

**ERLEN KEILA CANDIDO E SILVA**

***COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS: DIAGNÓSTICO, ESTUDO DE  
HERANÇA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES  
MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA***

**RECIFE-PE  
2008**

**ERLEN KEILA CANDIDO E SILVA**

***COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS: DIAGNÓSTICO, ESTUDO DE  
HERANÇA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES  
MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Fitopatologia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Vilela Resende - Orientadora

Dr.<sup>a</sup> Ana Verônica Silva do Nascimento – Co-Orientadora

**RECIFE  
Fevereiro - 2008**

***COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS: DIAGNÓSTICO, ESTUDO DE  
HERANÇA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES  
MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA***

**ERLEN KEILA CANDIDO E SILVA**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 29/02/2008

**ORIENTADORA:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Vilela Resende  
(UFRPE)

**EXAMINADORES:**

---

Dr.<sup>a</sup> Ana Verônica Silva do Nascimento  
(CNPq/FACEPE/UFRPE)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sonia Maria Alves de Oliveira  
(UFRPE)

---

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva  
(UNICENTRO)

**RECIFE  
Fevereiro de 2008**

“Porque Tu, Senhor, livraste a minha alma da morte, os meus olhos das lágrimas e os meus pés da queda” (Salmos 116,8).

A Deus, razão principal da nossa existência.

## **AGRADEÇO**

Aos meus pais e irmãos que não mediram esforços para fazer de mim o que sou, e que com amor e atenção tem suavizado os momentos mais difíceis de minha vida, transformando-os em agradáveis lembranças.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Edvaldo e Maria da Conceição, pelo imenso amor e dedicação, que me transformou na pessoa que hoje sou.

Aos meus irmãos Alan, Aline, Edvaldina, Edvan e Janns, por todo amor e amizade, a mim concedido durante o decorrer de minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos, por toda alegria e carinho que seus sorrisos revelam.

Ao, antes de tudo amigo, Rinaldo, por preencher meus dias com doçura e paz.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Vilela Resende, por repartir comigo seus conhecimentos, pela sua amizade e disponibilidade para realização deste trabalho.

A minha co-orientadora e amiga Dr<sup>a</sup>. Ana Verônica S. do Nascimento pela orientação, confiança, incentivo e incansável apoio durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pelos ensinamentos transmitidos.

A professora, Antonia Alice C. Rodrigues, por ter me iniciado na pesquisa científica, pela amizade e respeito.

Aos amigos Alisson e Carlos, pela companhia constante no desenvolvimento desta pesquisa científica e principalmente pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, em especial a Israini, Ana Luisa, Horace, Alexsandro, pela ajuda a mim concedida e pelos momentos de descontração.

Às amigas, Zilderlânia Alves, Daniela Salgues, Rosana Lúcia, Liliana Santos, Agna Rita, Adriana Guedes pelos laços de amizade construídos e que, certamente, ficará para sempre.

À Dona Lourdes, pelo apoio e amizade, sempre que eu precisava e principalmente pelos ótimos momentos vivenciados.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, pela convivência.

## SUMÁRIO

	folha
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
A cultura do feijão-caupi.....	14
Mosaico Severo do feijão-caupi.....	16
Resistência genética.....	20
Marcadores moleculares.....	22
Mapeamento genético.....	26
Referências bibliográficas.....	29
<b>CAPÍTULO II - IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AO <i>COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS</i> EM FEIJÃO-CAUPI</b> .....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados e Discussão.....	50
Referências bibliográficas.....	53
<b>CAPÍTULO III - DIAGNÓSTICO POR RT-PCR E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM POPULAÇÃO F<sub>3</sub> DE FEIJÃO CAUPI AO <i>COWPEA</i></b>	

<i>SEVERE MOSAIC VIRUS</i> .....	58
Resumo.....	59
Abstract.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	62
Resultados e Discussão.....	65
Referências bibliográficas.....	66
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	72

## RESUMO

O feijão-caupi, desempenha importante papel econômico-social na agricultura das regiões Norte e Nordeste do Brasil. O Nordeste é o maior produtor brasileiro, onde é largamente utilizado na alimentação humana em detrimento do feijão comum. Aproximadamente 60% da área total de feijão no Nordeste é cultivada com feijão-caupi. A cultura gera 2,4 milhões de empregos diretos e abastece a mesa de 27,5 milhões de nordestinos, o que credencia a cultura para receber apoio dos órgãos de fomento à pesquisa. No Nordeste brasileiro, os mosaicos, provocados por vírus, devido à frequência e severidade com que ocorrem, despontam como as doenças mais importantes, constituindo-se em fator limitante à produção. Dentre as viroses, o mosaico severo do feijão-caupi, causado pelo *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) é responsável por perdas da ordem de 60% a 100%. Desta forma, o presente estudo teve por objetivos determinar a herança da resistência e identificar marcadores associados a resistência. A fenotipagem de indivíduos F<sub>2</sub> resistentes ao CPSMV foi realizada através de avaliações dos sintomas após inoculação destas com extrato vegetal tamponado contendo vírus e o comportamento da população do feijão-caupi por observações sintomatológicas e teste de  $\chi^2$ . Nas análises moleculares, a seleção de primers polimórficos foi realizada pela análise de bulks segregantes (BSA). Os primers potencialmente associados a resistência ou suscetibilidade ao CPSMV foram avaliados na população segregante. Dos 85 primers testados, o primer VM 70 mostrou-se co-segregando com a resistência. Este marcador representa uma nova ferramenta que auxiliará na obtenção de cultivares resistentes de maneira mais rápida, precisa e econômica. Na análise do diagnóstico do vírus do mosaico severo constatou-se que a técnica de RT-PCR, apresenta-se como um método rápido e eficiente.

**Palavras chaves:** Mosaico Severo, resistência genética, marcadores moleculares, seleção assistida.

## ABSTRACT

The cowpea, it plays important economical-social part in the agriculture of the areas North and Northeast of Brazil. The Northeast is the largest Brazilian producer, where it is used broadly in the human feeding to the detriment of the common bean. Approximately 60% of the total area of bean in the Northeast are cultivated with cowpea. The culture generates 2,4 million direct jobs and it supplies the table of 27,5 million Northeasterners, what accredits the culture to receive support of the fomentation organs to the research. In the Brazilian Northeast, the mosaics, provoked by virus, due to the frequency and severity with that happen, they blunt as the most important diseases, being constituted in factor limiting of the production. Among the viral illnesses, the severe mosaic of the cowpea, caused by *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) it is responsible for losses of the order from 60% to 100%. This way, the present study had for objectives determine the inheritance of the resistance and identify associated markers with resistance. The individuals' selection resistant F<sub>2</sub> to CPSMV was accomplished through inoculation with extract vegetable and the behavior of the population of the cowpea for observations symptoms and qui-square test. The selection of primers polymorphic was accomplished by the analysis of bulks segregant (BSA). Primers potentially associated with resistance or susceptibility to CPSMV were evaluated in the population segregant. Of the 85 primers tested, the primer VM 70 proved to be co-segregating with resistance. This marker represents a new tool to assist in obtaining resistant cultivars, faster, accurate and economical. In the analysis of the diagnosis of the virus of the severe mosaic it was verified that the technique of RT-PCR, comes as a fast and efficient method.

**Key words:** Mosaic Severe, genetic resistance, molecular markers, assisted selection.

## **Capítulo I**

---

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

### A cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma planta Dicotiledônea pertencente a ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna*, subgênero *Vigna*, seção *Catiang*, espécie *V. unguiculata* e subesp. *unguiculata* (FREIRE FILHO et al, 2005). Também conhecido como feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-miúdo, feijão-macassar entre outros, é uma leguminosa bem adaptada às condições brasileiras de clima e solo. Assumindo grande relevância econômico-social para a região Nordeste, onde constitui o feijão mais consumido (LIMA et al., 2005b; ASSUNÇÃO et al., 2005). Devido ao seu baixo custo de produção, o feijão-caupi é apontado pela FAO como uma das melhores alternativas para o aumento da oferta de proteínas (SIMON, 2002).

O feijão-caupi originou-se no continente africano e expandiu-se pela Arábia, Ásia e Mediterrâneo. Acredita-se que este foi introduzido na América Latina no século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses, primeiramente nas colônias espanholas sendo em seguida introduzido no Brasil, provavelmente pelo estado da Bahia, por meio dos colonizadores portugueses e a partir daí expandiu-se por todo o país (WATT, 1978; FREIRE FILHO et al., 1981; VIEIRA et al., 1984; FREIRE FILHO, 1988; DUKE, 1999; FREIRE FILHO et al., 2005). Steele e Mehra (1980) e Ng e Maréchal (1985) citam o oeste da África, mais precisamente a Nigéria, como centro primário de diversidade da espécie. Entretanto, Padulosi e Ng (1997) afirmam que provavelmente a região de Transvaal, na República da África do Sul, é a região de especiação de *V. unguiculata*.

O feijão-caupi representa uma excelente fonte de proteínas (23-25%), apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), vitaminas e sais minerais, além de

possuir baixa quantidade de gordura e grande quantidade de fibras dietéticas, representando desta forma alimento básico para as populações de baixa renda no Nordeste brasileiro (ANDRADE JUNIOR et al., 2007). Este se constitui ainda em uma das alternativas de exploração agrícola em pequenas propriedades, de ocupação de mão-de-obra menos qualificada (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2004).

Devido suas propriedades nutricionais, o feijão-caupi é cultivado principalmente, para a produção de grãos, secos ou verdes visando o consumo humano “in natura” seja na forma de conserva ou desidratado. O feijão-caupi é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal, e como adubação verde e proteção do solo (ANDRADE JUNIOR et al., 2007).

O Brasil apresenta-se como o maior produtor e consumidor mundial, sendo o Ceará o maior produtor nacional, com estimativa em cerca de 20% da produção brasileira (IBGE, 2005). A importância agrícola do feijão-caupi no Brasil, inclusive no Norte e Nordeste, aumentou por ser cultivado por pequenos produtores, como cultura de subsistência e não apresentar grande necessidade de insumos (GUAZELLI, 1988).

É uma espécie dotada de grande rusticidade o que lhe confere tolerância à seca e à umidade excessiva, tendo também a capacidade de se desenvolver bem em áreas de baixa fertilidade. Apresenta uma ampla adaptação edafoclimática, permitindo assim, seu cultivo em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e/ou consorciado, durante o ano todo, em quase todos os estados. Isto favorece a diversificação da produção, além de manter o homem no campo e o abastecimento agroalimentar da população brasileira. (ANDRADE JUNIOR et al., 2007). Porém dentre as numerosas interferências a que ainda se acha sujeita a cultura do feijão-caupi no Brasil, o clima é a variável mais importante, dificultando desta forma a elaboração de safras seguras sobre a área plantada, os níveis de produtividade e a quantidade produzida (AGRIANUAL 2003, 2002).

A área colhida, a produção e produtividade do feijão-caupi oscilam muito de ano para ano, principalmente em virtude das variações climáticas. Entre 1993 e 2001, a média anual da área colhida foi de 1.355.184 ha, a produção foi de 429.375 t e a produtividade de 317 k/ha. Com base nesses dados e considerando que um hectare gera um emprego por ano, que o consumo per capita é de 18,6 kg e que o valor histórico da saca de feijão é de US\$ 33,84, estima-se que entre 1993-2001, o feijão-caupi tenha gerado em média por ano, 1,36 milhões de empregos, produzindo suprimentos alimentares para 23,06 milhões de pessoas, tendo sua produção valorizada em US\$ 242,6 milhões (FREIRE FILHO et al., 2005).

Apesar destas características positivas, as doenças, particularmente as viroses, concorrem para uma baixa produtividade da cultura no Brasil e em outras partes do mundo (PIO-RIBEIRO et al., 2005), as quais influenciam na qualidade e na quantidade de feijão produzida (FERNANDES, 2006).

### **Mosaico Severo do feijão-caupi**

Organismos fitopatogênicos são grandes responsáveis por perdas significativas nas lavouras de feijão-caupi, chegando muitas vezes a inviabilizar a cultura em determinadas regiões. Dentre os problemas fitossanitários do feijão-caupi, destacam-se aqueles de etiologia viral, sendo relatados, em nível mundial, cerca de 20 vírus diferentes, infectando naturalmente esta cultura (THOTTAPPILY; ROSSEL, 1985).

O vírus causador do mosaico severo do feijão-caupi pertence ao gênero *Comovirus*, da família *Comoviridae*. Suas partículas possuem forma isomérica com aproximadamente 28nm de diâmetro, tendo seu genoma bipartido, constituído de duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo, denominadas RNA1 ou RNA-B (“bottom component”) que codifica proteínas para replicação e RNA2 ou RNA-M

(“middle component”) que codifica proteínas para o movimento célula a célula e à longa distância, e as proteínas do capsídeo, sendo que ambos são necessários para a infecção sistêmica na planta (CHEN; BRUENING, 1992; PIO-RIBEIRO et al., 2005; HULL, 2002). O *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) é de fácil transmissão mecânica, transmitido na natureza de forma semi-persistente por vários coleópteros da família Chrysomelidae, com destaque para o *Ceratoma arcuata* Olivier (vaquinha) como a mais importante no Brasil. (COSTA et al., 1978; LIMA et al., 2005b).

O primeiro relato do CPSMV no Brasil foi realizado por 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), ocasionando danos quantitativos e qualitativos à cultura. A grande dispersão do CPSMV deve-se, essencialmente a presenças de vetores e ao grande número de hospedeiros naturais na proximidade da cultura, que servem como reservatórios naturais do vírus (PAZ et al., 1999).

As plantas doentes apresentam modificações na cor e no hábito das plantas, sendo os sintomas geralmente visíveis em toda parte aérea, com redução drástica do crescimento, necrose na extremidade superior do caule, morte dos brotos terminais e queda prematura das folhas em plantas jovens. Infecções tardias produzem sintomas severos apenas nos tecidos novos, reduzindo significativamente seu desenvolvimento. Os sintomas severos são expressos na forma de intenso encrespamento do limbo foliar, em função de numerosas bolhosidades associadas à presença de mosqueado, isto é, alternância, nos folíolos, de zonas de coloração verde-clara, com outras de cor verde-escura (PIO-RIBEIRO et al., 2005, HULL, 2002). Frequentemente, são observados subdesenvolvimentos das nervuras principais, resultando em franzimento e redução do limbo, distorção foliar. Quando as plantas são infectadas no início do ciclo, apresentam

intenso nanismo, com severos prejuízos à produção. Estudos conduzidos em casa de vegetação revelaram que na dependência da idade da planta infectada com o vírus, a produção pode ser reduzida em até 81% (GONÇALVES; LIMA, 1988). As sementes produzidas de plantas atacadas apresentam-se deformadas, "chochas" e manchadas, com acentuada redução no poder germinativo.

O vírus pode sobreviver de uma estação para outra em plantas remanescentes de cultivos anteriores e em outros hospedeiros naturais, silvestres ou cultivados. No Brasil as espécies vegetais *Glycine max* (L.) Merrill, *Phaseolus vulgaris* L., *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb., *Canavalia brasiliensis* Mart. Ex.Benth, *C. ensiformis* L., *Psophocarpus tetragonolopus* (L.) Dc., *Crotalaria juncea* L., *C. paulinea* Schrank entre outras, são naturalmente infectadas pelo CPSMV (BRIOSO, et al., 1994; BERTACINI, et al., 1998; LIMA et al, 2005a).

Vários métodos biológicos, sorológicos e físico-químicos, com suas vantagens e desvantagens, têm sido utilizados para detectar, diagnosticar e classificar os vírus vegetais durante décadas. Avanços na biologia molecular estão sendo aplicados no desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de patógenos de plantas. Desta forma várias técnicas têm sido utilizadas para a identificação de agentes patogênicos e diagnose de doenças, sendo esta constituída basicamente de duas estratégias: uma imunológica e outra baseada na hibridização de ácidos nucléicos (LAMBAIS, 1995). Nos últimos 30 anos foram desenvolvidas técnicas para diagnósticos de patógenos de plantas como o uso de anticorpos monoclonais e ELISA, que tornou possível que antígenos do patógeno sejam detectados *in vivo* e as tecnologias baseadas em DNA, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) a qual permite que regiões do genoma do patógeno sejam ampliadas, aumentando a sensibilidade da detecção do patógeno (FULTON, 1997).

Os diagnósticos de patógenos baseados em métodos moleculares apresentam maior sensibilidade e são mais específicos quando comparados com aqueles baseados na cultura ou na serologia, uma vez que através deles muitas perguntas de natureza fundamental sobre ecologia e a epidemiologia dos patógenos podem ser respondidas (HAYWARD, 1996).

No Brasil, a técnica de PCR vem sendo utilizada em fitoviroses para a obtenção de clones genômicos, na produção de sondas moleculares específicas, na seleção inicial de plantas transgênicas e na diagnose de espécies virais (BRIOSO, 1999; EIRAS et al., 1998; SILVA et al., 1997). Devido a sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez, a técnica de PCR vem auxiliando os pesquisadores de diversas áreas, destacando-se como uma importante ferramenta na detecção de vírus em plantas. Apresenta como vantagem utilização de pequenas quantidades de tecido, permitindo a detecção do vírus em baixas concentrações e em amostras guardadas por longos períodos (COLINET et al., 1994; COLINET; KUMMERT, 1993; ZERBINI et al., 2001). Brioso et al. (1996) utilizou a técnica de PCR a partir de preparações do RNA para a identificação rápida de vírus do gênero *Comovirus* utilizando como iniciadores um par de oligonucleotídeos degenerados.

As medidas de controle para o CPSMV compreendem a eliminação de plantas de feijão-caupi remanescentes de cultivos anteriores e de hospedeiros naturais, embora seja de difícil aplicação devido sua ampla gama de hospedeiros naturais. O combate aos insetos vetores é outra forma de controle da doença, sendo esta limitada por razões econômicas e ecológicas já que é atrelada a dependência de agrotóxicos (COSTA et al., 1978; SIMON, 2002; PIO-RIBEIRO et al., 2005). Porém, a utilização da resistência varietal é uma das formas mais efetivas para o controle do CPSMV, sendo este meio de controle a opção mais econômica e ambientalmente mais favorável ao controle da doença (VALE; LIMA, 1995; UMAHARAN et al., 1996; PAZ et al., 1999).

## **Resistência genética**

O estudo de resistência a vírus em feijão-caupi tem recebido grande atenção e obtido um grande progresso. Lima e Nelson (1977) identificaram a cultivar Macaíbo como imune ao CPSMV, tendo Rios e Neves (1982) confirmado a imunidade desta cultivar e identificado uma nova fonte de resistência a este vírus, a linhagem FP 7733-2. Posteriormente esta linhagem deu origem à cultivar CNC- 0434 (RIOS et al., 1982), que foi recomendada para o cultivo no estado do Maranhão (Embrapa 1986). A cultivar CNC-0434 foi utilizada em vários cruzamentos, e destes cruzamentos foram obtidas algumas cultivares resistentes ao CPSMV, tais como: BR 10-Piauí (SANTOS et al., 1987), BR 12-Canindé (SANTOS et al., 1990), BR 14-Mulato (CARDOSO et al., 1990) e BR 17-Gurguéia (FREIRE FILHO e al., 1994).

O estudo da base genética da resistência ao CPSMV tem apontado na maioria das vezes para uma herança recessiva monogênica, no entanto ainda não foi determinado se esses genes são alelos do mesmo loco ou se são genes distintos (VALE; LIMA, 1995; ASSUNÇÃO et al., 2005). No entanto em outras ocasiões a resistência ao CPSMV foi atribuída a três genes recessivos não ligados (UMAHARAN et al., 1996).

Assim, o entendimento da forma de herança da resistência aos vírus, torna-se importante para o planejamento de um programa de melhoramento cuja estratégia é incorporar genes para resistência em cultivares com características agronômicas desejáveis. A seleção de determinadas características que torna a produção de feijão-caupi economicamente viável tem sido realizada ao longo dos anos, através de cruzamentos experimentais (FREIRE-FILHO et al., 1999). Neste caso, determinado caráter é selecionado durante várias gerações e os genes de interesse são transferidos dos genitores para os descendentes durante a fecundação, dotando-os de características que os tornam mais adaptados às condições ambientais e conseqüentemente mais produtivas. Durante

muito tempo esta foi à técnica mais usada para transferência de genes entre indivíduos da mesma espécie.

No melhoramento genético de plantas, tem-se buscado, cada vez mais, a seleção assistida por marcadores moleculares, visando obter maior eficiência na transferência de fatores genéticos. Tradicionalmente os melhoristas de plantas têm selecionado os indivíduos com base no fenótipo. Esta estratégia tem tido sucesso com características de alta herdabilidade, onde o fenótipo reflete a constituição genética do indivíduo, o que nem sempre ocorre com características de baixa herdabilidade, pois o efeito do ambiente é elevado (SOUZA et al., 1998a; 1998b). Para minimizar as dificuldades da seleção, em muitos programas de melhoramento, onde a maioria das características de interesse possui herança quantitativa, tem sido utilizadas estratégias como o teste de progênie e seleção em gerações avançadas. No entanto, estas não diminuem ou evitam os efeitos da interação genótipo x ambiente, que é um dos principais fatores que afetam o processo de seleção (HANSCH, 1983). Portanto, uma das formas de evitar esses problemas seria a seleção com base na constituição genética do indivíduo, a qual independe do ambiente e em curto prazo não muda com o tempo (BRETTING; WIDRLECHNER, 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica têm sido desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis em gerações segregantes precoce. Esta estratégia reduz tempo, fontes e energias necessários não só para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar parâmetros usados na seleção indireta. Além de sua importância no melhoramento, os marcadores também são importantes nos estudos genéticos das plantas. Nesse contexto, marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética das plantas (MILACH,

2004; ARRIEL et al., 2006). Atualmente, técnicas moleculares como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados e marcadores de microsátélites têm sido aplicados para a localização e mapeamento de genes agronomicamente importantes num curto espaço de tempo (WINTER; KAHL, 1995). Em feijão-caupi, estudos com marcadores do tipo AFLP (QUÉDRAOGO et al. 2002) e SSR (Simple sequence Repeats) ou seqüências simples repetidas tem sido desenvolvidos (LI et al., 2001) e utilizados em estudos de similaridade genética e marcação de genes.

### **Marcadores moleculares**

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que são herdados geneticamente (MILACH, 1998). Um marcador molecular é definido como marcador genético, ao ser comprovado que seu comportamento esta de acordo com as leis básicas da herança Mendeliana (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1998).

O advento da técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) acelerou o desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares. Dentre as técnicas moleculares, destacam-se aqueles baseados em hibridização, como o RFLP e os minissátélites, onde o genoma é fragmentado por enzima de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas e marcadas radioativamente (sondas) e aqueles derivados de aplicação da técnica de PCR, como o RAPD, AFLP, microssátélites ou SSR, SCAR (Sequence Characterized Amplified

Regions) e STS (Sequence Tagged Sites) (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1998; MILACH, 1998; 2007) .

As técnicas de marcadores moleculares mais utilizadas, atualmente, são as isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP, Minisatélites e Microsatélites. Estes marcadores podem ser aplicados com diversos fins, como, por exemplo, para estudar a estrutura genética de populações; análise de filogenias; detecção de ligação gênica com caracteres mono e poligênicos; identificação de variedades; avaliação de germoplasma; introgressão gênica; seleção indireta de características agrônômicas, dentre outros. Pesquisas nesta área estão sendo desenvolvidas, tendo-se alguns casos, de eficiência comprovada, do emprego das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações e quantitativa e no melhoramento de plantas (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A técnica denominada RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é uma variação da técnica de PCR que possibilita a síntese de DNA *in vitro* por meio de iniciadores arbitrários. O número e o tamanho dos fragmentos amplificados depende da seqüência do *primer* usado e da seqüência de bases do DNA molde. O RAPD é uma técnica de fácil execução, de custo reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo. No entanto, existem problemas inerentes à reprodutibilidade dos padrões de amplificação, além do baixo conteúdo de informações por loco, uma vez que são marcadores dominantes (SANTOS, 2004).

O AFLP é uma das mais recentes técnicas de marcadores que combina as vantagens do RAPD e RFLP, onde o DNA do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, e adaptadores com seqüência conhecida são ligados as extremidades do DNA, servindo desta forma de sítios de ligação para primers em uma reação de PCR. E posterior a isso, é realizado uma pré-amplificação e uma amplificação seletiva dos grupos de fragmento de restrição, usando primers com seqüência complementar à seqüência do adaptador seguida de seqüência específica do sítio de restrição da enzima e uma extensão de nucleotídeos

seletivos na extremidade 3'. Este método gera um amplo número de fragmentos de restrição, facilitando a detecção de polimorfismos, além de possuir uma alta reprodutibilidade. Uma das desvantagens dessa técnica é a dominância apresentada e o elevado custo (VOS et al., 1995; CAIXETA et al., 2006).

Os marcadores microssatélites ou SSR são seqüências constituídas de um a seis nucleotídeos e que ocorrem naturalmente no genoma com uma freqüência relativamente alta (AKKAYA et al., 1995; CAIXETA et al., 2006). A utilização destes marcadores têm sido bastante explorados para mapeamento de genes específicos que determinam importantes características agrônômicas, como a resistência a doenças na cultura do feijoeiro comum (YU et al., 2000; GÓMEZ et al., 2004). Tem como vantagem reprodutibilidade e simplicidade da técnica, a pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução, altos níveis de polimorfismos, além de serem co-dominantes, razões pelas quais estes marcadores vêm sendo amplamente usados para a integração de mapas genéticos e físicos, proporcionando uma conexão nas variações fenotípicas e genotípicas (CAIXETA et al., 2006). Devido a possibilidade de utilizar marcadores microssatélites em qualquer população segregante, tornam estes marcadores ideais para o mapeamento genético. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a escolha da população para mapeamento pode ser feita visando a população mais informativa no que se refere as suas característica biológicas ou econômicas de interesse e não mais somente com base na maximização da distância genética. Têm sido desenvolvidos e mapas de ligação saturados com marcadores microssatélites nas mais diversas espécies de plantas, como a aveia (*Avena strigosa* Schreb.) (LIU et al., 1996), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (YU et al., 1999), arroz *Oryza sativa* L.) (TEMNYKH et al., 2001). Portanto, os marcadores microssatélites têm sido uma eficiente ferramenta para conectar variações fenotípicas e genotípicas.

Alcântara Neto (2001) constatou que o microssatélite é o marcador molecular mais indicado para a caracterização genética de soja, devido à natureza co-dominante e multi-alélica deste marcador, além de ser extremamente conservado dentro da espécie.

Os marcadores moleculares são úteis, também, se levarmos em conta que durante o melhoramento, via de regra, são monitorados diversos tipos de genes, não somente aqueles envolvidos com a resistência. Nesse contexto, é interessante dispor de uma ferramenta de seleção que possa ser utilizada de modo direto, pela simples análise da presença ou ausência de uma seqüência de DNA nas folhas das plantas que estão sendo melhoradas (ALZATE-MARIN et al., 2005). Portanto, a introdução do uso de marcadores moleculares na seleção de genótipos superiores pode contribuir de forma significativa para a obtenção de conhecimentos avançados tanto da cultura como do caráter associado às condições adversas da região. Estes avanços possibilitarão a geração de um maior número de produtos melhorados.

No processo de transferência de alelos de resistência, os marcadores moleculares do DNA podem ser uma ferramenta bastante útil. Esses marcadores, se estreitamente ligados aos alelos de resistência, podem ser usados na seleção assistida por marcadores, particularmente nas etapas iniciais e intermediárias do melhoramento. Nas etapas finais, as inoculações de campo são imprescindíveis para confirmar a seleção indireta feita inicialmente por meio de marcadores (ALZATE-MARIN et al., 2005).

### **Mapeamento genético**

Uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies e, potencialmente, no melhoramento de plantas é o desenvolvimento de mapas genéticos, pois estes possibilitam a cobertura e análise completa de genomas, e decomposição de características genéticas complexas nos seus

componentes mendelianos, a localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância, a quantificação do efeito dessas regiões na característica estudada e a canalização de toda essa informação para usos em programas de melhoramento (STAUB et al., 1996; CARNEIRO; VIEIRA, 2002; FALEIRO et al., 2003, GRATTAPAGLIA; FERREIRA, 2006).

O mapeamento genético é realizado a partir de técnicas de biologia molecular aplicadas aos conceitos da herança mendeliana. Sendo para isso necessária a utilização de plantas com reprodução sexuada capazes de produzir descendência e marcadores moleculares com comportamento mendeliano. A construção de mapas de ligação para muitas espécies só é possível devido a disponibilidade de um grande número de marcadores genéticos altamente polimórficos e que não sofrem influência do ambiente. Os mapas genéticos permitem a localização de genes, e ou locos controladores de características quantitativas (QTL) sem a necessidade de conhecimento prévio da característica, a não ser a possibilidade de mensurar adequadamente o fenótipo (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Para a elaboração de um mapa genético é necessário: a escolha dos genitores a serem cruzados de forma que maximize o polimorfismo genético e posterior desenvolvimento de uma progênie segregante; obtenção de marcas contrastantes entre os genitores que apresentem segregação mendeliana na população de mapeamento através de técnicas de biologia molecular; utilização de técnicas de análise estatística e computacional para estimar a ligação e distância entre os marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ROCHA et al., 2003).

A construção desses mapas permite obter uma cobertura e análise completa do genoma, a localização de genes que controlam características de importância econômica e posterior utilização dessas informações no melhoramento genético (YOUNG, 1996).

O mapeamento molecular e a identificação de QTL (quantitative trait loci) é uma ferramenta importante no estudo da resistência, já que a construção de mapas moleculares possibilita obter cobertura e análise completa do genoma, bem como a localização de regiões genômicas que controlam caracteres úteis e utilização dessas informações para o melhoramento genético. Diversos tipos existentes de marcadores moleculares tem sido utilizados no mapeamento genético (STAUB et al., 1996, BORÉM; CAIXETA, 2006) e a possibilidade de utilizar a segregação de vários marcadores moleculares agilizado a construção de mapas para características de interesse (QUEDRAOGO et al., 2002)

Desta forma objetivamos com este estudo avaliar progênies  $F_2$  quanto a resistência ao CPSMV, identificar marcadores associados a resistência, definindo desta forma a herança da resistência, diagnosticar CPSMV em plantas coletadas de plantios na região nordeste, avaliar o comportamento de progênies  $F_3$  resistente ao CPSMV frente a diferentes isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 2003. São Paulo: FNP, 2002. 528 p.

AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1439-1445, 1995.

ALCÂNTARA NETO, F. **Marcadores microssatélites na identificação de cultivares de soja**. 2001. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G.D.L.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. 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.

ANDRADE JÚNIOR, A.S.; SANTOS, A.A.; SOBRINHOS, C.A; BASTOS, E.A.; MELO, E.B.; VIANA, F.F.P.; FREIRE FILHO, F.R.; CARNEIRO, J.S.; ROCHA, M.M.; CARDOSO, M.J.; SILVA, P.H.S; RIBEIRO, V.Q. **Cultivo de feijão-caupi**. In: EMBRAPA MEIO-NORTE. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fontesHTML/feijao/feijaoCaupi/index.htm>> . Acesso em: 22 de set. de 2007.

ARRIEL, N.H.C.; COSTA, M.M.; TREVISOLI, S.H.U.; MAURO, A.O. Outras aplicações dos marcadores. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p.145-204.

ASSUNÇÃO, I.P.; FILHO, L.R.M.; RESENDE, L.V.; BARROS, M.C.S.; LIMA, G.S.A.; COELHO, H.S.B.; LIMA, J.A.A. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 274-278. 2005.

BERTACINI, P.V.; ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A.; CHAGAS, C.M. Biological and physicochemical properties of cowpea severe mosaic *Comovirus* isolated from soybean in the State of Paraná. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, p. 409-416, 1998.

BRETTING, P.K.; WIDRLECHNER, M.P. Genetic markers and horticultural germplasm management. **HortScience**, Alexandria, v. 30, n. 7, p. 1349-1356, 1995.

BRIOSO, P.S.T. Amplificação de fragmentos genômicos específicos, através de “RT-PCR”, diretamente de preparação viral. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 80-84. 1999.

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 “polimerase chain reaction”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21. n. 2, p. 219-224, 1996.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa:UFV, 2006. 374 p.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G. SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa:UFV, 2006. p. 10-78.

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

CARNEIRO, S.C.; VIEIRA, M.L.C. **Mapas genéticos em plantas**. Campinas, Bragantia, v. 61, n. 2, p. 89-100, 2002.

CHEN, X.; BRUENING, G. nucleotide sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA2 and comparisons with RNA2 of other comovirus. **Virology**, Elsevier, v. 187, p. 682-692, 1992.

COLINET, D., KUMMERT, J. Identification of a “*sweet potato feathery mottle virus*” isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Journal Virology Methods**, Washington, v. 45, p. 149-159, 1993.

COLINET, D.; KUMMERT, J.; LEPOIVRE, P. Identification of distinct potyviruses in mildly infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p. 65-69, 1994.

COSTA, C.L.; LIN, M.T.; KITAJIMA, E.W.; SANTOS, A.A.; MESQUITA, R.C.M.; FREIRE, F.R.F. *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, p. 81-82, 1978.

DUKE, J.A. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*. 1999. Disponível em: <[http://www.newcrop.ortperdue.edu/newcrop/duke\\_energy/vignaunguiculata.html](http://www.newcrop.ortperdue.edu/newcrop/duke_energy/vignaunguiculata.html)>. Acesso em: 23 set. 2005.

EIRAS, M.; RESENDE, R.O.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 5-17, 1998.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: 11 ago. 2004.

FALEIRO, F.G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V.A.; CRUZ, C.D.; CORRÊA, R.X.; MOREIRA, M.A.; BARROS, E.G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1387-1397. 2003.

FERNANDES, C.F. **Principais Doenças e Pragas do Feijão-de-Corda**. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=294>>. Acesso em: 17 dez. 2006.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.

FREIRE FILHO, F.R. Genética do caupi. In: ARAÚJO, J.P.P.; WATT, E.E. (Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 159 -229.

FREIRE FILHO, F.R.; CARDOSO, M.J.; ARAÚJO, A.G.; SANTOS, A.A. SILVA, P.H.S. Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Teresina: EMBRAPA-UEPAE** Teresina, 1981. 45 p. (EMBRAPA-UEPAE Teresina. Boletim de Pesquisa, 4).

FREIRE FILHO, F.R., LIMA, J.A.A., SILVA, P.H.S; RIBEIRO, V.Q. (Eds.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2005. 519 p.

FREIRE-FILHO, F.R., RIBEIRO, V.Q., BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A.F. Melhoramento genético do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região Nordeste. In: QUEIRÓS, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: EMBRAPA/ CPATSA, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatosa.embrapa.br/livrorg/index.html>>. Acesso em: 13 jun. 2002.

FREIRE FILHO, F.R.; SANTOS, A.A.; ARAÚJO, A.G.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. BR 17 gurguéia: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí. **Teresina: Embrapa-CPAMN**, 1994. 6p. (Embrapa-CPAMN. Comunicado técnico, 61).

FULTON C. Molecular methods for the detection of plant pathogens. **Fems microbiology letters**, Department Plant Science, UCC, p. 307-312, 1997.

GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E. Mapeamento físico e clonagem posicional em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa:UFV, 2006. p.231-272.

GONÇALVES, M.F.B.; LIMA, J.A.A. Danos ocasionados por estirpes do vírus do mosaico severo do cowpea em *Vigna unguiculata* cultivar pitiúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 33-34, 1988.

GÓMEZ, O.J.; BLAIR, M.W.; FRANKOW-LINDBERG, B.E.; GULLBERG, U. Molecular and phenotypic diversity of common bean landraces from Nicaragua. **Crop Science**, Madson, v. 44, p. 1412-1418, 2004.

GUAZELLI, R.J. Histórico das pesquisas com caupi no Brasil, In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E. (Eds.). **O caupi no Brasil**, Brasília: EMBRAPA- CNPAF, 1988. p. 47-62.

HANSCHKE, P.E. Response to selection. In: MORRE, J.N.; JANICK, J. (Eds). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue University Press, 1983, p. 154-171.

HAYWARD, A.C. Molecular Biology in Systematics and Diagnosis of phytopathogenic Prokaryotes. **Phytoparasitica**, Israel, v. 24, n. 4, p. 271-275, 1996.

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

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação automática. Banco de dados agregados. Rio de Janeiro: Sidra 2004. Disponível em: <<http://ww.ibge.gov.br>.> Acesso em 28 nov. 2005.

LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995, p. 507-539.

LI, C.D.; FATOKUN, C.A.; UBI, B.; SINGH, B.B.; SCOLES, G.J. Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop Science**, Madson, v. 41, n. 1, p. 189-197, 2001.

LIMA, J.A.A.; NELSON, M.R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará. **Plant disease**, St. Paul. v. 63, p. 864-867, 1977.

LIMA, J.A.A.; NASCIMENTO, A.K.; SILVA, G.S.; CAMARÇO, R.F.; GONÇALVES, F.B. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do Caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 429-433, 2005a.

LIMA, J.A.A., SITTOLIN, I.M.; LIMA, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F.R., LIMA, J.A.A., SILVA, P.H.S; RIBEIRO, V.Q. (Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica, 2005b, p.404-459.

LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; MARROF, M.A.S. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 869-876, 1996.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares de plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.

MILACH, S.C.K. Seleção assistida por marcadores moleculares em plantas: mito ou realidade? In: **XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia**. Pelotas, RS, 2004.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas**. Disponível em: <<http://cpatsa.embrapa.br/livrorg/marcadormolecular.doc>>. Acesso em 13 jul. 2007.

MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 155, p.335-350, 1987.

NG, N.Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germ plasm. In: SINCH, S.R.; RACHIE, K. O. (Eds.). **Cowpea research, production and utilization**. Chichester, John Wiley, p.11-21, 1985.

OLIVEIRA, M.A. **Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna spp.*)**. Instituto Agrônomo do Sul. (Pelotas). Boletim técnico, v. 1, p. 1-36, 1947.

PADULOSI, S.; NG, N.Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N. (Eds.). **Advances in Cowpea Research**. Tsukuba: IITA JIRCAS, p.1-12, 1997.

PAZ, C.D.; LIMA, J.A.A.; PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F.M.; ANDRADE, G.P.; GONÇALVES, M.F.B. Purificação de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi, obtido em Pernambuco, produção de antissoros e determinação de fontes de resistência em caupi. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, vol. 25, p. 285-288, 1999.

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

QUÉDRAOGO, J.T.; GOWDA, B.S.; JEAN. M.; CLOSE, T.J.; EHLERS, J.D.; HALL, A.E.; GILLASPIE, A.G.; ROBERTS, P.A.; ISMAIL, A.M.; BRUENING, G.; GEPTS, P.; TIMKO, M.P.; BELZILE, F.L. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna*

*unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. **Genome**, Ottawa, v. 45, p. 175-188. 2002.

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.

RIOS, G.P.; WATT, E.E.; ARAÚJO, J.P.P.; NEVES, B.P. Cultivar CNC-0434 imune ao mosaico severo do caupi. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, 1, 1982. Goiânia. **Resumos...** Goiânia: Embrapa-CNPAF, p. 113-115, 1982.

ROCHA, R.B.; PEREIRA, J.F.; CRUZ, C.D.; QUEIROZ, M.V.; ARAÚJO, E.F. O mapeamento genético no melhoramento de plantas. **Revista biotecnologia ciência e desenvolvimento**. 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2008.

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

SANTOS, A.A.; FREIRE FILHO, F.R.; CARDOSO, M.J.; FROTA, A.B. Nova cultivar de feijão macáçar (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 84-86, 1990.

SANTOS, S.G. **Diversidade Genética de acessos de tomateiro do banco de germoplasma de hortaliças da Universidade Federal de Viçosa com base em dados morfológicos e moleculares.** 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SIMON, M. V. **Uso de marcadores moleculares em *Phaseolus vulgaris*.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

SILVA, A.M.R.; KITAJIMA, E.W.; SOUZA, M.V. “*Papaya lethal yellowing virus*”: um possível membro do gênero Tombosvírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 529-534, 1997.

SOUZA, V.A.B; BYRNE, D.H.; TAYLOR, J.F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted response to selection of several quantitative plant traits in peach. **Journal of the American society for Horticultural Science**, Mount Vernon, VA, v. 123, n. 4, p. 598-603, 1998a.

SOUZA, V.A.B; BYRNE, D.H.; TAYLOR, J.F. Heritability, genetic and phenotypic correlations, and predicted response to selection of several quantitative plant traits in peach. **Journal of the American society for Horticultural Science**, Mount Vernon, VA, v. 123, n. 4, p. 604-611, 1998b.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction , and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 15, p. 729-740, 1996.

STEELE, W.M, MEHRA, K.L. Structure, evolution and adaptation to farming system and environment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, D.R; BUNTING, A.H. (Eds.). **Advances in legume science**. England: Royol Botanic Gardens, p.459-468. 1980.

TEMNYKH, S.; DeCLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; McCOUCH, S. Computacional and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome**, Ottawa, v. 11. p. 1441-1452, 2001.

THOTTAPPILY, 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. p. 155-171, 1985.

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**, New York, v.95, 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, p. 30-32, 1995.

VIEIRA, J.P.P.; RIOS, G.P.; WATT, E.E.; NEVES, B.P.; FAGERIA, N.K.; OLIVEIRA, I.P.; GUIMARÃES, C.M.; SILVEIRA-FILHO, A. **Cultura do caupi *Vigna unguiculata* (L.) Walp.; Descrição e recomendação técnicas de cultivo**. Goiânia. 1984. (Boletim Técnico).

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford Journal: oxford, v.23, p.4407-4414, 1995.

WATT, E.E. **First annual report on the EMBRAPA/IITA - Cowpea Program in Brasil**. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1978. 55p.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSAKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford Journal: oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WINTER, P.E.; KAHL, G. Molecular Marker technologies for plant improvement. **World Journal microbiology biotechnology**, Springer Netherlands, v.11, p.438-448, 1995.

YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 479-501, 1996.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, Ottawa, v.42, p.27-34, 1999.

YU, K.; PARK, S.J.; POYSA, V.; GEPTS, P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 91, p. 429-434, 2000.

ZERBINI, F.M.; AMBROZEVÍCIUS, L.P.; NAGATA, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In: ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. **Princípios e Técnicas de Diagnose aplicados em Fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 95-124, 2001.

## Capítulo II

---

# **IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA AO *COWPEA SEVERE* *MOSAIC VIRUS* EM FEIJÃO-CAUPI**



27 testados marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. Todos os primers RAPDs e combinações  
28 AFLP testadas mostraram-se monomórficas. Já dentre os 25 marcadores microssatélites  
29 testados, o marcador VM 70 apresentou-se polimórfico entre os bulks. Este marcador foi  
30 avaliado na população segregante e mostrou-se co-segregando com gene de resistência ao  
31 CPSMV, apresentando-se como uma nova ferramenta que pode auxiliar na seleção assistida  
32 para resistência ao CPSMV em feijão-caupi e é o primeiro passo para a clonagem deste gene.

33 **Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, mosaico severo, seleção assistida, melhoramento,  
34 *Comovirus*.

### 35 **ABSTRACT**

36 The cowpea acts an important social-economic role in the agriculture of the North and  
37 Northeastern regions of Brazil. The Northeast is the greatest brazilian producer, where it is  
38 largely used in human alimentation in detriment of the common bean. Approximately 60% of  
39 the whole bean area of the Northeast is cultivated with cowpea. Yet the diseases caused by  
40 viruses are considered the main factors responsible for the damage, causing loss of productivity  
41 this legume in their fields for cultivation. Among the viruses, the mosaic severe, caused by  
42 *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) is responsible for losses of the order of 60% to 100%.  
43 That way, the present study aimed to identify molecular markers that are associated with  
44 resistance to mosaic severe in cowpea. All of the individuals F<sub>2</sub> were analyzed by the test  
45 independent qui-square and frequencies waited of 3 susceptible plants: 1 resistant plant. To  
46 identify markers associated with the gene for resistance to CPSMV was used the technique of  
47 segregating bulks. Were tested RAPD, AFLP, microsattellites and markers,. All primers RAPDs  
48 and AFLP combinations tested, proved monomorphic. Among the 25 tested microsattellite  
49 markers tested, the label VM 70 showed up polymorphic among bulks. This was evaluated in  
50 the population segregating is shown to be co-segregating with gene for resistance to CPSMV.  
51 This marker is a new tool that can assist in the selection assisted for resistance to CPSMV in  
52 cowpea and is the first step towards the cloning of this gene.

53 **Keywords:** *Vigna unguiculata*, mosaic severe, assisted selection, improvement, *Comovirus*.

## 54 INTRODUÇÃO

55 O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., também conhecido como feijão de corda  
56 e feijão macassar é uma leguminosa adaptada às condições brasileiras de clima e de solo,  
57 assumindo grande relevância social para o Nordeste (Lima et al., 2005; Assunção et al., 2005).  
58 Entre os fatores que contribuem para a redução da produtividade desta leguminosa estão às  
59 doenças, sobretudo aquelas causadas por vírus. Dentre os vírus, destaca-se o vírus do mosaico  
60 severo do feijão-caupi (*Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV). Esse vírus pertence à família  
61 *Comoviridae* e ao gênero *Comovirus* tem como vetor mais de 10 espécies de coleópteros do  
62 gênero *Cerotoma*, sendo facilmente transmitido artificialmente por inoculação via extrato  
63 vegetal tamponado (Lima et al. 2005). Várias medidas de controle têm sido adotadas para o  
64 controle da doença, porém, não tem se mostrado efetivo. Uma alternativa que se tem buscado  
65 para várias doenças, principalmente as causadas por vírus, fundamenta-se na introdução da  
66 resistência genética, em cultivares comerciais através do melhoramento genético.

67 A seleção de determinadas características que torna a produção de feijão-caupi  
68 economicamente viável tem sido realizada ao longo dos anos através de cruzamentos  
69 experimentais (Freire-Filho et al., 1999). Neste caso, determinado caráter é selecionado durante  
70 várias gerações, com base no fenótipo e os genes de interesse são transferidos dos genitores para  
71 os descendentes durante a fecundação gerando novas combinações gênicas, dotando-os de  
72 características que os tornem mais adaptados às condições ambientais e, conseqüentemente,  
73 mais produtivas. Durante muito tempo esta foi à técnica mais usada para transferência de genes  
74 entre indivíduos da mesma espécie. A obtenção de uma variedade comercial com resistência a  
75 doenças é demorada e trabalhosa, portanto, a disponibilidade de marcadores moleculares que  
76 co-segregam com genes de resistência pode ser de grande utilidade para o melhoramento, pois  
77 permite monitorar e acelerar a introgressão de genes em cultivares comercial, além de  
78 possibilitar a piramidação de genes em cultivares de interesse (Lanza et al., 2000).

79 Marcadores moleculares associados a diferentes características de importância  
80 econômica têm sido desenvolvidos, permitindo a seleção indireta de características desejáveis

81 em gerações segregantes precoce. Esta estratégia reduz tempo e gastos desnecessários não só  
82 para desenvolver grandes populações segregantes por várias gerações, mas também para estimar  
83 parâmetros usados na seleção indireta. Além de sua importância no melhoramento, os  
84 marcadores moleculares também são importantes nos estudos genéticos, constituindo-se em  
85 ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética  
86 das plantas quando comparado aos métodos clássicos do melhoramento genético (Milach, 2004;  
87 Arriel et al., 2006).

88 Marcadores associados a um determinado gene de resistência podem ser utilizados para  
89 a seleção indireta das plantas resistentes em um programa de melhoramento utilizando uma  
90 nova fonte de resistência, com base na presença ou não do alelo SSR correspondente (Kelly,  
91 1995). No tocante ao mapeamento de genes relacionados à resistência de plantas a patógenos,  
92 inúmeros genes têm sido mapeados em inúmeras culturas. Embora existam estudos visando o  
93 mapeamento de genes de resistência a patógenos em feijão-caupi (Boukar et al., 2004, Humphry  
94 et al, 2003; Quedraogo et al., 2002; Gowda et al, 2002, Humphry et al, 2002) e feijão comum  
95 (*Phaseolus vulgaris* L.) (Faleiro et al., 2003, Alzate-Marin, 2005), nenhum foi relatado até então  
96 mapeando a resistência ao CPSMV. Assim, o presente trabalho teve como objetivo a  
97 identificação de marcadores moleculares associados a resistência do vírus do mosaico severo em  
98 feijão-caupi.

## 99 **MATERIAL E MÉTODOS**

### 100 **Cultivares e fenotipagem para resistência ao CPSMV**

101 As cultivares utilizadas neste trabalho foram IPA 206 e CNC 0434 que serviram como  
102 genitores para uma população segregante F<sub>2</sub> composta de 232 indivíduos, e as cultivares  
103 Sempre Verde e BR-14 Mulato que serviram como testemunhas. As cultivares IPA 206 e  
104 Sempre Verde serviram como padrão de suscetibilidade, enquanto as cultivares CNC 0434 e  
105 BR-14 Mulato serviram como padrão de resistência. A cultivar Pitiúba foi utilizada para  
106 multiplicação do inóculo de CPSMV.

107 A fenotipagem foi conduzida em casa de vegetação no Departamento de Fitotecnia da  
108 Universidade Federal Rural de Pernambuco. O isolado de vírus do mosaico severo de feijão-  
109 caupi (CPSMV-1) utilizado para inoculação da população F<sub>2</sub> foi cedido pelo laboratório de  
110 Fitovirologia da UFRPE. Inicialmente foi realizada a multiplicação do inóculo em plantas de  
111 feijão-caupi, cultivares Pitiúba e Sempre Verde, através de sucessivas inoculações com extrato  
112 vegetal, conteúdo tampão fosfato 0,05 M pH 7,0, e 0,01 M de sulfito de sódio, polvilhadas com  
113 abrasivo - Carborundum 300 mesh.

114 As plantas foram semeadas em copos descartáveis de 300 mL, contendo terra e esterco  
115 na proporção de 3:1. A inoculação dos indivíduos F<sub>2</sub>, dos genitores e das duas testemunhas  
116 foram realizadas cerca de 10 dias após a emergência, quando as plantas apresentaram o trifólio  
117 aberto, utilizando-se tampão fosfato, 0,05 M pH 7,0 contendo sulfito de sódio 0,01M, na  
118 proporção 1:10 (p/v). Para evitar possível escape foram realizadas duas inoculações com  
119 intervalo de 48 horas. Após 10 dias da inoculação foram realizadas avaliações semanais através  
120 de observações visuais dos sintomas até 45 dias após a primeira inoculação. As plantas que não  
121 apresentaram sintomas foram mantidas em casa de vegetação para observação de sintomas  
122 tardios. As frequências de segregação foram analisadas pelo teste  $\chi^2$ .

### 123 **Extração do DNA e análise por bulks**

124 As análises moleculares foram realizadas coletando-se amostras de folhas jovens dos  
125 genitores IPA 206 e CNC 0434 e da população segregante. O DNA foi extraído conforme  
126 descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Após extração do DNA este foi quantificado em gel  
127 de agarose 0,8% e em espectrofotômetro.

128 Para a análise de bulks (Michelmore, 1991) foram construídos dois bulks. O bulk I foi  
129 formado pela mistura do DNA de todos os indivíduos suscetíveis da população segregante e  
130 bulk II formado pela mistura do DNA de todos os indivíduos resistentes. Juntamente com os  
131 bulks foram analisados o DNA dos genitores. Os primers para RAPD (Random Amplified  
132 Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e SSR (Simple

133 sequence Repeats) foram testados, individualmente, entre os genitores e nos bulks segregantes  
134 e os que apresentaram polimorfismos foram testados separadamente nos genitores e em toda a  
135 população segregante.

### 136 **Análises moleculares**

#### 137 **RAPD**

138 Pela técnica de RAPD foram testados 30 primers decâmeros nos genitores e nos bulks I  
139 e II. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 15 µL, contendo tris-  
140 HCl 10Mm (pH 8,3), KCl 50mM, MgCl 2,0mM, 100µM de cada um dos  
141 desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 20µM de primer, uma unidade de Taq  
142 polymerase e 20ng de DNA. O programa para a PCR (Reação em cadeia da polimerase) teve  
143 um passo inicial de cinco minutos a 94°C para desnaturação inicial de DNA e, a seguir, 35  
144 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 34°C e 1 minuto a 72°C, seguida de cinco minutos a 72°C  
145 para a completa extensão de todas as cadeias complementares. Os fragmentos de DNA  
146 amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (p/v) em tampão TBE a  
147 100 V. O marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado como padrão para estimar o  
148 tamanho dos fragmentos. Após a eletroforese, os géis foram corados com SyBr Gold (1X,  
149 Invitrogen) e fotografados sob luz UV em um foto documentador digital Vilber Loumat.

#### 150 **AFLP**

151 O protocolo utilizado para identificação de marcadores AFLP foi o proposto por Vos et  
152 al., (1995) e consta de quatro etapas: a) digestão de 1 ng de DNA com 5 unidades da enzima  
153 MseI (37°C por 2 horas) seguida da digestão com a enzima PstI ( 37°C por 2 horas); b) ligação  
154 do DNA digerido a adaptadores específicos na presença de 1 unidade de T<sub>4</sub> DNA ligase (23°C  
155 por 2 horas); c) Pré-amplificação do DNA ligado com primers específicos com 1 base seletiva;  
156 d) amplificação do DNA pré-amplificado com primers específicos com 3 bases seletivas. Os  
157 fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida a 5% e corado com solução a base de

158 nitrato de prata conforme protocolo “Silver Sequence TM” da Promega Corporation (1996).  
159 Para esta técnica foram testadas 30 combinações de primers nos genitores e nos bulks I e II.

## 160 **Microsatélites**

161 Os primers utilizados para as análises de microsatélites foram retirados dos mapas  
162 publicados por Li et al. (2001). Para a PCR o DNA de cada genótipo foi diluído em água  
163 ultrapura na proporção de 50ng/ul. O protocolo para a PCR foi o proposto pelos autores  
164 obedecendo a temperatura de anelamento de cada primer. Primeiramente cada par de primer de  
165 microsatélite foi analisado nos genitores. Os pares de primers com padrão polimórfico entre os  
166 genitores foram avaliados na população segregante. Os produtos de amplificação foram  
167 resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% e corados conforme protocolo “Silver  
168 SequenceTM” da Promega Corporation (1996).

## 169 **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### 170 **Fenotipagem**

171 As plantas das cultivares Sempre Verde e Pitiúba utilizadas para multiplicação do  
172 isolado de CPSMV-1 apresentou sintomas de mosaico severo, deformação foliar,  
173 confirmando a virulência do isolado. Na avaliação das cultivares utilizadas foi observada  
174 infecção sistêmica no genótipo IPA 206 e na cultivar Sempre Verde confirmando a  
175 suscetibilidade destas cultivares. Na cultivar CNC 0434, genitor resistente, assim como na  
176 testemunha BR-14 Mulato não foram observados sintomas de infecção confirmando a  
177 resistência destas cultivares. Das 232 plantas F<sub>2</sub> avaliadas, 184 apresentaram infecção  
178 sistêmica. Os sintomas observados nessas plantas variaram de mosaico suave a mosaico  
179 severo e distorção foliar (Figura 1). Entretanto, não foram observados sintomas de infecção  
180 em 48 plantas F<sub>2</sub> sendo estas consideradas resistentes.

181 A análise de segregação das plantas F<sub>2</sub> derivadas do cruzamento IPA 206 x CNC 0434  
182 foi avaliada pelo teste do  $\chi^2$  validando a proporção de segregação 3:1 (suscetíveis: resistentes)  
183 ( $\chi^2=2.29$ ) o que confirmou a herança monogênica recessiva do gene de resistência ao CPSMV

184 presente na cultivar CNC 0434. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios sobre  
185 herança de resistência ao CPSMV, que tem revelado a existência de genes recessivos  
186 monogênicos. No entanto não se sabe se estes genes são alelos no mesmo loco ou em locos  
187 distintos (Vale & Lima, 1995; Assunção et al. 2005). Umaharam et al. (1997) atribuíram a  
188 resistência ao CPSMV a três genes recessivos e não ligados. A natureza recessiva da herança da  
189 resistência é consequência de algum fator essencial para o vírus se replicar ou se movimentar no  
190 hospedeiro, o que é reforçado pelo fato de nenhum sintoma ter sido observado nas plantas  
191 resistentes (Assunção et al., 2005).

192 Umaharam et al. (1997) estudando a resistência ao CPSMV em feijão-caupi constatou  
193 que plantas obtidas de sementes F<sub>3</sub> mostraram-se uniformemente resistentes indicando que as  
194 plantas resistentes obtidas ao final do período de seleção foram homozigotas para resistência.  
195 Segundo Van Loon (1983), a progressão da doença em plantas infectadas por vírus ocorre  
196 somente em folhas novas. Portanto, sintomas podem não ser expressos com a maturidade das  
197 folhas, como também pode aparecer de forma tardia. Desta forma em condições de campo  
198 alguns genótipos podem ter a expressão dos sintomas mascarados, fazendo com que a seleção  
199 para a resistência seja menos efetiva.

## 200 **Identificação de marcadores moleculares associados a resistência ao CPSMV-1**

201 Na análise por BSA (Análise de bulk segregante), os 30 primers RAPD e as 30  
202 combinações de primers AFLP não apresentaram polimorfismo. A exemplo dos marcadores  
203 RAPD e AFLP, não foi encontrado polimorfismo em 24 “primers” SSR testado através da  
204 análise de bulk segregante. Apenas o SSR VM70 mostrou-se polimórficos no bulks. Quando  
205 analisado na população segregante este marcador mostrou-se co-segregando com a resistência  
206 ao CPSMV (Figura 2). O fato da maioria dos primers microssatélite e todos os RAPDs e  
207 AFLPs mostrarem-se monomórficos entre os genitores, evidencia um baixo polimorfismo  
208 destes marcadores, que pode ser explicados pela estreita base genética da cultura. Segundo  
209 Montalvan et al. (2008), a base genética de cultivares brasileiras de feijão-caupi, é muito  
210 estreita, onde apenas sete de um total de 41 cultivares contribuíram com 50% dos genes do

211 germoplasma em uso. A grande contribuição genética de poucos ancestrais pode ser atribuída  
212 ao sucesso de um limitado número de cruzamentos. Assim, 18,6% das cultivares lançadas  
213 entre 1969 e 2005 têm a linhagem nigeriana CNC 0434 como ancestral.

214 O marcador microssatélite VM 70 está co-segregando (100% de associação na  
215 população avaliada) com gene de resistência ao CPSMV. Este fato pode ser evidência de que  
216 a seqüência do marcador pode fazer parte do próprio gene de resistência. No entanto os dados  
217 obtidos até o momento não são suficientes para esta afirmação, estudos futuros são  
218 necessários.

219 A identificação deste marcador associado ao gene de resistência ao CPSMV é de  
220 grande importância, pois este se constitui no primeiro passo para a seleção assistida no  
221 melhoramento de plantas e para a futura clonagem do gene de resistência ao CPSMV. A  
222 clonagem de um gene de resistência à doença abre novas perspectivas no estudo e  
223 compreensão da interação patógeno-hospedeiro e, sobretudo no melhoramento visando  
224 resistência.

## 225 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

226 ALZATE-MARIN, A. L., CERVIGNI, G.D.L., MOREIRA, M.A. & BARROS, E.G. Seleção  
227 assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças,  
228 com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira* 30(4):333-242. 2005.

229 ASSUNÇÃO, I. P., FILHO, L. R. M., RESENDE, L. V., BARROS, M. C. S., LIMA, G. S. A.,  
230 COELHO, H. S. B. & LIMA, J. A. A. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea*  
231 *severe mosaic virus* em caupi. *Fitopatologia Brasileira* 30(3): 274-278. 2005.

232 ARRIEL, N.H. C., COSTA, M.M., TREVISOLI, S.H.U. & MAURO, A.O. Outras aplicações  
233 dos marcadores. In: BORÉM, A. & CAIXETA, E. T. (Eds.). *Marcadores moleculares*. Viçosa-  
234 MG. 2006. pp.145-204.

235 BOUKAR, O., KONG, L., SINH, B.B., MURDOCK, L. & OHM, H.W. AFPL and AFLP-  
236 derived SCAR markers associated with *Striga gesnerioides* resistance in cowpea. *Crop Science*  
237 44(4): 1259-1264. 2004.

238 FALEIRO, F.G., SCHUSTER, I., RAGAGNIN, V. A., CRUZ, C. D., CORRÊA, R. X.,  
239 MOREIRA, M. A. & BARROS, E. G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes  
240 e mapeamento de locos de características quantitativas associados a ciclo e produtividade do  
241 feijoeiro-comum. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38(12):1387-1397. 2003.

242 FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em  
243 análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998.

244 FREIRE-FILHO, F.R., RIBEIRO, V.Q., BARRETO, P.D. & SANTOS, C.A.F. Melhoramento  
245 genético do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região Nordeste. In: QUEIRÓS,  
246 M.A. D., GOEDERT, C.O. & RAMOS, S.R.R (Eds.). Recursos genéticos e melhoramento de  
247 plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina. EMBRAPA/ CPATSA, 1999. Disponível em:  
248 <http://www.cpatosa.embrapa.br/livrorg/index.html>.

249 GOWDA, B.S., MILLER, J.L., RUBIN, S.S., SHARMA, D.R. & TIMKO, M.P.  
250 Isolation, sequence analysis, and linkage mapping of resistance-gene analogs in cowpea (*Vigna*  
251 *unguiculata* L. Walp.). Euphytica 126 (3): 365-377. 2002.

252 HUMPHRY, M.E., MAGNER, T., MCINTYRE, C.L., AITKEN, E.A.B. & LIU, C.J.  
253 Identification of a major locus conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni*  
254 DC) in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) by QTL analysis.  
255 Genome 46 (5): 738-744. 2003.

256 HUMPHRY, M.E., KONDURI, V., LAMBRIDES, C.J., MAGNER, T., MCINTYRE, C.L.,  
257 AITKEN, E.A.B. & LIU, C.J. Development of a mungbean (*Vigna radiata*) RFLP linkage map  
258 and its comparison with lablab (*Lablab purpureus*) reveals a high level of colinearity between  
259 the two genomes. Theoretical And Applied Genetics 105 (1): 160-166. 2002.

260 KELLY, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene  
261 resistance to plant pathogens. HortScience 30:461-465. 1995.

262 LANZA, M.A., GUIMARÃES, C.T., SHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no  
263 melhoramento genético. Informe Agropecuário 21(204): 97-108. 2000.

264 LI, C., FATOKUN, C.A., UBI, B., SINGH, B.B. & SCOLES, G. J. Determining Genetic  
265 Similarities and Relationships among Cowpea Breeding Lines and Cultivars by Microsatellite  
266 Markers. *Crop Science* 4:189-197. 2001.

267 LIMA, J.A.A., SITTO LIN, I.M. & LIMA, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças  
268 ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F.R., LIMA, J.A.A., SILVA, P.H.S & RIBEIRO,  
269 V.Q. (Eds.) Feijão caupi: Avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica. 2005.  
270 pp.404-459.

271 MICHELMORE, R.W., PARANM I. & KESSELI, R.V. identification of markers linked to  
272 disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in  
273 specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*  
274 88:9828-9832. 1991.

275 MILACH, S.C.K. Seleção assistida por marcadores moleculares em plantas: mito ou realidade?  
276 In: XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia. Pelotas, RS, 2004.

277 MONTALVÁN, R., MAIA, J. P., MACIEL, S. V. P. A., RAMOS, S. R. R. & FREIRE FILHO,  
278 F. R. Base genética das cultivares brasileiras de feijão-caupi. Disponível em:  
279 <http://www.cpamn.embrapa.br/anaisconac2006/resumos/GM27.pdf>.

280 QUÉDRAOGO, J. T., GOWDA, B. S., JEAN. M.; CLOSE, T.J., EHLERS, J.D., HALL, A. E.,  
281 GILLASPIE, A. G., ROBERTS, P. A., ISMAIL, A. M., BRUENING, G., GEPTS, P., TIMKO,  
282 M.P. & BELZILE, F. L. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.)  
283 combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance traits. *Genome*  
284 45:175-188. 2002.

285 UMAHARAN, P.; ARIYANAYAGAN, R.P. & HAQUE, S.Q. Resistance to *cowpea severe*  
286 *mosaic virus*, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp.  
287 *Euphytica* 95:49-55. 1997.

288 VALE, C. C.; LIMA, J. A. A. Herança da imunidade da cultivar macaibo de *Vigna unguiculata*  
289 ao vírus do mosaico severo do caupi. *Fitopatologia Brasileira* 20: 30-32. 1995.

290 VAN LOON, L. C. Mechanisms of resistance in virus infected plants. In: BAILEY, J.A. &  
291 DEVERALL (Eds.). The dynamics of host defence. Sydney and New York: Academic press,  
292 1983. pp. 123-190.

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

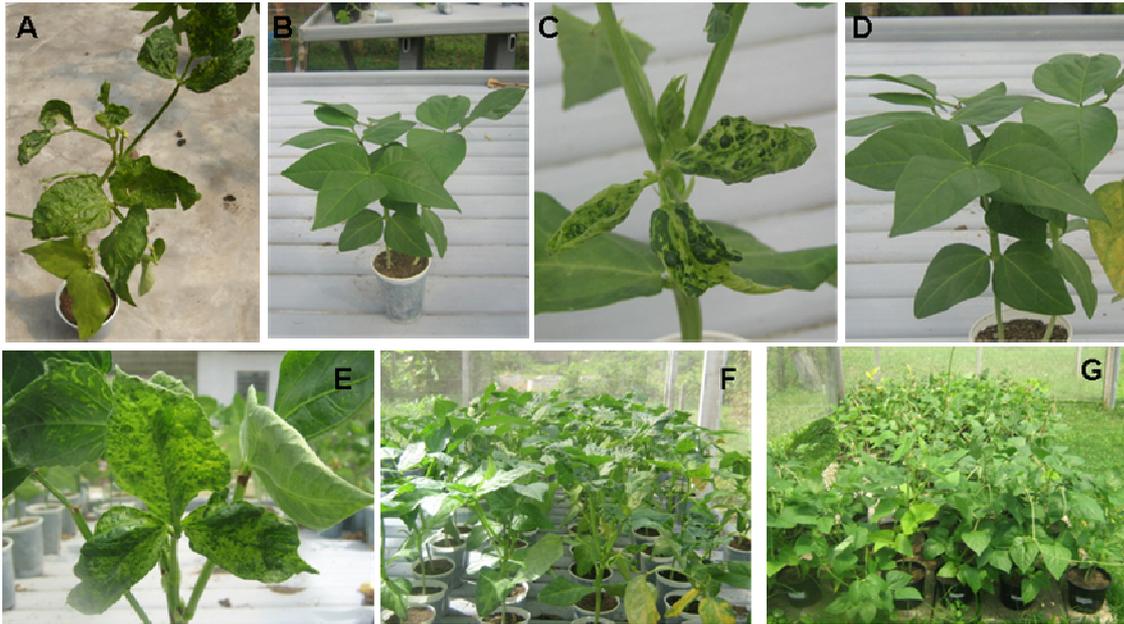
312

313

314

315

316



317

318 **FIG 1.** Sintomas observados nas plantas após inoculações com o isolado de CPSMV. **A:** cultivar  
 319 IPA 206 apresentando sintomas de mosaico severo e deformação foliar; **B:** cultivar BR-14  
 320 Mulato sem sintomas de infecção; **C:** cultivar Sempre Verde com sintomas de mosaico severo,  
 321 bolhosidade e deformação foliar; **D:** cultivar CNC 0434 sem sintomas de infecção; **E:** planta F<sub>2</sub>  
 322 (IPA 206 X CNC 0434) apresentando sintomas de mosaico severo; **F:** população F<sub>2</sub> (IPA 206 X  
 323 CNC 0434); **G:** plantas resistentes mantidas em casa de vegetação.

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333



334



335

336 **FIG 2.** Análise dos produtos de amplificação do DNA de feijão-caupi com o “primer” SSR  
 337 VM70. P<sub>R</sub>- CNC 0434 (genitor resistente); P<sub>S</sub>- IPA 206 (genitor suscetível); R- indivíduos  
 338 resistentes; S- indivíduos suscetíveis; M – Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb.3

### **Capítulo III**

---

## **DIAGNÓSTICO POR RT-PCR E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM POPULAÇÃO F<sub>3</sub> DE FEIJÃO CAUPI AO *COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS***

1 **DIAGNÓSTICO POR RT-PCR E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM POPULAÇÃO**  
2 **F<sub>3</sub> DE FEIJÃO-CAUPI AO *COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS***

3  
4 Erlen Keila Candido e Silva<sup>1</sup>, Luciane Vilela Resende<sup>1</sup>, Ana Verônica Silva do Nascimento<sup>1</sup>,  
5 Alisson Esdras Coutinho<sup>1</sup>, José Carlos da Costa<sup>1</sup>

6 <sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel  
7 de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, e-mail: erlenkeila@yahoo.com.br.

8 (Aceito para publicação em \_\_/\_\_/\_\_)

9 Autor(a) para correspondência: Erlen Keila Candido e Silva

---

10 **RESUMO**

11 SILVA, E. K. C.; RESENDE, L. V.; NASCIMENTO, A. V. S.; COUTINHO, A. E.; COSTA, J.  
12 C. Diagnóstico por RT-PCR e avaliação da resistência em população F<sub>3</sub> de feijão-caupi ao  
13 *Cowpea severe mosaic virus*. *Summa Phytopathologica*.

14 No Nordeste brasileiro, os mosaicos provocados por vírus, despontam como as doenças  
15 mais importantes para a cultura do feijão-caupi, constituindo-se em fator limitante da produção.  
16 A resistência genética tem sido considerada como melhor alternativa de controle *Cowpea severe*  
17 *mosaic virus*. Dentre os diversos métodos de diagnósticos de infecção viral, a técnica de PCR  
18 vem sendo utilizada, devido a rapidez, sensibilidade e especificidade, destacando-se como um  
19 instrumento importante na detecção de vírus de plantas. Desta forma, objetivou-se diagnosticar  
20 o mosaico severo do feijão-caupi, em plantas coletadas na região Nordeste, através do RT-PCR  
21 e avaliar o comportamento de uma população F<sub>3</sub> desenvolvida para a resistência, frente a  
22 diferentes isolados de CPSMV, coletados em diferentes áreas de cultivo. Amostras foliares de  
23 feijão-caupi apresentando sintomas de mosaico foram coletados em plantios nos estados de  
24 Pernambuco e Paraíba. Os isolados foram mantidos em cultivares suscetíveis de feijão-caupi em  
25 casa de vegetação através de inoculações mecânicas periódicas. Foi feita a extração dos RNAs  
26 totais, a síntese de cDNA e a reação de RT-PCR utilizando “primers” específicos de diagnóstico

27 do vírus. Foi realizada inoculação e avaliação de progênies F<sub>3</sub> quanto à resistência a isolados de  
28 CPSMV e diagnosticado por RT-PCR. Os isolados coletados e diagnosticados molecularmente  
29 apresentaram padrão de amplificação compatível com o fragmento esperado, com um tamanho  
30 aproximado de 593 pb. Das 185 plantas F<sub>3</sub> inoculadas com os diferentes isolados apenas duas  
31 plantas apresentaram sintomas de infecção sistêmica típico do CPSMV, sugerindo ter ocorrido  
32 escapes na inoculação.

33 Palavras-chaves adicionais: mosaico severo, diagnose molecular, resistência genética,  
34 *Comovirus*.

---

35 **ABSTRACT**

36 SILVA, E. K. C.; RESENDE, L. V.; NASCIMENTO, A. V. S.; COUTINHO, A. E.; COSTA, J.  
37 C. Diagnosis for RT-PCR and evaluation of the resistance in population F<sub>3</sub> of cowpea to  
38 *Cowpea severe mosaic virus*. *Summa Phytopathologica*.

39 In Brazilian Northeast, the mosaics caused by viruses top as the most important diseases  
40 to the caupi culture, forming a limiting factor in production. The genetic resistance has been  
41 considered as the best alternative to control the *Cowpea severe mosaic virus*. Amongst the many  
42 diagnosis methods of viral infection, the PCR technique has been used, due to it's quickness,  
43 sensibility and specificity, being highlighted as an important instrument in the detection of plant  
44 viruses. This way, the goal was to diagnostic the severe mosaic of caupi-bean, in plants  
45 collected at the Northeast Region, through RT-PCR and evaluate the behaviour of one  
46 population F<sub>3</sub> developed for endurance, facing different CPSMV isolateds, collected at different  
47 culture areas. Foliar examples of caupi-bean presenting symptoms of mosaic were collected in  
48 plantations on the states of Pernambuco and Paraíba. The isolated were kept in susceptible  
49 cultures of caupi in greenhouse through periodic mechanic inoculations. It was made the  
50 extraction of total RNAs, the synthesis of cDNA and the reaction of RT-PCR using specific  
51 "primers" of virus diagnosis. The inoculation and evaluation of F<sub>3</sub> concerning resitance through  
52 CPSMV isolated was made and diagnosed by RT-PCR. The isolated collected and diagnosed

53 molecularly presented standard amplification compatible to the expected fragment, with an  
54 approximated size of 593 pb. From the 185 F<sub>3</sub> plants inoculated with different isolated only two  
55 plants presented symptoms of systemic infection typical of the CPSMV, suggesting having been  
56 occurred escapes in the inoculation.

57 **Additional Key-words:** severe mosaic, molecular diagnose, genetic resistance, *Comovirus*.

## 58 **INTRODUÇÃO**

59 O feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subespécie *unguiculata*, também  
60 conhecido como feijão-de-corda e feijão-macassar, é uma leguminosa de grande relevância  
61 econômico-social para a região Nordeste, onde constitui o feijão mais consumido (3, 15). Com  
62 a expansão da área cultivada com a cultura, vários fatores têm contribuído para a redução da  
63 produtividade desta leguminosa. Dentre estes, as doenças ocasionadas por vírus, estão entre os  
64 principais fatores responsáveis pelos prejuízos (20), as quais influenciam na qualidade e na  
65 quantidade do feijão-caupi produzida.

66 Dentre os vírus que infectam o feijão-caupi, destaca-se o *Cowpea severe mosaic virus*  
67 (CPSMV) causador do mosaico severo (20). Esse vírus pertence ao gênero *Comovirus*, da  
68 família *Comoviridae*. Suas partículas possuem forma isomérica com aproximadamente 28nm  
69 de diâmetro, com genoma bipartido. É constituído de duas moléculas de RNA de fita simples,  
70 senso positivo, ambas necessárias para a infecção (12).

71 O primeiro relato do CPSMV no Brasil foi realizado por Oliveira (19) no Rio Grande  
72 do Sul, e desde então sua distribuição alcançou todas as regiões produtoras de feijão-caupi no  
73 país (15). Na região nordeste há registros da ocorrência de CPSMV infectado feijão-caupi na  
74 década de 70, no Estado do Ceará (16, 14) e desde então tem ocorrido de forma generalizada na  
75 maioria dos estados do nordeste.

76 As plantas infectadas pelo CPSMV apresentam sintomas severos, expresso na forma de  
77 modificações de cor e no hábito das plantas, subdesenvolvimentos das nervuras principais,

78 levando a um intenso encrespamento do limbo foliar, resultando em numerosas bolhosidades,  
79 associadas à presença de mosqueado e distorção foliar (12, 15).

80 O diagnóstico da infecção viral em vegetais repousa sobre métodos biológicos,  
81 imunológicos e moleculares (17). Nos últimos 30 anos foram desenvolvidas técnicas para  
82 diagnósticos de patógenos de plantas como o uso de anticorpos monoclonais e ELISA, tornando  
83 possível que antígenos do patógeno sejam detectados *in vivo* e as tecnologias baseadas em  
84 DNA, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) a qual permite que regiões do genoma do  
85 patógeno sejam ampliadas, aumentando a sensibilidade da detecção do patógeno (11). No Brasil  
86 a técnica de Reação em Cadeia em Polimerase (PCR) vem sendo utilizada em fitovirose para a  
87 obtenção de clones genômicos, na produção de sondas moleculares específicas, na seleção  
88 inicial de plantas transgênicas e na diagnose de espécies virais (5). Devido a alta sensibilidade,  
89 especificidade e rapidez, a técnica de PCR vem auxiliando os pesquisadores de diversas áreas,  
90 destacando-se como uma importante ferramenta na detecção de vírus em plantas. Tem como  
91 grande vantagem a possibilidade de se utilizar pequenas quantidades de tecido, permitindo desta  
92 forma, a detecção do vírus em baixas concentrações e em amostras guardadas por longos  
93 períodos (8, 30). Bezerra et al. (4) já chamavam a atenção para a especificidade na detecção de  
94 vírus com a utilização da técnica de PCR.

95 Atualmente não existe um controle efetivo da doença, porém são usadas algumas  
96 medidas como controle sistemático dos vetores, plantio em época de baixa população dos  
97 mesmos, eliminação de plantas de cultivos anteriores e de hospedeiros naturais. Levando-se em  
98 consideração a ocorrência generalizada, severa e permanente em toda a região nordeste a  
99 melhor forma de controle a ser adotada é o emprego de cultivares comerciais altamente  
100 resistentes (26).

101 O estudo de resistência a vírus em feijão-caupi tem recebido grande atenção e obtido  
102 um grande progresso. Fontes de resistência ao CPSMV em germoplasma de caupi têm sido  
103 relatadas. Lima & Nelson (14) identificaram a cultivar Macaíbo como imune ao CPSMV, tendo

104 Rios & Neves (21) confirmado a imunidade desta cultivar e identificado uma nova fonte de  
105 resistência a este vírus, a linhagem FP 7733-2. Posteriormente esta linhagem deu origem à  
106 cultivar CNC- 0434 (22), que foi recomendada para o cultivo no estado do Maranhão (Embrapa  
107 1986). A cultivar CNC-0434 foi utilizada em vários cruzamentos, e destes cruzamentos foram  
108 obtidas algumas cultivares resistentes ao CPSMV, tais como: BR 10-Piauí (24), BR 12-  
109 Canindé (25), BR 14-Mulato (7) e BR 17-Gurguéia (10).

110 A resistência genética de plantas a fitopatógenos pode estar baseada no número de  
111 genes envolvidos ou na interação hospedeiro-patógeno. Com relação ao número de genes pode  
112 ser monogênica, quando a presença de um único gene é suficiente para conferir resistência, ou  
113 poligênica. Neste caso, a resistência é conferida por vários genes tendo como característica  
114 marcante a presença de uma variação contínua de graus de resistência, variando de elevada  
115 suscetibilidade até elevada resistência. No tocante a interação hospedeiro-patógeno, pode ser  
116 classificada como resistência horizontal ou raça não específica, sendo a resistência efetiva a  
117 todas as raças do patógeno. Apesar de não promover resistência completa, mantém a doenças  
118 em baixo níveis. Já a resistência vertical apresenta resistência a algumas raças do patógeno e  
119 não a outras, havendo uma interação diferencial entre raça do patógeno e cultivar do hospedeiro.  
120 A resistência vertical é passível de ser vencida dentro da capacidade microevolutiva do  
121 patógeno. (1).

122 Considerando que cultivares resistentes são desenvolvidas pela transferência de alelos  
123 de resistência, e devido à co-evolução entre hospedeiro e patógeno, culminando no surgimento  
124 de novas raças, as cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidas (2) e  
125 testadas para diferentes raças. Com o aparecimento de raças complementares do patógeno,  
126 ocorre um aumento na população do hospedeiro com conseqüente pressão de seleção da raça do  
127 patógeno capaz de afetar a planta (1).

128 O objetivo deste trabalho foi diagnosticar a presença de CPSMV em plantas com  
129 sintomas de mosaico coletadas em plantios de feijão-caupi, na região Nordeste, bem como

130 avaliar o comportamento de uma população F<sub>3</sub> desenvolvida para resistência frente a  
131 diferentes isolados de CPSMV.

## 132 **MATERIAL E MÉTODOS**

### 133 **Obtenção e manutenção dos isolados virais**

134 Plantas de feijão-caupi apresentando sintomas de mosaico e bolhosidade nas folhas  
135 foram identificadas em plantios da cultura nos estados de Pernambuco, municípios de Goiana  
136 (CPSMV-3 e CPSMV-4), Amaragi (CPSMV-5) e Recife (CPSMV-1), Paraíba no município de  
137 Conde (CPSMV-A3). A partir dessas plantas, coletaram-se folhas com sintomas de mosaico e  
138 deformação foliar. As folhas foram utilizadas para inoculação de plantas de feijão-caupi cv.  
139 Sempre Verde e/ou Pitiúba, via extrato vegetal tamponado contendo fosfato de potássio 0,05 M,  
140 pH 7.2, e sulfito de sódio a 0,1% (p/v), a frio. As plantas infectadas foram mantidas em casa de  
141 vegetação da Área de Fitotecnia, Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural  
142 de Pernambuco (UFRPE). O isolado CPSMV-1 foi cedido pelo laboratório de Fitovirologia da  
143 UFRPE.

### 144 **Diagnóstico viral através de RT-PCR**

145 O RNA total foi extraído de 1 mg de tecido vegetal fresco que apresentava sintomas de  
146 mosaico, típico de CPSMV. O tecido vegetal foi triturado em nitrogênio líquido conforme Root  
147 & Jelkman (23), modificado com a eliminação do mercaptoetanol.

148 Para a síntese da fita simples de cDNA foram utilizadas 8 µl de RNA total extraído  
149 previamente. A seguir foram adicionadas 1 µl da solução (10 µg/µl) do oligonucleotídeo  
150 “antisense” 5’-YTCRAAWCCVYTRTTKGGMCCACA-3’ (5), 1 µl da mistura de dNTPs (10  
151 mM de cada) e 2 µl de água destilada e esterilizada. As amostras foram aquecidas a 70°C por 5  
152 minutos, resfriadas no gelo, e a seguir foram adicionados os demais componentes da reação  
153 sendo, 4µL do tampão de transcrição reversa 5X (200 mM Tris – HCl, pH 8,4 , 500 mM KCl ),  
154 2 µl (0,1 M) de DTT. A mistura foi incubada a 37°C por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 1  
155 U da enzima transcriptase reverse do M-MLV (Invitrogen). As amostras foram colocadas para  
156 incubar a 37°C por 50 minutos e depois a 70°C por 15 minutos.

157 Para a RT-PCR, foram utilizados o oligonucleotídeo “antisense” 5'-  
158 YTCRAAWCCVYTRTTKGGMCCACA-3' e o oligonucleotídeo “senso” 5'-  
159 GCATGGTCCACWCAGGT-3' (6). Estes oligonucleotídeos correspondem às seqüências de  
160 aminoácidos conservados, AWSTQV, presente na subunidade L, e GPN\*GFE (\* = N ou R),  
161 presente na subunidade S do capsídeo dos *Comovirus*, codificadas pelo RNA2 (27).

162 As soluções de RT-PCR foram preparadas em um volume total de 24 µl, contendo 1 µl  
163 da mistura de dNTPs (10 mM cada), 1 µl de cada oligonucleotídeo (10 mM), 0,5 µl de *taq* DNA  
164 Polimerase (Invitrogen, 5U/ µl), 2,5 µl de tampão PCR 10x (200mM Tris-HCL, pH 8.4, 0,5M  
165 KCl), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µl do produto da síntese de cDNA e 15,5 µl de água destilada  
166 e esterilizada. Os ciclos da reação de PCR foram os seguintes: 94°C por 5 minutos, 41°C por 2  
167 minutos e 72°C por 3 minutos, 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 41°C por 2 minutos, 72°C por 3  
168 minutos e um ciclo final de 72°C por 7 minutos (5). Alíquotas de 6 µl dos produtos de PCR  
169 foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1.2% corados com SYBR gold  
170 (5X) e visualizados no transiluminador (UV).

### 171 **Avaliação da população F<sub>3</sub>**

172 Para checar se a população F<sub>3</sub> previamente considerada resistente quando inoculadas  
173 com o isolado CPSMV-1, manteria a resistência frente a teste com outros isolados, uma  
174 população F<sub>3</sub>, oriunda do cruzamento CNC-0434 x IPA-206, foi semeada em copos  
175 descartáveis de 300 mL contendo substrato vegetal. Antes do semeio, foi construído um bulk,  
176 misturando-se equitativamente sementes de todas as plantas F<sub>2</sub> que se mostraram resistentes  
177 ao isolado de CPSMV-1. Para cada um dos cinco isolados foram inoculadas trinta e sete  
178 plantas, perfazendo um total de 185 plantas, e os respectivos controles. A inoculação foi feita  
179 via extrato vegetal tamponado em fosfato de potássio 0,05 M, pH 7.2, contendo sulfato de  
180 sódio a 0,1% (p/v) 10 dias após a emergência, quando as plantas apresentavam 5 folíolos  
181 definitivos. Como controle duas plantas de cada cultivar foram inoculadas apenas com o  
182 tampão de inoculação. Além desse controle foram utilizadas as cultivares IPA 206 e Sempre  
183 Verde que serviram como padrão de suscetibilidade enquanto as cultivares CNC 0434 e BR-

184 14 Mulato serviram como padrão de resistência. As plantas foram reinoculadas três dias após  
185 a primeira inoculação para evitar escape, e foram mantidas em casa de vegetação. A avaliação  
186 foi realizada visualmente observando-se a indução de sintomas até 45 dias após a segunda  
187 inoculação.

## 188 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 189 **Caracterização dos isolados**

190 A caracterização dos isolados foi realizada com o objetivo de determinar se os vírus  
191 encontrados infectando plantas no campo se tratava do CPSMV. O par de oligonucleotídeo  
192 utilizado no diagnóstico foi eficiente na identificação do vírus, confirmando a identidade de  
193 todos os isolados coletados com o CPSMV. Foram observados padrões de ampliações de  
194 aproximadamente 593 bp (Inserir Figura 1). Este resultado corrobora com os encontrados por  
195 Brioso et al. (6) que utilizaram o mesmo par de oligonucleotídeo e foi obtido um fragmento  
196 de 593 pb para dois sorotipos do CPSMV proveniente de RNA foliar de feijão-caupi cv.  
197 Seridó infectado. Estes autores conseguiram ainda padrão de ampliações diferentes entre  
198 três espécies do gênero testadas, permitindo desta forma a identificação das mesmas. Este par  
199 de oligonucleotídeos também foi utilizado por Souto et al. (27) que através da análise  
200 molecular do segmento do RNA2 de CPSMV isolados de soja (*Glycine max* (L.) Merr.)  
201 obtiveram um tamanho de banda de 594 pb e por Lima et al. (13), com tamanhos de  
202 fragmentos para os isolados de CPSMV de 594 pb e 596 pb. Estes resultados sugerem uma  
203 alta especificidade da técnica no diagnóstico de vírus que afetam o feijão-caupi. As amostras  
204 serão purificadas e encaminhadas para seqüenciamento para a detecção da variabilidade  
205 genética, bem como para a obtenção de primers específicos para estirpes de CPSMV.

206 O resultado das inoculações mostrou que todas as plantas de feijão-caupi cv. Sempre  
207 Verde e Pitiúba, padrões de suscetibilidade apresentaram sintomas característicos de mosaico  
208 severo como bolhosidade e distorção foliar, geralmente 15 dias após a inoculação com todos  
209 os isolados. Estes resultados estão de acordo com Vale & Lima (29) que estudaram a herança  
210 da imunidade em dois cultivares de *Vigna Unguiculata* (Macaibo e Pitiúba) ao vírus do

211 CPSMV. Não foi observada infecção pelo CPSMV no cultivar Macaibo, entretanto, o cultivar  
212 Pitiúba desenvolveu sintomas de mosaico severo, distorção foliar e redução do  
213 desenvolvimento, indicando ser a cultivar Pitiúba suscetível ao CPSMV.

214 As técnicas moleculares vêm se tornando altamente desejáveis para a detecção de  
215 vírus associados a plantas, devido sua maior especificidade e sensibilidade em relação aos  
216 métodos sorológicos. E sabe-se que essa especificidade, certamente contribuirá para o  
217 aprimoramento do estudo de vírus em feijão-caupi, permitindo uma detecção rápida e precisa  
218 de um determinado vírus, bem como de uma estirpe específica. O diagnóstico de CPSMV tem  
219 se baseado principalmente na dupla difusão em ágar, no entanto devido a baixa especificidade  
220 este vem sendo substituído por diagnóstico molecular.

### 221 **Avaliação da progênie F<sub>3</sub>**

222 Das plantas inoculadas com os isolados coletados, somente duas de uma população de  
223 185 plantas apresentaram sintomas de CPSMV, sendo uma planta pertencente ao grupo  
224 inoculado com o isolado CPSMV-1 e uma ao grupo inoculado com o CPSMV-3, sintomas estes  
225 caracterizados por um mosaico suave. O aparecimento de plantas com sintomas pode ser devido  
226 neste caso, a um escape durante a inoculação do vírus na população F<sub>2</sub>, fazendo com que uma  
227 planta suscetível fosse classificada como resistente quando na realidade o que ocorreu foi a não  
228 penetração do vírus no tecido hospedeiro (12). Entretanto, os sintomas não expressos podem ser  
229 detectados em teste em F<sub>3</sub> de acordo com Umaharan et al. (28), que em estudo de resistência ao  
230 CPSMV em feijão-caupi constatou que plantas obtidas de sementes F<sub>3</sub> mostraram-se  
231 uniformemente resistentes indicando que as plantas resistentes obtidas ao final do período de  
232 seleção foram homozigotas para resistência. A descoberta de um marcador molecular associado  
233 ao alelo de resistência permitiria uma redução do tempo necessário para a seleção, facilitando a  
234 introgressão de genes de resistência em cultivares com características agronômicas.

235 Genes dominantes geralmente codificam fatores envolvidos no reconhecimento do vírus  
236 e ativação de vias que conduzem à reação de hipersensibilidade. No entanto a natureza  
237 recessiva da herança da resistência, como é o caso da resistência ao CPSMV, é consequência da

238 ausência de algum fator essencial para o vírus se replicar ou se movimentar no hospedeiro (9).  
239 Este fato está de acordo com os resultados obtidos onde as plantas resistentes não apresentaram  
240 sintomas.

241 A situação mais favorável para se marcar um alelo é quando a herança do caráter é  
242 monogênica. Existem vários genes independentes de resistência, onde um ou mais alelos  
243 conferem resistências a várias raças. No entanto ocorre o problema da durabilidade de uma  
244 cultivar resistente, quando portadora de apenas um alelo de resistência, pelo fato da maioria  
245 conferir resistência completa, e conseqüentemente, exercer uma grande pressão de seleção na  
246 população do patógeno e favorecer a seleção da nova raça que o vença. Uma alternativa para  
247 aumentar a vida útil dos alelos verticais de resistência de genes diferentes é a piramidação de  
248 genes (18).

#### 249 **AGRADECIMENTOS**

250 Agradecimentos ao CNPq e a FACEPE pelo apoio financeiro.

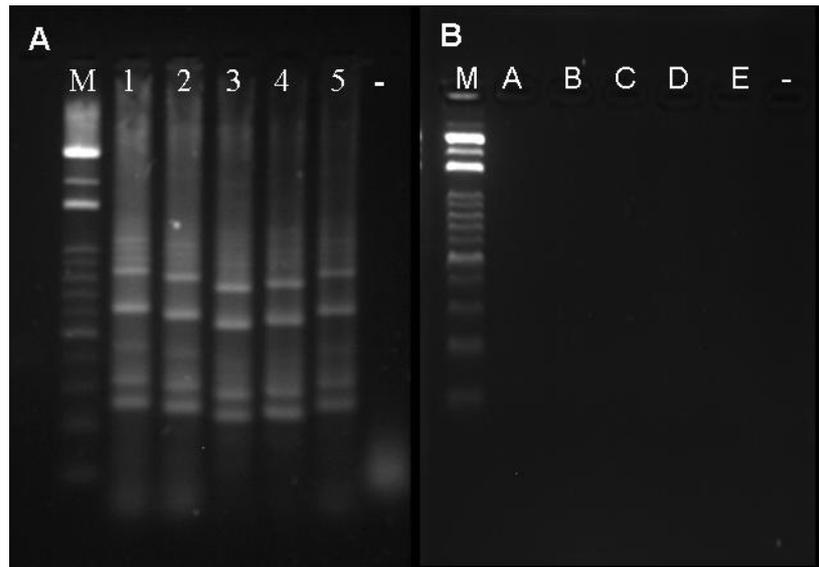
#### 251 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 252 1. Agrios, G.N. **Plant pathology**. Academic Press, London, 2004. 922p.
- 253 2. Alzate-Marin, A. L.; Cervigni, G.D.L.; Moreira, M.A.; Barros, E.G. Seleção assistida por  
254 marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com  
255 ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 333-242, 2005.
- 256 3. Assunção, I. P.; Filho, L. R. M.; Resende, L. V.; Barros, M. C. S.; Lima, G. S. A.; Coelho,  
257 H. S. B.; Lima, J. A. A. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe*  
258 *mosaic virus* em caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 274-278, 2005.
- 259 4. Bezerra, I.C.; Rezende, R.O.; Pozzer, L. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the  
260 identification of two new *Tospovirus* species, one from chrysanthemum and one from  
261 zucchini. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 823-830, 1999.
- 262 5. Brioso, P.S.T. Amplificação de fragmentos genômicos específicos, através de “RT-PCR”,  
263 diretamente de preparação viral. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 80-84,  
264 1999.

- 265 6. Brioso, P.S.T.; Santiago, L.J.M.; Anjos, J.R.N.; Oliveira, D.E. Identificação de espécies do  
266 gênero *Comovirus* através de “polymerase chain reaction”. **Fitopatologia Brasileira**,  
267 Brasília, v. 21, p. 219-225, 1996.
- 268 7. Cardoso, M.J.; Freire Filho, F.R.; Athayde Sobrinho, C. BR 14-mulato: nova cultivar de  
269 feijão macáçar para o estado do Piauí. Teresina: **Embrapa-UEPAE de Teresina**, 1990. 4p.  
270 (Embrapa-UEPAE de Teresina. Comunicado técnico, 48).
- 271 8. Colinet, D.; Kummert, J.; Lepoivre, P. Identification of distinct potyviruses in mildly  
272 infected sweet potato by the polymerase chain reaction with degenerate primers.  
273 **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p. 65-69, 1994.
- 274 9. Ellis, J.; Dodds, P.; Pryor, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance  
275 genes. **Current Opinion in Plant biology**, v.3, p. 278-284, 2000.
- 276 10. Freire Filho, F.R.; Santos, A.A.; Araújo, A.G.; Cardoso, M. J.; Silva, P.H.S.; Ribeiro, V.Q.  
277 BR 17 gurguéia: nova cultivar de caupi com resistência a vírus para o Piauí. **Teresina:**  
278 **Embrapa-CPAMN**, 1994. 6p. (Embrapa-CPAMN. Comunicado técnico, 61).
- 279 11. Fulton C. Molecular methods for the detection of plant pathogens. **Dept. Plant Science**,  
280 UCC. Fems microbiology letters. p. 307-312. 1997.
- 281 12. Hull, R. **Matthew’s plant virology**. 4<sup>a</sup> ed. Londres, Inglaterra: Academic Press. 2002.
- 282 13. Lima, J.A.A.; Nascimento, A.K.; Silva, G.S. Camargo, R.F.E.A.; Gonçalves, M.F.B.  
283 *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi.  
284 **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n. 4, p. 429-433, 2005b.
- 285 14. Lima, J.A.A.; Nelson, M.R. Etiology and epidemiology of mosaic of cowpea in Ceará.  
286 **Plant disease**, St. Paul. v. 63, p. 864-867, 1977.
- 287 15. Lima, J.A.A.; Sittolin, I.M.; Lima, R.C.A. Diagnose e estratégias de controle de doenças  
288 ocasionadas por vírus. In: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Silva, P.H.S; Ribeiro, V.Q.  
289 (Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica. p.404-459.  
290 2005a.

- 291 16. Lima, J.A.A; Nelson, M.R. Purificação e identificação sorológica de “Cowpea mosaico  
292 vírus” em *Vigna sinensis* Endl., no Ceará. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 3, n. 1-2, p.  
293 5-8, 1974.
- 294 17. Marinho, V. Técnicas imunológicas e moleculares do diagnóstico de vírus de plantas.  
295 **RAPP**, v.9. p. 383-402. 2001.
- 296 18. Michelmore, R. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. **Annual**  
297 **Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 33, p. 393-427, 1995.
- 298 19. Oliveira, M. A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar  
299 (*Vigna spp.*). **Instituto Agronômico do Sul**. (Pelotas). Boletim técnico v. 1, p. 1-36, 1947.
- 300 20. Pio-Ribeiro, G.; Assis Filho, M. F.; Andrade, G. P. Doenças do caupi. In: Kimati, H. (Ed.).  
301 **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. 4ª ed. São Paulo: Agronômica  
302 Ceres, v.3, 2005. p. 215-216.
- 303 21. Rios, G.P.; Neves, B.P. Resistência das linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*  
304 (L) Walp.) ao vírus do mosaico severo (VMSC). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n.  
305 2, p. 175-184, 1982.
- 306 22. Rios, G.P; Watt, E.E.; Araújo, J.P.P.; Neves, B.P. Cultivar CNC-0434 imune ao mosaico  
307 severo do caupi. In: Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, 1, 1982. Goiânia. **Resumos...**  
308 Goiânia: Embrapa-CNPAF, p. 113-115, 1982.
- 309 23. Root, M. E.; Jelkman, W. Characterization and detection of several filamentous viruses of  
310 cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an  
311 RNA extraction protocol. **European journal of plant pathology**, v. 107, p. 411-420, 2001.
- 312 24. Santos, A.A.; Freire Filho, F.R.; Cardoso, M.J. “BR 10-Piauí”, cultivar de feijão macáçar  
313 (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**,  
314 Brasília, v. 12, n. 4, p. 400-402, 1987.
- 315 25. Santos, A.A.; Freire Filho, F.R.; Cardoso, M.J.; Frota, A.B. Nova cultivar de feijão macáçar  
316 (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.  
317 15, n. 1, p. 84-86, 1990.

- 318 26. Simon, M. V. Uso de marcadores moleculares em *Phaseolus vulgaris*. 2002. Dissertação  
319 (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- 320 27. Souto, E.S.; Almeida, A.M.R.; Bianchini, A.; Sartori, F.; Calvo, E.S. Análise molecular de  
321 segmento do RNA2 de *Comovirus* isolados de soja no estado do Paraná. **Fitopatologia**  
322 **Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 525-527, 2002.
- 323 28. Umaharan, P., Ariyanayagan, R.P. & Haque, S.Q. Resistance to *cowpea severe mosaic*  
324 *virus*, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp.  
325 **Euphytica**, v.95, p. 49-55, 1996.
- 326 29. Vale, C.C; Lima, J.A.A. Herança da imunidade da cultivar macaibo de *Vigna unguiculata*  
327 ao vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 30-  
328 32, 1995.
- 329 30. Zerbini, F.M.; Ambrozevícius, L.P.; Nagata, A.K.I. Diagnose molecular de fitoviroses. In:  
330 Almeida, A.M.R.; Lima, J.A.A. **Princípios e Técnicas de Diagnose aplicados em**  
331 **Fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja / Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia,  
332 2001. p. 95-124.
- 333
- 334
- 335
- 336
- 337
- 338
- 339
- 340
- 341
- 342
- 343
- 344



345  
 346 **Figura 1.** A) Produtos da amplificação via RT-PCR, a partir de isolados de CPSMV coletados  
 347 em campo: 1. CPSMV-4; 2. CPSMV-1; 3. CPSMV-3; 4. CPSMV-A3; 5. CPSMV-5; -. Controle  
 348 negativo. B) Plantas F<sub>3</sub> resistentes inoculadas com isolados coletados: A. CPSMV-1; B.  
 349 CPSMV-3; C. CPSMV-4; D. CPSMV-5; E. CPSMV-A3; -. Controle negativo; M- marcador de  
 350 peso molecular.

351

## **Capítulo IV**

---

# **CONCLUSÕES GERAIS**

## CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Na avaliação fenotípica da população  $F_2$  foi observado uma segregação 3:1, indicando uma herança monogênica recessiva;
- Marcador SSR VM70 apresentou-se fortemente ligado ao gene de resistência, constituindo-se no primeiro passo para a clonagem do gene de resistência ao CPSMV;
- A técnica de RT-PCR permite um diagnóstico rápido e preciso de CPSMV em feijão-caupi;
- A progênie  $F_3$  apresentou-se resistente ao CPSMV frente a diferentes isolados coletados.