

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

SAMARA CAMPOS DO NASCIMENTO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Rice stripe necrosis virus* E
SEU VETOR *Polymyxa graminis* NO ESTADO DE SANTA CATARINA E
DESENVOLVIMENTO DE UMA ESCALA DE SEVERIDADE DA DOENÇA**

LAGES

2023

SAMARA CAMPOS DO NASCIMENTO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Rice stripe necrosis virus* E
SEU VETOR *Polymyxa graminis* NO ESTADO DE SANTA CATARINA E
DESENVOLVIMENTO DE UMA ESCALA DE SEVERIDADE DA DOENÇA**

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

Orientador: Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva

LAGES

2023

SAMARA CAMPOS DO NASCIMENTO

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Rice stripe necrosis virus* E SEU VETOR *Polymyxa graminis* NO ESTADO DE SANTA CATARINA E DESENVOLVIMENTO DE UMA ESCALA DE SEVERIDADE DA DOENÇA

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

Orientador: Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva

BANCA EXAMINADORA

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Fabio Nascimento da Silva
Universidade do Estado de Santa Catarina

MEMBROS:

Dr. Klaus Konrad Scheuermann
Estação Experimental da Epagri de Itajaí (EEI)

Dr. Eduardo Silva Gorayeb
Fundecitrus (SP)

Dra. Raquel Neves de Mello
Embrapa Arroz e Feijão (GO)

Lages, 25 de julho de 2023.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me amar e por sempre me guiar pelos bons caminhos, me permitindo a evolução como ser humano;

Aos meus pais Silmara Correia Campos e Volmir Luis Soletti do Nascimento, pelo amor infinito, apoio, incentivos e orações, por acreditarem nos meus sonhos e me ensinarem a nunca desistir, sem vocês eu nada seria;

Às minhas irmãs Sophia Campos do Nascimento e Simone Campos do Nascimento, pela amizade, palavras de carinho e companheirismo;

A todos os outros familiares que mesmo distante se fizeram presentes em orações, palavras de apoio, e torcida pela realização dos meus sonhos;

Aos meus pais adotivos de Lages, Dona Fátima e Seu Wolni por me acolherem com amor e estarem presentes em todos os momentos, sem medir esforços;

Ao meu orientador Dr. Fabio Nascimento da Silva, pela oportunidade de fazer pesquisa e orientação admirável, por todo o conhecimento e segurança transmitidos ao longo da minha trajetória acadêmica e pela amizade;

Aos meus amigos do coração, Jéssica de Souza Pires, Matheus Albuquerque e Daniel Cipriani, pelo carinho, amizade valiosa, incentivos e por tornarem a trajetória mais prazerosa, me suportando nos bons e maus momentos;

Aos amigos da Produção Vegetal, pela grande união, por tornaram tudo mais divertido e suportável, e por toda ajuda fornecida em forma de trabalho árduo e/ou palavras de conforto, em especial Paulo Sérgio, Gabriela, Patrícia, Vanucci, Alba, Fernando, Paulo Cerutti, Liliam e toda equipe do Laboratório de Virologia Vegetal;

À professora Dra. Giselle Camargo Mendes pelos ensinamentos e incentivos e por não medir esforços em repassá-los;

Ao pesquisador Dr. Klaus Konrad Scheuermann por sempre se mostrar um entusiasta em fornecer toda a ajuda necessária e transmitir seu vasto conhecimento;

Ao Dr. Eduardo Silva Gorayeb, pela amizade, ensinamentos, incentivos, conselhos e por toda ajuda fornecida;

Aos pesquisadores Dra. Raquel Mello, Dr. Douglas Lau e Dr. Eliot Kitajima pela parceria, oportunidades fornecidas e por todo auxílio;

A todos os professores e profissionais que contribuíram para minha caminhada, por me moldarem e me despertarem o interesse em sempre buscar a evolução;

À Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPGPV-UDESC), pela oportunidade de me aperfeiçoar, estrutura e recursos fornecidos;

Às instituições de fomento CAPES, FAPESC e CNPq pelo fornecimento de recursos financeiros;

A mim, por não desistir frente aos obstáculos e desafios da vida e sempre buscar a evolução como ser humano e profissional de forma ética e virtuosa;

Deixo aqui, minha eterna gratidão.

RESUMO

A virose conhecida como 'enrolamento do arroz' tem como agente causal o rice stripe necrosis virus (RSNV, família *Benyviridae*, gênero *Benyvirus*), transmitido pelo protozoário do solo, *Polymyxa graminis* Led. O manejo da virose baseia-se na exclusão. A resistência genética ainda vem sendo explorada pelas instituições de pesquisa e universidades. Diante da busca pela resistência genética como ferramenta de manejo, um passo inicial importante é conhecer a variabilidade genética da população viral alvo. Além disso, o vetor *P. graminis* hoje é um problema dentro de vários patossistemas e uma alta diversidade já foi encontrada dentro da espécie. No Brasil, poucas são as informações disponíveis acerca dessa diversidade. Alguns trabalhos já realizados visando a busca pela resistência genética ao RSNV apontam a espécie *Oryza glaberrima* como fonte promissora. No entanto, várias lacunas ainda precisam ser esclarecidas. Discute-se se essa resistência é efetiva contra o vírus, o vetor ou ambos, e se poderia ser transferida para cultivares de *Oryza sativa*. Hoje a seleção de genótipos resistentes a doenças se dá principalmente através de observações visuais da expressão dos sintomas a campo. Para o RSNV, a falta de uma escala de severidade dificulta este processo. Além disso, apenas o uso de avaliações visuais pode ser subjetivo. Diante dessas questões, os objetivos deste estudo foram realizar a caracterização e analisar a variabilidade genética de isolados de RSNV e seu vetor *P. graminis* no estado de Santa Catarina; desenvolver uma escala de severidade para o RSNV e um ensaio de quantificação absoluta para o vírus e para o vetor, bem como explorar graus de resistência genética em materiais contrastantes de arroz. Para a caracterização e análise da diversidade do vírus e do vetor, amostras de arroz sintomáticas foram coletadas no estado de Santa Catarina durante os anos de 2021 e 2022. As amostras foram submetidas a extração de ácidos nucleicos totais e posteriormente, a RT-PCR e PCR, visando amplificação do vírus e do vetor, respectivamente. As sequências obtidas foram submetidas a análises de variabilidade genética e o relacionamento filogenético foi analisado. Visando a quantificação absoluta, um experimento em casa de vegetação, utilizando a espécie *Oryza glaberrima* e três cultivares de *O. sativa* (SCS123 Pérola, Epagri 106 e Epagri 109) foi realizado. A inoculação ocorreu de forma natural utilizando solo de área com histórico da doença. Os sintomas observados foram registrados semanalmente e a intensidade da doença foi avaliada trinta dias após a semeadura. As amostras foram submetidas a extração de

ácidos nucleicos totais (RNA e DNA) e, posteriormente, a carga viral e do vetor foram determinadas por qRT-PCR e qPCR, respectivamente. Os isolados virais obtidos neste estudo são geneticamente próximos a outros isolados brasileiros já caracterizados e baixa diversidade nucleotídica (π) foi encontrada em todas as populações virais analisadas. Os isolados de *P. graminis* caracterizados nesse estudo pertencem ao subgrupo ribótipo V e/ou f.sp. *colombiana*. A espécie *O. glaberrima* apresentou menor carga viral e do vetor quando comparada aos demais cultivares. O cultivar Epagri 106 apresentou maior carga viral. Esses resultados confirmam que a espécie *O. glaberrima* apresenta resistência ao RSNV e ao vetor *P. graminis*. O cultivar SCS123 Pérola, que não diferiu de *O. glaberrima* para as variáveis analisadas, é resultante da hibridização entre uma linhagem de *O. glaberrima* e uma linhagem de *O. sativa*. O registro semanal dos sintomas juntamente com relatos de campo, permitiu o desenvolvimento de uma escala de severidade para a doença.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; RSNV; diversidade genética; carga viral; resistência genética.

ABSTRACT

The rice stripe necrosis virus (RSNV; family *Benyviridae*, genus *Benyvirus*) is the causal agent of the disease known as “rice crinkling”, which is transmitted by the soil protozoan *Polymyxa graminis* Led. Disease management is based on exclusion. Research institutions and universities are exploring the genetic resistance to this disease. To effectively utilize genetic resistance as a management tool, it is crucial to understand the genetic variability of the virus target population. Additionally, the *P. graminis* vector has become a challenge in several pathosystems, as there is already a high level of diversity within the species. However, there is limited available information regarding this diversity in Brazil. Previous studies have conducted research aimed at identifying RSNV genetic resistance, considering the species *Oryza glaberrima* as a promising source. However, several areas remain to be clarified. It is debated whether this resistance is effective against the virus, the vector, or both, and whether it could be transferred to *Oryza sativa* cultivars. Currently, the selection of disease-resistant genotypes occurs mainly through visual observations of the expression of symptoms in the field. For RSNV, the lack of a severity scale makes this process challenging. In addition, using visual assessments alone can be subjective. The objectives of this study were to characterize and analyze the RSNV genetic variability from isolates and their vector, *P. graminis*, from the State of Santa Catarina. Additionally, this study aimed to develop an RSNV severity scale, an absolute quantification test for the virus and vector, and explore the degree of genetic resistance in rice-contrasting materials. For the characterization and analysis of the virus and vector diversity, symptomatic rice samples were collected from the State of Santa Catarina from 2021 to 2022. Total nucleic acid extraction was performed on the samples, and subsequently, RT-PCR and PCR were conducted with the aim of amplifying the virus and vector, respectively. The obtained sequences were subjected to genetic variability analyses, and the phylogenetic relationship was analyzed. Aiming for absolute quantification, an experiment in a greenhouse using the species *Oryza glaberrima* and three *O. sativa* cultivars: SCS123 Pérola, Epagri 106, and Epagri 109 was conducted. Inoculation occurred naturally using soil from an area with a history of the disease. The observed symptoms were recorded weekly, and the disease intensity was evaluated every thirty days after sowing. The samples were subjected to total nucleic acid extraction (RNA and DNA), and the viral and vector loads were subsequently quantified by qRT-PCR

and qPCR, respectively. The viral isolates obtained in this study were genetically close to other Brazilian isolates that were previously characterized, and a low nucleotide diversity (π) was found among all analyzed viral populations. The *P. graminis* isolates characterized in this study belonged to the ribotype V and/or f.sp. *Colombiana* subgroups. The species *O. glaberrima* revealed a lower viral and vector load compared to the other cultivars. The cultivar Epagri 106 showed the highest viral load. These results confirm that the species *O. glaberrima* was resistant to RSNV and to the *P. graminis* vector. The cultivar SCS123 Pérola, which did not differ from *O. glaberrima* for the analyzed variables, was the result of hybridization between the strains *O. glaberrima* and *O. sativa*. The weekly recorded symptoms, together with the field reports, allowed for the development of a severity scale for the disease.

Keywords: *Oryza sativa*; RSNV; Genetic diversity; Viral load; Genetic resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Sintomas induzidos por rice stripe necrosis virus (RSNV) em plantas de arroz (*Oryza sativa*): A – mosaico e deformação foliar; B – encarquilhamento; C – deformação foliar; D – nanismo; E – listras cloróticas23
- Figura 2 – Organização genômica do isolado colombiano de rice stripe necrosis virus (RSNV)..... 26
- Figura 3 – Ciclo de vida de *Polymyxa graminis* em raízes de plantas suscetíveis29
- Figura 4 – (A) Mapa das principais regiões orizícolas de Santa Catarina, sendo 1= Alto Vale do Itajaí, 2= Litoral Norte, 3= Vale do Itajaí, 4= Litoral Sul; (B) Mapa do estado de Santa Catarina com os municípios com pontos de coleta; (C, D e E) sintomas típicos de RSNV em plantas de arroz..... 37
- Figura 5 – Percentual de identidade de nucleotídeos (nt) entre os isolados virais de Santa Catarina obtidos neste estudo e isolados já depositados no banco de dados do GenBank (Global)..... 47
- Figura 6 – Número médio de nucleotídeos diferentes por sítio (diversidade de nucleotídeos - π) na região codificadora da capa proteica (CP) nas populações de rice stripe necrosis virus analisadas..... 50
- Figura 7 – Relacionamento filogenético baseado no alinhamento das sequências de nucleotídeos da região codificadora da capa proteica (CP) de rice stripe necrosis virus..... 52
- Figura 8 – Percentual de identidade de nucleotídeos (nt) entre os isolados de *Polymyxa graminis* de Santa Catarina obtidos em plantas de arroz neste estudo e outros isolados já depositados no banco de dados do GenBank (Global)..... 54

Figura 9 – Relacionamento filogenético baseado no alinhamento das sequências da região ITS de isolados de <i>Polymyxa graminis</i>	56
Figura 10 – Estruturas de repouso de <i>P. graminis</i> em raízes de plantas de arroz coletadas nos municípios de Itajaí e Praia Grande (2021)	57
Figura 11 – Partículas virais observadas em extrato foliar ('leaf dip') obtido de plantas de arroz infectadas por RSNV coletadas no município de Itajaí (SC)	58
Figura 12 – Agregados de partículas virais no citoplasma de células de arroz infectadas por RSNV coletadas no município de Itajaí (SC), obtidas por histologia ultraestrutural.....	58
Figura 13 – Escala ilustrativa da severidade de sintomas de RSNV	70
Figura 14 – Avaliação da frequência de notas em genótipos de arroz (2022)	72
Figura 15 – Comparação visual do desenvolvimento de genótipos de arroz infectados por RSNV, trinta dias após a semeadura. Em A, B, C e D= <i>Oryza glaberrima</i> , SCS123 Pérola, Epagri 109 e Epagri 106, respectivamente. Em E, F e G tem-se = <i>O. glaberrima</i> à esquerda e cultivar SCS123 Pérola, Epagri 109 e Epagri 106, respectivamente à direita.....	73
Figura 16 – Índice de doença (ID) dos genótipos de arroz baseado em escala de notas no ano de 2022, onde de 0-3= Resistente/tolerante; 4-6= Moderado; 7-9= Suscetível.....	74
Figura 17 – Detecção do vírus RSNV e do vetor <i>Polymyxa graminis</i> por RT-PCR e PCR. A e B= Detecção do vírus NOS ENSAIOS DE 2021 e 2022 respectivamente. C e D: Detecção do vetor nos anos de 2021 e 2022 respectivamente	75
Figura 18 – Validação dos iniciadores desenvolvidos para quantificação do RSNV	76

Figura 19 – Curva padrão construída para as regiões CP (A) e replicase (B) viral e para a região ITS do vetor (C).....	77
Figura 20 – Curva de amplificação das amostras. Em A= amplificação de um fragmento da região codificadora CP; em B= amplificação de um fragmento da região codificadora da replicase (RdRp) e em C= amplificação de um fragmento do genoma do vetor.....	77
Figura 21 – Comparação da carga viral em diferentes genótipos de arroz. A e B: quantificação da replicase (RNA 1) e da capa proteica (RNA 2), respectivamente, no ensaio de 2021; C e D= quantificação da replicase e da capa proteica no ensaio de 2022.....	79
Figura 22 – Comparação do número de cópias do vetor em diferentes genótipos de arroz. A= ensaio de 2021 e B = ensaio de 2022.....	83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Lista de isolados de RSNV retirados do banco de dados do GenBank com origem, números de acesso e referência bibliográfica 39
- Tabela 2 – Lista de isolados de *Polymyxa graminis* retirados do banco de dados do GenBank com origem, números de acesso e referência bibliográfica 43
- Tabela 3 – Municípios e regiões de coleta das amostras, identificação e situação no RT-PCR e PCR (Lages,SC, 2023) 44
- Tabela 4 – Descritores de variabilidade genética para populações de rice stripe necrosis virus (RSNV) 49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 A cultura do arroz	20
2.2 Doenças de etiologia viral na cultura.....	22
2.2.1 Família <i>Benyviridae</i>	24
2.2.2 A espécie <i>Rice stripe necrosis virus</i>	25
2.3 O vetor <i>Polymyxa graminis</i>.....	26
2.3.1 Ciclo de vida	27
2.3.2 Diversidade genética da espécie <i>P.graminis</i>	29
2.4 Variabilidade genética.....	31
3 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE rice stripe necrosis virus (RSNV) E SEU VETOR <i>Polymyxa graminis</i> INFECTANDO ARROZ NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	33
3.1 RESUMO.....	33
3.2 INTRODUÇÃO	34
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.3.1 Coleta de amostras.....	36
3.3.2 Extração de ácidos nucleicos totais	37
3.3.3 PCR e RT-PCR	37
3.3.4 Sequenciamento Sanger e análise inicial de sequências	38
3.3.5 Análises de variabilidade genética (vírus)	38
3.3.5.1 Identidade de nucleotídeos (nt)	39
3.3.5.2 Descritores de variabilidade genética	39
3.3.5.3 Filogenia	40
3.3.6 Análises de variabilidade genética (vetor)	40
3.3.6.1 Identidade de nucleotídeos (nt)	42
3.3.6.2 Filogenia	42

3.3.7 Microscopia.....	42
3.3.7.1 Microscopia de luz	42
3.3.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	42
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
3.4.1 Variabilidade genética viral	46
3.4.2 Diversidade do vetor <i>Polymyxa graminis</i>	53
3.4.3 Caracterização biológica do vírus e do vetor	57
3.5 CONCLUSÕES	59
4 CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E USO DE UM ENSAIO DE RT-qPCR e qPCR PARA AUXILIAR NA SELEÇÃO DE NÍVEIS DE RESISTÊNCIA AO rice stripe necrosis virus (RSNV) E AO SEU VETOR <i>Polymyxa graminis</i> EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE ARROZ	60
4.1 RESUMO.....	60
4.2 INTRODUÇÃO	61
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	62
4.3.1 Delineamento experimental e avaliações visuais	62
4.3.2 Extração de ácidos nucleicos totais	64
4.3.3 PCR e RT-PCR	64
4.3.4 Desenho de iniciadores para PCR em tempo real (qPCR).....	65
4.3.5 Clonagem do vírus e do vetor.....	66
4.3.6 qPCR e RT-qPCR	67
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.4.1 Avaliação da intensidade da doença	68
4.4.2 Detecção por RT-PCR e PCR.....	74
4.4.3 Quantificação do vírus e do vetor (RT-qPCR e qPCR)	75
4.5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	92
APÊNDICE A - SEQUÊNCIAS PARCIAIS DA REGIÃO CODIFICADORA	

**DA CAPA PROTEICA (CP) E DA REPLICASE (RdRp) DE RSNV OBTIDAS
COM OS PRIMERS PROJETADOS PARA qPCR NESTE ESTUDO92**

1 INTRODUÇÃO

O arroz cultivado (*Oryza sativa* L.) está entre os três cereais mais consumidos no mundo, atendendo populações de alto e baixo poder aquisitivo e fornecendo mais de 40% das calorias necessárias na alimentação humana (SOSBAI, 2018). No Brasil, tradicionalmente é um dos alimentos mais consumidos e apesar da notória redução na área cultivada nos últimos anos, o país permanece entre os dez países com maior produção de arroz, produzindo em média 10 milhões de toneladas por ano (CONAB, 2023).

A maior parte da produção brasileira está concentrada no sul do país. O estado do Rio Grande do Sul, juntamente com o estado de Santa Catarina lideram a produção, sendo responsáveis por mais de 90% de toda a produção. Ambos os estados adotam o sistema de produção irrigado e atingem produtividades acima da média nacional, próximas de 8 mil kg/ha (CONAB, 2023). Em Santa Catarina, a produção de arroz ocupa uma área próxima de 150 mil hectares (CEPA, 2023), concentrando-se no Vale do Itajaí, Litoral Sul e Litoral Norte do estado. A orizicultura catarinense caracteriza-se pela presença de pequenas propriedades, e a adoção do sistema de cultivo com sementes pré-germinadas em quase a totalidade das áreas cultivadas (SOSBAI, 2018).

No entanto, a cultura constantemente está sujeita a fatores externos que limitam a expressão do potencial produtivo. Frente a estes fatores, um dos pilares determinantes para o sucesso da cultura a campo é o correto manejo fitossanitário de doenças. No Brasil, diversas doenças já foram registradas acometendo a cultura do arroz (SILVA-LOBO; FILIPPI, 2017).

Doenças de etiologia viral só começaram a ser relatadas no Brasil no início dos anos 2000, com a observação de sintomas como plântulas mortas, listras cloróticas em folhas e retorcimento de folhas e panículas em lavouras de arroz irrigado, no estado do Rio Grande do Sul. Essas observações levaram ao primeiro relato da virose conhecida como “entorchamiento” ou “crinkling” no Brasil, durante a safra 2001/2002 (MACIEL et al., 2006). Desde então, a ocorrência da doença vem aumentando entre os estados brasileiros. A virose já foi relatada no estado de Santa Catarina (SCHEUERMANN et al., 2015), e mais recentemente no estado de Goiás e no estado do Tocantins (MELLO et al., 2019).

A doença tem como agente causal o rice stripe necrosis virus (RSNV), um benyvírus (família *Benyviridae*) que é transmitido por uma espécie de protozoário

natural do solo, *Polymyxa graminis*. Os sintomas da infecção por RSNV, incluem geralmente nanismo, malformação severa (deformação e encarquilhamento) e listras cloróticas nas folhas. Em condições extremas, incluindo alta concentração de inóculo, ambiente favorável e cultivar suscetível é possível observar morte de plântulas já na primeira semana após a semeadura (FAUQUET et al., 1988).

Os danos causados pelo RSNV ainda não foram estimados no Brasil. No entanto, outros países como África e Colômbia relatam incidências de 70% a 100%, dependendo do cultivar de arroz semeado e danos a produtividade acima de 20% (MAURINO et al., 2018; PARDO et al., 1994). O manejo da virose baseia-se até o momento em práticas de exclusão, evitando o plantio de arroz em áreas com histórico da doença e a entrada de inóculo na área.

A resistência genética deve ser a principal medida adotada dentro dos sistemas de manejo. Para o RSNV, a busca pela resistência genética ainda vem sendo trabalhada pelas instituições de pesquisa e universidades. Alguns trabalhos já realizados apontam para uma resistência ao RSNV na espécie *Oryza glaberrima* Steud, um arroz africano próximo do arroz cultivado (CORREA et al., 2002; GUTIÉRREZ et al., 2010). Questiona-se se essa resistência é efetiva contra o vírus, o vetor ou ambos, e se poderia facilmente ser transferida para cultivares de *Oryza sativa*.

No entanto, sabe-se que populações virais são geneticamente diferentes, sendo passíveis de mudança com o tempo, processo denominado evolução. Os vírus apresentam de maneira geral uma alta variabilidade genética, resultante da sua rápida replicação (RUBIO et al., 2020) e de mecanismos como mutação e recombinação (ROOSSINCK, 1997). Conhecer a variabilidade genética de uma população viral é um passo importante para que se tenha otimização no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e estratégias de manejo baseadas na resistência.

O vetor *P. graminis* é considerado um problema dentro de vários patossistemas. O protozoário é vetor de mais de 14 espécies virais de importância econômica, acometendo cereais como trigo, triticale, cevada, centeio, aveia, arroz, sorgo, milho e algumas gramíneas silvestres (KANYUKA et al., 2003). A possibilidade da obtenção de resistência genética ao vetor é bastante atraente. No entanto, dentro da espécie *P. graminis* uma grande diversidade genética já foi encontrada (LEGRÈVE et al., 2002; WARD et al., 1998).

Requisitos biológicos como especificidade de hospedeiro e temperatura quando combinados com análises de sequências da região ITS (internal transcribed spacer) de diferentes isolados permitiram uma separação dentro da espécie *P. graminis* em cinco formas especiais ou ribótipos distintos: f. sp. *temperata*, correspondente ao ribótipo I; f. sp. *tepida*, correspondente ao ribótipo II; f. sp. *tropicalis*, correspondendo ao ribótipo III; f. sp. *subtropicalis*, correspondendo ao ribótipo IV; e f. sp. *colombiana*, correspondendo ao ribótipo V (LEGRÈVE et al., 2002). No Brasil, *P. graminis* é frequentemente associado a plantas de arroz infectadas por RSNV, porém informações acerca do ribótipo predominante não estão disponíveis.

Diante dessas questões, os objetivos deste estudo foram realizar a caracterização e analisar a variabilidade genética de isolados de RSNV e seu vetor *P. graminis* nas principais regiões orizícolas do estado de Santa Catarina; desenvolver uma escala de severidade para o RSNV; padronizar um ensaio de quantificação para o vírus e para o vetor e explorar graus de resistência genética em materiais contrastantes de arroz, através da associação entre intensidade da doença e quantificação absoluta do vírus e do vetor.

3 CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE rice stripe necrosis virus (RSNV) E SEU VETOR *Polymyxa graminis* INFECTANDO ARROZ NO ESTADO DE SANTA CATARINA

3.1 RESUMO

A virose conhecida como enrolamento do arroz já foi relatada nos principais estados brasileiros produtores de arroz. A doença tem como agente causal o rice stripe necrosis virus (RSNV), transmitido por meio do vetor *Polymyxa graminis*, uma espécie de protozoário natural do solo. Hoje o manejo da virose se baseia na exclusão e a resistência genética ainda vem sendo buscada. No entanto, sabe-se que populações virais são geneticamente diferentes, sendo passíveis de mudança com o tempo por meio do processo denominado evolução. Conhecer a variabilidade genética de uma população viral é um passo importante para que se tenha otimização no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e de manejo. Destaca-se ainda que o vetor *P. graminis* é uma problemática dentro de vários patossistemas e uma alta diversidade já foi encontrada dentro da espécie. No Brasil, poucas são as informações disponíveis acerca dessa diversidade. Com isso, o objetivo do estudo foi caracterizar e analisar a variabilidade genética de isolados de RSNV e seu vetor, *Polymyxa graminis*, no estado de Santa Catarina. Amostras de arroz sintomáticas foram coletadas nas principais regiões orizícolas do estado de Santa Catarina. As amostras foram submetidas a extração de ácidos nucleicos totais (RNA e DNA) e posteriormente, a RT-PCR e PCR, visando amplificação do vírus e do vetor, respectivamente. As amostras foram enviadas para sequenciamento Sanger. As sequências obtidas foram submetidas as análises de variabilidade genética e o relacionamento filogenético foi analisado. Os isolados virais obtidos neste estudo são geneticamente próximos a outros isolados brasileiros já caracterizados. Quando comparados a isolados de outros países duas linhagens principais são estruturadas com base na origem geográfica dos isolados: linhagem africana e linhagem sul-americana. Além disso, baixa diversidade nucleotídica (π) foi encontrada em todas as populações de RSNV analisadas. Todos os isolados de *P. graminis* caracterizados nesse estudo pertencem ao subgrupo ribótipo V e/ou f.sp. *colombiana*. Além da caracterização molecular, realizou-se a caracterização biológica por meio de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, sendo possível a observação de estruturas de repouso do vetor e partículas virais, respectivamente.

Palavras-chave: Diversidade genética; Populações virais; Ribótipos.

3.2 INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina (SC) juntamente com o estado do Rio Grande do Sul (RS) são responsáveis por mais de 90% da produção brasileira de arroz (CONAB, 2023). Dentre os diversos fatores que podem acometer a cultura, reduzindo produção e qualidade de grãos, estão as doenças infecciosas. Atualmente, no Brasil, apenas uma doença de etiologia viral ocorre na cultura do arroz. A virose conhecida como enrolamento do arroz, já foi relatada em ambos os estados brasileiros líderes em produção (SC e RS), e a ocorrência vem sendo relatada em outros estados produtores de arroz.

A doença tem como agente causal rice stripe necrosis virus (RSNV), um vírus de RNA fita simples sentido positivo, pertencente à família *Benyviridae* e ao gênero *Benyvirus* (GILMER, 2017). A infecção por RSNV resulta em sintomas de nanismo, mosaico e estrias cloróticas, encarquilhamento de folhas e panículas e morte de plântulas. A transmissão do vírus ocorre por meio do vetor *Polymyxa graminis* Led., uma espécie de protozoário habitante do solo que infecta as raízes do arroz.

O protozoário é um microrganismo biotrófico obrigatório de plantas, pertencente à família *Plasmodiophoraceae* e ao gênero *Polymyxa*. Apesar de ser considerado um patógeno “fraco” e aparentemente não reduzir produtividade, *P. graminis* é um eficiente vetor de vírus que causam doenças agronomicamente importantes. O protozoário já foi relacionado com a transmissão de mais de 14 espécies virais em cereais e gramíneas. Além disso, o vetor produz esporos de repouso que podem permanecer no solo e em associação com restos culturais por anos, abrigando partículas virais (KANYUKA et al., 2003).

Alguns estudos de gama de hospedeiros já demonstraram uma considerável diversidade com relação à especificidade do hospedeiro dentro da espécie *P. graminis*. Baseado em estudos da região ITS do DNA ribossomal da espécie, cinco subgrupos (ribótipos) foram revelados se correlacionando com o tipo de hospedeiro (LEGRÈVE et al., 1998, 2000; VAÏANOPOULOS et al., 2007; WARD et al., 2005). Predominando em cevada, trigo, aveia e centeio os ribótipos I e II (SUBR et al., 2002; WARD et al., 1994); em gramíneas como milheto, sorgo e milho prevalecem o ribótipo III e IV dependendo de fatores como temperatura e hospedeiro. No arroz encontra-se um quinto subgrupo, denominado ribótipo V

(MORALES et al., 1999). E mais recentemente, um novo ribótipo infectando trigo foi proposto (ribótipo VI) baseado em um isolado australiano e um isolado africano (COX et al., 2014). Posteriormente, houve ainda uma subdivisão em sub-ribotipos 'a' e 'b' dentro dos ribótipos I, II e III, devido à grande diversidade genética intraespecífica encontrada dentro desses grupos (LEGRÈVE et al., 2002).

Destaca-se que poucos estudos foram realizados para o patossistema do RSNV e suas interações envolvendo o vetor. A classificação em ribótipo V para isolados de *P. graminis* infectando arroz é baseada em poucas sequências obtidas em países como Colômbia e Mali. No Brasil, não existem dados de caracterização molecular de populações de *P. graminis* associadas a transmissão de RSNV em plantas de arroz.

Hoje o manejo do RSNV se baseia em práticas de exclusão, evitando o plantio de arroz em sistema de semeadura em solo seco em áreas com histórico da doença e a entrada de inóculo na área (SCHEUERMANN et al., 2015). O uso de sementes certificadas é importante, uma vez que apesar da espécie viral não ser transmitida por semente, os esporos de repouso do vetor podem ser transportados junto da semente. Além disso, limpeza e desinfestação de máquinas e implementos agrícolas, assim como evitar o movimento de água entre áreas, é recomendado devido a presença de esporos de repouso do vetor no solo (PAZ et al., 2009).

A resistência genética é uma das principais medidas de controle utilizada em programas de manejo de doenças. Entretanto, para o RSNV pouco se conhece a respeito da mesma. Sabe-se que já existem relatos de resistência a virose na espécie de arroz africano *Oryza glaberrima* e essa resistência vem sendo explorada como fonte doadora para o arroz cultivado (GUTIÉRREZ et al., 2010), embora se desconheça o(s) gene(s) envolvidos e mecanismo.

Populações virais são geneticamente diferentes, sendo passíveis de mudança com o tempo, processo este denominado evolução. Vírus apresentam de maneira geral, alta variabilidade genética resultante da sua rápida replicação e de mecanismos como mutação e recombinação (DALLAGNOL, 2018; RUBIO et al., 2020). Conhecer a variabilidade genética de uma população viral é um passo importante para que se tenha otimização no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e estratégias de manejo adequadas a tais patógenos, uma vez que trabalhos dessa natureza fornecem subsídios para programas de melhoramento, indicando as regiões do genoma do vírus com menor propensão a variações.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar e analisar a variabilidade genética de isolados de RSNV no estado de Santa Catarina, bem como caracterizar o ribótipo de *P. graminis* associado a transmissão da virose em arroz no estado.

4 CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E USO DE UM ENSAIO DE RT-qPCR e qPCR PARA AUXILIAR NA SELEÇÃO DE NÍVEIS DE RESISTÊNCIA AO rice stripe necrosis virus (RSNV) E AO SEU VETOR *Polymyxa graminis* EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE ARROZ

4.1 RESUMO

A virose conhecida como ‘enrolamento do arroz’ foi relatada pela primeira vez no Brasil na safra 2001/02 e desde então, a ocorrência vem aumentando entre os estados brasileiros produtores de arroz. A doença tem como agente causal o rice stripe necrosis virus (RSNV, família *Benyviridae*, gênero *Benyvirus*), que é transmitido pelo protozoário do solo, *Polymyxa graminis* Led. O manejo recomendado baseia-se na exclusão. A resistência genética deve ser sempre que possível a principal ferramenta em programas de manejo de doenças de plantas. Para o RSNV, a resistência ainda vem sendo explorada e buscada. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma escala de severidade para o RSNV e padronizar um ensaio de RT-qPCR e qPCR para quantificação da carga viral e do vetor, respectivamente, visando correlacionar essas variáveis com a intensidade da doença e investigar graus de resistência em diferentes genótipos de arroz. O experimento foi composto por quatro genótipos: a espécie *Oryza glaberrima* e três cultivares de *O. sativa* desenvolvidas pela Epagri (SCS123 Pérola, Epagri 106 e Epagri 109), cada um em cinco repetições, totalizando vinte unidades experimentais. A inoculação ocorreu de forma natural utilizando solo de área com histórico da doença. Os sintomas foram registrados semanalmente. A intensidade da doença (incidência e severidade) foi avaliada trinta dias após a semeadura. As amostras foram submetidas a extração de ácidos nucleicos totais (DNA e RNA), e a carga viral e do vetor foram determinadas por quantificação absoluta utilizando curva padrão para os respectivos alvos [Capa Proteica (CP) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) para o vírus; e DNA ribossomal para o vetor]. O vírus e o vetor foram detectados em todas as plantas por PCR convencional e qPCR, porém houve uma diferença significativa para as variáveis analisadas entre os genótipos testados. Além disso, um grau de correlação positiva foi encontrado entre as variáveis carga viral, carga do vetor e intensidade da doença. A espécie *O. glaberrima* apresentou a menor carga viral e do vetor quando comparada aos demais cultivares e diferiu dos cultivares Epagri 109 e

Epagri 106. O cultivar Epagri 106 apresentou a maior carga viral e diferiu de todos os outros. Com relação à carga do vetor, Epagri 109 apresentou a maior quantificação, mas não diferiu de Epagri 106. Esses resultados confirmam que a espécie *O. glaberrima* apresenta resistência ao RSNV e ao vetor *P. graminis*, uma vez que apresentou baixa carga viral e do vetor e não expressou sintomas visíveis. SCS123 Pérola, que não diferiu quanto a carga viral e do vetor de *O. glaberrima* para as variáveis analisadas, é resultante da hibridização entre *O. glaberrima* e *O. sativa*. Estudos futuros visando investigar os mecanismos que conferem menor carga viral e do vetor devem ser realizados.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; *Oryza glaberrima*; carga viral; RSNV; resistência genética.

4.2 INTRODUÇÃO

A doença conhecida como enrolamento do arroz é causada por rice stripe necrosis virus (RSNV, família *Benyviridae*, gênero *Benyvirus*). O primeiro relato da virose no Brasil ocorreu no estado do Rio Grande do Sul durante a safra 2001/02 (MACIEL et al., 2006). Desde então, a ocorrência da doença vem aumentando entre os estados brasileiros produtores de arroz, chamando a atenção de produtores e pesquisadores.

Os sintomas típicos de infecção por RSNV incluem nanismo, encarquilhamento, malformação severa da planta e listras cloróticas. Além disso, em condições de alta pressão de inóculo, ocorre a morte de plântulas já nas primeiras semanas. No Brasil, os danos causados pelo RSNV ainda não foram estimados. No entanto, outros países como África e Colômbia relatam incidências de 70% a 100%, dependendo do cultivar de arroz semeado e perdas em produtividade acima de 20% (MAURINO et al., 2018; PARDO et al., 1994).

O manejo da doença baseia-se até o momento na exclusão. A resistência genética deve ser sempre que possível a principal medida de controle dentro dos sistemas de manejo, principalmente para doenças de etiologia viral, onde as práticas de manejo são mais limitadas. Entretanto, para o RSNV pouco se conhece a respeito. Alguns trabalhos já realizados indicam resistência ao RSNV na espécie *Oryza glaberrima*, um arroz africano próximo do arroz cultivado *Oryza sativa* (CORREA et al., 2002; GUTIÉRREZ et al., 2010). No entanto, várias lacunas

ainda precisam ser esclarecidas. Ainda não se sabe se essa resistência é efetiva contra o vírus, o vetor ou ambos, e se poderia facilmente ser transferida para cultivares de *Oryza sativa*.

Hoje a seleção de genótipos resistentes a doenças se dá principalmente através de ensaios de reação de cultivares, baseados em observações visuais da expressão dos sintomas a campo. Para o RSNV, a falta de uma escala de severidade dificulta este processo. Além disso, apenas o uso de avaliações visuais pode ser subjetivo e não representar o real cenário. Ferramentas moleculares como PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR) possibilitam uma maior padronização e aumentam a confiabilidade nos resultados. Ensaios de qPCR são altamente sensíveis e permitem o acompanhamento em tempo real da amplificação do material genético (SCHENA et al., 2004), permitindo quantificar a carga viral presente em um material e dando maior sustentação na seleção de genótipos com graus de resistência ou suscetibilidade.

Com isso, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma escala de severidade para o RSNV e padronizar um ensaio de RT-qPCR e qPCR para quantificação da carga viral e do vetor, respectivamente, visando correlacionar essas variáveis com a intensidade da doença e investigar graus de resistência em diferentes genótipos de arroz.