

INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS TÍPICAS DE INFECÇÃO VIRAL EM FORRAGEIRAS DOS GÊNEROS *Stylosanthes* E *Panicum*

Silva, M.S.^{1*}; Fernandes, C.D.²; Resende, R.O.³; Kitajima, E.W.⁴; Marchi, C.E.²; Charchar, M.J.d'A.¹; Anjos, J.R.N.¹; Máximo, R.M.³; Pereira, L.M.³ & Corrêa, D.C.V.¹.

¹EMBRAPA Cerrados, BR 020 Km 18, C.P. 08223, 73310-970 Planaltina DF, Brasil, *marilia@cpac.embrapa.br;

²EMBRAPA Gado de Corte/ UNIDERP, BR 262 Km 04, 79002-910 Campo Grande MS, Brasil;

³Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, 90710-900 Brasília DF, Brasil;

⁴Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Fitopatologia, Av. Pádua Dias N. 11, 13418-900 Piracicaba SP, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de pastagens é base do sistema de produção pecuária brasileiro. Com a expansão das pastagens cultivadas e intensificação da atividade pecuária nos últimos anos, várias doenças de forrageiras começaram a ter importância significativa, especialmente nas regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil. A ocorrência de viroses em forrageiras é pouco relatada, sendo raros os vírus que foram detectados infectando naturalmente plantas dos gêneros *Stylosanthes* e *Panicum* e que foram identificados a nível de espécie. Plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e de *Panicum maximum* cv. Mombaça apresentando mosaico foliar típico de infecção viral têm sido observadas em áreas experimentais e comerciais de forrageiras no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. A fim de detectar e identificar possíveis vírus presentes em *S. guianensis* cv. Mineirão e de *P. maximum* cv. Mombaça, amostras de folhas com sintomas típicos de infecção viral foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e por *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR).

2. MATERIAL, MÉTODOS & RESULTADOS

2.1. Inclusões citoplasmáticas indicam infecção viral em *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão.



Figura 1. *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão sintomático. Mosaico Foliar.

Plantas de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão apresentando mosaico foliar e manchas cloróticas típicos de infecção viral (Figura 1) têm sido observadas em áreas experimentais e comerciais de forrageiras no Mato Grosso do Sul. A fim de investigar a possível presença de vírus associada ao mosaico, amostras de folhas sintomáticas de *S. guianensis* cv. Mineirão foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Para tanto, amostras de folhas sintomáticas foram fixadas utilizando-se glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% e tetróxido de ósmio 1%, contrastadas com acetato de uranila 0,5%, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina tipo *Spur*. Ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, encontraram-se inclusões citoplasmáticas em "agulhas" (Figura 2), sugerindo infecção viral por família ainda não identificada.

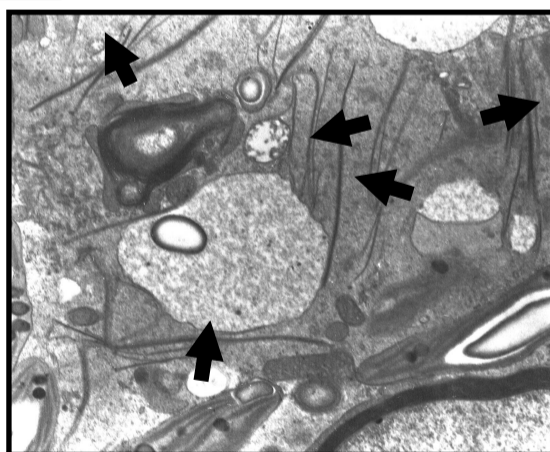


Figura 2. *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão sintomático. Inclusões citoplasmáticas em forma de "agulha" (indicadas por setas).

2.2. Inclusões citoplasmáticas e amplificação por RT-PCR indicam infecção por potyvírus em *Panicum maximum* cv. Mombaça.

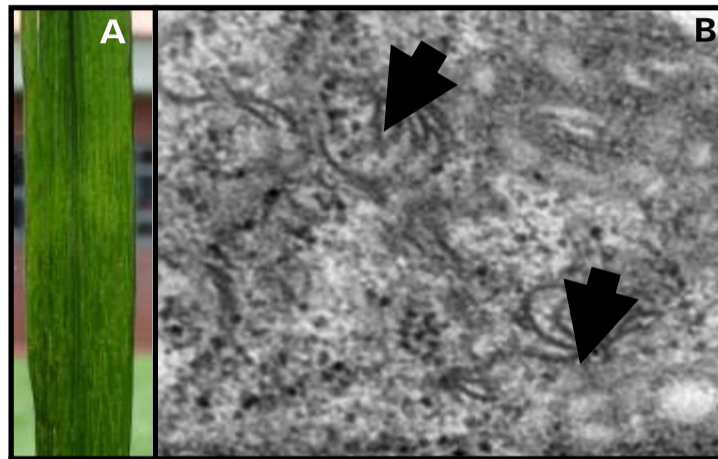


Figura 3. *Panicum maximum* cv. Mombaça sintomático. A. Mosaico foliar. B. Inclusões citoplasmáticas em forma de "catavento" (indicadas por setas).

Algumas plantas *Panicum maximum* cv. Mombaça apresentando mosaico foliar característico de infecção viral (Figura 3A) têm sido observadas tanto em áreas experimentais como em áreas comerciais de pastagens no Mato Grosso do Sul.

Para investigar a possível presença de vírus associada ao mosaico, amostras de folhas sintomáticas de *P. maximum* cv. Mombaça foram processadas e observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, como descrito para amostras de *S. guianensis* cv. Mineirão (Figura 2). Nestas amostras de *P. maximum* cv. Mombaça, observaram-se inclusões citoplasmáticas em forma de "catavento" (Figura 3B), típicas de infecção por potyvírus.

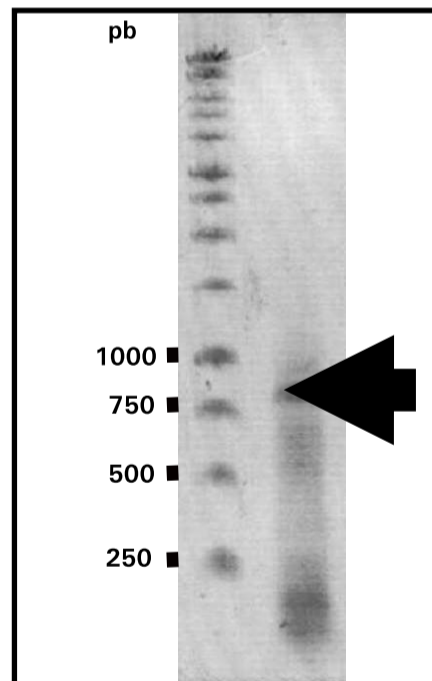


Figura 4. *Panicum maximum* cv. Mombaça sintomático. Amplificação por RT-PCR (direita) de banda indicativa de potyvírus (indicada pela seta). Marcador de massa molecular (esquerda): 1Kb ladder (Promega). pb = pares de base.

A fim de confirmar a presença de potyvírus por RT-PCR, RNA total de folhas sintomáticas de *P. maximum* cv. Mombaça foi extraído usando-se tiocianeto de guanidina, extração protéica com fenol:clorofórmio, precipitação de RNA com etanol e acetato de sódio e ressuspensão em água. Para a primeira etapa da RT-PCR, RNA total extraído das folhas sintomáticas foi usado como molde na síntese de cDNA utilizando-se o primer M14 (universal para detecção de potyvírus). O cDNA sintetizado foi usado como molde na segunda etapa da RT-PCR e amplificado pelos primers M14 e Py11 (universais para detecção de potyvírus) em 1 ciclo de desnaturação a 94°C/ 3 min., seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C/ 1 min., anelamento a 47°C/ 1 min. e extensão a 72°C/ 1 min., com extensão final a 72°C/ 7 min. Através da RT-PCR foi amplificado um fragmento específico de cerca de 800 pb (Figura 4) indicativo de infecção por potyvírus.

3. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Em amostras coletadas em campos experimentais e comerciais no Mato Grosso do Sul, há indícios de infecção de *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão por vírus de família ainda não identificada e indícios de infecção de *Panicum maximum* cv. Mombaça por potyvírus.
- Nestas amostras de *S. guianensis* cv. Mineirão e *P. maximum* cv. Mombaça sintomáticos, serão realizados: (i) identificação das espécies virais por sequenciamento de fragmentos específicos de RT-PCR/ PCR, (ii) sequenciamento do genoma completo dos vírus encontrados, (iii) identificação dos vetores e (iv) determinação da gama de plantas hospedeiras.
- As investigações aqui relatadas são relevantes no contexto dos programas de melhoramento de forrageiras, no que tange à futura seleção de genótipos com resistência a vírus.