetor. Todavia, enquanto SCMV apresenta vários vetores (*Hysteroneura setariae*, *Rhopalosiphum maidis*, *Rhopalosiphum padi*, *Schizaphis graminum*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*), os estudos de transmissão de MaYMV confirmaram apenas *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum* como vetores, sendo este último menos eficiente que o primeiro (Ohlson, et al., 2024).

Em regra, vírus de DNA circular são detectados a partir da extração de DNA ou de RNA/DNA total seguido da amplificação em círculo rolante (RCA) (Inoue-Nagata et al., 2004). Fontenele et al (2017), ao detectar MSMV pela primeira vez no Brasil, realizou a extração de ácido nucleico viral usando Kit viral DNA/RNA (Zymo Research) e RCA com kit de amplificação Illustra TempliPhi™ (GE Healthcare); sendo o produto sequenciado na plataforma Illumina Nextseq500. Contudo, a aplicação de metodologia de detecção de vírus de RNA

usada neste estudo não impediu a detecção de MSMV. Sugere-se que o protocolo de extração de RNA não exclui o DNA do mastrevírus tendo em vista seu pequeno tamanho (2,7kbp) e a transcrição reversa não inibe a amplificação do DNA uma vez que não houve tratamento com DNAses. Outra hipótese seria no sentido de que houve amplificação de mRNA, entretanto, o resultado obtido no HTS mostrou *reads* cobrindo todo o genoma (mesmo usando kit de extração de RNA), incluindo regiões não codificantes (íntrons) que são removidas por *splicing* na transcrição do mRNA maduro. Isso sugere que o material amplificado seja realmente DNA do vírus.

Problemas de falsos negativos em testes diagnósticos podem ocorrer quando *primers* são desenhados com base em sequências de bancos de dados que não refletem a amplitude da diversidade genética viral existente, pois esta pode ser afetada por fatores locais, como hospedeiros e condições ambientais (Rubio et al, 2020). Para evitar isso, este estudo, ao desenhar os *primers* de RT-PCR e RT-qPCR, realizou o alinhamento múltiplo entre as sequências depositadas no GenBank, oriundas do Brasil e do exterior, e as sequências-consenso obtidas pelo HTS.

As curvas-padrão de SCMV e MRFV apresentaram eficiência entre 90% e 110% e coeficiente de correlação (R^2) próximo de 0,999, atendendo aos padrões recomendados. Isso permite que sejam usadas para determinar a concentração de material viral nas amostras. Em contraste, as curvas-padrão de MaYMV, MSMV e MULV atingiram apenas valores próximos dos desejados, o que não impede que os *primers* sejam usados para fins de detecção. A qualidade do *template* não parece ser o motivo que afetou a eficiência dessas reações, pois o RNA de todas as amostras apresentou uma relação A260/280 próxima a 2.

Importante registrar que questões técnicas, como refluxo de vapor e bolhas de ar, podem interferir na uniformidade da temperatura e na distribuição dos reagentes, impactando a eficiência da reação (Thermo Fisher, 2014). Até mesmo a adequada vedação do tubo é relevante. Durante a ciclagem térmica, especialmente em altas temperaturas (como 95 °C), a água pode volatilizar e condensar nas paredes do tubo, formando gotículas que retornam aos reagentes. Além disso, interferências químicas, como a presença de

contaminantes (fenol ou etanol) e flutuações na leitura de fluorescência devido à descalibração do aparelho podem afetar a precisão e a reprodutibilidade dos dados (Ibidem).

De todo modo, importa que, para este estudo de detecção, as curvas de dissociação das curvas-padrão (controles positivos) apresentaram picos únicos de temperatura de *melting* (T_m) para todos os alvos, o que permitiu diferenciar reações não específicas, ou artefatos do sistema, na análise das amostras de campo. O controle com plantas saudáveis foi extremamente relevante para discriminar falsos positivos por meio da análise da curva de dissociação, pois apesar de apresentarem valores de C_q dentro da faixa considerada positiva, a T_m obtida não coincidiu com a T_m do *amplicon* esperado para os *primers* desenhados para cada vírus, concluindo-se pelo resultado negativo, que foi confirmado pela RT-PCR. Situação semelhante ocorreu em ensaio de RT-qPCR baseado em SYBR Green para detectar e quantificar o RNA 1 e o RNA 2 de três espécies de furovírus de trigo em que foi observado um baixo valor de C_t para o *amplicon* de RNA1 de SBWMV, entretanto pela variação de $T_m > 1^\circ\text{C}$ foi possível discriminar o resultado como negativo (Gauthier et al., 2024).

Quanto aos limites mínimos de detecção, a menor diluição testada (0,1 pg) apresentou 10^4 cópias e uma C_q variando de 17 a 28, indicando que mais duas diluições decimais, 10 fg e 1 fg (Figura 16; Apêndice C), podem ser testadas para definição do menor nº cópias detectável. Bernardo et al. (2021) no desenvolvimento de teste de RT-qPCR baseado em SYBR Green para detecção de maize chlorotic mottle virus (MCMV) em lotes de sementes de milho, determinou o limite mínimo de detecção (LoD) de 1 fg.

Por fim, os resultados obtidos na RT-qPCR foram confirmados por RT-PCR, reforçando a necessidade de que os valores de C_q sejam interpretados juntamente com a análise da curva de dissociação a fim de evitar leituras equivocadas. Para os alvos MaYMV, MSMV e MULV, novos *primers* serão testados como meio de melhorar a eficiência das reações para que os protocolos sejam utilizados também para quantificação viral.

8. CONCLUSÃO

O HTS tem sido tornado um valioso instrumento para o monitoramento fitossanitário, pois fornece informações que permitem aos pesquisadores acompanharem a evolução da virosfera, identificando novos vírus ou novas variantes, em amostras sintomáticas ou assintomáticas.

Estudos sobre a diversidade genética dos isolados brasileiros de JGMV são necessários para esclarecer as razões pelas quais estes não infectam o milho.

Possivelmente MULV não depende de um membro dos gêneros *Luteovirus*, *Enamovirus* e *Polerovirus* para sua movimentação e transmissão, ao contrário dos umbravírus. Esse resultado, juntamente com outros casos relatados, reforça a tese de que a criação de um novo gênero dentro da família *Tombusviridae* seja necessária.

A metodologia utilizada neste trabalho se mostra ampla e eficiente para detectar tanto vírus de RNA quanto de DNA (mastrevírus), atendendo ao objetivo geral inicialmente proposto.

O uso da PCR em tempo real baseada em SYBR Green se mostrou tão eficiente quanto a RT-PCR, com a vantagem adicional de não necessitar da etapa de eletroforese. Estudos mais detalhados são necessários para comparar a sensibilidade entre os dois métodos.

A análise da curva de dissociação é essencial para eliminar o risco de falsos positivos nos testes de RT-qPCR, além do uso de controles positivo, negativo e interno para se obter resultados confiáveis. Para minimizar a chance de artefatos no sinal de amplificação e garantir precisão no valor de C_q, é fundamental otimizar as condições da reação, garantir a pureza dos reagentes e realizar uma análise cuidadosa dos dados.

A metodologia de RT-qPCR desenvolvida neste trabalho está sendo aperfeiçoada e poderá ser usada em programas de fiscalização fitossanitária, certificação de germoplasma para produção de mudas livres de vírus e estudos de levantamento de ocorrência e incidência do milho no Brasil. Tais informações contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de controle mais eficazes que poderão ser elaboradas visando reduzir perdas e trazer mais segurança alimentar.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMIAN, P. E. et al. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 320–326, 2013.

AGINDOTAN, B. O.; Domier, L. L.; Bradley, C. A. Detection and characterization of the first North American mastrevirus in switchgrass. **Arch. Virol.** 160:1313-1317, 2015.

ANTUNES, T. F. S. et al. The dsRNA Virus Papaya Meleira Virus and an ssRNA Virus Are Associated with Papaya Sticky Disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

AVILA, C. J. et al. **Cigarrinha-do-milho: desafios ao manejo de enfezamentos e viroses na cultura do milho**. Embrapa Agropecuária Oeste, 2022.

BATISTA, J. G. et al. First report of maize striate mosaic virus (Geminiviridae) in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 16, n. 1, p. 16, 24 jun. 2021.

BERGER, D. K. Diseases of maize/corn. In: OLIVER, R. P. et al. **Agrios' Plant Pathology**. 6ª edition. Cambridge: Elsevier Academic Press, p. 739-746, 2024.

BERNADO, P. et al. Detection of Diverse Maize Chlorotic Mottle Virus Isolates in Maize Seed. **Plant Disease**, v. 105, n. 6, p 1596-1601. 2021.

BERNREITER, A. et al. First report of Maize yellow mosaic virus infecting maize in Ecuador. **New Disease Reports**, v. 36, n. 1, p. 11–11, 2017.

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**, v. 120, n. 2, p. 177–188, 2008.

BLAWID, R.; SILVA, J. M. F.; NAGATA, T. Discovering and sequencing new plant viral genomes by next-generation sequencing: description of a practical pipeline. **Annals of Applied Biology**, v. 170, n. 3, p. 301–314, 2017.

BUSTIN, S. A. Improving the quality of quantitative polymerase chain reaction experiments: 15 years of MIQE. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 96, p. 101249, 1 abr. 2024.

CAMELO-GARCÍA, V. M. et al. Genome organization and host range of a Brazilian isolate of johnsongrass mosaic virus. **Archives of Virology**, v. 161, n. 5, p. 1335–1341, 1 maio 2016.

CANALE, M. C.; NESI, C. N.; CASTILHOS, R. V. Abundance of *Dalbulus maidis* and impact of maize rayado fino disease on different genotypes in field conditions

in Santa Catarina, Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 48, n. 6, p. 675–684, 2023.

CAO, M.; LAN, P.; Li, F.; Abad, J.; Zhou, C.; Li, R. Genome characterization of sweet potato symptomless virus 1: A mastrevirus with an unusual nonanucleotide sequence. **Arch. Virol.** 162:2881-2884, 2017.

SOUZA, I. R. P. et al. Johnsongrass mosaic virus infecting sorghum in Brazil. **International Journal of Current Research**, n. 9, v. 12, p.63415-63422, 2017.

CHEN, S. et al. Characterization of a Novel Polerovirus Infecting Maize in China. **Viruses**, v. 8, n. 5, p. 120, 2016.

COCKERILL, F. R.; UHL, J. R. Applications and Challenges of Real-Time PCR for the Clinical Microbiology Laboratory. Em: REISCHL, U.; WITTEWER, C.; COCKERILL, F. (Eds.). **Rapid Cycle Real-Time PCR — Methods and Applications: Microbiology and Food Analysis**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 3–27, 2002.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. Grãos: Safra 2023/24. **12º levantamento**, v. 11, n. 12, set., 2024a. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> . Acessado em: 1º de outubro de 2024.

CONAB. Planilha **Série histórica: milho total (1ª, 2ª e 3ª safras)**. 2024b. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras/itemlist/category/910-Milho> . Acessado em: 1º de outubro de 2024.

CORNEJO-FRANCO, J. et al. An Umbra-related Virus Found in *Vasconcellea X Heilbornii* (Caricaceae). **Research Square**, v. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-196384/v1> .

CORNEJO-FRANCO, J. F.; ALVAREZ-QUINTO, R. A.; QUITO-AVILA, D. F. Transmission of the umbra-like Papaya virus Q in Ecuador and its association with meleira-related viruses from Brazil. **Crop Protection**, v. 110, p. 99–102, 2018.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e de micoplasma no milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v. 4, n. 4, p. 39 41, 1971.

COSTA, T. M. et al. The recombinant isolate of cucurbit aphid-borne yellows virus from Brazil is a polerovirus transmitted by whiteflies. **Plant Pathology**, v. 69, n. 6, p. 1042–1050, 2020.

CRUZ, J. C. et al. **A cultura do milho**. Embrapa Milho e Sorgo, 517 p., 2008.

DA COSTA, R. V. et al. Corn stunt disease complex increases charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) under field conditions. **Tropical Plant Pathology**, v. 48, n. 3, p. 283–292, 2023.

DEL PONTE, E. M.; MIZUBUTI, E. S. G. Epidemics: Disease in populations. In: OLIVER, R. P. et al. **Agrios' Plant Pathology**. 6ª edition. Cambridge: Elsevier Academic Press, p. 227-245, 2024.

EPPO, Global Database. **Potyvirus sacchari**. Disponível em <https://gd.eppo.int/taxon/SCMV00/hosts> . Acessado em: 15 de outubro de 2024.

FONTENELE, R. S. et al. Discovery of the first maize-infecting mastrevirus in the Americas using a vector-enabled metagenomics approach. **Archives of Virology**, v. 163, n. 1, p. 263–267, jan. 2018.

GAUTHIER, K. et al. Detection and Quantification of Soil-Borne Wheat Mosaic Virus, Soil-Borne Cereal Mosaic Virus and Japanese Soil-Borne Wheat Mosaic Virus by ELISA and One-Step SYBR Green Real-Time Quantitative RT-PCR. **Viruses**, v. 16, n. 10, p. 1579, out. 2024.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**. 6, 995–1001.

GHOSH, S. et al. Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly Bemisia tabaci. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, 2019.

GONÇALVES, M. C. et al. First Report of Maize yellow mosaic virus Infecting Maize in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 12, p. 2156, dez. 2017.

GONÇALVES, M. C. et al. Aphid transmission of maize yellow mosaic virus: an emerging polerovirus. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 5, p. 544–549, 1 out. 2020.

GONÇALVES, M. C. Viroses do milho: epidemiologia, sintomas e diagnose, IN: Duarte et al. **3 Décadas De Inovações Na Cultura Do Milho Safrinha: Avanços e Desafios**. Campinas, SP: IAC, p. 215-234, 2021.

HAMMOND, R. W.; BEDENDO, I. P. Molecular confirmation of Maize rayado fino virus as the Brazilian corn streak virus. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 6, p. 601–603, dez. 2005.

HAMMOND, R. W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 78, n. 12, p. 3153–3159, 1997.

HAMMOND, R. W.; RAMIREZ, P. Molecular Characterization of the Genome of Maize Rayado Fino Virus, the Type Member of the Genus Marafivirus. **Virology**, v. 282, n. 2, p. 338–347, abr. 2001.

HIGUCHI R.; DOLLINGER, G.; WALSH, S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotecnology**, v. 10, 413-417, 1992.

HULL, R. Symptoms and Host Range. In: HULL, R. **Plant Virology**. 5^a edition. Cambridge: Elsevier Academic Press, p. 144-198, 2014.

ICTV, 2011a. Family: *Tombusviridae*. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Tombusviridae . Acessado em 30 de outubro de 2024.

ICTV, 2011b. Family: *Tymoviridae*. Disponível em: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Tymoviridae . Acessado em 15 de outubro de 2024.

ICTV, 2018. Family: *Potyviridae*. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/potyviridae/potyviridae/potyvirus> . Acessado em 17 de outubro de 2024.

ICTV, 2024. Family: *Geminiviridae*. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/geminiviridae/geminiviridae>. Acessado em 15 de outubro de 2024.

INOUE-NAGATA, A. K. et al., A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ø29 DNA polymerase. *Journal of virological methods*, v. 116, p. 209-211. 2004.

JEONG, J.-J.; JU, H.-J.; NOH, J. A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. **Research in Plant Disease**, v. 20, n. 3, p. 173–181, 30 set. 2014.

JONES, R. A. C. Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. **Plants**, v. 10, n. 233, 2021.

KEARSE M., et al., Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-9, 2012.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, n. 2, 2020.

KOKANE, A. D. et al. Development of a SYBR Green-based RT-qPCR assay for the detection of Indian citrus ringspot virus. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, p. 359, jul. 2021.

LAPPE, R. R. et al. Metagenomic identification of novel viruses of maize and teosinte in North America. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 767, 23 nov. 2022.

LEVIN, R. E. The Application of Real-Time PCR to Food and Agricultural Systems. A Review. **Food Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 97–133, jan. 2004.

LI, L. et al. Study on seed transmission of Sugarcane mosaic virus in maize. **Acta Phytopathologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 37-42, 2004.

LIU, J. et al. Structural Analysis and Whole Genome Mapping of a New Type of Plant Virus Subviral RNA: Umbravirus-Like Associated RNAs. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 646, abr., 2021.

LU, G. et al. Sugarcane Mosaic Disease: Characteristics, Identification and Control. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1984, set. 2021.

MAR, T. B. et al. Molecular identification based on coat protein sequences of the Barley yellow dwarf virus from Brazil. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 6, p. 428–434, dez. 2013.

OHLSON, E. W.; KHATRI, N.; WILSON, J. R. Experimental Host and Vector Ranges of the Emerging Maize Yellow Mosaic Polerovirus. **Plant Disease**, v. 108, n. 5, p. 1246–1251, maio 2024.

PALANGA, E. et al. First report of Maize yellow mosaic virus infecting maize in Burkina Faso. **New Disease Reports**, v. 35, p. 26, 2017.

POOJARI, S. et al. SYBR® Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 235, p. 112–118, set. 2016.

QUITO-AVILA, D. F. et al. Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, n.1, p. 199–204, 2015.

QUITO-AVILA, D. F. et al. Two new umbravirus-like associated RNAs (ulaRNAs) discovered in maize and johnsongrass from Ecuador. **Archives of Virology**, v. 167, n. 10, p. 2093–2098, 1 out. 2022.

ROBERTS, C. A. et al. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. **Journal of Virological Methods**, v. 88, n. 1, p. 1–8, jul. 2000.

RUBIO L. et al. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. **Frontiers in Plant Science**. v. 11, n. 1092. 2020.

RUIZ POSSE, A. et al. First report of *Maize striate mosaic virus*, a mastrevirus infecting *Zea mays* in Argentina. **New Disease Reports**, v. 47, n. 2, p. e12186, abr. 2023.

RUIZ-RUIZ, S. et al. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 160, n. 1–2, p. 57–62, set. 2009.

SABATO, E. DE O. Manejo do risco de enfezamentos e da cigarrinha no milho. **Comunicado Técnico 226**. Embrapa Milho e Sorgo. 18p, maio, 2018.

SHUKLA, D. D. et al. Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. Em: BARNETT, O. W. (Ed.). **Potyvirus Taxonomy**. Vienna: Springer, 1992. p. 363–373.

SIGNORET, P. A. Cereal viruses: maize/corn. **Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology**, p. 383-389, 2010.

SILVA, K. N. et al. First Report of Johnsongrass mosaic virus (JGMV) Infecting Pennisetum purpureum in Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 7, p. 1003–1003, jul. 2013.

SMIRNOVA, E. et al. Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Polioviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, 2015.

SNIHUR, H.; KHARINA, A.; KALIUZHNA, M.; CHUMAK, V.; BUDZANIVSKA, I. First Report of Sugarcane Mosaic Virus in Zea mays L. in Ukraine. **Mikrobiolohichnyi Zhurnal**, v. 83, n. 5, p. 58–66, 17 out. 2021.

SOUZA, C. A. et al. First Report of Sweet Potato Symptomless Virus 1 Infecting Ipomoea batatas in Brazil. **Plant Disease**, v. 102, n. 10, p. 2052–2052, out. 2018.

STEWART, L. R. et al. Johnsongrass mosaic virus Contributes to Maize Lethal Necrosis in East Africa. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1455–1462, ago. 2017.

TALIANSKY, M. E.; ROBINSON, D. J. Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 1951–1960, 2003.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Real-time PCR handbook**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/institution/Thermo-Fisher-Scientific/post/Real-Time-PCR-Handbook-6671801c315dc9e5f009ae8d>. Acessado em: 9 de outubro de 2024.

TORRE, C. et al. Comparison of DAS-ELISA and qRT-PCR for the detection of cucurbit viruses in seeds. **Annals of Applied Biology**, v. 176, n. 2, p. 158–169, mar. 2020.

USDA. **USDA forecasts US corn production down and soybean production up from 2023**. Disponível em: <https://www.nass.usda.gov/Newsroom/2024/08-12-2024.php>. Acessado em 1º de outubro de 2024a.

USDA. Production – Corn. **Top Producing Countries**. Disponível em <https://fas.usda.gov/data/production/commodity/0440000> . Acessado em 1º de outubro de 2024b.

VARGA, A.; JAMES, D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. **Journal of Virological Methods**, v. 123, n. 2, p. 213–220, fev. 2005.

VILANOVA, E. S. et al. First Report of a Mastrevirus (Geminiviridae) Transmitted by the Corn Leafhopper. **Plant Disease**, v. 106, n. 5, p. 1330–1333, maio 2022.

WU, L. et al. *Sugarcane mosaic virus* – Long history but still a threat to industry. **Crop Protection**, v. 42, p. 74–78, 1 dez. 2012.

YAHAYA, A. et al. First report of Maize yellow mosaic virus infecting sugarcane (*Saccharum* spp.) and Itch Grass (*Rottboellia cochinchinensis*) in Nigeria. **Plant Disease**, v. 101, p. 1335, 2017.

ZHANG, K. et al. Selection of reference genes for gene expression studies in virus-infected monocots using quantitative real-time PCR. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 1, p. 7–14, out. 2013.

APÊNDICE A - Levantamento de acessos de genoma completo e parcial registrados no NCBI como vírus patógenos de milho.

Nº item	Nome do vírus (versão binomial)	Nº de acessos com genoma completo	Nº de acessos com genoma parcial	Total Geral
1	Barley virus G (<i>Polerovirus BVG</i>)		2	2
2	Barley yellow dwarf virus PAV (<i>Luteovirus pavhordei</i>)		16	16
3	Barley yellow dwarf virus-PAS (<i>Luteovirus pashordei</i>)	1	1	2
4	Brome mosaic virus (<i>Bromovirus BMV</i>)		6	6
5	Cucumber mosaic virus (<i>Cucumovirus CMV</i>)	3	6	9
6	Emaravirus tritici (<i>Emaravirus tritici</i>)		1	1
7	Ethiopia maize-associated virus		2	2
8	High Plains virus		2	2
9	Hubei picorna-like virus 55		3	3
10	Iranian johnsongrass mosaic virus (<i>Potyvirus zeatessellati</i>)	1	12	13
11	Johnsongrass mosaic virus (<i>Potyvirus halapensis</i>)	1	4	5
12	Maize associated ampelovirus		1	1
13	Maize associated clostervirus		1	1
14	Maize associated foveavirus		1	1
15	Maize associated partiti-like virus		3	3
16	Maize associated rhabdovirus	2		2
17	Maize associated totivirus (<i>Totivirus jyukyu</i>)	5	21	26
18	Maize bymovirus A		2	2
19	Maize chlorotic dwarf virus (<i>Waikavirus zea</i>)	1		1
20	Maize chlorotic mottle virus (<i>Machlomovirus zea</i>)	97	74	171
21	Maize dwarf mosaic virus (<i>Potyvirus zeananus</i>)	15	163	178
22	Maize Iranian mosaic nucleorhabdovirus (<i>Alphanucleorhabdovirus zeiranense</i>)	13	74	87
23	Maize Iranian mosaic virus	1		1

	<i>(Alphanucleorhabdovirus zeairanense)</i>			
24	Maize mosaic nucleorhabdovirus	1		1
	<i>(Alphanucleorhabdovirus maydis)</i>			
25	Maize necrotic streak virus	2		2
	<i>(Zeavirus zaeae)</i>			
26	Maize pteridovirus	1	1	2
27	Maize pteridovirus 1		2	2
28	Maize rayado fino virus	1	45	46
	<i>(Marafivirus maydis)</i>			
29	Maize red stripe virus		1	1
30	Maize rough dwarf virus	81	41	122
	<i>(Fijivirus zaeae)</i>			
31	Maize sterile stunt virus	1		1
	<i>(Cytorhabdovirus hordei)</i>			
32	Maize streak dwarfing virus	5		5
	<i>(Mastrevirus fulleri)</i>			
33	Maize streak Reunion virus	6	5	11
	<i>(Mastrevirus bourbonense)</i>			
34	Maize streak virus	614	72	686
	<i>(Mastrevirus fulleri)</i>			
35	Maize streak virus	2	1	3
	<i>(Mastrevirus storeyi)</i>			
36	Maize striate mosaic virus	14		14
	<i>(Mastrevirus striatis)</i>			
37	Maize suscal virus		1	1
38	Maize umbra-like virus 1	2		1
39	Maize white line mosaic virus	2		2
	<i>(Aureusvirus zaeae)</i>			
40	Maize yellow dwarf virus RMV	2	3	5
	<i>(Pterovirus MYDVRMV)</i>			
41	Maize yellow dwarf virus-RMV2	2	1	3
	Maize yellow mosaic virus			
42	Maize yellow mosaic virus	23	105	128
	<i>(Pterovirus MAYMV)</i>			
43	Maize yellow striate virus	2	1	3
	<i>(Cytorhabdovirus maysflavostriatis)</i>			
44	Maize yellow stripe virus		6	6
45	Maize-associated betaflexivirus		1	1
46	Maize-associated picornavirus		6	6
47	Maize-associated pteridovirus	4	4	8
	<i>(Pteridovirus maydis)</i>			
48	Maize-associated tombusvirus	1	1	2
49	Maize-associated totivirus 1	2		2

	<i>(Totivirus shichi)</i>			
50	Maize-associated totivirus 2	2	1	3
51	Maize-associated totivirus 3	1	6	7
52	Maize-associated trichovirus 1		1	1
53	Maize-associated trichovirus 2		1	1
54	Mal de Rio Cuarto virus	12	1	13
	<i>(Fijivirus cuartoense)</i>			
55	Morogoro maize-associated virus	2	4	6
	<i>(Alphanucleorhabdovirus morogoromaydis)</i>			
56	North American maize-associated mastrevirus	1		1
57	Panicum streak virus	1		1
	<i>(Mastrevirus panici)</i>			
58	Pennisetum mosaic virus	18	9	27
	<i>(Potyvirus penniseti)</i>			
59	Rice black gall dwarf virus		5	5
60	Rice black streaked dwarf virus	173	552	725
	<i>(Fijivirus alporyzae)</i>			
61	Rottboellia yellow mottle virus	2		2
	<i>(Sobemovirus ROMOV)</i>			
62	Sorghum mosaic virus		1	1
	<i>(Potyvirus sorghitessellati)</i>			
63	Southern rice black-streaked dwarf virus	3	17	20
	<i>(Fijivirus boryzae)</i>			
64	Sugarcane mosaic virus	108	206	314
	<i>(Potyvirus sacchari)</i>			
65	Tenuivirus zeae	12	34	46
	<i>(Tenuivirus zeae)</i>			
66	Tobacco mosaic virus		1	1
	<i>(Tobamovirus tabaci)</i>			
67	Turnip ringspot virus		6	6
	<i>(Comovirus rapae)</i>			
68	Wheat dwarf India virus	3		3
	<i>(Mastrevirus tritici)</i>			
69	Wheat mosaic virus	9	3	12
	<i>(Emaravirus tritici)</i>			
70	Wheat streak mosaic virus		2	2
	<i>(Tritimovirus tritici)</i>			
71	Zea mays polerovirus	1		1

APÊNDICE B. Lista dos isolados depositados no banco de dados do NCBI utilizados no alinhamento múltiplo com as sequências obtidas no HTS para escolha das regiões mais conservadas.

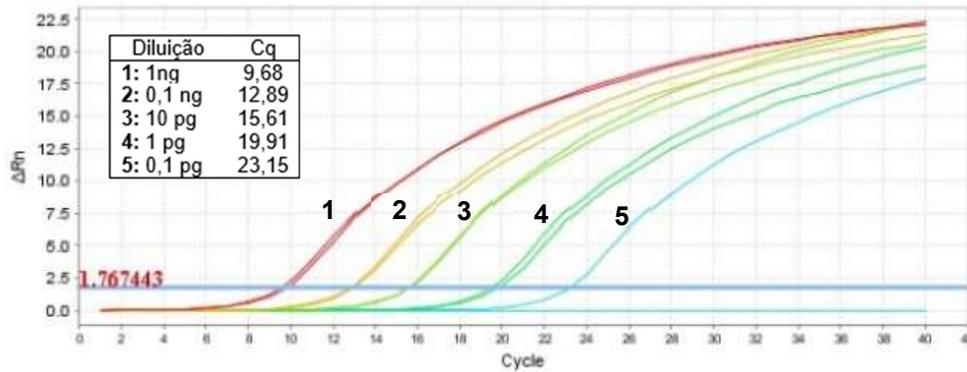
Vírus	Gênero	Número de acesso	Local do isolado
Maize rayado fino virus	<i>Marafivirus</i>	KM523134	EUA
		AF265566	Costa Rica
Sugarcane mosaic virus	<i>Potyvirus</i>	JX188385	EUA
		JX237862	Argentina
		JX237863	Argentina
		MN203189	Mexico
		OQ060499	Argentina
Maize umbra-like virus	Umbra-like, não tem gênero	OM937759	Equador
		OK018180	Mexico
Maize striate mosaic virus	<i>Mastrevirus</i>	MF167297	Brasil
		MF167298	Brasil
		MF167299	Brasil
		MF167300	Brasil
		MF167301	Brasil
		MF167302	Brasil
		MF167303	Brasil
		MF167304	Brasil
		MF167305	Brasil
		MF167306	Brasil
		MF167307	Brasil
		MN535988	Brasil
		MN535989	Brasil
		OP811251	Argentina
Maize yellow mosaic virus	<i>Polerovirus</i>	KT992824	China
		KU179221	China
		KU291107	China
		KY378940	China
		KY940544	Brasil

MF385583	China
MF684369	Etiópia
MG570476	África do Sul
MK652148	China
MK652150	China
MN943641	África do Sul
MT809617	Tanzânia
MW036244	Tanzânia
MW447649	EUA
OK331995	China

APÊNDICE C. Gráficos de amplificação mostrando triplicatas de cinco diluições seriadas 1:10 de cada vírus.

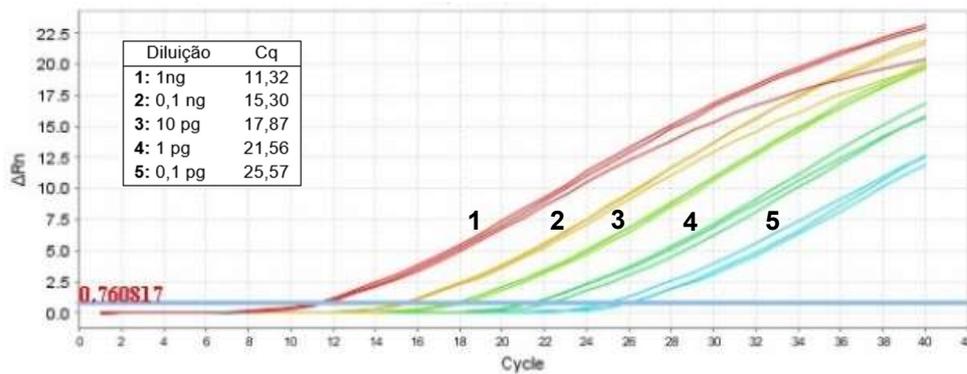
A

SCMV



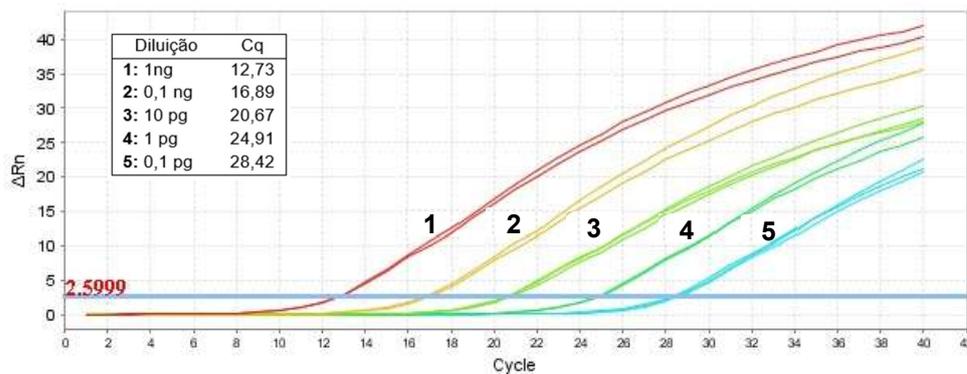
B

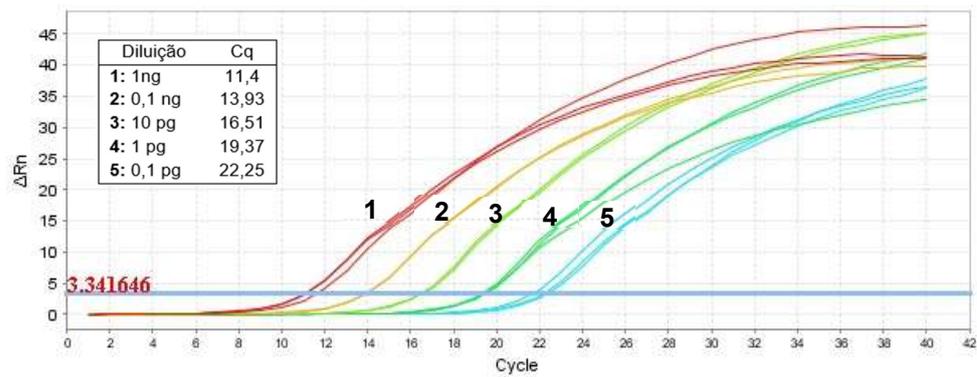
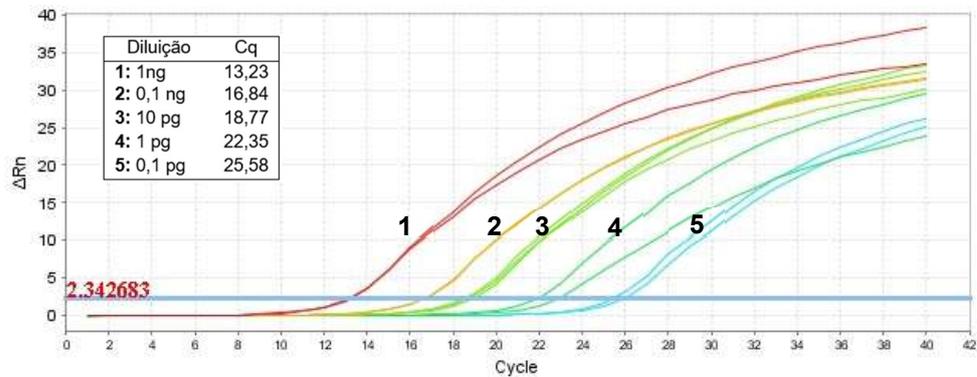
MRFV



C

MSMV



D**MaYMV****E****MULV**

* valor de fluorescência normalizada (ΔR_n) versus ciclo de amplificação.

APÊNDICE D. Géis de agarose das reações de RT-PCR para confirmação da planta hospedeira.

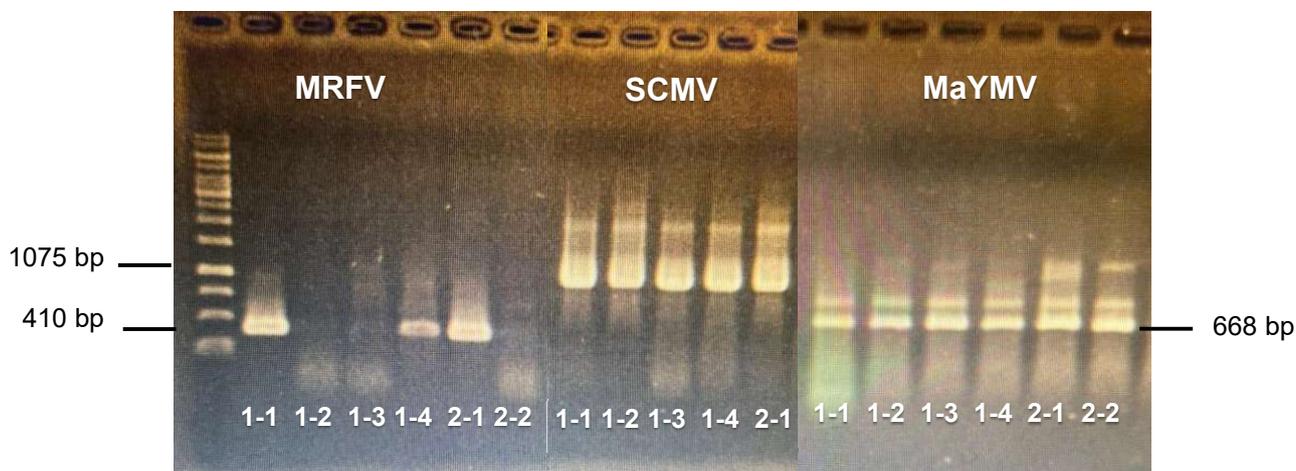


Figura C1. Teste de hospedeiros com amostras individuais oriundas do DF. RT-PCR. A) MRFV e SCMV; B)

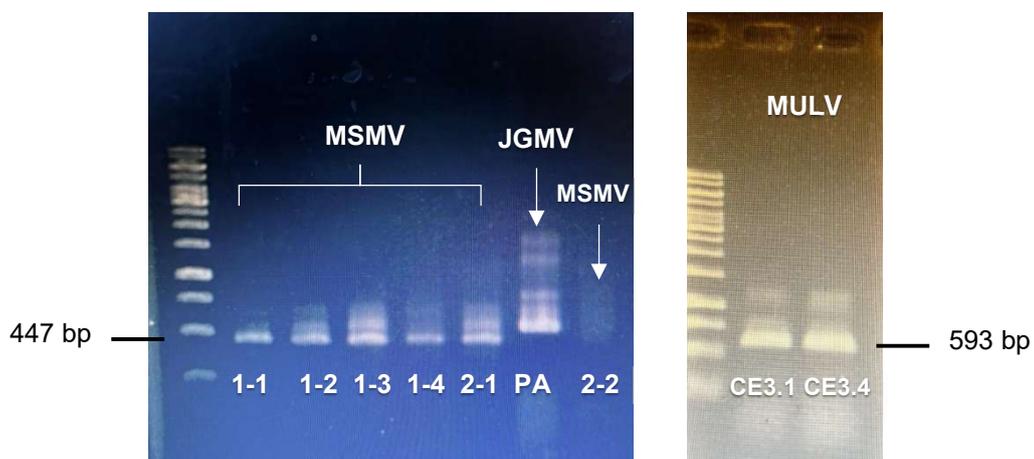


Figura C2. Teste de hospedeiros com amostras individuais oriundas do DF e Juazeiro/BA. A) RT-PCR com *primers* de MSMV e JGMV em amostras do DF; B) RT-PCR com *primers* de MULV em amostras de Juazeiro/BA. Amostras de milho DF = 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 2-1, 2-2; CE 3.1 e 3.4 oriundos de Juazeiro/BA.

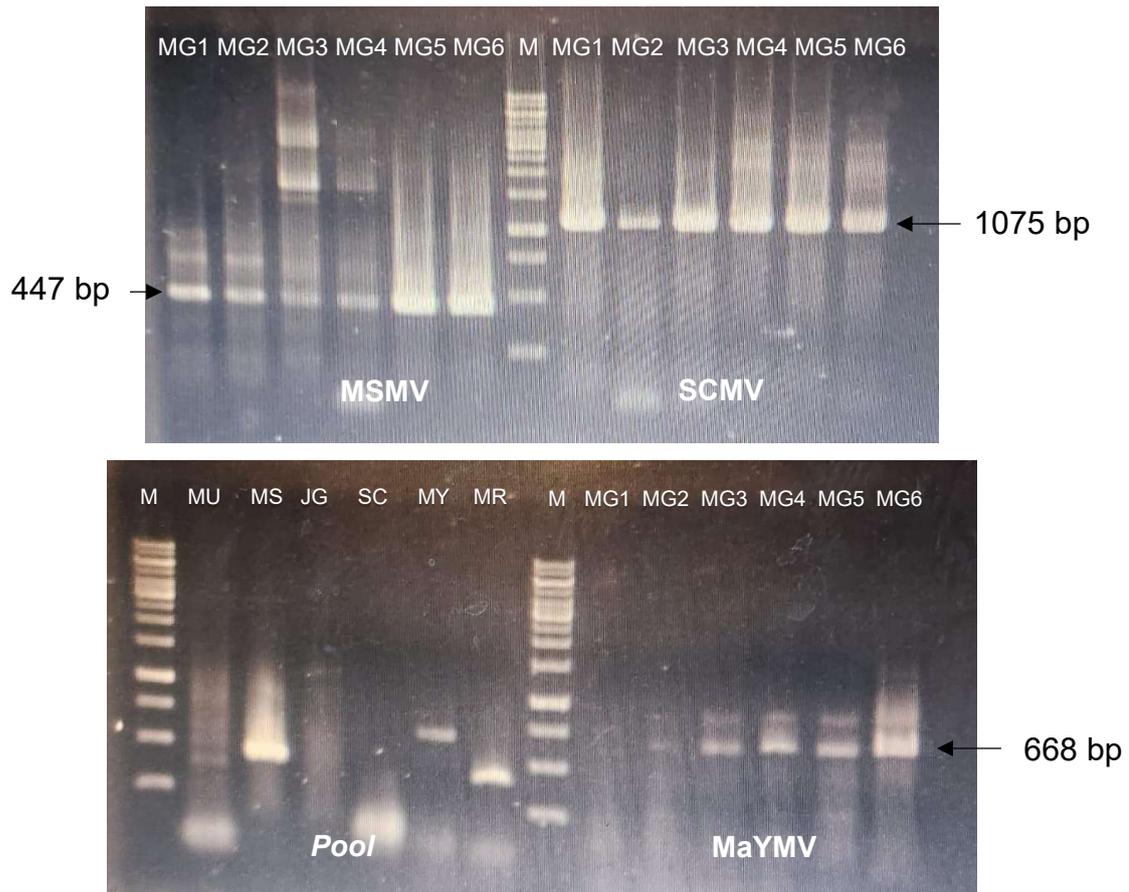


Figura C3. A - RT-PCR de amostras oriundas de Uberlândia/MG testadas para MSMV e SCMV; B – RT-PCR de *pool* de amostras oriundas de MG (7 a 10 e duas de sorgo) e amostras individuais testadas para MaYMV.