

Análise do N-Terminal da Proteína Capsidial de SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2012

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 59

Análise do N-Terminal da Proteína Capsidial de SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil

Isabel Regina Prazeres de Souza
Newton Portilho Carneiro
Fabian Giolitti
Sergio Luis Lenardon
Elizabeth de Oliveira Sabato
Eliane Aparecida Gomes
Roberto Willians Noda
Francisco Adriano de Souza

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2012

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: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávia Cristina dos Santos, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

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: Isabel Regina Prazeres de Souza

1ª edição

1ª impressão (2012): 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**

Análise do N-terminal da proteína capsidial de SCMV infectando milho e sorgo no Brasil / Isabel Regina Prazeres de Souza ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2012.

14 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 59).

1. Fitopatologia. 2. Genética vegetal. 3. Potyvírus. 4. Gene. 5. Sequenciamento. I. Souza, Isabel Regina Prazeres de. II. Série.

CDD 632 (21. ed.)

© Embrapa 2012

Sumário

Introdução	4
Material e Métodos	6
Resultados	6
Discussão	9
Conclusões	10
Referências	11

Análise do N-Terminal da Proteína Capsidial de SCMV Infectando Milho e Sorgo no Brasil

*Isabel Regina Prazeres de Souza*¹

*Newton Portilho Carneiro*²

*Fabian Giolitti*³

*Sergio Luis Lenardon*⁴

*Elizabeth de Oliveira Sabato*⁵

*Eliane Aparecida Gomes*⁶

*Roberto Willians Noda*⁷

*Francisco Adriano de Souza*⁸

Introdução

O mosaico comum do milho, causado por potyvírus, está entre as viroses mais importantes desta cultura no Brasil (WAQUIL et al., 1996; SOUZA et al., 2005, 2008; GONÇALVES et al., 2011). Seis espécies de potyvírus 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) (SHEIFERS et al., 2000), e

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

²Biólogo, PhD. em Plant Science, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, newton.carneiro@embrapa.br

³Biólogo, Dr. em Ciencias Biológicas, Pesquisador IPAVE-CIAP-INTA, Córdoba, Argentina, giolitti.fabian@inta.gob.ar

⁴Eng.-Agr., PhD. em Molecular Virology, Pesquisador IPAVE-CIAP-INTA, Córdoba, Argentina, lenardon.sergio@inta.gob.ar

⁵Bióloga, Dra. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, elizabeth.o.sabato@embrapa.br

⁶Bióloga, Dra. em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, eliane.aparecida@embrapa.br

⁷Biólogo, Dr. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, roberto.noda@embrapa.br

⁸Eng.-Agr., PhD. em Plant and Microbial Ecology, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, francisco.adriano@embrapa.br

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

Pennisetum mosaic virus (PenMV) (DENG et al., 2008). Existem evidências de que o SCMV é o vírus mais comum causando sintomas de mosaico em milho (*Zea mays* L.) no Brasil (MELO, 2000; MELO et al., 2000; SOUZA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2011). Entretanto, são escassas as informações sobre a espécie de potyvírus infectando sorgo no Brasil. Os potyvírus são transmitidos de maneira não persistente por vários afídeos e o vetor mais eficiente na cultura do milho é o *Rhopalosiphum maidis* L. (Hemiptera: Aphididae) (EDWARDSON; CHRISTIE, 1991). Um dos fatores que influencia a disseminação deste vírus é a sobreposição de ciclos da cultura do milho. No Brasil, o cultivo de segunda safra, denominado safrinha - semeado de janeiro a março (CRUZ et al., 2010) -, o cultivo do milho irrigado e a primeira safra são responsáveis pela sobreposição de cultivo do milho (WAQUIL et al., 1996; GONÇALVES et al., 2007a). Esta condição, associada com o grande número de hospedeiros, contribui para a manutenção do inóculo no campo. Estudos para identificar o potyvírus infectando milho no Brasil são recentes e têm mostrado, por meio do sequenciamento da proteína capsidial, que o SCMV estava presente, com maior identidade com o SCMV-MDB, 86,3% (ALMEIDA et al., 2000; SOUZA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2011), sugerindo uma nova estirpe. O SCMV-MDB é uma estirpe americana do SCMV, anteriormente classificada como MDMV-B (FRENKEL et al., 1991). Os objetivos do presente estudo foram (i) identificar por meio do sequenciamento da proteína capsidial a espécie de potyvírus causando sintomas de mosaico em milho e sorgo no Brasil, e (ii) analisar a sequência de aminoácidos (aa) do N-terminal do gene da proteína capsidial.

Material e Métodos

Material vegetal

Folhas apresentando sintomas característicos de mosaico, pequenas áreas cloróticas entremeadas com pequenas áreas verdes, foram coletadas de milho e de sorgo, em 2004. As amostras de cultivares de milho foram identificadas como: 01, 02, e 06; de cultivares de *S. bicolor*: 08, 09, e 13; de cultivares originadas do cruzamento de *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*: 10 and 11; e de *Sorghum verticilliflorum*: 14. A amostra 08 foi coletada em Jardinópolis-SP e as demais, em Sete Lagoas-MG.

RT-PCR e imunocaptura, clonagem e sequenciamento de DNA fita dupla e alinhamento de nucleotídeos da proteína capsidial

Conforme descrito por Souza et al. (2012).

Alinhamento da sequência do N-terminal da proteína capsidial

Para comparações do N-terminal e região core da proteína capsidial, foram utilizadas sequências de aminoácidos de acessos de diferentes países e do Brasil, tendo milho ou cana como hospedeiros, obtidos de banco de dados público - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). O alinhamento de aminoácidos foi realizado utilizando ClustalW2 (LARKIN et al., 2007), implementado no software Sea View versão 4 (GOUY et al., 2010).

Resultados

Somente primers para o SCMV-Brasil amplificaram um fragmento de aproximadamente 1 Kb. Todos os outros primers para potyvírus (**Tabela 1**) amplificaram somente o controle homólogo. Comparações

da sequência amplificada mostrou o mesmo fragmento de 1072 pb, previamente relatado por Melo (2000) e Resende et al. (2004), compreendendo parte da Nib (nt 1 to 11), toda a proteína capsidial (nt 12 a 998) e uma pequena parte do 3' UTR (nt 999 a 1072).

A sequência de aminoácidos do N-terminal variável, deduzida a partir do fragmento amplificado do SCMV das amostras brasileiras de milho e de sorgo, foi alinhada com algumas das sequências da proteína capsidial de SCMV disponíveis em banco de dados público, GenBank (**Figura 1**). O comprimento total das amostras brasileiras consistiram de 328 aa como GU474635 do México e D00949 (SCMV-MDB) e A34976 dos Estados Unidos. A maioria dos demais acessos apresentava um comprimento da proteína capsidial de 313 aa. Esta diferença está localizada no comprimento do N-terminal dos isolados de campo brasileiros de milho e de sorgo em relação à maioria dos acessos de milho e de cana do GenBank. Os acessos de isolados brasileiros de cana (AY819716, AY819717 e AY819718) e um de milho (HQ342698) apresentavam um N-terminal com, respectivamente, 15 e 5 resíduos de aa menor do que as amostras de milho e de sorgo. A proteína capsidial do SCMV das amostras brasileiras de milho e de sorgo e dos acessos brasileiros HQ342698, HQ439439 e HQ439440 apresentaram Q/S como sítio de clivagem da protease, e os acessos brasileiros de cana apresentaram o sítio -/A. Os aminoácidos das posições 1 a 11 do N-terminal foram muito conservados entre todas as amostras e acessos brasileiros. O SCMV das amostras brasileiras de milho e de sorgo apresentou um dodecapeptídeo, GTGTGATGGQAG, duplicado, posição 40 a 51 e 57 a 68 e parcialmente replicado como um octopeptídeo, GTGATGGQ, posição 82 to 89 (**Figura 1**). Alguns dos isolados apresentavam GGT ou GVT na sequência do octopeptídeo ao invés de GAT. Neste caso, os resíduos de aa A foram substituídos por G ou V, sendo todos não polar com grupo R alifático. Embora a proteína capsidial do SCMV das amostras brasileiras de milho e de sorgo e dos acessos SCMV-MDB D00949, A34976, e GU474635

apresentassem o mesmo comprimento, a sequência duplicada e parcialmente repetida no N-terminal, posições 34 a 49, 53 a 66 e 68 a 73 diferem das nossas amostras, tendo somente GATGGQ em comum, o qual é parte da sequência repetida na posição 53 a 66. Os quatro acessos brasileiros de cana apresentaram o decapeptídeo QPPATGAAAQ, duplicado, nas posições 18 a 27 e 31 a 40 e parcialmente repetida como QPPTGGA na posição 48 a 54. A percentagem do dipeptídeo GT no N-terminal (dados não mostrados, ver SOUZA et al., 2012) foi maior para as amostras brasileiras e para dois dos três acessos brasileiros de milho, HQ439439 e HQ439440, variando de 10.23 a 14.77%, posicionada acima da média, 7.36%. O conteúdo de G das amostras e dos acessos brasileiros de milho apresentou tendência para valores mais elevados, 36.36 to 42.05%. Entretanto, quando comparadas com os acessos tendo milho como hospedeiro, as amostras brasileiras apresentaram os menores valores para o conteúdo de GS, 1.14 a 3.41%. Estes valores foram similares aos dos acessos brasileiros tendo cana como hospedeiro, AY819716, AY819717, AY819718, e AY819719.

Tabela 1. Sequência dos pares de primers, de diferentes potyvírus, utilizados nas reações de RT-PCR.

Potyvírus	Nome do primer	Sequência do primer 5'-3'	Referência
JGMV*	JG5'	AGAGATGTACAAGAACGCCATCGC	Lenardon e Giolitti (2004)
	JG3'	CATCCTTTAACGTCAGATCGACGG	
SCMV-Arg*	SC5'	TTACAACGAAGATGTTTTCC	Giolitti et al. (2005)
	SC3'	CTGAAATAGTAAATACGAGG	
MDMV-Arg*	MD5'	ACGACAATTCTTTGACGATCTTCC	Lenardon e Giolitti (2004)
	MD3'	CCTCACTCACTTGACAGACATAGTAGG	
SCMV-Brasil	MDMV2	GTATTCATCAGTCGGGAAGCTG	Melo (2000),
	MDMV3	ACGAGGTAAAACCTCAC	Resende et al. (2004)

*Pares de primers JG5'/JG3', MD5'/MD3', SC5'/SC3', previamente desenhados por Giolitti (coautor, comunicação pessoal), baseando-se nas sequências do NCBI, respectivamente, JGMV- MDO (U07217), MDMV-Argentina (DQ973169) e SCMV-Argentina (DQ973170).

Estados Unidos (FRENKEL et al., 1991), é evidente a frequente troca de um aa S (serina) por um T (treonina). Ambos os aminoácidos apresentam um grupo R, polar não carregado (LEHNINGER et al., 1993). Kimalov et al. (2004) sugeriram que a manutenção do balanço de carga, e não a sequência primária, foi essencial para a infectividade do ZYMV. A sequência repetida, GTGTGATGGQAG, e o sítio de clivagem putativo Q/S entre Nib/CP dos isolados brasileiros de milho e de sorgo diferem dos acessos brasileiros de cana dispostos no GenBank, AY819716 a AY819719, apresentando, respectivamente, QPPATGAAAQ e -/A (**Figura 1**). Gonçalves et al. (2007b) mencionaram que o acesso de cana AY819719 apresentou a maior identidade, 94 a 96%, com isolados da Austrália e dos Estados Unidos. O N-terminal dos isolados brasileiros, com 15 aa a mais do que a maioria dos SCMV, com uma sequência repetida diferente e um alto conteúdo do dipeptídeo GT, poderia explicar a classificação dos isolados brasileiros em um grupo diferente, sugerindo uma nova estirpe, como mostrado na árvore filogenética apresentada por Souza et al. (2012). Estas diferenças na sequência da proteína capsidial e a separação dos isolados de milho e de sorgo dos acessos de cana, verificados por Souza et al. (2012), sugerem a existência de diferentes estirpes de SCMV no Brasil.

Conclusões

Nossos resultados mostraram que os isolados brasileiros de SCMV coletados em milho e em sorgo formam um grupo monofilético distinto e estes estão em concordância com outros estudos (HA et al., 2008; XU et al., 2008; GAO et al., 2011) utilizando estas nossas sequências do SCMV, já depositadas no GenBank desde dezembro/2005 sob os seguintes números de acesso: DQ315489 (Amostra 01), DQ315490 (Amostra 02), DQ315491 (Amostra 06), DQ315492 (Amostra 08), DQ315493 (Amostra 09), DQ315494 (Amostra 10), DQ315495

(Amostra 11), DQ315496 (Amostra 13) e DQ315497 (Amostra 14). Estes resultados sugerem e reforçam nossos dados em relação a uma nova estirpe. Além disso, estudos utilizando o sequenciamento da proteína capsidial de potyvírus de isolados brasileiros de sorgo estão sendo relatados pela primeira vez.

Referências

ALMEIDA, A. C. L.; OLIVEIRA E.; RESENDE R. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridação “dot-blot” e dot-ELISA em milho com mosaico-comum. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 168-170, 2000.

CRUZ, J. C.; SILVA, G. H.; PEREIRA FILHO, I. A.; GONTIJO NETO, M. M.; GUIMARÃES, P. C. Caracterização do cultivo de milho safrinha de alta produtividade em 2008 e 2009. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, n. 2, p. 177-188, 2010.

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. (Monograph 16).

FRENKEL, M. J.; JILKA, J. M.; MCKERN, N. M.; STRIKE, P. M.; CLARK JR., J. M.; SHUKLA, D. D. Unexpected sequence diversity in the amino-terminal ends of the coat proteins of strains of sugarcane mosaic virus. **Journal of General Virology**, Amsterdam, v. 72, p. 237-242, 1991.

GAO, B.; CUI, X-W.; LI, X. D.; ZHANG, C. Q. Complete genomic sequence analysis of a highly virulent isolate revealed a novel strain

of Sugarcane mosaic virus. **Virus Genes**, Norwell, v. 43, p. 390-397, 2011.

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.; GALDEANO, M. D.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M. Variabilidade genética de Sugarcane mosaic virus, causando mosaico em milho no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, p. 362-369, 2011.

GONÇALVES, M. C.; MAIA, I. G.; GALLETI, S. R.; FANTIN, G. M. Infecção mista pelo Sugarcane mosaic virus e Maize rayado fino vírus 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. M.; MAIA, I. G.; CHAGAS, C. M.; HAKAWA, R. Caracterização de um isolado de sugarcane mosaic virus que quebra a resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 32, n. 1, p. 32-39, 2007b.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.

HA, C.; REVILL, P.; HARDING, R. M.; VU, M.; DALE, J. L. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 45-60, 2008.

KIMALOV, B.; GAL-ON, A.; STAV, R.; BELAUSOV, E.; ARAZI, T. Maintenance of coat protein N-terminal net charge and not primary sequence is essential for zucchini yellow mosaic virus systemic infectivity. **Journal of General Virology**, Amsterdam, v. 85, p. 3421-3430, 2004.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE,

I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth, 1993.

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.

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.

MELO, P. R.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O. Vírose do mosaico comum do milho no Brasil: caracterização e incidência. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, p. 444-445, 2000.

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, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 206-226.

SHEIFERS, 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.; BRUNT, A. A. **The Potyviridae**. Wallingford: CAB International, 1994. 516 p.

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.

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**, v. 11, n. 2, p. 120-135, 2012.

WAQUIL, J.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; CORRÊA, L. A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 4, p. 460-463, 1996.

XU, D. L.; PARK, J. W.; MIRKOV, T. E. Viruses causing mosaic disease in sugarcane and their genetic diversity in Southern China. **Archives of Virology**, New York, v. 153, p. 1031-1039, 2008.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA