

# Resistência de cultivares de feijoeiro ao vírus do mosaico comum necrótico

Aloísio Sartorato<sup>1</sup>, Josias Correa de Faria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Arroz e Feijão, CP 179, CEP 75375-000, Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: sartorat@cnpaf.embrapa.br.

Data de chegada: 07/07/2003. Aceito para publicação em: 01/12/2003.

Autor(a) para correspondência: Aloísio Sartorato.

. 0978

## RESUMO

Sartorato, A.; Faria, J.C. de. Resistência de cultivares de feijoeiro ao vírus do mosaico comum necrótico. *Summa Phytopathologica*, v.30, p.394-397, 2004.

Foram avaliadas, por suas reações ao vírus do mosaico comum necrótico (*Bean common mosaic necrotic virus*-BCMNV), 92 genótipos de feijoeiro comum utilizando-se das técnicas de inoculação direta de plântulas e de marcador molecular. Deste total, 71 genótipos (77,2%) apresentaram o sintoma de necrose sistêmica (NS/I), 19 (20,6%) apresentaram sintomas de mosaico (Mo/ii) e dois genótipos (2,2%), que não eram linhas puras, apresentaram plantas com sintomas de mosaico e necrose sistêmica (NS/I e Mo/ii). Entre as 76 cultivares recomendadas para plantio, 64 (84,2%) apresentaram necrose, duas (2,6%) apresentaram sintomas de necrose sistêmica e mosaico e dez (13,2%) mostraram reação de

mosaico. As cultivares Aporé, Barriga Verde, Guateian 6662, IAPAR 14, Ipanema, Milionário 1732 e Porto Real apresentaram os sintomas de necrose sistêmica sem, contudo, apresentarem no gel de agarose, a banda ligada ao gene de resistência. No presente estudo foi observado que a maioria dos genótipos recomendados pelo antigo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) possui o alelo *I* que confere ampla resistência ao *Bean Common Mosaic Virus*-BCMNV e que, a presença deste alelo, pode ser avaliada através da técnica de SCAR usando o primer SW13. Observou-se, também, que nenhum genótipo suscetível ao BCMNV apresentou a referida banda.

Palavras-chave adicionais: *Phaseolus vulgaris*, método de inoculação, sequence characterized amplified region, SCAR, *bean common mosaic necrotic virus*, BCMNV.

## ABSTRACT

Sartorato, A.; Faria, J.C. de. Common bean resistance to *Bean common mosaic necrotic virus*. *Summa Phytopathologica*, v.30, p.394-397, 2004.

A total of 92 bean genotypes were tested for their reaction to the *Bean common mosaic necrotic virus* using the direct inoculation and molecular marker methods. Out of this total, 71 genotypes (77,2%) showed systemic necrosis symptoms (NS/I), 19 (20,6%) presented only mosaic symptoms (Mo/ii) and two non-pure-bred genotypes (2,2%) had plants exhibiting both systemic necrosis and mosaic symptoms (NS/I and Mo/ii). Among the 76 cultivars released for planting, 64 (84,2%) displayed systemic necrosis, two (2,6%) showed systemic necrosis and mosaic symptoms and ten (13,2%) had mosaic.

The cultivars Aporé, Barriga Verde, Guateian 6662, IAPAR 14, Ipanema, Milionário 1732 and Porto Real, showed systemic necrosis symptoms without showing the respective band in the agarose gel. It was observed that the great majority of the released cultivars had the *I* allele that confer broad spectrum resistance to *Bean Common Mosaic Virus*-BCMNV and that the presence of this allele can be evaluated through the SCAR technique using the primer SW13. It was also observed that none of the susceptible genotypes showed the presence of the SW13 band.

Additional keywords: *Phaseolus vulgaris*, inoculation method, sequence characterized amplified region, SCAR, *bean common mosaic necrotic virus*, BCMNV.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é suscetível a inúmeras doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Entre as principais doenças viróticas encontram-se as incitadas pelos vírus do mosaico comum (*Bean common mosaic virus*-BCMNV) e do mosaico comum necrótico do feijoeiro (*Bean common necrotic mosaic virus*-BCMNV). O BCMNV, até o momento, não foi identificado no Brasil (5). Os agentes causais destas enfermidades são altamente transmissíveis pelas sementes (2, 4). Este fato, aliado

à suscetibilidade do feijoeiro ao BCMNV, foi responsável por perdas de até 98% na produção desta leguminosa (6). A forma mais efetiva (9) e econômica de se controlar estas enfermidades é através do uso, pelos produtores, de cultivares geneticamente resistentes. Segundo Melotto et al. (10), as cultivares de feijoeiro que possuem o gene dominante *I*, que resulta em necrose ao ser inoculado com o BCMNV, são resistentes a todas as estirpes do BCMNV conhecidas. Mais recentemente, o desenvolvimento de novas cultivares re-

sistentes às doenças pelos programas de melhoramento, têm diminuído consideravelmente as perdas por elas ocasionadas.

O objetivo do presente estudo foi avaliar genótipos recomendados pela pesquisa além de algumas linhagens que apresentam resistência a outras doenças do feijoeiro comum, tanto pelo método da inoculação direta como pelo uso de marcador molecular baseado em SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).

Para determinar a presença do gene *I* através da inoculação direta das plântulas, foi utilizada a estirpe NL-3 do BCMNV (12) e a metodologia descrita por Faria et al. (5). Foram realizadas duas avaliações: a primeira quatro a seis dias, e a segunda 15 dias após a inoculação, observando-se a presença de necrose ou mosaico nas plantas inoculadas. Quando não foi observado sintoma tanto em alguns genótipos como em plantas individuais, procedeu-se a re-inoculação das mesmas. Os genótipos que permaneceram sem sintomas ou com sintomas duvidosos, foram testados para a presença de vírus utilizando uma cultivar indicadora, que responde com necrose à presença do vírus.

No estudo da determinação da presença deste gene utilizando a técnica de marcadores moleculares, os genótipos foram plantados em vasos com 2,0 kg de solo, utilizando-se três sementes por vaso. Aproximadamente 15 dias após o plantio, foi realizada a coleta de folhas de feijoeiro, de uma única planta, para a extração do DNA pelo método desenvolvido por Doyle & Doyle (3). A reação de amplificação foi realizada segundo Melotto et al. (10) utilizando o primer SCAR W13 (SW13) desenvolvido a partir do marcador RAPD OPW13, identificado por Haley et al. (7). Cada ciclo de amplificação consistiu de uma etapa de desnaturação do DNA a 94°C por 10 segundos, seguido por uma etapa de anelamento dos primers a 67°C por 40 segundos e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Após 34 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos (10). O produto da amplificação foi separado em gel de agarose 1,4%, contendo 10 mg de brometo de etídio/mL de gel. As bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografada com o foto sistema Eagle Eye II (Stratagene Inc., La Jolla, CA).

Foram avaliadas, por suas reações ao vírus do mosaico comum necrótico, 92 genótipos de feijoeiro comum. Deste total, 71 genótipos (77,2%) apresentaram o sintoma de necrose sistêmica (NS/I), indicando a presença do gene dominante *I*, dois genótipos (2,2%) apresentaram plantas com sintomas de mosaico e necrose sistêmica (NS/I e Mo/ii), indicando que, ou não eram linhas puras para o caráter analisado ou apresentavam segregação e 19 genótipos (20,6%) apresentaram sintoma de mosaico (Mo/ii) (Tabela 1).

Entre as 76 cultivares recomendadas para plantio, 64 (84,2%) apresentaram reação de necrose ao vírus do mosaico comum necrótico do feijoeiro, apresentando sintomas de necrose sistêmica; duas (2,6%) apresentaram sintomas de necrose sistêmica e mosaico e, dez (13,2%) mostraram mosaico (Tabela 1). Estes resultados encontram-se em conformidade com os obtidos por Faria et al. (5) que encontraram um total de 84% de cultivares que apresentaram o gene *I* em sua constituição. Como até o momento não foi constatada a presença do BCMNV no Brasil (5), a simples introdução do gene *I* nas novas cultivares de feijoeiro comum pelos diferentes programas de melhoramento, continuará a proteger estas novas cultivares da doença.

**Tabela 1.** Reação de cultivares/linhagens de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) ao vírus do mosaico comum necrótico.

Genótipo	Reação	Banda	Genótipo	Reação	Banda
97200203	NS/I	P <sup>2</sup>	Ipanema	NS/I	A
97200213	NS/I	P	Iraí	Mo/ii	A
97200311	NS/I	P	Jalo EEP 558	Mo/ii	A
AND 0277	Mo/ii <sup>4</sup>	A <sup>3</sup>	Jalo Precoce	Mo/ii	A
Aporé	NS/I	A	Macanudo	NS/I	P
Bagajó	Mo/ii	A	Macotaço	NS/I	P
Bambui	NS/I	P	Meia Noite	NS/I	P
Barriga Verde	NS/I	A	Milagre	NS/I	P
			Santo Antônio		
BAT 332	NS/I	P	Milionário 1732	NS/I	A
Carioca	NS/I	P	Mineiro Precoce	Mo/ii	A
Carioca 80	NS/I	P	Minuano	NS/I	P
Carioca MG	NS/I	P	Mulatinho	Mo/ii	A
			Vagem Roxa		
Cornell 49-242	NS/I	P	Novo Jalo	Mo/ii	A
Corrente	NS/I	P	Onix	NS/I	P
Diamante Negro	NS/I	P	Ouro Branco	NS/I	P
Empasc 201-	NS/I	P	Ouro Negro	NS/I	P
Chapecó			e Mo/ii <sup>6</sup>		
EPABA 1	NS/I	P	Pérola	NS/I	P
Favinha	Mo/ii	A	Porto Real	NS/I	A
FT 120	NS/I	P	Princesa	NS/I	P
FT 206	NS/I	P	Rico 1735	NS/I	P
FT Bonito	NS/I	P	Rio Doce	NS/I	P
FT Nobre	NS/I	P	Rio Tibagi	NS/I	P
FT Tarumã	NS/I	P	Rosado	Mo/ii	A
Goytacazes	NS/I	P	Rosinha G-2	Mo/ii	A
Guapo Brillhante	NS/I	P	Rudá	NS/I	P
Guatelian 6662	NS/I	A	Safira	NS/I	P
IAC Bico de Ouro	NS/I	P	São José	NS/I	P
IAC Carioca	NS/I	P	Serrano	NS/I	P
80 (SH)					
IAC Carioca	NS/I	P	Varre-Sai	NS/I	P
Akytã					
IAC Carioca Aruã	NS/I	P	Vermelho 2157	NS/I	P
IAC Carioca Pyatã	NS/I	P	Xamego	NS/I	P
IAC Una	NS/I	P	Xodó	NS/I	P
IAPAR 8 Rio Negro	NS/I	P	Michelite	Mo/ii	A
IAPAR 14	NS/I	A	Michigan	Mo/ii	A
			D R Kidney		
IAPAR 20	NS/I	P	Perry Marrow	Mo/ii	A
IAPAR 31	NS/I	P	Widusa	NS/I	P
IAPAR 44	NS/I	P	Kaboon	Mo/ii	A
IAPAR 57	NS/I	P	PI 207262	Mo/ii	A
IAPAR 65	NS/I	P	TO	NS/I	P
IAPAR 72	NS/I	P	TU	Mo/ii	A
IAPAR 80	NS/I	P	AB 136	Mo/ii	A
IPA 1	NS/I	P	G 2333	Mo/ii	A
IPA 6	NS/I	P	<sup>1</sup> NS/I - reação de necrose sistêmica/		
IPA 7	NS/I e	P	presença do alelo dominante <i>I</i> ; <sup>2</sup> P -		
	Mo/ii <sup>5</sup>		presença de banda; <sup>3</sup> Mo/ii - reação		
IPA 8	NS/I	P	de mosaico/ausência de gene de resis-		
IPA 9	NS/I	P	tência à estirpe NL-3; <sup>4</sup> A - ausência de		
IPA 10	NS/I	P	banda; <sup>5</sup> Cultivar composta pela mis-		
IPA 11 - Brigida	NS/I	P	tura de duas linhagens; <sup>6</sup> Cultivar com		
IPA 7419	NS/I	P	mistura para esta característica.		

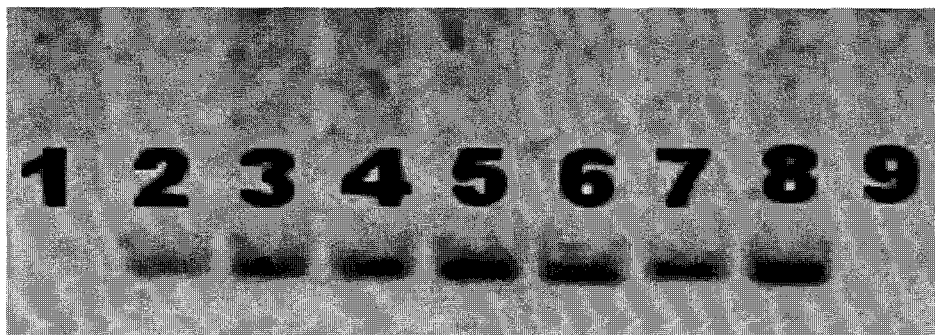
Dentre os genótipos pertencentes às diferenciadoras de *Colletotrichum lindemuthianum*, apenas Widusa e TO apresentaram reação de necrose sistêmica, com ambas possuindo o alelo *I* e a banda polimórfica para o marcador SW13. Os resultados obtidos no presente estudo com as cultivares Michelite, Michigan Dark Red Kidney, Perry Marrow, Widusa e Kaboon foram exatamente os mesmos obtidos por Melotto et al. (10).

A utilização de marcadores RAPD para monitorar genes de resistência tem sido questionada devido a problemas de reprodutibilidade de resultados entre laboratórios (8, 13). Segundo Penner et al. (13) esta reprodutibilidade é afetada por dois fatores: (i) tamanho do fragmento de DNA amplificado e (ii) diferentes temperaturas, principalmente a de anelamento, dentro do tubo de amplificação. Por outro lado, os marcadores do tipo SCAR apresentam uma alternativa para aumentar esta reprodutibilidade (1).

A presença do gene de resistência *I* nos genótipos testados através do uso do marcador SW13, pode ser observada no gel de agarose pela presença de uma banda polimórfica simples de 690 pb. Entretanto, os genótipos Guateian 6662 e IAPAR 14 (Figura 1), Aporé, Barriga Verde, Ipanema, Milionário 1732 e Porto Real, apresentaram os sintomas de necrose sistêmica e,

por conseguinte, a presença do mencionado gene, sem contudo apresentarem a referida banda. Segundo Melotto et al. (10) a ligação entre o gene de resistência *I* e o marcador SW13 foi testada em três diferentes populações tendo sido obtida uma frequência de recombinação que variou de 0,8 a 2,2 cM. Este fato indica que, embora a banda marcada esteja muito próxima não se encontra totalmente ligada ao gene *I* de resistência, sendo possível alguma recombinação entre os mesmos. Isto pode significar que durante o processo de desenvolvimento de uma cultivar, utilizando-se de marcador molecular, genótipos que apresentam o gene de resistência podem ser descartados, incluindo aqueles com boas características agrônômicas. Conforme foi apontado por Miklas et al. (11), a aplicação deste tipo de marcador molecular deve ser limitada a populações geradas com pais para os quais os fragmentos esperados estejam presentes ou ausentes, dependendo do caso.

Em conclusão, observou-se que a maioria absoluta dos genótipos recomendados pela pesquisa possui o alelo *I* que confere ampla resistência ao BCMV, e que a presença deste alelo pode ser avaliada através da técnica de SCAR usando o primer SW13. Observou-se, também, que nenhum genótipo suscetível ao BCMNV apresentou a referida banda.



**Figura 1.** Análise eletroforética da amplificação dos produtos obtidos com o primer SW13 (banda de 690 pb, aproximadamente). Coluna 1, cultivar (cv) Guateian 6662; coluna 2, cv IAC Bico de Ouro; coluna 3, cv IAC Carioca 80 SH; Coluna 4, cv IAC Carioca Akitã; coluna 5, cv IAC Carioca Aruã; coluna 6, cv IAC Carioca Piatã; Coluna 7, cv IAC Una; coluna 8, cv Rio Negro; coluna 9, cv IAPAR 14. Observa-se que as cultivares 1 e 9, embora tenham apresentado necrose sistêmica, não apresentaram a banda correspondente ao gene de resistência.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam-Blondon, A.F.; Sévignac, M.; Bannerot, H.; Dron, M. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, Berlim, v.88, n.6/7, p.865-870, 1994.
- Costa, A.S. Investigações sobre moléstias do feijoeiro no Brasil. In: Simpósio Brasileiro de Feijão, 1., 1971, Campinas. **Anais... Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 1972. v.2, p.303-384.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- Faria, J.C. Identification of common bean germ plasm with low bean common mosaic virus seed transmissibility. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n.7, p.818, 1984.
- Faria, J.C.; Del Peloso, M.J.; Carneiro, G.E.S. Resistência de cultivares de feijoeiro ao vírus do mosaico comum necrótico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, n.2, p.197-199, 2000.
- Gálvez, G.E.; Cardeñas, M.R. Pérdidas económicas causadas por el virus del mosaico común (BCMV) en cuatro variedades de frijol. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, St. Paul, v.1, p.121-122, 1974.
- Haley, S.D.; Afanador, L.; Kelly, J.D. Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the *I* gene (Potyvirus resistance) in common bean. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, n.2, p.157-160, 1994.
- Kelly, J.D. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. **HortScience**, Alexandria, v.30, n.3, p.461-465, 1995.
- Kelly, J.D.; Afanador, L.; Haley, S.D. Pyramiding genes for resistance to bean common mosaic virus. **Euphytica**, Dordrecht, v.82, n.3, p.207-212, 1995.
- Melotto, M.; Afanador, L.; Kelly, J.D. Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. **Genome**, Ottawa, v.39, p.1216-1219, 1996.

11. Miklas, P.N.; Afanador, L.; Kelly, J.D. Recombination-facilitated RAPD marker-assisted selection for disease resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v.36, n.1, p.86-90, 1996.
12. Ogliari, J.B.; Castaño, M. Identification of resistant germplasm to the bean common mosaic virus-BCMV. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.7, p.1043-1047, 1992.
13. Penner, G.A.; Bush, A.; Wise, R.; Kim, W.; Domier, L.; Kasha, K.; Laroche, A.; Scoles, G.; Molnar, S.J.; Fedak, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. **PCR Methods and Applications**, New York, v.2, n.2, p.341-345, 1993.