

## Detecção molecular de potyvirus causador de mosaico em plantas daninhas na cultura do milho

Isabel Regina Prazeres de Souza<sup>(1)</sup>, José Avelino Santos Rodrigues<sup>(1)</sup> Décio Karam<sup>(1)</sup>,  
Beatriz de Almeida Barros<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Minas Gerais, isabel.prazeres@embrapa.br; <sup>(2)</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo.

**RESUMO:** O mosaico comum é a principal virose do milho no Brasil, cujo agente causal foi identificado como sendo uma nova estirpe de *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). Considerando as perdas que esta virose pode causar à produção e a sua ocorrência em diferentes hospedeiros, o presente trabalho teve como objetivo identificar espécies de potyvirus causando mosaico em plantas daninhas na cultura do milho. Nesta etapa inicial foram amostradas as espécies *Brachiaria plantaginea*, *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. Por meio da utilização de primers específicos para detecção molecular de potyvirus, que amplificam a proteína capsidial ou região conservada desta, foi possível identificar o SCMV como a espécie causando mosaico nestas plantas.

**Termos de indexação:** *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), proteína capsidial, identificação molecular

### INTRODUÇÃO

O mosaico é a principal virose em milho no Brasil (Gonçalves et al., 2007a,2011), tendo o *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) como seu agente causal (Souza et al., 2008, 2012a,b; Resende et al., 2004). O aumento da área plantada com milho nos últimos anos, associado ao cultivo na safrinha (plântio 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, entre as quais a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) (Gonçalves et al., 2007b, 2011; Barboza et al., 2008) e o sorgo (Souza et al., 2012a,b), além de infectar várias outras espécies como os capins massambará e colômbio (Almeida, 1988). O objetivo deste trabalho foi utilizar primers específicos para a proteína capsidial ou região conservada desta na identificação dos potyvirus do complexo do mosaico presentes em plantas daninhas na cultura do milho.

### MATERIAL E MÉTODOS

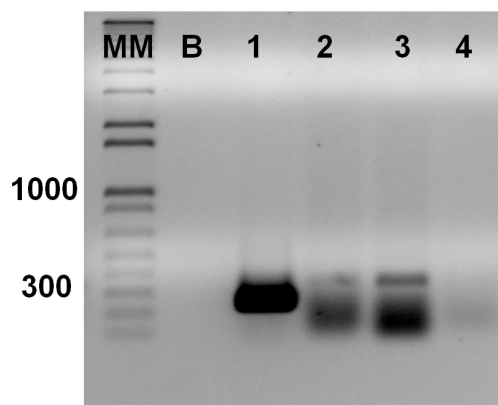
Folhas sintomáticas de *Brachiaria plantaginea* (capim marmelada), *Brachiaria decumbens* (Figura 1) e de *Panicum maximum*, consideradas plantas daninhas na cultura do milho, foram coletadas em campo de produção na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. O material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer a -80 °C. A extração de RNA foi realizada empregando-se o RNeasy<sup>®</sup>Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado por meio do Nanodrop 1000 (Thermoscientifica, Waltham, MA, U.S.A). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1,0 µg de RNA total utilizando-se o SuperScript<sup>®</sup>III First-Strand Synthesis System e oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a detecção do agente causal as reações de PCR foram realizadas com primers específicos para os potyvirus do complexo do mosaico (SCMV, MDMV, SrMV, PenMV, ZeMV e JGMV) também de acordo com as recomendações do fabricante e conforme condições otimizadas por Souza et al. (2013). Como controle das reações, foram utilizadas amostras em branco e de milho sadio. 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 de DNA foi realizado com o BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) em sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de sequências do NCBI (*GenBank*) para confirmação de suas identidades.



**Figura 1.** Folhas de *Brachiaria plantaginea* (esquerda) e *Brachiaria decumbens* (direita) com sintomas de mosaico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os primers testados, foram produzidos amplicons nas três plantas daninhas com a utilização do conjunto de primers para amplificação de potyvirus em geral, PZEO (Figura 2). Além disso, para *B. plantaginea* houve também amplificação com o conjunto de primers (MDV2/MDMV3) específicos para SCMV desenvolvidos por Resende et al. (2004).



**Figura 2.** Amplicons obtidos com o conjunto de primers PZEO, onde B= amostra em branco, 1= *B. plantaginea*, 2= *P. maximum*, 3= *B. decumbens* e 4 = milho sadio. MM = 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen).

O fragmento obtido com o conjunto de primers PZEO a partir da amostra de *B. plantaginea* foi isolado do gel e sequenciado. A sequência obtida refere-se à região conservada da proteína capsial viral (**Figura 3**) e, ao ser comparada com as sequências disponíveis no NCBI, demonstrou 100% de identidade com as sequências de SCMV da

estirpe brasileira infectando milho e sorgo depositadas por Souza et al. (2005).

```

VWCIENGCSPNINGSWTMMDGDEQRFVPLKPVI
ENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPR
YGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEA
HMQMKAAA
  
```

**Figura 3.** Sequência da proteína traduzida do amplicon obtido de *B. plantaginea* com o primer PZEO. Em negrito, regiões conservadas MVWCIENG e QMKAAA utilizadas por SEIFERS et al.(2000) para o desenho do conjunto de primers PZEO, direto e reverso, respectivamente.

Este estudo é o início de uma amostragem mais ampla a ser realizada em áreas produtoras de milho visando à identificação de potyvirus do complexo do mosaico infectando plantas daninhas.

## CONCLUSÃO

As plantas daninhas *Brachiaria plantaginea*, *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* são hospedeiras do SCMV. Novos estudos estão em andamento visando a amostragem de outras espécies de plantas daninhas.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Célio Ramos das Neves pelo apoio com os trabalhos em campo e laboratório.

## APOIO FINANCEIRO

FAPEMIG

## 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.
- FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 2000. 80 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 26).
- 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**, Botucatu, v. 33, n. 4, p. 348-352, 2007a.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, A. S.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M.; HAKAKAVA, 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.

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. **Análise do N-terminal da proteína capsidial de SCMV infectando milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012b. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 59).

SOUZA, I. R. P. de; BARROS, B. de A.; RAFAEL, H. A. **Deteção molecular do SCMV infectando**

**milho e sorgo no Brasil**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 24 p. il. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 66). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/89930/1/bol-66.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

SOUZA, I. R. P.; LENARDON, S.; GIOLITTI, F. J.; OLIVEIRA, E.; CARNEIRO, N. P.; GOMES, E. A. Identification of the potyvirus species in maize, sorghum and sugarcane from Brazil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2005. p. 64.

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

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. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho: mollicutes, vírus, vetores, mancha por Phaeosphaeria**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 206-226.

