

## AValiação DA RESISTÊNCIA EM POPULAÇÃO F<sub>3</sub> ORIUNDA DO CRUZAMENTO CNC-0434 X IPA-206 DE FEIJÃO-CAUPI AO MOSAICO SEVERO<sup>1</sup>

ERLEN KEILA CANDIDO E SILVA<sup>2\*</sup>, ANA VERÔNICA SILVA DO NASCIMENTO<sup>3</sup>, ALISSON ESDRAS COUTINHO<sup>4</sup>, JOSÉ CARLOS DA COSTA<sup>4</sup>, LUCIANE VILELA RESENDE<sup>5</sup>

**RESUMO** - No nordeste brasileiro, os mosaicos provocados por vírus, despontam como as doenças mais importantes para a cultura do feijão-caupi, constituindo-se em fator limitante da produção. A resistência genética tem sido considerada como melhor alternativa de controle do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). Desta forma, objetivou-se avaliar o comportamento de uma população F<sub>3</sub> desenvolvida para resistência, frente a diferentes isolados de CPSMV, coletados em diferentes áreas de cultivo. Foram coletados nos Estados de Pernambuco e Paraíba, amostras foliares de feijão-caupi apresentando sintomas típicos de mosaico. Realizaram-se inoculações em cultivares suscetíveis de feijão-caupi mantidas em casa de vegetação. Os isolados também foram diagnosticados através de reações de RT-PCR utilizando “primers” específicos. Das 185 plantas F<sub>3</sub> inoculadas, 183 plantas apresentaram resistência aos diferentes isolados de CPSMV.

**Palavras-chave:** *Cowpea severe mosaic virus*. Resistência genética. *Comovirus*.

### EVALUATION OF THE RESISTANCE IN POPULATION F<sub>3</sub> FROM THE CROSS CNC-0434 X IPA-206 COWPEA TO COWPEA *Severe mosaic virus*

**ABSTRACT** - In the Northeastern part of Brazil, the mosaics caused by viruses, emerge as the most important diseases for the cowpea, thus becoming a limiting factor of production. Genetic resistance has been considered as the best alternative of controlling *Cowpea severe mosaic virus*. Thus, the aim was to evaluate the F<sub>3</sub> population behavior developed for the resistance against different isolated CPSMV collected from different areas of cultivation. Leaf samples presenting cowpea mosaic symptoms were collected from plantations from the states of Pernambuco and Paraíba. There was inoculation on susceptible cultivars of cowpea kept in house vegetation. The isolates were also diagnosed by reactions RT-PCR using specific primers. Of the 185 F<sub>3</sub> plants inoculated 183 plants were resistant to different isolates of CPSMV.

**Keywords:** *Cowpea severe mosaic virus*. Genetic resistance. *Comovirus*.

\*Autor para correspondência.

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 06/02/2011; aceito em 06/09/2011.

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia/Fitopatologia, UFRPE, rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife - PE; erlenkeila@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente, UFAM, rua 29 de agosto, 786, Centro, 69800-000, Humaitá - AM; averonicasilva@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Departamento de Agronomia/Melhoramento Genético de Plantas, UFRPE, rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife - PE; alissonsdras@yahoo.com.br; carl\_agro@hotmail.com

<sup>5</sup>Departamento de Fitotecnia, UFV, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras - MG; luciane.vilela@ufla.br

## INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], subespécie *unguiculata*, também conhecido como feijão-de-corda e feijão-macassar, é uma leguminosa de grande relevância econômico-social para a região Nordeste, constituindo-se no feijão mais consumido (ASSUNÇÃO et al., 2005; LIMA, et al., 2005b). Com a expansão da área cultivada, vários fatores têm contribuído para a redução da produtividade. Dentre estes, as doenças ocasionadas por vírus, estão entre os principais fatores responsáveis pelos prejuízos (PIO-RIBEIRO et al., 2005), influenciando na qualidade e na quantidade produzida.

Dentre os vírus que infectam o feijão-caupi, destaca-se o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) causador do “mosaico severo do caupi” (PIO-RIBEIRO et al., 2005). Pertencente ao gênero *Comovirus*, família *Comoviridae*, esse vírus possui partículas de forma isomérica com aproximadamente 28nm de diâmetro, com genoma bipartido. É constituído de duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo, ambas necessárias para infecção (HULL, 2002). O primeiro relato do CPSMV no Brasil foi realizado por Oliveira (OLIVEIRA, 1947) no Rio Grande do Sul, e desde então sua distribuição alcançou todas as regiões produtoras de feijão-caupi no país (LIMA et al., 2005a). Na região nordeste há registros da ocorrência de CPSMV infectado feijão-caupi na década de 70, no Estado do Ceará (LIMA; NELSON, 1974) e desde então tem ocorrido de forma generalizada nos estados do nordeste.

As plantas infectadas pelo CPSMV, no caso de algumas cultivares, apresentam sintomas severos observados na forma de modificações de cor e hábito das plantas, subdesenvolvimento das nervuras principais, levando a um intenso encrespamento do limbo foliar, resultando em numerosas bolhosidades, associadas à presença de mosaico e distorção foliar (HULL, 2002; LIMA et al., 2005a). Atualmente não existe um controle efetivo do vírus, porém são usadas algumas medidas como controle sistemático dos vetores, plantio em época de baixa população dos mesmos, eliminação de plantas de cultivos anteriores e de hospedeiros naturais. Levando-se em consideração a ocorrência generalizada, severa e permanente em toda a região nordeste a melhor forma de controle a ser adotada é o emprego de cultivares comerciais altamente resistentes (UMAHARAN et al., 1996).

O estudo de resistência a vírus em feijão-caupi tem recebido grande atenção e obtido um grande progresso. Fontes de resistência ao CPSMV em germoplasma de caupi têm sido relatadas. Lima e Nelson (1977) identificaram a cultivar Macaibo como imune ao CPSMV, tendo Rios e Neves (1982) confirmado a imunidade desta cultivar e identificado uma nova fonte de resistência ao vírus, a linhagem FP-7733-2. Posteriormente esta linhagem deu origem à cultivar CNC-0434 (SOARES, 1985), que foi recomendada para o cultivo no estado do Maranhão.

A cultivar CNC-0434 foi utilizada em vários cruzamentos, dos quais foram obtidas algumas cultivares resistentes ao CPSMV, tais como: BR10-Piauí (SANTOS et al., 1987), BR12-Canindé (SANTOS et al., 1990), BR14-Mulato (CARDOSO et al., 1990) e BR17-Gurguéia (FREIRE FILHO, 1994).

Considerando que cultivares resistentes são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência, e devido à co-evolução hospedeiro-patógeno, culminando no surgimento de novas raças, as cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidas (ALZATE-MARIN et al., 2005) e testadas para diferentes estirpes. Com o aparecimento de estirpes do patógeno, ocorre um aumento na população do hospedeiro com conseqüente pressão de seleção da estirpe do patógeno capaz de afetar a planta (AGRIOS, 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de uma população F<sub>3</sub> desenvolvida para resistência frente a diferentes isolados do CPSMV.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas de feijão-caupi apresentando sintomas de mosaico e bolhosidade nas folhas foram identificadas em plantios da cultura nos estados de Pernambuco e Paraíba. Foram coletados os seguintes isolados: CPSMV-1 (Recife - PE), CPSMV-3 e CPSMV-4 (Goiana - PE), CPSMV-5 (Amaragi - PE), CPSMV-A3 (Conde - PB). A partir dessas plantas, coletaram-se folhas com sintomas de mosaico e deformação foliar. As folhas foram utilizadas para inoculação mecânica de plantas de feijão-caupi cvs. Sempre Verde e/ou Pitiúba, via extrato vegetal tamponado contendo fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, e sulfito de sódio a 0,01M (p/v), a frio, na proporção 1:10 (p/v) tendo como abrasivo carborundum 300 mesh. As plantas infectadas foram mantidas em casa de vegetação. Empregou-se também o teste sorológico ELISA indireto nas amostras coletadas no campo, conduzido de acordo com o protocolo de Almeida (2001) utilizando antissoros policlonais contra CABMV e CMC pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Além das inoculações dos isolados em plantas de caupi suscetíveis para reprodução dos sintomas típicos e comprovação da doença, realizou-se a extração do RNA total das amostras conforme Root e Jelkman (2001) e para a reação de RT-PCR empregou-se a metodologia descrita por Brioso et al. (1996) utilizando os oligonucleotídeos ‘antisense’ 5'-YTCRAAWCCVYTRTKGGMCCACA-3' e o oligonucleotídeo ‘sense’ 5-GCATGGTCCACWCAGGT-3'. Aliquotas de 6 µl dos produtos de RT-PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1.2% corados com SYBR gold (5X) e visualizados no transiluminador de ultravioleta.

Para verificar se a população F<sub>3</sub> previamente considerada resistente quando inoculadas com o iso-

lado CPSMV-1, manteria a resistência frente a teste com outros isolados, uma população F<sub>3</sub>, oriunda do cruzamento CNC-0434 x IPA-206, foi semeada em copos descartáveis de 300 mL contendo substrato vegetal. Antes do semeio, foi construído um *bulk*, misturando-se equitativamente sementes de todas as plantas F<sub>2</sub> que se mostraram resistentes ao isolado de CPSMV-1. Para cada um dos cinco isolados foram inoculadas trinta e sete plantas, perfazendo um total de 185 plantas, e os respectivos controles. A inoculação foi feita via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v), a frio, na proporção 1:10 (p/v), tendo como abrasivo carborundum, 10 dias após a emergência, quando as plantas apresentavam cinco folíolos definitivos. Como controle duas plantas de cada cultivar foram inoculadas apenas com o tampão de inoculação. Além desse controle foram utilizadas as cultivares IPA 206 e Sempre Verde que serviram como cultivares que apresentam reações de suscetibilidade enquanto as cultivares CNC 0434 e BR-14 Mulato apresentam reações de resistência. As plantas foram reinoculadas três dias após a primeira inocula-

ção para evitar escape, e foram mantidas em casa de vegetação. A avaliação foi realizada visualmente observando-se a indução de sintomas até 45 dias após a segunda inoculação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de feijão-caupi inoculadas para a manutenção com os isolados coletados apresentaram reações de suscetibilidade através do sintoma manifestado de mosaico. As plantas de feijão-caupi cvs. Sempre Verde, IPA 206 e Pitiúba apresentaram sintomas característicos de mosaico severo como bolhosidade e distorção foliar, geralmente 15 dias após a inoculação com todos os isolados (Tabela 1). Entretanto, não foi observada infecção pelo CPSMV nas cultivares Macaibo, CNC 0434 e BR-14 mulato que são resistentes ao CPSMV. Estes resultados estão de acordo com Vale e Lima (1995) que estudaram a herança da imunidade em dois cultivares de feijão-caupi (Macaibo e Pitiúba) ao vírus do CPSMV.

**Tabela 1.** Reações das plantas de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] inoculadas com os isolados de CPSMV coletados.

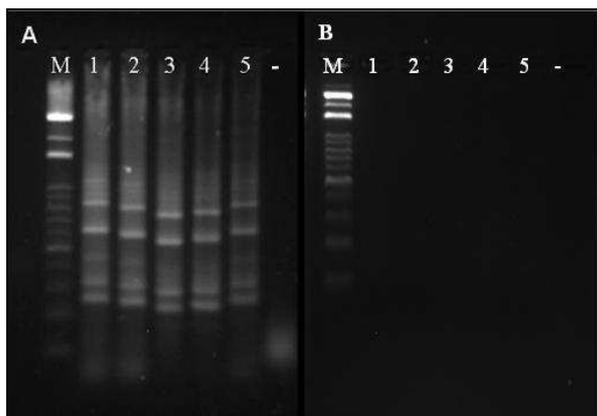
Isolados	Cultivares						
	População F <sub>3</sub> (CNC-0434 x IPA-206)	CNC 0434	BR-14 Mu- lato	IPA 206	Sempre verde	Pitiúba	Macaibo
CPSMV-1*	+	-	-	+	+	+	-
CPSMV-3*	+	-	-	+	+	+	-
CPSMV-4	-	-	-	+	+	+	-
CPSMV-5	-	-	-	+	+	+	-
CPSMV-A3	-	-	-	+	+	+	-

\*Apenas duas plantas da população F<sub>3</sub> apresentaram sintomas com os isolados CPSMV-1 e CPSMV-3.

Além das reações de sintomas nas plantas suscetíveis foi comprovado o diagnóstico dos isolados de CPSMV através da RT-PCR sendo observado um fragmento de aproximadamente 593 bp, confirmando dessa forma, a identidade viral de todos os isolados coletados em campo, conforme Brioso et al. (1996).

Das plantas inoculadas com os isolados coletados, somente duas de uma população de 185 plantas apresentaram sintomas de CPSMV, sendo uma planta pertencente ao grupo inoculado com o isolado CPSMV-1 e uma ao grupo inoculado com o CPSMV-3 (Tabela 1), sintomas estes caracterizados por um mosaico suave. O aparecimento de plantas com sintomas pode ser devido neste caso, a um escape durante a inoculação do vírus na população F<sub>2</sub>, fazendo com que uma planta suscetível fosse classificada como resistente quando na realidade o que

ocorreu foi a não penetração do vírus no tecido hospedeiro (HULL, 2002), ou a presença de infecção mista (estirpes diferentes do CPSMV). Entretanto, os sintomas não expressos podem ser detectados em teste em F<sub>3</sub> de acordo com Umaharan et al. (1996), que em estudo de resistência ao CPSMV em feijão-caupi constatou que plantas obtidas de sementes F<sub>3</sub> mostraram-se uniformemente resistentes indicando que as plantas resistentes obtidas ao final do período de seleção foram homocigotas para resistência. A descoberta de um marcador molecular associado ao alelo de resistência permitiria uma redução do tempo necessário para a seleção, facilitando a introgressão de genes de resistência em cultivares com características agrônomicas desejáveis. É possível também que os isolados estudados apresentam diferenças na severidade dos sintomas induzidos.



**Figura 1.** A) Produtos da amplificação via RT-PCR, a partir de isolados de CPSMV coletados em campo: 1. CPSMV-4; 2. CPSMV-1; 3. CPSMV-3; 4. CPSMV-A3; 5. CPSMV-5; -. Controle negativo. B) Plantas F<sub>3</sub> resistentes inoculadas com os isolados coletados: 1. CPSMV-1; 2. CPSMV-3; 3. CPSMV-4; 4. CPSMV-5; 5. CPSMV-A3; -. Controle negativo; M- marcador de massa molecular.

Nas plantas que não apresentaram sintomas realizou-se uma RT-PCR para verificar se não houve replicação viral nas mesmas (Figura 1), comprovando que as plantas são resistentes aos isolados de CPSMV-4, CPSMV-5 e CPSMV-A3.

Genes dominantes geralmente codificam fatores envolvidos no reconhecimento do vírus e ativação de vias que conduzem à reação de hipersensibilidade. No entanto a natureza recessiva da herança da resistência, como é o caso da resistência ao CPSMV, é consequência da ausência de algum fator essencial para o vírus em se replicar ou se movimentar no hospedeiro (ELLIS et al., 2000). Este fato está de acordo com os resultados obtidos onde as plantas resistentes não apresentaram sintomas e não foi detectada, por RT-PCR, a replicação viral.

## CONCLUSÃO

A população F<sub>3</sub> de feijão-caupi obtida a partir do cruzamento cv. CNC-0434 x cv. IPA-206 mostrou-se resistente aos isolados do CPSMV utilizados neste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao CNPq e a FACEPE pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. London: Academic Press 2004. 922 p.

ALMEIDA, A. M. R. Detecção e quantificação de

vírus pelo teste de ELISA. In: ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. (Ed.). **Princípios e técnicas de diagnóstico aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja/ Brasília: Sociedade Brasileira de Fitovirologia. 2001. p. 63-94.

ALZATE-MARIN, A. L. et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-242, 2005.

ASSUNÇÃO, I. P. et al. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 274-278, 2005.

BRIOSO, P. S. T. et al. Identificação de espécies do gênero *Comovirus* através de “polymerase chain reaction”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 219-225, 1996.

CARDOSO, M. J.; FREIRE FILHO, F. R.; ATHAYDE SOBRINHO, C. **BR 14-mulato**: nova cultivar de feijão macassar para o estado do Piauí. Teresina: Embrapa-UEPAE de Teresina, 1990. 4 p. (Comunicado Técnico, 48).

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant biology**, v. 3, n. 4, p. 278-284, 2000.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **BR 17 gurguéia**: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí. Teresina: Embrapa-CPAMN, 1994. 6 p. (Comunicado Técnico, 61).

HULL, R. **Mattew's plant virology**. 4. ed. Londres: Academic Press. 2002. 1001 p.

LIMA, J. A. A. et al. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 429-433, 2005b.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnóstico e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F. R. et al. (Ed.). **Feijão caupi**: avanços tecnológicos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2005a. p. 404-459.

LIMA, J. A. A.; NELSON, M. R. Purificação e identificação sorológica de “Cowpea mosaic vírus” em *Vigna sinensis* Endl., no Ceará. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 3, n. 1-2, p. 5-8, 1974.

OLIVEIRA, M. A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna*

spp.). Pelotas: **Instituto Agronômico do Sul**, 1947. p. 1-36. (Boletim Técnico, 1).

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, M. F.; ANDRADE, G. P. Doenças do caupi. In: KIMATI, H. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 3, 2005. p. 215-216.

RIOS, G. P.; NEVES, B. P. Resistência das linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) ao vírus do mosaico severo (VMSC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 175-184, 1982.

ROOT, M. E.; JELKMAN, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 4, p. 411-420, 2001.

SANTOS, A. A.; FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. “BR 10-Piauí”, cultivar de feijão macacão (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 4, p. 400-402, 1987.

SANTOS, A. A. et al. Nova cultivar de feijão macacão (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 84-86, 1990.

SOARES, U. M. **CNC 0434**: nova opção de feijão capa no maranhão. São Luis: EMAPA, 1985. 3 p. (Comunicado Técnico, 7).

UMAHARAN, P.; ARIYANAYAGAN, R. P.; HAQUE, S. Q. Resistance to *cowpea severe mosaic virus*, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Euphytica**, v. 95, n. 1, p. 49-55, 1996.

VALE, C. C.; LIMA, J. A. A. Herança da imunidade da cultivar macaibo de *Vigna unguiculata* ao vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 30-32, 1995.