

Deteccão Molecular do SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil



Milho (acima) e sorgo (abaixo) com sintomas de mosaico.

ISSN 1679-0154

Setembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 66

Deteção Molecular do SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil

Isabel Regina Prazeres de Souza
Beatriz de Almeida Barros
Henrique Albano Rafael

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro,
Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda
de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Célio Ramos das Neves

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Souza, Isabel Regina Prazeres de.

Detecção molecular do SCMV infectando milho e sorgo
no Brasil / Isabel Regina Prazeres de Souza, Beatriz de Almeida
Barros, Henrique Albano Rafael. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e
Sorgo, 2013.

24 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa
Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 66).

1. Potyvirus. 3. Doença de planta. 2. *Zea mays*. 3. Sorghum
bicolor. L. Barros, Beatriz de Almeida. II. Rafael, Henrique Albano.
III. Título. IV. Série.

CDD 579.2 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	13
Conclusões	20
Agradecimentos	20
Referências	20

Detecção Molecular do SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil

Isabel Regina Prazeres de Souza¹

Beatriz de Almeida Barros²

Henrique Albano Rafael³

Resumo

O mosaico está entre as viroses mais importantes das culturas do milho e do sorgo no Brasil, cujo agente causal foi identificado como sendo uma nova estirpe de SCMV, pertencente ao gênero Potyvirus. A utilização da técnica de sorologia na identificação desta estirpe tem apresentado reações cruzadas em razão da utilização de anticorpos policlonais. Entretanto, a detecção molecular associada ao sequenciamento de todo ou de parte conservada do gene da proteína capsidial tem permitido uma identificação confiável das espécies de potyvirus. O objetivo deste trabalho foi utilizar as técnicas de RT-PCR empregando-se *primers* descritos na literatura

¹Eng.-Agr., PhD. em Plant Science, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, isabel.prazeres@embrapa.br

²Bióloga, Dra. em Genética e Melhoramento, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, beatriz.barros@embrapa.br

³Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas, Sete Lagoas, MG, henriquealbanorafael@hotmail.com

Autor correspondente, E-mail: isabel.prazeres@embrapa.br

para as seis espécies de potyvirus constituintes do complexo do mosaico, visando identificar aqueles capazes de amplificar parte ou toda a sequência da proteína capsidial da estirpe de SCMV causadora do mosaico em milho e sorgo no Brasil e testar o restante destes primers para a possível presença dos demais potyvirus deste complexo. As condições definidas neste trabalho para as reações de RT-PCR permitiram selecionar conjuntos de *primers* (PZEO, PSC, e MDMV) capazes de detectar de forma rápida o SCMV, agente causal do mosaico em milho e sorgo no Brasil.

Palavras-chave: potyvirus, *Zea mays* L., *Sorghum bicolor* (L.) Moench, RT-PCR, proteína capsidial.

Molecular Detection of SCMV Infecting Maize and Sorghum in Brazil

Isabel Regina Prazeres de Souza¹

Beatriz de Almeida Barros²

Henrique Albano Rafael³

Abstract

The mosaic is among the most important virus diseases affecting maize and sorghum in Brazil, whose causal agent was identified as a new SCMV strain of the genus Potyvirus. The use of serological tests in the identification of this strain has shown cross-reactions due to polyclonal antibodies. However, molecular detection associated with the sequencing of the whole or part of the conserved core region of the coat protein gene has allowed a reliable identification of the potyvirus species. The aim of this study was to use RT-PCR technique applying primers described in the literature for the six potyvirus species of the mosaic complex and to identify those capable of amplifying the whole or part of the coat protein gene sequence of the SCMV strain causing mosaic in maize and sorghum in Brazil and to test for the possible presence of other potyviruses. The conditions set out in this work for these reactions allowed us to select specific primers (PZEO, PSC, and MDMV), that enabled to rapidly detect the SCMV, causal agent of the mosaic disease in maize and sorghum in Brazil.

Key words: potyvirus, *Zea mays* L., *Sorghum bicolor* (L.) Moench, RT-PCR, coat protein.

Introdução

O *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) e o *Maize rayado fino virus* (MRFV) são os principais vírus que infectam o milho no Brasil (GONÇALVES et al., 2007a). O aumento da área plantada com milho nos últimos anos, associado ao cultivo na safrinha (plantio de janeiro a março), tem ampliado a permanência da cultura em campo, contribuindo para o incremento na incidência do mosaico e a manutenção do inóculo (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). Outro aspecto importante é que o SCMV incide sobre outras gramíneas cultivadas, como a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) (GONÇALVES et al., 2007b, 2011; BARBOZA et al., 2008) e o sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (ESPEJEL et al., 2006), além de infectar várias outras espécies como os capins massambará e colômbio (ALMEIDA, 1988).

O mosaico-comum-do-milho é causado por vírus do gênero Potyvirus, que apresenta partículas alongadas e flexuosas com cerca de 750 nm de comprimento por 13 nm de largura (KITAJIMA, 1979). Seis espécies de potyvirus têm sido identificadas no mundo, causando sintomas de mosaico em uma variedade de cultura de grãos e gramíneas, incluindo: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV) (SHUKLA et al., 1994), *Zea mosaic virus* (ZeMV) (SEIFERS et al., 2000), e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) (DENG et al., 2008). O SCMV prevalece na China e Europa, e o MDMV é, predominantemente, epidêmico em partes do sul dos

Estados Unidos (LOUIE et al., 1990; KUNTZE et al., 1995). No Brasil, estudos demonstram que o SCMV é o agente causal do mosaico em milho, sorgo (SOUZA et al., 2012a,b; GONÇALVES et al., 2011; MELO, 2000; RESENDE et al., 2004) e em cana (GONÇALVES et al., 2007a).

Os sintomas do mosaico-comum podem ser facilmente identificados em plantas de milho jovens e tendem a desaparecer quando as plantas atingem a maturidade. Nas folhas formam-se áreas cloróticas entremeadas com áreas verdes, em padrão de mosaico. Em sorgo, o SCMV pode provocar o aparecimento de dois sintomas, o mosaico típico e o sintoma necrótico, dependendo da cultivar (KIMATI et al., 2005). No necrótico, aparecem áreas necrosadas de cor avermelhada ou amarelada nas folhas, dependendo da cultivar atacada. Esses tipos de sintomas, na maioria das vezes, levam a planta do sorgo à morte, principalmente quando a infecção ocorre prematuramente (CASELA et al., 2008). Os potyvirus são transmitidos de maneira não persistente por vários afídeos, e o vetor mais eficiente na cultura do milho é o *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera: Aphididae) (EDWARDSON; CHRISTIE, 1991). Os pulgões são polípagos e, geralmente, realizam picadas de prova em diferentes espécies vegetais. Ao se alimentarem de uma planta infectada, adquirem o vírus e, durante várias horas ou dias, podem transmiti-lo para plantas saudáveis, de forma não persistente, ou semipersistente (SHUKLA et al., 1994). Desta forma, o manejo da doença por meio de controle químico não é efetivo e a utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente de controle do vírus (SOUZA et al., 2008).

A estirpe de SCMV que infecta o milho no Brasil foi inicialmente identificada por Melo (2000). Posteriormente, Souza et al. (2012a,b) demonstraram, por meio do sequenciamento da região referente à capa proteica de isolados de SCMV, que se tratava de uma nova estirpe. A detecção molecular desta estirpe distinta tem sido realizada por meio da amplificação dessa região a partir dos *primers* descritos por Melo (2000). A aplicação da técnica de sorologia na identificação de potyvirus apresenta, com frequência, reações cruzadas e resultados não conclusivos, em razão da utilização de anticorpos policlonais (SHUKLA et al., 1994; SOUZA et al., 2012a). Entretanto, isso pode ser contornado quando se utiliza o sequenciamento da região do genoma viral que codifica a proteína capsidial para classificação hierárquica de potyvirus (SHUKLA; WARD, 1989). O objetivo do presente trabalho foi utilizar a técnica de RT-PCR para identificar a estirpe de SCMV que causa mosaico em milho e sorgo no Brasil e testá-la para a possível presença dos demais potyvirus do complexo do mosaico.

Material e Métodos

Tecido Vegetal

Folhas de milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), *Sorghum verticilliflorum* e capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq), com e sem sintomas de mosaico, foram coletadas na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Em cada coleta, o ferramental utilizado era previamente limpo empregando-se RNaseZAP™ (Sigma) para evitar contaminação. O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80 °C até a extração de RNA.

Seleção de Primers

Primers específicos para detecção dos potyvirus capazes de causar sintomas de mosaico em diversas gramíneas foram selecionados da literatura (Tabela 1) e utilizados para síntese de cDNA e em reações de RT-PCR.

Tabela 1. *Primers* utilizados em RT-PCR para detecção do complexo do mosaico.

<i>Potyvirus</i>	<i>Identificação do Primer</i>	<i>Sequencia 5' – 3'</i>	<i>Referência</i>
SCMV, SrMV,			
MDMV, e JGMV	PSR ^c	CAGCTGTGTGCKSTCTGTATT	Jiang e Zhou (2002)
SCMV	PSCF ^b	GGTAGTGGTACAGGAACAAGA	Jiang e Zhou (2002)
MDMV	PMDF ^b	TGACGAAATTATAGATGTAA	Jiang e Zhou (2002)
SrMV	PSrF ^b	AGGATGAATTAATTGACGTGC	Jiang e Zhou (2002)
JGMV	PJG ^b	AAACCAGCTAGTGGTGAAGGC	Jiang e Zhou (2002)
Potyvirus em geral	PZEO1 ^d PZEO2 ^e	GTATGGTGCATCGAAAATGGT TGCTGCTGCTTTCATCTG	Seifers et al. (2000)
PenMV	PPenF PPenR	GGNAAYAAYAGYGGNCARCC CGACTGCAGGATCCAAGC(T) ₁₈	Fan et al. (2003)
JGMV	JG5' JG3'	AGAGATGTACAAGAACGCCATCGC CATCCTTTAACGTGAGATCGACGG	Lenardon e Giolitti (2004)
SCMV (Argentina)	SC5' SC3'	TTACAACGAAGATGTTTTCC CTGAAATAGTAAATACGAGG	Giolitti et al. (2005)
MDMV (Argentina)	MD5' MD3'	ACGACAATTCCTTGACGATCTTCC CCTCACTCACTTGACAGACATAGTA GG	Lenardon e Giolitti (2004)
SCMV (Brasil)	MDMV2 ^f MDMV3 ^f	GTATTCATCAGTCGGGAAGCTG ACGAGGTAAAACCTCAC	Melo (2000) Resende et al. (2004)

^a– B= (G, C ou T); K = (G ou T); S = (G ou C); N = (A, G, C ou T); Y = (C ou T); R = (A ou G).

^b–*Primers* diretos específicos para determinado potyvirus.

^c–*Primer reverso* comum para todos os potyvirus.

^d–*Primer direto* que corresponde ao domínio conservado da proteína capsial, MVVCIENG.

^e–*Primer reverso* que corresponde ao domínio conservado da proteína capsial, QMKAAA.

^f–*Primers* que, embora tenham a denominação de MDMV, foram desenhados para detecção da estirpe brasileira de SCMV infectando milho e outras gramíneas.

Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando o RNeasy®Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado por meio de espectrofotometria utilizando o Nanodrop 1000.

Para a síntese de cDNA, a partir de 1,0 ug de RNA total, foram utilizadas duas metodologias. Na primeira, foi utilizado kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Esse kit utiliza *random primers* para a síntese do cDNA e é recomendado para a detecção de fragmentos pequenos. O segundo sistema empregado foi SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) utilizando *primers* reversos específicos para cada potyvirus (SCMV, MDMV, SrMV e JGMV) também de acordo com as recomendações do fabricante.

Reações de PCR para Detecção do Complexo do Mosaico

Inicialmente, foram feitos testes para otimização das reações de PCR. Para aquelas feitas com os *primers* descritos por Seifers et al. (2000), Jiang e Zhou (2002) e Fan et al. (2003) foram utilizados cDNAs sintetizados com *random primers*. Já para reações com *primers* descritos por Melo (2000), Resende et al. (2004), Lenardon e Giolitti (2004) e Giolitti et al. (2005) foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de *primers* reversos específicos para cada tipo de potyvirus. Para todos os conjuntos, os testes foram feitos utilizando *bulks* de cDNAs de amostras apresentando sintomas do mosaico.

Cada reação continha 2,0 µL de cDNA, Tampão de Reação 1X, 2,0 mM MgCl₂, 125 µM dntps, 0,125 µM de cada *primer* e 1U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) num volume final de 20 µL. As condições de ciclagem foram as seguintes: 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, X °C por 30 s e 72 °C por 1 min; e, finalmente, um período de extensão final de 72 °C por 5 min. O X representa um gradiente de temperatura, 40 °C, 43 °C, 46 °C, 49 °C, 52 °C e 55 °C, que foi utilizado para se identificar a temperatura de anelamento ideal para cada conjunto de *primers*.

Para a detecção do complexo do mosaico, as reações que apresentaram amplificação foram repetidas nas mesmas condições descritas acima, mas utilizando (i) a temperatura de anelamento determinada para cada conjunto de *primers* e (ii) cDNAs individualizados de amostras de milho, sorgo, *Sorghum verticilliflorum* e capim-colonião, com e sem sintomas de mosaico.

Todas as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v), visualizadas com solução de GelRed 10X (Biotium) sob luz UV e fotodocumentadas com Gel Logic 200 (Kodak).

Sequenciamento

Os fragmentos amplificados foram purificados de gel de agarose utilizando-se o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. O sequenciamento foi feito com o BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing Kit (Life Technologies) em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies). As sequências obtidas foram editadas utilizando

o software Sequencher v 4.1.4 e comparadas contra o banco de sequências do NCBI (*GenBank*) para confirmação de suas identidades.

Resultados e Discussão

No Brasil, apenas o SCMV tem sido identificado causando sintomas de mosaico nas culturas do milho e do sorgo (SOUZA et al., 2012a,b; MELO, 2000; GONÇALVES et al., 2011). Neste trabalho foram utilizados conjuntos de *primers* específicos (Tabela 1) para os seis potyvirus do complexo do mosaico (MDMV, SrMV, SCMV, JGMV, PenMV e ZeMV) objetivando a detecção da estirpe brasileira de SCMV e a possível presença dos demais potyvirus. O alvo para a amplificação com esses *primers* é a sequência codificadora (inteira ou parcial) da proteína capsidial. O gradiente de temperatura de anelamento testado, 40 °C, 43 °C, 46 °C, 49 °C, 52 °C e 55 °C, para os diferentes conjuntos de *primers* resultou no estabelecimento da temperatura de 52 °C para os pares de *primers* PSC, PZEO e MDMV. Já os conjuntos PJG, PPEN, JG, SG, MD, não apresentaram amplificação sob nenhuma condição, confirmando os resultados de Melo (2000), Souza et al. (2012a,b), de que *Sorghum mosaic virus* (SrMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Zea mosaic virus* (ZeMV) e *Pennisetum mosaic virus* (PenMV) não estavam presentes nas amostras analisadas. Dentre os diversos conjuntos de *primers* testados para o complexo do mosaico, apenas aqueles específicos para o SCMV foram capazes de apresentar amplicons nas reações de PCR, cujo RNA foi extraído de milho, sorgo, *Sorghum verticilliflorum* e capim-colômbio com sintomas de mosaico (Figura 1). Estes resultados confirmaram os obtidos por Melo (2000), Souza et al. (2012a,b)

e Gonçalves et al. (2011), em que apenas o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) foi identificado como o agente causal do mosaico em milho e sorgo.

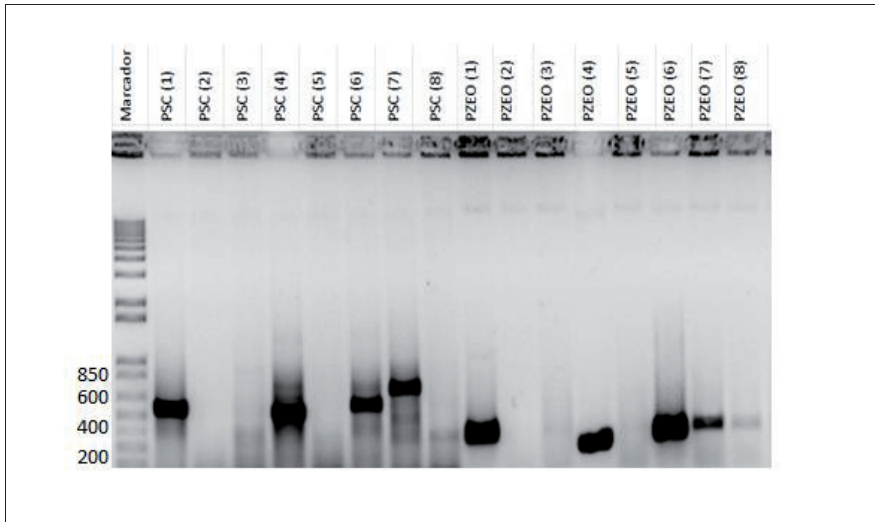


Figura 1. Amplicons obtidos com os conjuntos de *primers* PSC e PZEO. Na parte superior do gel tem-se a identificação dos *primers*. Números entre parênteses identificam as amostras: Milho com sintoma de mosaico (1), Milho sem sintoma (2), Sorgo sem sintoma (3), Sorgo com sintoma (4), *Sorghum verticilliflorum* sem sintoma (5), *Sorghum verticilliflorum* com sintoma (6), Capim-colonião com sintoma (7), Capim-colonião sem sintoma (8). Marcador 1kb Plus Invitrogen.

Os conjuntos de *primers* PZEO e PSC específicos para *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) amplificaram fragmentos de tamanhos em pares de base (pb) de, respectivamente, 324 e 465 pb (Figura 1). Algumas bandas referentes ao mesmo amplicon apresentaram padrão de migração diferente (canaletas 7 e 8). De acordo com Huang et al. (2010), isso pode ser verificado

quando se utilizam soluções de GelRed diluídas acima de 100X para coloração do gel, como foi a utilizada neste trabalho. O conjunto de *primers* PZEO *direto e reverso*, desenhados para as regiões conservadas da capa proteica de potyvirus em geral (SEIFERS et al., 2000), respectivamente, MVWCIENG de SCMV e QMKAAA de MDMV (U07216), foram capazes de amplificar os fragmentos esperados em todas as gramíneas sintomáticas testadas, uma vez que essas sequências estavam presentes na região conservada da proteína capsial da estirpe brasileira de SCMV (Figura 3). A partir da utilização dos *primers* PSC *direto* e PS *reverso*, também específicos para regiões da capa proteica de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), foi possível a amplificação do fragmento da região conservada da capa proteica da estirpe brasileira de SCMV, o que pode ser confirmado pela presença da região *core* (Figura 4).

A obtenção do fragmento de 1072 pb, resultante da amplificação com o conjunto de *primers* denominado MDMV, desenhado por Melo (2000), foi possível devido a utilização do sistema SuperScript®III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) na síntese do cDNA empregando o *primer reverso* específico (MDMV) nas amostras sintomáticas de milho, sorgo e *Sorghum verticilliflorum* (Figura 2). A banda menor (~500 pb) resulta, possivelmente, de um anelamento interno inespecífico de um dos *primers* (MDMV2 ou MDMV3). O sequenciamento dessa banda será realizado para verificar esta possibilidade e, caso contrário, serão realizadas alterações na reação de PCR.

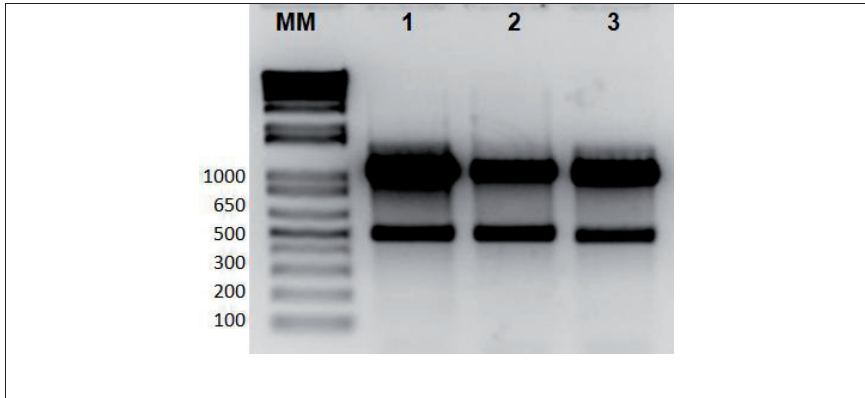


Figura 2. Amplicons resultantes da reação de PCR com o conjunto de *primers* MDMV2 e MDMV3, específicos para SCMV. Amostras sintomáticas de milho (1), sorgo (2) e *Sorghum verticilliflorum* (3). MM = marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen).

```
VFHQSGTVDAGAQQGGTGNQGATPPTTGTTGSAAPQTGSGGGTGTGTGATGGQTGAGTGA
ETGTGATGGQAGTGGGTGRTGTGTSVGTGATGGQKDKDVDAGTTGTITVPLKAMSKKMRLP
KAKGKDVHLDFLLTYKQQQDISNTRATREEFDRWYEAIKKEYEIDDTQMTVMSGLMVWCI
ENGCSPNINGSWTMMDGDEQRFPLKPIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPR
YGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGNVGETQE
NTERHTAGDVSRRMHSLLGQQHH.
```

Figura 3. Sequência de aminoácidos da proteína capsial da estirpe de SCMV causando mosaico em milho no Brasil, depositada no *GenBank* por Souza et al. (2012a,b), sob numero de acesso DQ315490. Em negrito verificam-se as mesmas regiões conservadas **MVWCIENG** e **QMKAAA** utilizadas por Seifers et al. (2000) para o desenho do conjunto de *primers* PZEO, direto e reverso, respectivamente.

Os amplicons obtidos a partir de amplificação com os *primers* PZEO, PSC e MDMV2/ MDMV3 (SCMV-Brasil) foram isolados do gel, sequenciados e apresentaram 324, 465 e 863 pb, respectivamente. A comparação através de *blastn* realizado contra o *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mostrou identidades variando de 95 a 98% e de 99 a 100% quando comparados, respectivamente, com a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína capsidial da sequência da estirpe de SCMV (DQ315490) infectando milho no Brasil.

A Figura 4 mostra o alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína capsidial traduzida destes fragmentos e do acesso de SCMV, DQ315490. Observa-se que os fragmentos amplificados com os *primers* PSC e PZEO representam parte da região *core* conservada da proteína capsidial. Entretanto, para o fragmento maior de 1072 pb (Figura 2), amplificado com o conjunto de *primers* MDMV, não foi possível o sequenciamento da região referente ao N-terminal da proteína capsidial e sim do restante do gene, que também corresponde ao *core* conservado (Figura 4). A obtenção de fragmentos parciais se deve aos comprimentos de leitura obtidos nas reações de sequenciamento, que não foram suficientes para cobrir as extremidades dos amplicons. Isso é comum quando se sequenciam fragmentos purificados sem a utilização de *primers* internos. No entanto, mesmo utilizando sequências parciais, foi possível identificar a estirpe de potyvirus que infectava as amostras em teste.

Os resultados obtidos nas reações de PCR com os *primers* MDMV, PSC e PZEO indicaram que todas as amostras sintomáticas analisadas estavam infectadas com SCMV,

confirmando o agente causal do mosaico em milho e sorgo no Brasil. Estes dados estão em concordância com os apresentados por Melo (2000), Souza et al. (2012a,b) e Gonçalves et al. (2011). Para os conjuntos de primers MDMV2 e MDMV3 (MELO, 2000), PSC e PS (JIANG; ZHOU, 2002) e PZEO1 e PZEO2 (SEIFERS et al., 2000), a melhor temperatura de anelamento foi de 52 °C, e o sequenciamento dos amplicons obtidos permitiu identificar o SCMV. Para a utilização do conjunto de primers MDMV2 e MDMV3 em reações de PCR, o cDNA deve ser obtido empregando-se o sistema SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) e o primer reverso específico (MDMV). Com os outros dois conjuntos de primers, como os amplicons são menores, os cDNAs são sintetizados com random primers utilizando kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Considerando o exposto acima e que os primers (PZEO1 e PZEO2) foram desenhados com base nas regiões conservadas de potyvirus infectando poáceas (SEIFERS et al., 2000), a utilização desses, sob as condições estabelecidas nesse trabalho, constitui uma ferramenta prática e rápida para identificação de SCMV quando um grande número de amostras precisa ser analisado.

.....
	5	15	25	35	45	55	65
DQ315490	VFHQ <u>S</u> GTVDA	GAQGGTGNQG	ATPPTTGGTT	GSAAPQTGSG	GGTGTGTGAT	GGQTGAGTGA	ETGTGATGGQ
PSC-MZ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PSC-Sr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Mz	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Sr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-SrV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Col	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MDMV-Mz	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MDMV-Sr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MDMV-SrN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
.....
	75	85	95	105	115	125	135
DQ315490	AGTGGGTGRT	GTGSVGTGAT	GGQKDKDVDA	GTTGTITVPK	LKAMSKMRL	PKARGKDVHL	LDFLLTYKPO
PSC-MZ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PSC-Sr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Mz	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Sr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-SrV	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PZEO-Col	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
MDMV-Mz	-----	-----	---KDKVDV	GTTGTITVPK	LKAMSKMRL	PKARGKDVHL	LDFLLTYKPO
MDMV-Sr	-----	-----	---KDKVDV	GTTGTITVPK	LKAMSKMRL	PKARGKDVHL	LDFLLTYKPO
MDMV-SrN	-----	-----	---KDKVDVA	GTTGKITVPK	LKAMSKMRL	PKARGKDVHL	LDFLLTYKPO
.....
	145	155	165	175	185	195	205
DQ315490	QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIDDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PSC-MZ	-QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIDDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PSC-Sr	-QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIDDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PZEO-Mz	-----	-----	-----	-----	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PZEO-Sr	-----	-----	-----	-----	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PZEO-SrV	-----	-----	-----	-----	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
PZEO-Col	-----	-----	-----	-----	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
MDMV-Mz	QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIDDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
MDMV-Sr	QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIDDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
MDMV-SrN	QDISNTRAT	REEFDRWYEA	IKKEYEIEDT	QMTVVMSGLM	VWCIENGCS	NINGSWTMMD	GDEQRVFFLK
.....
	215	225	235	245	255	265	275
DQ315490	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PSC-MZ	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PSC-Sr	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PZEO-Mz	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PZEO-Sr	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PZEO-SrV	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
PZEO-Col	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
MDMV-Mz	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
MDMV-Sr	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
MDMV-SrN	PVIENASPTF	RQIMHHFSDA	AEAYIEYRNS	TERYMPRYGL	QRNLTDYSLA	RYAFDFYEMN	SRTPARAKEA
.....
	285	295	305	315	325		
DQ315490	HMQMKA ⁵ AAVR	GSNTRLFGLD	GNVGETQENT	ERHTAGDVSR	NMHSLLGVQQ	HH	
PSC-MZ	HMQMKA----	-----	-----	-----	-----	---	
PSC-Sr	HMQMKA----	-----	-----	-----	-----	---	
PZEO-Mz	HMQMKA ⁵ AA--	-----	-----	-----	-----	---	
PZEO-Sr	HMQMKA ⁵ AA--	-----	-----	-----	-----	---	
PZEO-SrV	HMQMKA ⁵ AA--	-----	-----	-----	-----	---	
PZEO-Col	HMQMKA ⁵ AA--	-----	-----	-----	-----	---	
MDMV-Mz	HMQMKA ⁵ AAVR	GSNTRLFGLD	GNVGETQENT	ERHTAGDVSR	NMHSLLGVQQ	HH	
MDMV-Sr	HMQMKA ⁵ AAVR	GSNTRLFGLD	GNVGETQENT	ERHTAGDVSR	NMHSLLGV--	---	
MDMV-SrN	HMQMKA ⁵ AAVR	GSNTRLFGLD	GNVGETQENT	ERHTAGDVSR	NMHSLLGV--	---	

Figura 4. Alinhamento da sequência da proteína capsidial do acesso brasileiro de SCMV (DQ315490) infectando milho e dos amplicons de SCMV traduzidos obtidos neste trabalho. PSC, PZEO, MDMV representam a denominação dos *primers* e MZ=milho, Sr=sorgo, SrV=*Sorghum verticilliflorum* e Col=capim colônião. Aminoácido de número 5 (S) sublinhado, indica o início do gene da proteína capsidial.

Conclusões

As condições definidas neste trabalho para as reações de RT-PCR, empregando *primers* previamente desenvolvidos e disponíveis na literatura para identificação dos potyvirus do complexo do mosaico, permitiram selecionar conjuntos de *primers* capazes de detectar de forma rápida o SCMV, agente causal do mosaico em milho e sorgo no Brasil.

Agradecimentos

Agradecemos ao assistente Célio Ramos das Neves pelas fotos das plantas com sintomas de mosaico e pelo apoio nos trabalhos em campo e laboratório.

Referências

ALMEIDA, A. C. L. **Detecção, caracterização e aspectos epidemiológicos do complexo viral do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.)**. 1998. 83 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

BARBOZA, A. A. L.; SOUTO, E. R.; CARNELOSSI, P. R.; MARCUZ, F. S.; MARRAFON, M. A. Propriedades de isolados virais de *Saccharum* spp., causadores de mosaico em cana-de-açúcar no Paraná e São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 109-112, 2008.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; FERNANDES, F.T.; PINTO, N. F. J. A. Doenças: mosaico da cana-de-açúcar (Virus - "SCMV"). In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. 4. ed. Sete Lagoas:

Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de produção, 2).

DENG, C. L.; WANG, W. J.; WANG, Z. Y.; JIANG, X.; CAO, Y.; ZHOU, T.; WANG, F. R.; LI, H. F.; FAN, Z. F. The genomic sequence and biological properties of Pennisetum mosaic virus, a novel monocot-infecting potyvirus. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 921-927, 2008.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. **The potyvirus group**. Gainesville: Florida Agricultural Experiment Station, 1991. (Florida Agricultural Experiment Station. Monograph Series, 16).

ESPEJEL, F.; JEFFERS, D.; NOA-CARRAZANA, J. C.; RUIZ-CASTRO, S.; SILVA-ROSALES, L. Coat protein gene sequence of a Mexican isolate of sugarcane mosaic virus and its infectivity in maize and sugarcane plants. **Archives of Virology**, New York, v. 151, p. 409-412, 2006.

FAN, Z.; CHEN, H.; CAI, S.; DENG, C.; WANG, W.; LIANG, X.; LI, H. Molecular characterization of a distinct potyvirus from whitegrass in China. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 1219-1224, 2003.

FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2000. 80 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 26).

GIOLITTI, F.; HERRERA, M. G.; MADARIAGA, M.; LENARDON, S. L. Detection of *Maize Dwarf Mosaic Virus* (MDMV) on maize in Chile. **Maydica**, Bergamo, v. 50, p. 101-104, 2005.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo Sugarcane mosaic virus e Maize rayado fino virus provoca danos na cultura do milho no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007a.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, A. S.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M.; HARAKAVA, R. Caracterização de um isolado do sugarcane mosaic virus que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2007b.

GONÇALVES, M. C.; GALDEANO, D. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de sugarcane mosaic virus, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 346, p. 362-369, 2011.

HUANG, Q.; BAUM, L.; FU, W. L. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. **Clinical Laboratory**, Heidelberg, v. 56, p. 149-152, 2010.

JIANG, J. X.; ZHOU, X. P. Maize dwarf mosaic disease in different regions of China is caused by *Sugarcane mosaic virus*. **Archives of Virology**, New York, v. 147, p. 2437-2443, 2002.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.

KITAJIMA, E. W. Citopatologia e localização de vírus do milho e de leguminosas alimentícias nas plantas infectadas e nos

vetores. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, n. 2, p. 241-254, 1979.

KUNTZE, L.; FUCHS, E.; GRUNTZEG, M.; SCHULZ, B.; HENNING, U.; HOUMANN, F.; MELCHINGER, A. E. Evaluation of maize inbredlines for resistance to sugarcane mosaic virus (SCMV) and maize dwarf mosaic virus (MDMV). **Agronomic**, v. 15, p. 463-467, 1995.

LENARDON, S. L.; GIOLITTI, F. Maize Argentina mosaic. In: LAPIERRE, H.; SIGNORET, P. A. (Ed). **Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)**. Montpellier: INRA, 2004. p. 635-636.

LOUIE, R.; KNOCK, J. K.; FINDLEY, W. R. Elite maize germplasm: reaction to maize dwarf mosaic and maize chlorotic dwarf viruses. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 1210-1215, 1990.

MELO, P. R. **Estudo da variabilidade e do uso de métodos moleculares na detecção dos vírus do rayado fino e do mosaico comum do milho (*Zea mays* L.)**. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

RESENDE, R. O.; ALMEIDA, A. C. L.; MELO, P. R. Técnicas moleculares para detecção de vírus em milho e em insetos-vetores. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 206-226.

SEIFERS, D. L.; SALOMON, R.; MARIE-JEANNE, V.; ALLIOT, B.; SIGNORET, P.; HABER, S.; LOBODA, A.; ENS, W.; SHE, Y. M.; STANDING, K. G. Characterization of a novel potyvirus isolated

from maize in Israel. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 505-513, 2000.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W. Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. **Archives of Virology**, New York, v. 106, p. 171-200, 1989.

SHUKLA, D. D.; WARD, C. W.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Cambridge: CAB International, 1994. 516 p.

SOUZA, I. R. P.; GIOLITTI, F.; CARNEIRO, N. P.; LENARDON, S. L.; OLIVEIRA, E.; GOMES, E. A.; NODA, R. W.; SOUZA, F. A. de. Sequence diversity in the coat protein of SCMV infecting maize and sorghum in Brazil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 11, n. 2, p. 120-135, 2012a.

SOUZA, I. R. P.; CARNEIRO, N. P.; GIOLITTI, F.; LENARDON, S. L.; SABATO, E. O.; GOMES, E. A.; NODA, R.; SOUZA, F. A. de. **Análise do N-terminal da proteína capsidial de SCMV infectando milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012b. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 59).

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARAES, C. T.; SCHUSTER, I.; OLIVEIRA, E. de; REDINBAUGH, M. Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. **Hereditas**, Lund, v. 145, n. 4, p. 167-173, 2008.

Embrapa

Milho e Sorgo

CGPE 10790



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

