

# DETECÇÃO DE VÍRUS POR RT-PCR, HIBRIDIZAÇÃO “DOT-BLOT” E DOT-ELISA EM MILHO COM MOSAICO COMUM\*

ANA CARLA L. ALMEIDA<sup>1\*\*</sup>, ELIZABETH OLIVEIRA<sup>2</sup> & RENATO O. RESENDE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, <sup>2</sup>EMBRAPA Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG, <sup>3</sup>Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, e-mail: rresende@unb.br.

(Aceito para publicação em 24/01/2000)

Autor para correspondência: Renato de Oliveira Resende

ALMEIDA, A.C.L., OLIVEIRA, E. & RESENDE, R.O. Detecção de vírus por RT-PCR, hibridização “dot-blot” e dot-ELISA em milho com mosaico comum. *Fitopatologia Brasileira* 25:168-174. 2000.

## RESUMO

O mosaico comum do milho é causado por um complexo viral constituído por quatro potyvirus distintos e pode reduzir significativamente a produção do milho (*Zea mays*). Frequentemente, a diagnose dessa virose é dificultada devido à recuperação dos sintomas pelas plantas ou a ocorrência de infecções simultâneas com outros vírus e/ou com fitoplasmas e espiroplasmas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos eficazes para a detecção do complexo viral utilizando-se RT-PCR com “primers” degenerados, hibridização “dot-blot” e dot-ELISA. O complexo viral foi multiplicado em plantas de milho por meio

de inoculação mecânica e posteriormente purificado. A preparação purificada foi utilizada para a produção de antisoro policlonal e as IgGs purificadas foram utilizadas para a realização do teste dot-ELISA. A RT-PCR foi realizada a partir de RNA total extraído de folhas infetadas, utilizando-se “primers” universais para a detecção de potyvirus. Os resultados apresentados indicam que as três técnicas podem ser utilizadas para a detecção do complexo viral do mosaico comum do milho.

**Palavras-chave:** Potyvirus, métodos diagnósticos, *Zea mays*.

## ABSTRACT

### Virus detection by RT-PCR, dot blot Hybridization and dot-ELISA in maize with potyvirus-induced-mosaic

The potyvirus-induced-mosaic is caused by a virus complex that includes four distinct potyvirus, and can significantly reduce crop yields. Considering that, in our conditions, methods for the detection of the viral complex have not yet been developed, the objective of this work was to develop reliable methods for detection of virus complex using RT-PCR with degenerate primers, dot blot hybridization and dot-ELISA. The viral complex was propagated by

mechanical inoculation in maize (*Zea mays*) plants and purified. Purified viral preparations were used to produce polyclonal antiserum and to extract viral RNA. Purified RNA was used as a template for RT-PCR with degenerate primers and the PCR product was used as a cDNA probe in dot-blot hybridization tests. Polyclonal antiserum was used to perform dot-ELISA. The results presented here indicate that the three techniques can be used for detection of the viral complex

## INTRODUÇÃO

O mosaico comum do milho (*Zea mays* L.) tem-se destacado, em importância, devido ao aumento na sua incidência e pela possibilidade de perdas que podem acarretar à produção de sementes e grãos (Waquil *et al.*, 1996). No Brasil, a virose foi inicialmente descrita por Costa *et al.*, (1971), como sendo causada por estirpes do vírus do mosaico da cana-de-açúcar (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) mas com importância

econômica limitada (Balmer, 1980). Recentemente, o SCMV foi dividido em quatro espécies de potyvirus: *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Sorghum mosaic virus*; (SrMV) e SCMV. Todos esses vírus e suas estirpes constituem um complexo viral que infeta o milho, causando sintomas de mosaico, e pertencem à família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* (Shukla *et al.*, 1989; Hollings & Brunt, 1981; Hari, 1981; Dougherty & Carrington, 1988; Shukla *et al.*, 1991). Esses vírus são transmitidos na natureza por várias espécies de afídeos de forma não-circulativa (Pirone, 1972).

Os sintomas do mosaico comum do milho caracterizam-se pela presença de um mosaico típico e, ocasionalmente, enfezamento e necrose (Pirone, 1972; Koike & Gillaspie, 1989). Em geral os sintomas são mais claramente visíveis em plantas

\*Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor apresentada à Universidade de Brasília. (1998)

\*\*Bolsista da CAPES



jovens, sendo que algumas cultivares de milho infetadas podem recuperar dos sintomas, dificultando a diagnose da doença (Shurtleff, 1986). O mosaico comum tem sido observado em associação com os enfezamentos causados por fitoplasma e espiroplasma, e também com outros vírus como o vírus da risca (*Maize rayado fino*, MRFV) Gênero *Marafivirus*. Quando ocorre associado a outras doenças, sua diagnose também é bastante dificultada (Dudienas *et al.*, 1997).

Os dados quantitativos sobre o impacto do mosaico comum na produção do milho ainda são muito escassos. Observações obtidas no CNPMS/EMBRAPA, Sete Lagoas (MG), relativas às regiões Sudeste e Centro Oeste, indicaram elevado potencial de perdas quando essa virose ocorre juntamente com o enfezamento de forma epidêmica. Acredita-se que o efeito do complexo mosaico/enfezamento na redução da produtividade depende da cultivar utilizada (Dudienas *et al.*, 1997).

O controle da virose tem sido feito com base em métodos de erradicação e outras práticas culturais (Abbott, 1961). O método mais efetivo de controle do mosaico da cana-de-açúcar é o desenvolvimento e uso de cultivares resistentes (Breux & Koike, 1978). Porém, é essencial a determinação precisa dos vírus causadores da infecção, a fim de que se possa selecionar genótipos resistentes a diferentes condições de pressão de inóculo.

Considerando-se todos esses aspectos, principalmente a impossibilidade de identificação das espécies de vírus presentes via sintomatologia, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver métodos universais eficazes para deteção e diagnose precisa do complexo viral do mosaico comum do milho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Multiplicação dos vírus

O complexo viral foi obtido a partir de amostras de folhas de milho coletadas na área experimental da EMBRAPA- Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG), e mantido em plantas de milho cultivar Br-01, em casa de vegetação. Plântulas no estádio de duas a três folhas (aproximadamente sete a dez dias após o plantio) foram inoculadas mecanicamente com inóculo preparado a partir de folhas infetadas apresentando sintomas de mosaico. As folhas, sem a nervura central, foram cortadas em pequenos segmentos e trituradas em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, na proporção 1:5, contendo 1 % do abrasivo carborundum. Após 10-14 dias da inoculação, quando as plantas apresentavam sintomas da doença, fez-se a coleta das folhas com sintomas de mosaico, para purificação dos vírus.

### Purificação do Complexo Viral

As folhas de plantas com mosaico, sem a nervura central, foram trituradas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 + 0,5 % 2-mercaptoetanol + 0,01 M EDTA, na proporção 1:2. O extrato foi filtrado em gaze e centrifugado a 9.000 g por 30 min. Ao sobrenadante foi acrescentado 1 % Triton X-100,

em agitação fria (4 °C) por 3 h. O sobrenadante foi centrifugado a 8.000 g por 20 min, e, em seguida, foi centrifugado a 100.000 g por 3 h em colchão de sacarose a 30 % preparado em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 6,2. O pellet resultante foi ressuspenso em 1 ml de tampão/50 g de folhas, em agitação à temperatura de 4 °C durante uma noite. A mistura foi centrifugado a 7.000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 40.000 rpm em rotor Beckman SW 50.1 por 3 h em gradiente de cloreto de céσιο (0,38/0,88/1,38 g CsCl em 1 ml de tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 6,2). A banda com vírus foi coletada manualmente e dialisada três vezes em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 6,2. As partículas dos vírus foram contrastadas com uma solução aquosa de acetato de uranila 3 % e visualizadas ao microscópio eletrônico JEOL 100 C. A concentração de vírus foi determinada através de espectrofotometria.

### Produção de anti-soro policlonal

Anti-soro policlonal foi produzido em coelhos a partir de preparações virais purificadas. Foi aplicado 1 mg de vírus através de três injeções intradérmicas, intervalos de 10 - 15 dias. À preparação purificada foi misturado igual volume de adjuvante de Freund completo, para a primeira injeção, e adjuvante incompleto para as outras duas injeções. Foram coletados 15-20 ml de sangue todas as semanas, 10 dias após a terceira injeção. As IgGs foram purificadas em coluna cromatográfica DEAE-Sephacel acoplada a um detector de absorvância/fluorescência (UA-5 ISCO) de acordo com Hampton *et al.* (1990). O título das IgGs foi determinado por ELISA indireto usando diluição seriada da preparação viral purificada, de acordo com Clark & Adams (1977).

### Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de folhas de milho infetadas com o complexo viral, de acordo com Lane (1986) e o RNA da preparação viral purificada foi extraído utilizando-se o método descrito por De Vries *et al.* (1982).

### Amplificação por RT-PCR e Seqüenciamento

O produto de RT-PCR foi obtido a partir de RNA viral purificado e RNA total. Para o RNA total, o cDNA foi preparado em uma diluição seriada de 1:10, 1:30, 1:60, 1:300, 1:1.000, 1:3.000. Para o RNA de vírus purificado, foi feita uma única diluição equivalente a uma concentração de 3 µl de RNA. Em ambos os casos, o cDNA foi obtido a partir da mistura do RNA, 1 µl do "primer" degenerado D335 (1 µg/µl) (5'GAGCTCGCNGYTT CATYTGNRHDWKNCG3'), 0,5 µl de inibidor de RNase (RNAguard, Pharmacia Biotech), 1 µl de dNTP (2,5 mM), 0,3 µl da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, Pharmacia Biotech) e 4 µl de tampão 5x para a enzima (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; EDTA 1 mM; DTT 5 mM DTT; NaCl 100 mM e 0,1 % Triton X-100). A mistura foi incubada por 1 h, à temperatura de 37 °C. Para a realização da PCR, utilizaram-se 10 µl do cDNA acrescido de 1 µl do "primer" degenerado U335 (1 µg/µl) (5'GAATTCATGRTNTGGT GYATHGANAAAYGG3'), 5 µl de dNTP (2,5 mM), 0,3 µl da enzima



Taq polimerase, e 5 µl de tampão 10x para a enzima (Tris-HCL 100 mM, pH 8,4; KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 20 mM). Foram realizados 35 ciclos de reações, com períodos de 2 min para desnaturação a 94 °C, 2 min para anelamento a 55 °C e 1 min para extensão a 72 °C, com uma extensão final de 7 min a 72 °C. Os “primers” usados foram sintetizados de acordo com as seqüências publicadas por Langeveld *et al.* (1991). O produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose (1,2 %), diluída em TAE 1X. Foram utilizados 3 µl do produto da RT-PCR. O gel foi corado em uma solução com brometo de etídeo (0,005 %). O fragmento de 335 pb foi clonado no vetor pGEM-T de acordo com as instruções do fabricante e seqüenciado pelo método de terminação em cadeia no seqüenciador automático ABI PRISM 377 DNA sequencer (Sanger *et al.*, 1977). As seqüências foram analisadas utilizando-se o algoritmo do programa GCG (Genetic Computer Group) da Universidade de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984).

### Preparação das amostras para hibridização “dot-blot”

O RNA total extraído a partir de folhas de milho infetadas foi preparado em uma diluição seriada de 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000 e aplicado 30 µl de cada diluição, com utilização de vácuo, em uma membrana de náilon saturada com 4X SSC (20X SSC sendo 0,15 M de citrato de sódio + 1,5 M de cloreto de sódio). Foram aplicadas também amostras de RNA total extraídas de folhas sadias e extrato bruto de folhas sadias e infetadas obtido a partir da trituração das folhas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2.

### Hibridização “dot-blot”

Para hibridização, foi utilizada uma sonda preparada a partir de clone de fragmento de 335 pb de potyvirus isolado de milho obtido por Almeida (1998). Para a preparação da sonda utilizou-se o “DNA labelling kit (dCTP) Ready to Go” (Pharmacia Biotech), adicionando-se 5 µl do DNA molde e 2 µl de α-<sup>32</sup>P dCTP, conforme instruções do fabricante. A membrana contendo as amostras foi pré-hibridizada em uma solução de pré-hibridização (4X SSC; 0,1 % de SDS; 0,05 % de leite em pó; 40 % formamida e 10 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado) por 3 h à 55 °C. A hibridização foi realizada à 55 °C por 12 h. As membranas foram lavadas duas vezes em 2X SSC à 55 °C, por 20 min e, um vez em 1X SSC + SDS 0,1 % à 55 °C por 20 min. Após as lavagens, a membrana foi colocada em contato com filme de raio-X (Kodak-XAR) e revelada após 72 h de exposição.

### Dot-ELISA

Utilizaram-se preparações purificadas de vírus e extrato de folhas de plantas sadias e infetadas. As folhas foram trituradas em tampão TBS pH 7,5 (Tris-base 0,02M; NaCl 0,5M), acrescido de 0,2 % de sulfato de sódio. Os extratos obtidos, 30 µl cada, foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose (NCM), com o auxílio de uma bomba de vácuo conectada à placa de aplicação das amostras. A membrana foi mergulhada na solução bloqueadora (TBS; 2 % Triton X-100; 2 % leite em pó) por 1 h, sob agitação de 50 rpm. Em seguida, foi feita a

aplicação do anti-soro diluído 1: 1.000 em tampão TBS + 2 % de leite em pó. A membrana foi mantida nesta solução por 16 h, à temperatura ambiente, sob agitação de 50 rpm. Fez-se então a lavagem da membrana com tampão TTBS (TBS + 0,05 % de Tween 20). Foram realizadas três lavagens de três minutos cada, sob agitação de 100 rpm. Após as lavagens, foi adicionado o anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina (GIBCOBRL), diluído 1: 3.000 em tampão TBS + 2 % de leite em pó. A membrana foi incubada sob agitação de 50 rpm, por 1 h, à temperatura ambiente. As lavagens com TTBS foram repetidas e a membrana foi incubada na solução reveladora (Tris-base 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 0,05 M), com adição de 60 µl da solução estoque de “Nitro Blue Tetrazolium” (40 mg de NBT + 1,2 ml de N’N’ dimetilformamida) e 5-bromo-4-chloro-3-indolil-fosfato (20 mg de BCIP + 1,2 ml de N’N’ dimetilformamida). A membrana permaneceu na solução reveladora, sob agitação suave, até a visualização da reação. Para interromper a reação, a membrana foi lavada várias vezes em água destilada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método para purificação do complexo viral responsável pelo mosaico comum do milho adotado no presente trabalho mostrou resultados bastante satisfatórios. O exame da suspensão purificada ao MET (Figura 1A), demonstra a presença de uma grande quantidade de partículas alongadas e flexuosas características de potyvirus.

Através da análise espectrofotométrica da preparação purificada, foi determinado o rendimento da purificação, de aproximadamente, 29 µg de vírus/g de tecido processado, superior aos valores já obtidos com outras técnicas descritas na literatura, que variam de 0,2-28 µg/g (Snazelle *et al.*, 1971; Jones & Tolin, 1972; Langenberg, 1973; Hill *et al.*, 1973; Moghal & Francki, 1976). O espectro de absorção da preparação purificada (Figura 1B) foi bastante característico e mostrou um mínimo a 240 nm e um máximo a 260 nm. A relação de absorção a 260/280 foi de 1,51 enquanto a de máxima/mínima foi de 1,14.

A IgG purificada a partir do anti-soro, produzido em coelho, foi testada por meio de ELISA indireto com extrato de planta infetada e com preparação viral purificada, e não reagiu com extrato de plantas de milho sadias, sendo específico para as espécies virais contra as quais foi produzida, embora as espécies virais não tenham sido identificadas. Com relação à detecção a partir de extratos de folhas infetadas, foram testadas várias diluições do antígeno e da IgG, sendo que as melhores diluições encontradas foram de 1:10 e 1:1.000, respectivamente (Figura 2A). O limite de detecção de vírus em plantas com mosaico comum foi determinado por meio de uma série de diluições do complexo viral purificado, de 170 µg a 0,017 ng de vírus/50 µl. Os resultados indicaram que foi possível detectar até 1,7 ng de vírus/50 µl (Figura 2B).

O produto da reação de RT-PCR a partir de RNA extraído de vírus purificado foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1,2 %, verificando-se a presença de uma banda de tamanho correspondente ao esperado (335 pb) nas amostras testadas (Figura 3). Utilizando-se uma diluição seriada do RNA



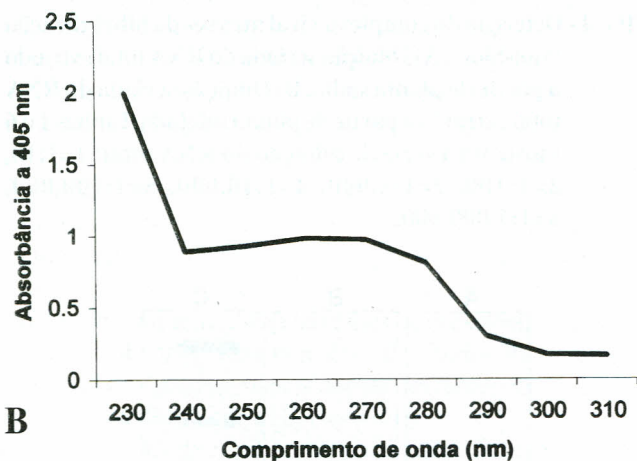
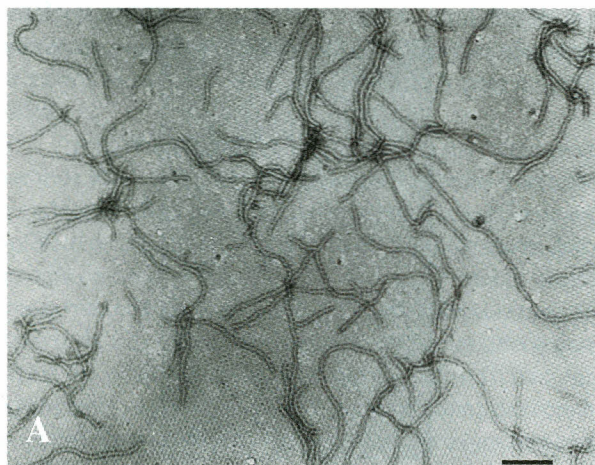


FIG. 1 - (A) Micrografia eletrônica da preparação purificada do complexo viral do mosaico comum do milho, contrastada negativamente com acetato de uranila 3 %. A barra representa 0,4  $\mu$ m; (B) Espectro de absorção da preparação purificada.

total extraído de plantas infetadas, foi possível detectar a presença dos vírus, entretanto, as bandas obtidas não se apresentaram tão nítidas em relação às obtidas para o RNA extraído de vírus purificado (dados não mostrados). Embora RT-PCR seja capaz de detectar vírus pertencentes ao complexo viral, sua utilização como ferramenta de diagnose ainda não é recomendada, devido à necessidade de se purificar o vírus para extração de RNA. Seu uso em diagnose de rotina depende do desenvolvimento de um protocolo de obtenção de RNA diretamente a partir de plantas infetadas.

A análise da porcentagem de similaridade das seqüências de nucleotídeos entre o clone do fragmento de 335 pb e os quatro potyvirus que causam o mosaico, mostrou maior valor para o MDMV-B (86,3 %) seguido do SCMV (81,8 %). Para o SrMV e JGMV os valores foram 77,1 % e 70,2 %, respectivamente.

A análise do "dot-blot" utilizando RNA total extraído de folhas infetadas mostrou resultado positivo para a hibridização (Figura 4). Foi possível detectar o vírus em amostras diluídas até 1:100. Em termos de concentração, este valor

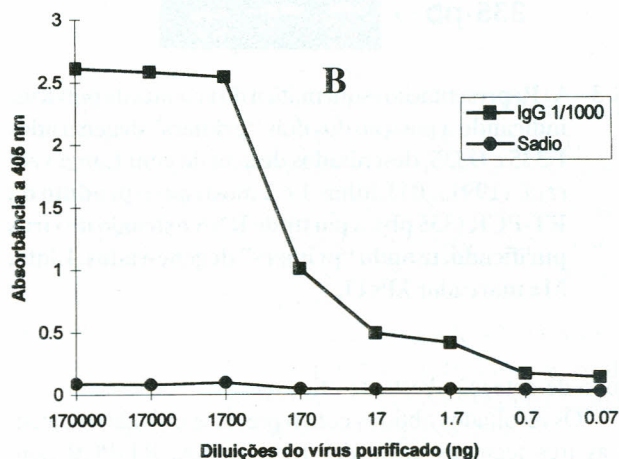
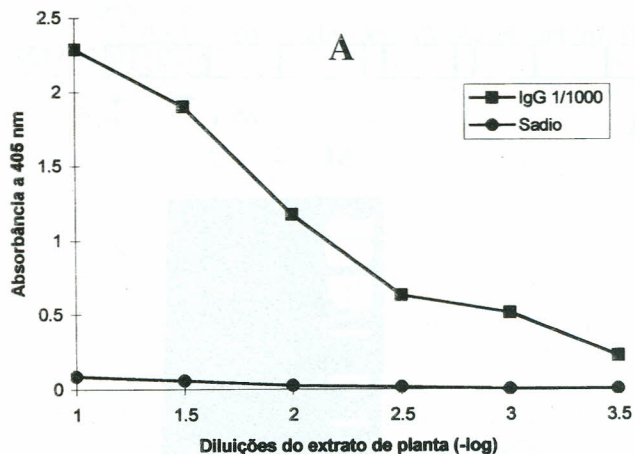


FIG. 2 - (A) Reações de ELISA-indireto com extratos de plantas infetadas utilizando anti-soro policlonal produzido contra o complexo viral do mosaico comum do milho, a 405 nm, 45 minutos após a adição do substrato. As diluições do extrato infetado são dadas em logaritmo e correspondem, respectivamente, às diluições: 1:10, 1:33, 1:100, 1:330, 1:1.000, 1:3.300. (B) Reações de ELISA-indireto com diluições seriadas de preparações purificadas do complexo viral, a 405 nm, 45 min após a adição do substrato. Diluições da IgG (■) e do extrato de folhas sadias (●) preparado em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6. Valores de  $A_{450}$  superiores a 0,5 (média do controle  $\pm 2x$  desvio-padrão) foram considerados positivos.

corresponde a 0,7 ng/ml de RNA total (21 pg em cada 30  $\mu$ l aplicado à membrana). Porém, a sonda não permitiu a detecção do vírus a partir de extrato bruto de folhas.

Dot-ELISA preparado com extratos de folhas de milho infetadas permitiu a detecção do complexo viral até diluições de  $10^{-4}$  (Figura 5A). Em termos de concentração, foi possível detectar com a utilização desse método até 0,1 ng de vírus purificado (Figura 5B). Não houve reações inespecíficas com extrato de folha sadia. O resultado indica que a técnica de dot-ELISA utilizando-se as IgGs produzidas constituiu-se em



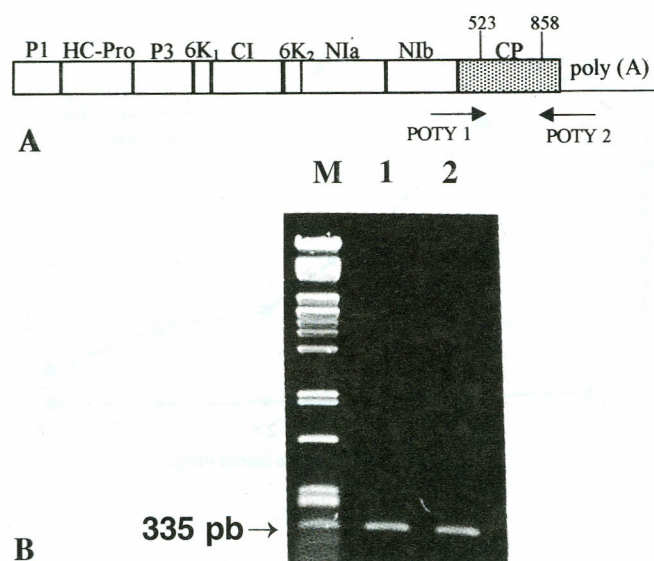


FIG. 3 - A) Representação esquemática do genoma de potyvirus, indicando a posição dos dois "primers" degenerados U335 e D335, desenhados de acordo com Langeveld *et al.* (1991). B) Linhas 1 e 2 mostram o produto da RT-PCR (335 pb), a partir de RNA extraído de vírus purificado, usando "primers" degenerados. Linha M= marcador λPstI.

método de detecção bastante eficiente.

Os resultados obtidos com o presente trabalho indicam que as três técnicas utilizadas (dot-ELISA, RT-PCR com "primers" degenerados e hibridização "dot-blot"), podem ser aplicadas para a detecção do complexo viral do mosaico comum do milho. A utilização de uma ou de outra técnica dependerá da sensibilidade desejada com a detecção.

Dot-ELISA pode ser usado para a detecção do complexo viral a partir de folhas infetadas coletadas em campo, mesmo quando houver infecções mistas com outros vírus ou com outros patógenos. Esta técnica demonstrou ser bastante sensível, de fácil execução, rápida e possível de ser utilizada para a análise de muitas amostras. Segundo Hampton *et al.* (1990), mesmo quando ocorrem reações inespecíficas, estas podem ser minimizadas com a utilização de agentes bloqueadores como o leite em pó desnatado. Estas características fazem com que essa técnica tenha um grande potencial para ser utilizada como método de rotina para diagnose de viroses de plantas a partir de extrato bruto de folhas infetadas.

É possível que a sensibilidade da RT-PCR realizada a partir de RNA total extraído de folhas possa ser aumentada caso o RNA seja extraído por meio da utilização de fenol/clorofórmio. A utilização da RT-PCR como método para a detecção de novos vírus pode permitir a detecção precisa e a classificação e estudos taxonômicos de vírus, através de análises moleculares subsequentes, além de permitir a amplificação de diferentes regiões do genoma viral (Langeveld *et al.*, 1991). De acordo com Colinet *et al.* (1994), a utilização de

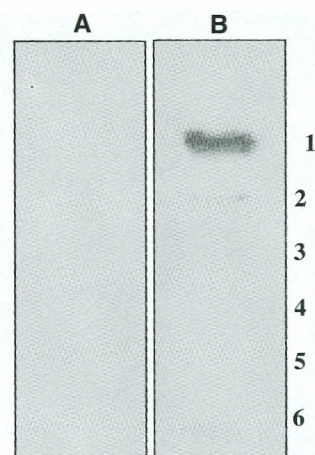


FIG. 4 - Detecção do complexo viral através de hibridização "dot-blot". A) Diluição seriada do RNA total extraído a partir de planta sadia. B) Diluição seriada do RNA total extraído a partir de planta infetada. Linhas 1 a 6 mostram a série de diluição do RNA total: 1=1:10, 2=1:100, 3=1:1.000, 4=1:10.000, 5=1:100.000, 6=1:1.000.000.

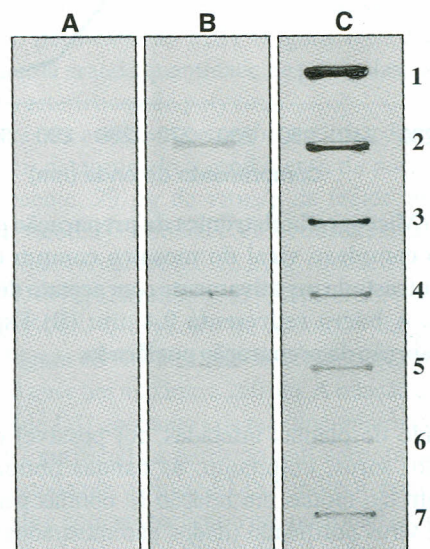


FIG. 5 - Sensibilidade de detecção por dot-ELISA. A) Controle negativo. B) Diluição seriada do extrato bruto de folhas infetadas. Linha 1= extrato de planta sadia; linha 2 a 7 mostra a série de diluições do extrato de folhas: 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000. C) Diluição seriada da preparação viral purificada: 1=1:10, 2=1:100, 3=1:1.000, 4=1:10.000, 5=1:100.000, 6=1:1.000.000.

PCR com "primers" degenerados consiste em um método bastante útil para a detecção de infecção mista por potyvirus distintos e também por novos membros do gênero *Potyvirus*, sem necessitar, para isto, da separação e purificação dos



possíveis componentes de um complexo viral. Porém, por ser uma técnica mais trabalhosa e de custo mais elevado, mostrou-se menos recomendada do que dot-ELISA para detecção de rotina.

A hibridização "dot-blot" detectou o complexo viral a partir de RNA total extraído de folhas infetadas e demonstrou ser a técnica mais sensível, permitindo a detecção de até 21 pg/30 µl de RNA total. A sonda de cDNA utilizada na detecção reconhece uma porção central da capa proteica altamente conservada entre as espécies de potyvirus (Shukla *et. al.*, 1994). Apesar da diferença de homologia de nucleotídeos entre os vírus do complexo, se utilizarmos condições menos estridentes, a sonda de cDNA pode ser capaz de reconhecer as quatro espécies de potyvirus que causam o mosaico comum, constituindo-se em um método universal eficiente para detecção de potyvirus. Além disso, essa técnica pode constituir, no futuro, uma importante ferramenta, com o desenvolvimento de sondas específicas para a detecção dos vírus componentes do complexo viral, capazes de detectar um desses vírus isoladamente a partir de extratos de folhas infetadas. Nesse caso, as sondas poderão ser empregadas em programas de melhoramento para desenvolvimento de cultivares de milho resistentes a potyvirus, já que nesse tipo de programa é imprescindível o reconhecimento da identidade do patógeno que se utiliza nos testes de resistência. Tais sondas poderão ser utilizadas também em estudos de distribuição geográfica e predominância desses diferentes vírus nas várias regiões produtoras de milho no Brasil.

Apesar da composição do complexo viral não ter sido estudada neste trabalho, os três métodos utilizados, por apresentarem amplo espectro de detecção, provavelmente, podem ser empregados para detectar qualquer vírus do complexo causador do mosaico comum do milho. Os estudos sobre a variabilidade presente entre as quatro espécies de potyvirus que causam o mosaico comum estão sendo conduzidos atualmente.

#### LITERATURA CITADA

ABBOTT, E.V. Mosaic. In: MARTIN, J.P.; ABBOTT, E.V & HUGHES, C.G.(Ed.) Sugarcane Diseases of the world. V.1. Amsterdam. Elsevier Science Publishers. 1961.pp.407-430.

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

BALMER, E.Doenças do milho. In: Galli, F. (Ed.) Manual de Fitopatologia. São Paulo. Agronômica Ceres. 1980. pp. 371-391.

BREAUX, R.D.& KOIKE, H. Problems and progress in breeding sugarcane for mosaic resistance in Louisiana's subtropical environment.Proc. Int. Soc. Sugarcane Technology 16:425-432.1978.

CLARK, M.F.& ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology

34:475-483.1977.

COLINET, D., KUMMERT, J., LEPOIVRE, P.& SEMAL, J.Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweetpotato by polymerase chain reaction with degenerate primers. Phytopathology 1:65-69.1994.

COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W.& ARRUDA S.C.Moléstias de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. Fitopatol.bras.4: 39-41.1971.

De VRIES, S.C.; SPRINGER, J.& WESSELS, J.G.H.Diversity of abundant mRNA sequences and patterns of proteins synthesis in etiolated and greened pea seedlings. Planta 156:129-135.1982.

DEVEREUX, J., HAEBERLI, P.& SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res.12:387-395.1984.

DOUGHERTY, W.G.& CARRINGTON, J.C. Expression and function of potyviral gene products.Annu Rev Phytopathol 26:123-140.1988.

DUDIENAS, C., DUARTE, A.P, PATERNIANI, M.E.A.G.Z., RIBEIRO, J.L., BIANCHINI, M.T., KANTHACH, R.A.D., CASTRO, J.L., SILVEIRA, L.C.P, DENUCCI, S., JUNIOR, J.S., BOLONHESI, D.& DE SORDI, G. Severidade de doenças no milho "safrinha" no Estado de São Paulo em 1996. Seminário sobre a cultura do milho "safrinha", 4., IAC/CDV.1997.pp.107-115.

HAMPTON, R.O., BALL, E.M.& De BOER, S.H.M. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual.Saint Paul. American Phytopathological Society. 1990.

HARI, V. The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. Virology 112:391-399.1981.

HILL, J.H., FORD, R.E.& BENNER, H.I. Purification and partial characterization of maize dwarf mosaic virus strain B (sugarcane mosaic virus). Journal of general Virology 20:327-339.1973.

HOLLINGS, M.& BRUNT, A. A.Potyvirus group.CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses,n.245, 1981.

JONES, R.K.& TOLIN, S.A.Factors affecting purification of maize dwarf mosaic virus from corn. Phytopathology 62:812-816.1972.

KOIKE, H.& GILLASPIE, A.G.Mosaic.In: Ricaud, C.(Ed.) Diseases of Sugarcane Major Diseases. Amsterdam. Elsevier Science Publishers. 1989. pp.301-322.

LANE, L.C. Propagation and purification of RNA plant viruses.Methods in Enzimology 20:687-696.1986.

LANGENBERG, W.G. Serology, physical properties, and purification of unaggregated infectious maize dwarf mosaic virus. Phytopathology 63:149-154.1973.

LANGEVELD, S.A., DORE, J., MEMELINK, J., DERKS, A.F.L.M., VAN DER VLUGT, C.I.M., ASJES, C.J.& BOL, J.F. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72:1531-1541.1991.

MOGHAL, S.M.& FRANCKI, R.I.B.Towards a system for the identification and classification of potyviruses. I.

- Serology and aminoacid composition of six viruses. *Virology* 73:350-362.1976.
- PIRONE, T.P. Sugarcane mosaic virus. No.88. In: CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, Kew, Surrey, England, 1972.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.1977.
- SHUKLA, D.D., TOSIC, M., JILKA, J. & FORD, R.E., TOLER, R.W. & LANGHAM, M.A.C. Taxonomy of potyviruses infesting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology* 79: 223-229.1989.
- SHUKLA, D.D.; FRENKEL, M.J. & WARD, C.W. Structure and function of potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Can J Plant Pathol* 13:178-191.1991.
- SHUKLA, D.D.; WARD, C.W. & BRUNT, A.A. The potyviridae. Cambridge. CAB International. 1994. 516p.
- SHURTLEFF, M.C. Compendium of corn diseases. 2<sup>nd</sup>. ed. Saint Paul. American Phytopathological Society. 1986.105p.
- SNAZELLE, T.E., BANCROFT, J.B. & ULLSTRUP, A.J. Purification and serology of maize dwarf mosaic and sugarcane mosaic viruses. *Phytopathology* 61:1059-1063.1971.
- WAQUIL, J.M., OLIVEIRA, E., PINTO, N.F.J.A., FERNANDES, F.T. & CORREIA, L.A. Viroses em milho, incidência e efeito na produção. *Fitopatol. bras.* 21: 460-463.1996.

99056