

RESISTÊNCIA AO *Cowpea severe mosaic virus* SOROTIPO I EM LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI, ORIUNDAS DO PIAUI¹

M. S. R. NOGUEIRA², F. R. FREIRE FILHO³, R. C. PEREIRA², J. R. S. SANTOS²,
D. V. FIGUEIREDO² e P. S. T. BRIOSO²

Resumo – Entre os vírus que infectam o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) destaca-se o CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*), causando perdas consideráveis na produção. Com o objetivo de testar linhagens de feijão-caupi contra o CPSMV sorotipo I para obter genótipos resistentes foram realizados testes biológicos e moleculares. O isolado viral foi coletado em plantas de feijão-caupi naturalmente infectadas e mantidas em casa de vegetação na linhagem IT89D-200-49 (indicadora do CPSMV sorotipo I) e na cv. Costelão (suscetível ao vírus). Dez dias após a inoculação das linhagens foram observados os sintomas e, extratos das plantas aparentemente sadias inoculadas na cv. Costelão, a fim de detectar possível infecção latente. Os testes biológicos confirmaram a resistência das linhagens MNC 99-508 F-12, MNC 99-510 G-7 e MNC 99-510 F-16 ao CPSMV sorotipo I. O produto amplificado por RT-PCR revelou após a eletroforese uma banda de 592 pb e os dados da análise das seqüências confirmaram uma similaridade de 89 % do isolado com o CPSMV. Essas linhagens resistentes abrem perspectivas para a obtenção de novas cultivares resistentes com boas características agrônômicas e potencial para elevar a produtividade da cultura.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, vírus, resistência a vírus.

RESISTANCE TO THE *Cowpea severe mosaic virus* SOROTYPE I IN COWPEA LINES ORIGINATED FROM PIAUI STATE, BRAZIL

Abstract – Among the viruses that infect cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*) is the most important, causing considerable losses in the production. With the objective to test cowpea lines against the CPSMV serotype I, in order to obtain resistant genotypes biological and molecular tests were done. The virus isolate was collected from naturally infected cowpea plants and was kept in the greenhouse, inoculated on plants of the line IT89D-200-49F, indicator of the CPSMV serotype I and plants of cv. Costelão, susceptible to the virus. Ten days after inoculation, symptoms were observed and sap from asymptomatic plants was extracted and inoculated in healthy plants of cv. Costelão, in order to detect possible latent infection. The biological tests confirmed the resistance to the CPSMV serotype I of lines MNC 99-508 F-12, MNC 99-510 G-7 and MNC 99-510 F-16. Amplification in RT-PCR yielded a band of 592 pb, and the data from sequence analysis confirmed a of 89% sequence similarity between the isolate and the CPSMV. These lines demonstrate potential to create resistant new cultivars, with good agronomical characteristics and capable to raise crop productivity.

Keywords: *Vigna unguiculata*, virus, virus resistance.

¹ Parte da tese de doutorado do primeiro autor.

² Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário /UFRRJ, CP 74585, CEP. 23851-970, Seropédica, RJ.
E-mail: maria_nogueira@terra.com.br

³ Embrapa Meio-Norte, CP 01, CEP. 64006-220, Teresina, PI. E-mail: freire@cpamn.embrapa.br

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa cultivada, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Um dos mais sérios problemas enfrentados pelos agricultores são as doenças de etiologia viral, sendo que já foram identificados cerca de 20 vírus, no mundo, infectando naturalmente essa cultura (Thottappilly & Rossel, 1985).

Entre os principais vírus que limitam a produção do feijão-caupi, destaca-se o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), que pode causar perdas na produção, além de afetar a qualidade da semente.

Diferentes estirpes do CPSMV têm sido identificadas no Brasil, que se distribuem na sua maioria, em quatro grupos sorológicos designados de sorotipo I, sorotipo II, sorotipo III e sorotipo IV (Lin et al., 1981; Lin et al., 1984), embora nove sorotipos já tenham sido comprovados mundialmente (Hampton et al., 1997).

Devido à alta incidência do CPSMV sorotipo I em áreas tradicionais produtoras de feijão-caupi no Brasil (Passos, 1999) e de inúmeros hospedeiros naturais desse vírus, torna-se de grande importância à identificação de genótipos resistentes.

O trabalho tem como objetivo testar linhagens de feijão-caupi contra o CPSMV sorotipo I, a fim de obter genótipos resistentes e contribuir com o programa de melhoramento genético da Embrapa Meio-Norte.

Material e Métodos

O isolado viral foi obtido a partir de plantas de feijão-caupi infectadas naturalmente por vírus no campo experimental da Embrapa Meio-Norte e inoculado mecanicamente na linhagem TE 93-200-49F indicadora do CPSMV sorotipo I (Passos, 1999) e posteriormente esse isolado foi inoculado no cv. Costelão, também suscetível ao vírus, a fim de multiplicar a fonte de inóculo. Os testes biológicos e moleculares foram realizados no Laboratório Oficial de Diagnóstico Fitossanitário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As linhagens de feijão-caupi testadas foram obtidas da Embrapa Meio-Norte, Teresina (PI).

As linhagens foram semeadas, separadamente, em bandejas contendo solo autoclavado e inoculadas mecanicamente após seis dias, nas folhas primárias, com o extrato foliar de plantas da cv. Costelão infectadas com o CPSMV sorotipo I, conforme descrito por Nogueira et al. (2001a).

Dez dias após a inoculação, o extrato de plantas assintomáticas das linhagens supostamente resistentes, foi inoculado mecanicamente em 'Costelão', a fim de detectar possível infecção latente e confirmar a resistência dessas linhagens ao CPSMV sorotipo I.

Para a extração de RNA total foram coletadas amostras foliares, de planta sadia e de plantas exibindo sintoma do CPSMV sorotipo I, conforme o método adotado por Briosso (1994). Na reação de RT-PCR foram utilizados os *primers* degenerados, antisense (5'- CTCAAACCCCTGTTGGGACCACA - 3') e sense (5'- GGATGAATTTTTGATGGCATGG - 3'), sendo o produto amplificado por RT-PCR visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio.

Na obtenção das seqüências virais dos produtos amplificados, foi utilizado o kit *ET-Terminador* (Amersham) compatível para a plataforma MEGA BASE 1000, de acordo com o protocolo do fabricante. As seqüências obtidas neste estudo foram alinhadas com seqüências depositadas em bancos de dados (*GenBank* NCBI), utilizando-se o programa DS GENES 1.5 (Accelerlys) e a seqüência consenso obtida foi analisada pelo programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados e Discussão

Dentre as 20 linhagens inoculadas, dezessete apresentaram sintomas de mosaico resultantes de infecções sistêmicas e/ou necrose nas folhas inoculadas e três linhagens não exibiram nenhum tipo de infecção (Tabela 1).

O teste biológico revelou que as linhagens MNC 99-508 F-12, MNC 99-510 G-7 e MNC 99-510 F-16 não foram infectadas sistemicamente pelo CPSMV sorotipo I, portanto apresentam genes de resistência ao vírus.

Fontes de resistência ao CPSMV têm sido relatadas por diversos pesquisadores (Vale & Lima, 1995; Umaharan et al., 1996; Paz et al., 1999) e estudos da herança genética ao CPSMV sorotipo I, mostraram que a resistência tem herança monogênica e é controlada por apenas um gene recessivo (Nogueira et al., 2001b), embora alguns estudos apontem três genes recessivos não ligados (Umhamam et al., 1996)

O resultado das reações de RT-PCR, a partir de RNA extraído de amostras com CPSMV sorotipo I, revelou a presença de bandas predominantes no gel de agarose, correspondentes a 592 pb, confirmando resultados obtidos por Brioso et al. (1996) (Figura 1).

O resultado da análise das seqüências do CPSMV sorotipo I confirmou que este isolado trata-se do CPSMV. O programa *BLAST* revelou 89 % de identidade entre o CPSMV sorotipo I e outra seqüência deste mesmo vírus (acesso AF263549), disponível no GeneBank.

Desta forma, este dado sugere que o produto amplificado na reação de RT-PCR descrita neste trabalho, apresenta potencial para ser utilizado como sonda em testes de diagnóstico baseados em *Dot Blot*.

Tabela 1. Dados da reação das linhagens de feijão-caupi, inoculadas mecanicamente com o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) sorotipo I.

Linhagem	Nº de sementes	Nº de plantas germinadas	Nº de plantas com sintomas	Nº de plantas sem sintomas	Sintomas*
MNC 99-507F-8	60	40	40		MI, Bo, Ln
MNC 99-507 F-9	60	40	40		Ln, M
MNC 99-507 G-4	'	45	'		Ms, Bo
MNC 99-507 F-11	'	55	11		Ms, Bo
MNC 99-508 G-1	'	55	4		Ms, Bo
MNC 99-508 G-2	'	58	10		Ms, Bo
MNC 99-505 G-2	'	45	08		Ms, Bo
MNC 99-505 G-6	'	50	04		Ms, Bo
MNC 99-508 F-12	'	50	nenhuma	50	-
MNC 99-508 G-7	'	50	50		Ms, Bo
MNC 99-510 G-7	'	54	nenhuma	54	-
MNC 99-510 F-20	'	60	10		Ms, Bo
MNC 99-510 G-8	'	52	10		Ms, Bo
MNC 99-510 F-16	'	56	nenhuma	56	-
MNC 99-518 F-4	40	11	11		Ln
MNC 99-521 G-3	'	40	40		Ln, Ms, Bo
TE 97-309 G-18	'	12	12		Ln
TE 97-309 G-9	'	32	05		Ms
TE 97-309 G-10	'	37	37		Ln
MNC 99-505 G-11	'	30	30		Ms, Bo, Ln

*Bo – bolhosidade; Ln – lesão necrótica; M – morte; MI – mosaico leve; Ms – mosaico severo.

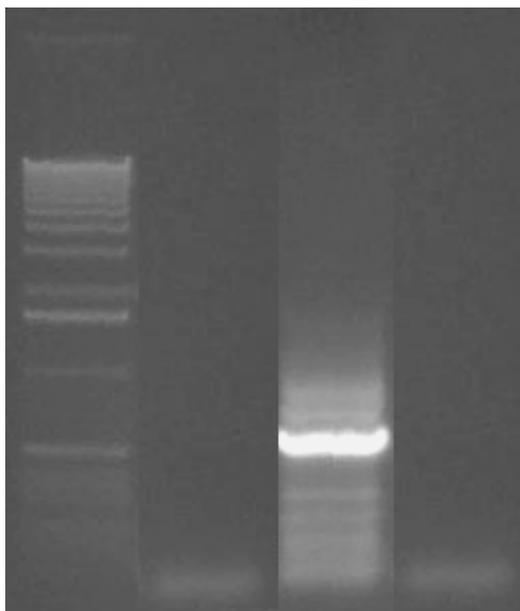


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídio, do fragmento amplificado por RT-PCR com *primers* específicos para o CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*): (L) Padrão de massa molecular 1Kb DNA Ladder, (1) Feijão-caupi cv. Costelão sadio, (2) Amostras foliares da linhagem TE 93-200-49F infectada com o CPSMV sorotipo I, (3) Controle sem RNA.

Conclusão

As linhagens MNC 99-508 F-12, MNC 99-510 G-7 e MNC 99-510 F-16 comprovadamente resistentes ao CPSMV sorotipo I, neste trabalho, abrem perspectivas para a obtenção de novas cultivares resistentes, com boa aceitação comercial e com potencial para elevar a produtividade da cultura do feijão-caupi na Região Meio Norte do Brasil.

Referências

- BRIOSO, P. S. T.; DUQUE, F. F.; SAYÃO, F. A. D.; LOURO, R. P.; KITAJIMA, E. W.; OLIVEIRA, D. E. Vírus do mosaico severo do caupi – infecção natural em mungo verde, *Vigna radiata*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3, p. 420-429, 1994.
- BRIOSO, P. S. T.; SANTIAGO, L. J. M.; ANJOS, J. R. N.; OLIVEIRA, D. E. identificação de espécies do gênero Comovirus através de “polymerase chain reaction”. **Fitopatologia brasileira**, v. 21, n. 2, p. 219-225, 1996.
- HAMPTON, R. O.; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Viral diseases of cowpea and their control by resistance-conferring genes. In: SINGH, B. B.; MOHAO RAJ, D. R.; DASHIRELL, R. E.; JACHAIL, L. E. N. (Ed.). **Advances in Cowpea Research International Institute of Tropical Agriculture**. Ibadan: IITA, 1997. p. 159-175.
- LIN, M. T.; HILL, J. H.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Two new serotypes of cowpea severe mosaic virus. **Phytopathology**, v. 74, p. 581-585, 1984.
- LIN, M.; ANJOS, J. R. N.; RIOS, G. P. Serological grouping of cowpea severe mosaic virus isolats from Cental Brazil. **Phytopathology**, v. 71, p. 435-438, 1981.

NOGUEIRA, M. S. R.; FREIRE FILHO, F. R.; BRIOSO, P. S. T. Melhoramento genético do caupi para resistência ao CPSMV, no Estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26., Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Fitopatologia: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001. p. 520.

NOGUEIRA, M. S. R.; FREIRE FILHO, F. R.; BRIOSO, P. S. T. Resistência e estudo da herança em caupi 'Costelão' à infecção ao *Cowpea severe mosaic virus* Sorotipo I. In: V REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI. 56., 2001, Teresina. **Anais...** Teresina: Avanços Tecnológicos no Feijão Caupi. Embrapa. 2001. p. 63-66 (b).

PASSOS, M. M. Fonte de Resistência, Diferenciação Biológica e Identificação Molecular de Sorotipos virais, e competição de genótipos de caupi no Estado do Rio de Janeiro. 1999. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica.

PAZ, C. D.; LIMA, J. A. A.; PIO-RIBEIRO, G. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoro e determinação de fontes de resistência em caupi. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 4, p. 285-288, 1999.

THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Worldwide occurrence and distribution of virus diseases. In: SINGH, S.R.RICHAIE, K. O. Eds. **Cowpea research, production and utilization**. Chichester: John Wiley & Sons, 1985, p. 155-171.

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, p. 49-55, 1996.

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