

GLORIA PATRICIA CASTILLO URQUIZA

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO *Bean rugose mosaic virus* (BRMV)

**Tese apresentada à
Universidade Federal de
Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fitopatologia,
para obtenção do título de
“Magister Scientiae”**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

GLORIA PATRICIA CASTILLO URQUIZA

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO *Bean rugose mosaic virus* (BRMV)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2004.

Prof. Acelino Couto Alfenas

Prof. Rosângela D' Arc de Lima Oliveira

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Conselheiro)

Dra. Cleide Maria Ferreira Pinto
(Conselheira)

Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, apoio incondicional, incentivo, pela compreensão e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos, como estudante estrangeiro PEC/PG.

Ao meu orientador, Prof. Francisco Murilo Zerbini Jr., pela oportunidade, orientação, pelos ensinamentos e pela receptividade durante todo o curso.

Ao professor Murilo Geraldo de Carvalho pela valiosa ajuda e atenciosa colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À pesquisadora Cleide Maria Ferreira Pinto pela valiosa colaboração e orientação.

Às minhas amigas colombianas, pelos bons momentos e a amizade que me ajudaram na minha estadia em Viçosa.

Aos meus amigos Cláudia, Eduardo 'Du', Irma, Mayra, Ximena e Luis, pela amizade, carinho e ajuda sempre.

Aos amigos da turma de mestrado pela ajuda, paciência e amizade durante este tempo.

Aos amigos de laboratório: Ana Verônica, Ana Raquel, Tutu, Adriana, Renata, Dani, Poliane, Alison, Silvana, Carlos, Sávio e Plínio, pelo apoio, pelas sugestões e pela valiosa ajuda.

Aos funcionários do DFP que sempre foram atenciosos comigo, principalmente Fizinho e Joaquim, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram nesta etapa e cujo apoio foi muito válido. Sincera gratidão.

BIOGRAFIA

Gloria Patricia Castillo Urquiza, filha de Juan de la Cruz Castillo e Gloria Amparo de Castillo, nasceu em 2 de maio de 1975 em Bogotá (Cundinamarca), Colômbia.

Em 1993 iniciou o curso de Agronomia na Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colômbia, vindo a graduar-se em julho de 1999.

Em maio de 2002 ingressou no curso de Mestrado em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), defendendo tese em fevereiro de 2004.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
LITERATURA CITADA	10
Caracterização de um isolado do <i>Bean rugose mosaic virus</i> (BRMV).....	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
Origem e manutenção do isolado viral	18
Purificação do vírus	18
Qualidade e rendimento do vírus purificado.....	19
Produção de anti-soro	19
Absorção do anti-soro com proteína total de feijoeiro.....	20
Análise do anti-soro	20
Gama de hospedeiros	20
Transmissão por besouros.....	21
Interação entre BRMV e BCMV	21
RESULTADOS	22
Purificação do vírus	22

Produção, avaliação e tratamento dos anti-soros ao BRMV	22
Gama de hospedeiros	23
Transmissão por besouros	23
Estudo de interação entre BRMV e BCMV	23
DISCUSSÃO	24
LITERATURA CITADA	27

RESUMO

CASTILLO-URQUIZA, Gloria Patricia, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2003. **Caracterização de um isolado do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).** Orientador: Francisco Murilo Zerbini Junior. Conselheiros: Murilo Geraldo de Carvalho e Cleide Maria Ferreira Pinto.

Plantas de feijão-vagem do cultivar Novirex apresentando sintomas de mosaico e enrolamento de vagens, sem deformação foliar evidente, foram coletadas em 2002 no município de Cordisburgo, MG. Estudos anteriores de microscopia eletrônica, eletroforese da proteína e do RNA viral e sorologia identificaram o isolado como o comovírus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). Neste trabalho deu-se prosseguimento à caracterização do isolado, por meio de análises em laboratório e casa de vegetação envolvendo produção e avaliação de anti-soro policlonal, determinação da gama de hospedeiros, estudo da transmissão do vírus por besouros crisomelídeos e avaliação de perdas em feijoeiro como resultado de infecção isolada ou em conjunto com o potyvírus *Bean common mosaic virus* (BCMV). O procedimento adotado para purificação possibilitou a obtenção de vírus purificado em rendimento satisfatório para a obtenção de anti-soro. A titulação dos anti-soros obtidos foi realizada por ELISA indireto, obtendo-se reações positivas com a diluição máxima testada (1:70.000), e nenhuma reação com extrato de planta sadia. Das 22 espécies vegetais testadas, *Chenopodium quinoa* apresentou inicialmente lesões locais cloróticas e posteriormente infecção sistêmica com mosaico e distorção foliar. Nos cultivares de feijão e soja observou-se sintomas de mosaico e bolhosidade, em conformidade com os resultados esperados para o BRMV. O isolado de BRMV foi transmitido pelo besouro crisomelídeo *Cerotoma arcuata* a uma taxa de 33,3%. Este isolado foi inoculado em plantas de feijoeiro ‘Ouro Negro’ e de feijão-vagem ‘Novirex’, levando a uma redução do peso de vagens por planta de 44,6% e 65,7%,

respectivamente. O *Bean common mosaic virus* (BCMV) ocasionou porcentagens de redução de peso de vagens menores em ‘Novirex’ (13,1%) em comparação a ‘Ouro Negro’ (50,4%). Quando o BRMV foi inoculado inicialmente, seguido do BCMV, verificou-se redução do peso de vagens por planta de até 69,3% para ‘Novirex’ e de 91,5% para ‘Ouro Negro’. Não se observou diferença significativa em peso ou número de vagens por planta quando estas foram inoculadas seqüencialmente com o BCMV seguido do BRMV.

ABSTRACT

CASTILLO-URQUIZA, Gloria Patricia Castillo, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2003. **Characterization of an isolate of *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).** Advisor: Francisco Murilo Zerbini Junior. Committee Members: Murilo Geraldo de Carvalho and Cleide Maria Ferreira Pinto.

Bean plants of the cultivar Novirex, showing an atypical pod curling symptom without mosaic or leaf distortion, were collected in 2002 at Cordisburgo, MG. Previous studies involving electron microscopy and electrophoretic analysis of viral protein and RNA identified the isolate as the comovirus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). The present work continued the characterization of the isolate, and included its purification and production of a polyclonal antiserum, determination of a partial host range, vector transmission studies, and estimates of yield losses in beans due to single or mixed infection with the potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV). The protocol adopted for virus purification led to purified preparations with high yield, and the antisera obtained after rabbit immunization reacted with the maximum dilution tested (1:70.000) in indirect ELISA, without any reactions with sap from healthy plants. Out of the 22 plant species tested as hosts, *Chenopodium quinoa* reacted with chlorotic local lesions which evolved to mosaic and leaf distortion in non-inoculated leaves. Bean and soybean cultivars reacted with mosaic of varied intensities, as expected for BRMV. The isolate was transmitted by *Ceratoma arcuata* to 33,3% of the inoculated plants. Upon inoculation onto ‘Ouro Negro’ and ‘Novirex’ beans, the total weight of pods per plant was reduced by 44,6% and 65,7%, respectively. Single infection by BCMV led to a smaller reduction of pod weight in ‘Novirex’ (13,1%) compared to ‘Ouro Negro’ (50,4%). When BRMV was inoculated first, followed by BCMV, total pod weight was reduced by up to 69,3% in ‘Novirex’ and 91,5% in ‘Ouro Negro’. No statistically significant differences were

observed in total weight or number of pods per plant after inoculation with BCMV followed by BRMV.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada do gênero *Phaseolus*. É espécie originária das Américas, com três centros de domesticação, o México/América Central, Colômbia e sul dos Andes. Cultivares originados dos dois primeiros centros diferem daquelas originadas do Sul dos Andes por possuírem sementes maiores (Gepts & Bliss, 1986; Gepts & Debouck, 1991). Os dois tipos de feijão, tanto para consumo de grãos secos (feijão comum) quanto de vagens verdes (feijão-vagem), pertencem à mesma espécie botânica e classificam-se na subfamília Papilionoideae da família Fabaceae (Vieira *et al.*, 1998). Acredita-se que o feijão-vagem seja originário da Europa, como resultado de mutações genéticas ocorridas no feijão comum introduzido das Américas (Oca, 1987). Há, no entanto, pesquisas preconizando que o feijão-vagem seja originário da América Central, de onde teria sido levado para a Europa e a Ásia. A grande diversidade de tipos e as diferentes tonalidades de sementes seriam atribuídas às variações ocorridas ao longo de vários séculos em sua extensa área de cultivo. Entretanto, sua forma silvestre nunca foi encontrada (Murayama, 1973).

O feijoeiro comum representa uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento nas Américas (47% da produção mundial) e no leste e sul da África (10% da produção mundial). Além do elevado conteúdo calórico, o feijão constitui fonte acessível de proteínas, com composição aproximada de 20 a 25% de proteína na maioria dos cultivares brasileiros. A proteína do feijão é rica no aminoácido essencial lisina, porém pobre nos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína. A cultura é denominada feijão-vagem quando destinada ao consumo do fruto ainda verde, as vagens imaturas (Vieira *et al.*, 1998). Apesar de não ser tão rica em proteínas e calorias como os grãos secos, a vagem é rica em

vitaminas e sais minerais. Cultivares específicos de feijão-vagem foram desenvolvidos para as diferentes formas de consumo (Evans, 1976; Filgueira, 2000).

No Brasil, a produção de feijão em 2001 foi de aproximadamente 2.500.000 toneladas, com os estados de Paraná, Minas Gerais e São Paulo respondendo por 48% da produção total (IBGE, 2001). A cultura do feijão-vagem tem importância relativa dentre as espécies de hortaliças mais comercializadas no Brasil. É a décima primeira hortaliça em volume produzido, destacando-se os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, responsáveis por 68,5% do total produzido no país (IBGE, 2001).

As regiões brasileiras são bem definidas quanto à preferência pelo grão de feijão comum. O feijão “Preto” é mais popular no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. O “Carioca” é aceito praticamente em todo o Brasil, representando 53% da área cultivada. O “Mulatinho” é mais aceito na região Nordeste, e os tipos “Roxo” e “Rosinha” são mais populares nos estados de Minas Gerais e Goiás (Costa & Vieira, 2000). Qualquer cultivar de feijoeiro pode ser utilizado para se colherem as vagens, porém nem todos fornecerão produtos de boa qualidade (Vieira *et al.*, 1998). Existem alguns grupos de feijoeiro que produzem vagens verdes, lisas e tenras, com baixo teor de fibras, polpa espessa e formato alongado. As vagens de cor verde incluem a maioria dos cultivares comerciais, sendo as mais populares para consumo *in natura* e industrialização. As demais cores apresentam mercado restrito (Abreu, 2001; Castellane *et al.*, 1988).

As principais doenças que reduzem a produtividade do feijoeiro são ocasionadas por fungos. Seguem-se as de etiologia viral, algumas com expressiva importância econômica, como o mosaico-comum, causado pelo potyvírus *Bean common mosaic virus* (BCMV), e o mosaico dourado, causado pelo begomovírus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Yokoyama, 2000). Também infectam o feijoeiro os potyvírus *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) e *Soybean mosaic virus* (SMV), o begomovírus *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e o comovírus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) (Hall, 1991).

A doença causada pelo *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) foi relatada pela primeira vez na Costa Rica (Gamez, 1972), e em seguida na Guatemala (Cartin, 1973), El Salvador (Galvez *et al.*, 1977), Brasil (Lin *et al.*, 1981), Colômbia (Acosta *et al.*, 1986), Honduras e Nicarágua (Gamez, 1977). No Brasil, inicialmente foi relatada uma doença denominada mosaico-em-desenho, com sintomatologia similar àquela induzida pelo BRMV, em plantas de feijoeiro no estado de São Paulo (Camargo *et al.*, 1969), e posteriormente no Distrito Federal (Kitajima *et al.*, 1980), Paraná (Bianchini *et al.*, 1985), Minas Gerais e Goiás (Anjos *et al.*,

1986). O agente etiológico foi denominado “vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro”. Posteriormente, Lin *et al.* (1981), baseando-se no agrupamento dos comovírus em cinco serogrupos (Fulton & Scott, 1977), propuseram a inclusão do “vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro” no serogrupo do BRMV, considerando-o uma estirpe desse vírus.

Incidências do BRMV acima de 50% foram constatadas em algumas lavouras do norte, nordeste e sudeste do Paraná (Bianchini *et al.*, 1989). Em levantamento feito no Distrito Federal e nos estados de Goiás e Minas Gerais, de 1992 a 1994, 20 a 25% das lavouras apresentavam o mosaico-em-desenho do feijoeiro, indicando que esta virose está bem disseminada nos cerrados. Porém, foi baixa a porcentagem de plantas infectadas na maioria das lavouras amostradas (Anjos *et al.*, 1994).

Estimativas de perdas causadas pelo BRMV em feijoeiro indicam que a doença pode adquirir considerável importância econômica sob condições favoráveis. A infecção pelo BRMV reduziu o rendimento da produção de grãos das variedades Jalo, Mulatinho Paulista, Costa Rica, Rosinha G2, Capixaba Precoce, Carioca e Safira em 29 a 59%, 10 a 27%, 10 a 27%, 48%, 11 a 53,9%, 20 a 56,7% e 3,6 a 11,2%, respectivamente (Sperandio, 1982). O número de vagens por planta também foi significativamente reduzido (39 a 59%) na variedade Rosinha G2 (Costa, 1983). Maiores reduções no rendimento são obtidas quanto a infecção das plantas ocorre mais cedo, e simultaneamente com outras viroses (Anjos *et al.*, 1994; Bianchini & Bergamin Filho, 1994; Costa, 1983; Martins *et al.*, 1994). O aumento da incidência desta virose pode ocorrer em cultivos sucessivos, principalmente na região dos cerrados, em razão da transmissão eficiente do vírus por insetos vetores e da existência de hospedeiros alternativos, o que possibilita continuidade do ciclo da doença de uma safra para outra (Anjos *et al.*, 1994).

A gama de hospedeiros do BRMV está restrita a espécies de Chenopodiaceae e Fabaceae (Cupertino *et al.*, 1991; Gamez, 1972; Gamez, 1982). Em *Chenopodium quinoa*, formam-se lesões cloróticas nas folhas inoculadas e não-inoculadas, enquanto *Chenopodium amaranticolor* apresenta lesões locais necróticas, sem infecção sistêmica (Gamez, 1982). Em soja (*Glycine max*) os sintomas variam com o cultivar, em geral incluindo mosaico, bolhosidades e encrespamento foliar, com redução no porte da planta (Cupertino, 1987). O BRMV infecta sistemicamente a maioria dos cultivares de feijão recomendados para plantio no Brasil, havendo grande variação de sintomas. O sintoma de mosaico predomina na maioria dos cultivares, com formação de um desenho típico na lâmina foliar. Outros sintomas incluem bolhosidade, deformação foliar e lesões locais cloróticas, observados nos cultivares Goiano Precoce, Manteiga, Mulatinho Paulista, Aeté, Aysó, Carioca 80, Costa Rica, Catú e Jalo.

Lesões locais necróticas e necrose de nervuras ocorrem nos cultivares Venezuela 36, IPA 5047, Carioca e Rio Tibagi. A queima do topo pode ocorrer em ‘Ricobaio 1014’ e ‘Rico 23’, entre outras (Anjos *et al.*, 1994; Costa, 1983).

O BRMV é transmitido naturalmente por besouros (Coleoptera: Chrysomelidae). As espécies vetoras mais comuns incluem *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa*, sendo a primeira a mais eficiente (Costa *et al.*, 1981; Fulton & Scott, 1977; Martins *et al.*, 1994). Para *C. arcuata*, o período mínimo de aquisição é de três horas, o período de alimentação para inoculação mais eficiente é de 12 horas, e 3 a 6 horas de jejum após a aquisição aumentam a taxa de transmissão (Sperandio, 1982; Sperandio & Costa, 1982). Entretanto, Meyer *et al.* (1992) relataram que um período de jejum de 48 horas anterior ao período de aquisição não aumentou a transmissão e a persistência do BRMV em *C. arcuata*. Esses autores não encontraram diferença significativa na transmissão e persistência do vírus entre machos e fêmeas, em que as porcentagens de transmissão foram de 22% e 31%, respectivamente. Os insetos permanecem virulíferos até 6 a 8 dias após a aquisição em plantas infectadas (Costa *et al.*, 1981; Sperandio & Costa, 1982). O vírus não é transmitido via semente em feijoeiro ou soja (Galvez *et al.*, 1977; Gamez, 1972; Martins *et al.*, 1994; Sperandio, 1982), mas é facilmente transmitido via extrato vegetal tamponado com o uso de abrasivo fino.

O vírus ocorre em concentração relativamente alta nos tecidos infectados, e induz inclusões citoplasmáticas cristalinas nas células de tecidos foliares do feijoeiro (Camargo *et al.*, 1976; Camargo *et al.*, 1969; Muñoz & Kitajima, 1990; Rivera & Carmona, 2000). Em exames ao microscópio de luz, encontraram-se cristais densos de perfil poligonal, formados por vírions, no citoplasma de células epidérmicas, dos parênquimas, de tricomas e em células-guarda dos estômatos (Muñoz & Kitajima, 1990; Rivera & Carmona, 2000). A constatação desses cristais possui valor diagnóstico para a identificação e separação do BRMV de outros vírus que causam sintomas de mosaico em feijoeiro (Edwarson & Christie, 1978; Muñoz & Kitajima, 1990; Rivera & Carmona, 2000).

Até o momento, tem sido pequeno o impacto do BRMV na produção de feijão no Brasil, e nenhuma medida especial de controle tem sido recomendada. O controle químico de *D. speciosa* e *C. arcuata* como insetos-praga tem mantido a incidência do BRMV em níveis baixos, atuando indiretamente no controle do vírus. Existem também estudos sobre a resistência de *P. vulgaris* ao BRMV. Inicialmente, Gamez (1972) relatou que, diante do BRMV, os cultivares de feijão apresentaram imunidade, resistência via hipersensibilidade, ou suscetibilidade. Machado & Pinchinat (1975), estudando a herança destes três tipos de reação,

determinaram que a expressão dos sintomas ao vírus é governada por três alelos do mesmo loco. O alelo *Mrf*, correspondente a imunidade, mostra dominância completa. Quanto aos outros dois alelos, *Mrf₁*, correspondente a resistência via hipersensibilidade, e *mrf* correspondente a suscetibilidade. Em soja, a herança da resistência ao BRMV foi analisada mediante cruzamentos simples entre cultivares resistentes e suscetíveis. Na geração F1 todas as plantas apresentaram sintomas. As plantas F2 segregaram numa proporção de 3 suscetíveis para 1 planta resistente, indicando que a resistência é do tipo monogênica recessiva (Martins *et al.*, 1995).

O BRMV pertence ao gênero *Comovirus* da família *Comoviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). A família *Comoviridae* é dividida em três gêneros: *Comovirus*, *Fabavirus* e *Nepovirus*, de acordo com o tipo de inseto vetor e relacionamento sorológico. O genoma dos comovírus é dividido em duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo, denominadas RNA 1 e RNA 2. Estes RNAs estão encapsulados separadamente em partículas icosaédricas com 28 a 30 nm de diâmetro. Os RNAs 1 e 2 possuem em torno de 5.900 e 3.500 nucleotídeos, respectivamente, com uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente à extremidade 5', e uma cauda poli-A em sua extremidade 3'. De maneira análoga aos potyvírus, as proteínas virais são originadas nos comovírus mediante autoproteólise (Figura 1).

Cada um dos componentes do genoma possui uma só fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), traduzida como uma única poliproteína. Entretanto, o RNA 2 produz duas poliproteínas com igual extremidade carboxílica, como resultado da tradução de sua ORF a partir de dois códons iniciadores na mesma fase. A poliproteína de 95 kDa é produzida em quantidade superior à poliproteína de 105 kDa. A única proteína com atividade de protease é a 24K, sintetizada pelo RNA 1, responsável pelo processamento de ambas poliproteínas. As demais proteínas codificadas pelo RNA 1 estão envolvidas na replicação dos RNA virais. A proteína 87K possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, enquanto a proteína 58K possui atividade de helicase e, possivelmente, funciona como âncora para manter o complexo replicativo associado à membrana plasmática da célula. A VPg funciona como iniciador da replicação do RNA. A protease (24K) também é essencial para a replicação, porque catalisa a proteólise que libera da VPg da poliproteína de 84 kDa, um processo que parece ocorrer durante a replicação do RNA. O RNA 1 possui autonomia de replicação, porém os vírions completos são formados apenas na presença do RNA 2, que codifica as duas proteínas capsidiais (37K e 23K). As proteínas 58K e 48K, codificadas pelo

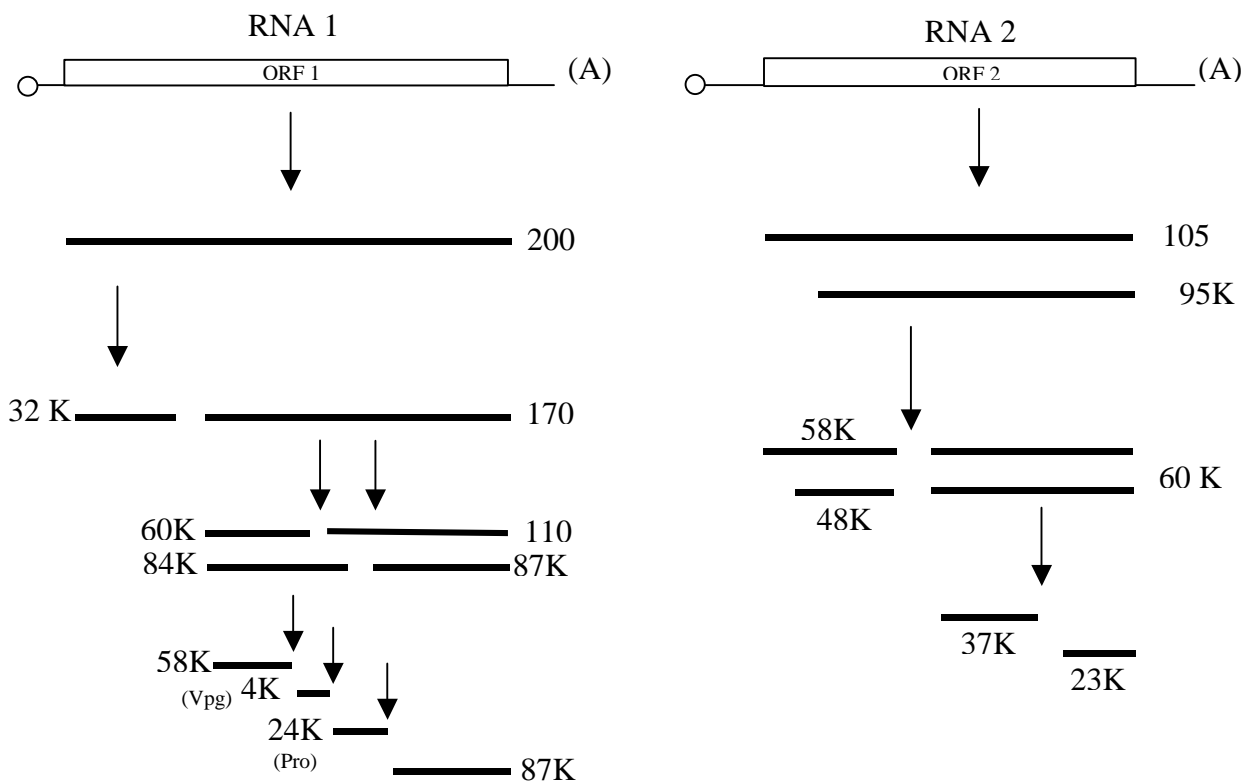


Figura 1. Organização e expressão do genoma de um comovírus. Cada componente genômico (RNA 1 e RNA 2) possui uma proteína viral ligada à sua extremidade 5' (VPg, representada por um círculo) e uma cauda poli-A na extremidade 3' (representada por A_n). Há apenas uma ORF em cada RNA, codificadora de uma poliproteína que, mediante autoproteólise, gera cinco proteínas (32K, 58K, 4K, 24K e 87K) no caso do RNA 1, e quatro (58K, 48K, 37K e 23K) no caso do RNA 2.

RNA 2 e com a mesma extremidade carboxílica, são as proteínas de movimento célula-a-célula dos comovírus. Essas proteínas formam túbulos que conectam as células infectadas e a contígua, pelos quais passam vírions. Ambos os RNAs são necessários para a infecção sistêmica da planta hospedeira (Chen & Bruening, 1992).

A primeira seqüência parcial de nucleotídeos de um isolado de BRMV foi determinada por Souto *et al.* (2002), utilizando um par de oligonucleotídeos correspondentes às seqüências conservadas de aminoácidos AWSTQV e GNPNN/RGFE, presentes nas regiões codificadoras das proteínas 37K e 23K, respectivamente. Um fragmento de 600 nucleotídeos do RNA 2 do BRMV foi amplificado por RT-PCR, clonado e seqüenciado. As seqüências deduzidas de aminoácidos foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank, verificando-se 39% de correspondência seqüencial nucleotídica com o RNA 2 do *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e 44% com o do *Bean pod mottle virus* (BPMV).

Assim como os demais vírus, os comovírus podem ser identificados e caracterizados por meio de: (i) métodos biológicos, baseados na morfologia da partícula viral, nas propriedades de transmissão natural e artificial e na gama de hospedeiros; (ii) métodos sorológicos, fundamentados na detecção da proteína capsidial do vírus; e (iii) métodos moleculares, em que se detecta o ácido nucléico viral. Os métodos biológicos proporcionam alta sensibilidade e são capazes de diferenciar estirpes taxonomicamente próximas do mesmo vírus. Entretanto, os resultados dos testes podem demorar desde alguns dias até algumas semanas, além de estarem sujeitos a variações dependentes do ambiente e resultantes de alterações genotípicas das plantas utilizadas como indicadoras (Hull, 2002).

Os métodos sorológicos constituem a ferramenta mais comum para a identificação rápida, simples e precisa da grande maioria dos vírus de plantas (Hull, 2002). A necessidade de disponibilidade contínua de anti-soros de boa qualidade é a maior limitação para o seu uso. A produção de anti-soros é normalmente realizada via injeção de partículas virais purificadas na corrente sanguínea de coelhos. Desta forma, a purificação viral é um componente essencial desse processo. A partir de folhas infectadas pelo vírus, e por meio de uma série de etapas envolvendo tratamentos físico-químicos, obtém-se uma preparação quimicamente pura de partículas virais (Hull, 2002). Os protocolos de purificação são específicos para cada vírus e em geral dependem das propriedades físico-químicas das partículas virais respectivas. Assim, vírus pertencentes à mesma família, que normalmente possuem propriedades físico-químicas semelhantes, possuem protocolos de purificação bastante similares. Entretanto, a purificação de um vírus será sempre um processo trabalhoso, e que freqüentemente conduz a preparações com pureza e/ou concentração insatisfatórias.

Existem diversos testes sorológicos, com diferentes características de sensibilidade, especificidade e consumo de anti-soro (Hampton *et al.*, 1990). Dois se destacam, atualmente, pela sua versatilidade, simplicidade e sensibilidade: imunoabsorção com enzima ligada ao anticorpo (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA, e suas variações) e *Western blot*. As vantagens dos ELISA são a grande sensibilidade, aplicabilidade a um grande número de amostras, consumo reduzido de anti-soro, possibilidade de quantificação dos resultados e fácil ajuste de sua especificidade conforme as necessidades (Agrios, 1996). Por combinar estas características, o ELISA é hoje o teste sorológico mais utilizado para detecção viral em todo o mundo.

A identificação de vírus também pode ser feita mediante testes moleculares, como é o caso do teste de RT-PCR (“reverse transcription - polymerase chain reaction”) para vírus com genoma composto de RNA. O teste é normalmente realizado a partir de preparações do RNA total obtido de amostras foliares infectadas, usando-se um par de oligonucleotídeos específico para o vírus em questão. É comum também o uso de oligonucleotídeos universais ou “degenerados”, cuja seqüência é determinada a partir do alinhamento de regiões conservadas do genoma de várias espécies de um determinado gênero. O uso desses oligonucleotídeos geralmente permite a amplificação de fragmentos da maioria ou mesmo de todas as espécies do gênero. Exemplo de utilização desses oligonucleotídeos é o trabalho de Souto *et al.* (2002), com utilização de um par de oligonucleotídeos universais para o gênero *Comovirus*, que possibilitou amplificar fragmento de 600 nt correspondente ao RNA 2 do BRMV.

Em 2002, um isolado do BRMV foi obtido de plantas de feijão-vagem do cultivar ‘Novirex’ coletados no município de Cordisburgo, MG. As plantas apresentavam um sintoma atípico de encurvamento das vagens, além de um mosaico leve, sem ocorrência de deformação foliar. O vírus foi inicialmente identificado como um comovírus por meio de observações em microscópio eletrônico de transmissão, que demonstraram a presença de partículas isométricas com 28 nm de diâmetro e de inclusões cristalinas típicas de comovírus, além de uma combinação de testes que determinaram a massa molecular das proteínas que compõe o capsídeo viral e o comprimento dos RNAs genômicos (Torres *et al.*, 2003). Realizou-se ELISA indireto (Clark *et al.*, 1986) com anti-soro específico para o BRMV (cedido por E.W. Kitajima, ESALQ-USP, Piracicaba, SP), e o resultado positivo obtido no teste confirmou a identidade do isolado (Torres *et al.*, 2003). Esse foi o primeiro relato de ocorrência do BRMV em Minas Gerais em mais de 17 anos. Os sintomas atípicos observados sugerem que o cultivar ‘Novirex’ pode apresentar suscetibilidade elevada ao BRMV. Entretanto, constatou-se escassez de informações a respeito da incidência de BRMV em

plantios comerciais dessa cultivar, ou de outras cultivares de feijoeiro em Minas Gerais. Além disso, o BRMV é um vírus parcialmente caracterizado, dispondo-se de poucas informações a respeito de suas propriedades biológicas, sorológicas e de suas características moleculares.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivos: (i) purificar o isolado de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) obtido de feijão-vagem, em Minas Gerais, e utilizá-lo como imunógeno na produção de anti-soros policlonais em coelhos, (ii) caracterizar os anti-soros recém-preparados quanto à sensibilidade e especificidade na detecção do BRMV, (iii) caracterizar o isolado utilizando métodos biológicos e sorológicos; e (iv) estudar o efeito da interação *in vivo* deste isolado de BRMV com outro vírus do feijoeiro, o potyvírus BCMV.

LITERATURA CITADA

- ABREU, F.B. Análise multivariada na determinação da divergência genética em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) de crescimento indeterminado. (Tese de mestrado). Campos dos Goytacazes, R. J. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2001.
- ACOSTA, O., ALEGRÍA, A. & LASTRA, R. Some biological and physicochemical properties of *Bean rugose mosaic virus*. *Phytopathology* 76:1182-1189. 1986.
- AGRIOS, G.N. Fitopatología. 2 ed. Mexico. Noriega Editores. 1996.
- ANJOS, J.R.N., COSTA, A.S., SPERANDIO, C.A. & COSTA, C.L. Mosaico-em-desenho. In: SARTORATO, A. & RAVA, C.A. (Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília, EMBRAPA/CNPAF. 1994. pp. 285-300
- ANJOS, J.R.N., COSTA, C.L. & KITAJIMA, E.W. Levantamento de viroses em cultura de feijão irrigado na região dos Cerrados. *Fitopatologia Brasileira* 11:391. 1986.
- BIANCHINI, A. & BERGAMIN FILHO, A. Reação induzida em feijoeiro pela interação do vírus do mosaico dourado e do mosaico-em-desenho. In: Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro. Piracicaba. FEALQ. 1994. pp. 21
- BIANCHINI, A., KITAJIMA, E.W. & LIN, M.T. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 10:307. 1985.
- BIANCHINI, A., MENEZES, J.R. & MARINGONI, A.C. Doenças e seu controle. In: Instituto Agronômico do Paraná. O feijão no Paraná. Londrina. 1989. pp. 189-216
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.F. Microscopia eletrônica do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro *in situ*. *Fitopatologia Brasileira* 1:207-214. 1976.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Inclusões cristalinas de um vírus isodiamétrico que afeta o feijoeiro. *Ciência e Cultura* 21:490. 1969.
- CARTIN, F. Caracterización de dos nuevas razas del virus del mosaico fufoso del frijol. (Tesis de Licenciatura). San José. Universidad de Costa Rica. 1973.

- CASTELLANE, P.D., VIEIRA, R.D. & CARVALHO, N.M. Feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L): Cultivo e produção de sementes. Jaboticabal. FUNEP/FCAV-UNESP. 1988.
- CHEN, X. & BRUENING, G. Nucleotide sequence and genetic map of cowpea severe mosaic virus RNA2 and comparisons with RNA2 of other comoviruses. *Virology* 187:682-692. 1992.
- CLARK, M.F., LISTER, R.M. & BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-766. 1986.
- COSTA, A.F. Efeito das infecções simples e duplas de quatro vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na produção e em algumas características da planta. (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 1983.
- COSTA, C.L., LIN, M.T. & SPERANDIO, C.A. Besouros crisomelídeos vetores do sorotipo IV do "Cowpea severe mosaic virus" isolado de feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:523. 1981.
- COSTA, J.G.C.D. & VIEIRA, N.R.D.A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L.P. & STONE, L.F. (Eds.) *Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção*. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 2000. pp. 75
- CUPERTINO, F.P. Vírus do mosaico-em-desenho afetando plantações de soja no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 16:246-250. 1987.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L. & KITAJIMA, E.W. Infecção natural da soja pelo vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro, no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 16:246-250. 1991.
- EDWARSON, J.R. & CHRISTIE, R.G. Use of virus induced inclusion bodies in classification and diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 16:31-55. 1978.
- EVANS, A.M. Beans (*Phaseolus* spp. Leguminosae-Papilionatae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.) *Evolution of crop plants*. London. Longman. 1976. pp. 16-172
- FILGUEIRA, F.A.R. *Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção de hortaliças*. Viçosa. UFV. 2000.
- FULTON, J.P. & SCOTT, H.A. Bean rugose mosaic and related viruses and their transmission by beetles. *Fitopatologia Brasileira* 2:9-16. 1977.
- GALVEZ, G., CARDENAS, M., KITAJIMA, E.W., DIAZ, A. & NIETO, M. Purification, serology, electron microscopy and properties of Ampollado strain of *Bean rugose mosaic virus*. *Turrialba* 27:343-350. 1977.
- GAMEZ, R. Los virus del frijol en Centro América. II. Algunas propiedades y transmisión por crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. *Turrialba* 22:249-257. 1972.
- GAMEZ, R. Las enfermedades virales como factores limitantes en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en América Latina. *Fitopatologia (Lima)* 12:24-26. 1977.

- GAMEZ, R. Bean rugose mosaic virus. In: CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 246. 1982. pp.
- GEPTS, P. & BLISS, F.A. Phaseolin variability among wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany* 40:469-478. 1986.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: VAN SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O. (Eds.) *Common beans: research for crop improvement*. Wallingford. CAB International. 1991. pp. 7-53
- HALL, R. (Ed.) *Compendium of bean diseases*. St. Paul. APS Press. 73p. 1991.
- HAMPTON, R., BALL, E. & DE BOER, S. (Eds.) *Serological tests for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: A Laboratory Manual*. St. Paul. APS Press. 389p. 1990.
- HULL, R. *Matthew's Plant Virology*. Londres, Inglaterra. Academic Press. 2002.
- IBGE. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11>. 2001
- KITAJIMA, E.W., LIN, M.T., COSTA, C.L. & BATISTA, M.F. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 5:408. 1980.
- LIN, M.T., GÁMEZ, R.G. & KITAJIMA, E.W. Bean "mosaico-em-desenho" virus is a member of the bean rugose mosaic virus serogroup. *Fitopatologia Brasileira* 6:293-298. 1981.
- MACHADO, P.F.R. & PINCHINAT, A.M. Herencia de la reacción del frijol común a la infección por el virus del mosaico rugoso. *Turrialba* 25:418-419. 1975.
- MARTINS, T.R., ALMEIDA, A.M.R., ALMEIDA, L.A., NEPOMUCENO, A., CHAGAS, C.M. & TOLEDO, J.F.F. Sinergismo observado em plantas de soja infectadas pelos vírus do mosaico comum da soja e do mosaico-em-desenho do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 19:430-436. 1994.
- MARTINS, T.R., ALMEIDA, L.A., ALMEIDA, A.M.R. & KIIHL, R.A.S. Inheritance of soybean resistance to bean "mosaico-em-desenho" virus. *Fitopatologia Brasileira* 20:241-243. 1995.
- MEYER, M.C., COSTA, C.L. & SANTOS, O.R. Inter-relações de *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) com quatro vírus de leguminosas. *Fitopatologia Brasileira* 17:314-320. 1992.
- MUÑOZ, J.O. & KITAJIMA, E.W. Estudo comparativo da citopatologia induzida por alguns vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em infecções simples. *Fitopatologia Brasileira* 15:276-284. 1990.
- MURAYAMA, S. *Horticultura*. Campinas. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 1973.
- OCA, G.M. Mejoramiento genético de la habichuela en el CIAT y resultados de viveros internacionales. *El mejoramiento genético de la habichuela en América Latina. Memorias de un taller*. Cali, 1987. pp. 60-72.

- RIVERA, C. & CARMONA, L.M. Inclusion bodies induced by *Bean rugose mosaic comovirus* seen under light microscopy. *Revista de Biologia Tropical* 48:955-959. 2000.
- SOUTO, E.R., ALMEIDA, A.M.R., BIANCHINI, A., SARTORI, F. & CALVO, E.S. Análise molecular de segmento do RNA2 de *Comovirus* isolados de soja no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 27:525-527. 2002.
- SPERANDIO, C.A. Caracterização do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 1982.
- SPERANDIO, C.A. & COSTA, C.L. Besouros crisomelídeos vetores do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro. Reunião Nacional de Pesquisa de feijão. Goiânia, EMBRAPA/CNPAP, 1982. 231-233.
- TORRES, L.B., MOREIRA, A.G., CASTILLO-URQUIZA, G.P., CARVALHO, M.G., MATSUOKA, K. & ZERBINI, F.M. Detection of an isolate of *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) infecting beans in Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research* 8: no prelo. 2003.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego. Academic Press. 1162p. 2000.
- VIEIRA, C., PAULA, J.T.J.D. & BORÉM, A. Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa. Imprensa Universitária. 1998.
- YOKOYAMA, L.P. Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 2000.

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO *Bean rugose mosaic virus* (BRMV)

Castillo-Urquiza, G.P., Carvalho, M.G., Pinto, C.M.F. & Zerbini, F.M. Caracterização de um isolado do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). *Fitopatologia Brasileira*, *submetido para publicação*.

CARACTERIZAÇÃO DE UM ISOLADO DO *Bean rugose mosaic virus* (BRMV)*

Gloria Patricia Castillo-Urquiza¹, Murilo G. de Carvalho¹,
Cleide Maria F. Pinto² e F. Murilo Zerbini¹

¹Departamento de Fitopatologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000, Viçosa, MG; ²Centro Tecnológico da Zona da Mata, EPAMIG, Vila Gianetti nº 46 e 47, Cx. Postal 216, 36570-000, Viçosa, MG.

(Aceito para publicação em / /)

Autor para correspondência: F. Murilo Zerbini (E-mail: zerbini@ufv.br)

Castillo-Urquiza, G.P., Carvalho, M.G., Pinto, C.M.F. & Zerbini, F.M. Caracterização de um isolado do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). Fitopatologia Brasileira, 00:000-000.

RESUMO

Plantas de feijão-vagem do cultivar Novirex apresentando mosaico e enrolamento de vagens, sem deformação foliar evidente, foram coletadas em 2002 em Cordisburgo, MG. Estudos preliminares identificaram o isolado como o comovírus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). Neste trabalho foram conduzidos estudos para caracterização do isolado, por meio de produção e avaliação de anti-soro, determinação da gama de hospedeiros, estudo da transmissão do vírus por besouros crisomelídeos e avaliação de perdas em feijoeiro como resultado de infecção isolada ou em conjunto com o potyvírus *Bean common mosaic virus* (BCMV). O roteiro adotado para purificação possibilitou a obtenção de vírus purificado em rendimento satisfatório para a produção de anti-soro. A titulação dos anti-soros foi realizada por ELISA indireto, obtendo-se reações positivas com a diluição máxima testada (1:70.000). Das 22 espécies vegetais utilizadas na gama de hospedeiros, foram infectadas plantas de *Chenopodium quinoa* e de alguns dos cultivares de feijão e soja, conforme esperado para BRMV. O isolado de BRMV foi transmitido pelo besouro crisomelídeo *Cerotoma arcuata* a uma taxa de 33,3%. Este isolado foi inoculado em plantas de feijão do cultivar Ouro Negro e de feijão-vagem do cultivar Novirex, levando a uma redução do peso das vagens por planta de 44,58% e 65,7%, respectivamente. Quando o BRMV foi inoculado inicialmente, seguido do

* Parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Viçosa.

BCMV, verificou-se redução do peso de vagens por planta de até 69,3% para ‘Novirex’ e de 91,53% para ‘Ouro Negro’. Não se observou diferença significativa em peso ou número de vagens por planta quando estas foram inoculadas seqüencialmente com o BCMV seguido do BRMV.

Palavras-chaves: feijão, feijão-vagem, *Bean rugose mosaic virus*.

ABSTRACT

Bean plants of the cultivar Novirex, showing an atypical pod curling symptom without mosaic or leaf distortion, were collected in 2002 at Cordisburgo, MG. Previous studies identified the isolate as the comovirus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV). The present work continued the characterization of the isolate, and included its purification and production of a polyclonal antiserum, determination of a partial host range, vector transmission, and estimates of yield losses due to single or mixed infection with the potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV). The protocol adopted for virus purification led to purified preparations with high yield, and the antisera obtained reacted with the maximum dilution tested (1:70.000) in indirect ELISA. Out of the 22 plant species tested as hosts, *Chenopodium quinoa* reacted with chlorotic local lesions which evolved to mosaic and leaf distortion in non-inoculated leaves. Bean and soybean cultivars reacted with mosaic of varied intensities, as expected for BRMV. The isolate was transmitted by *Ceratoma arcuata* to 33,3% of the inoculated plants. Upon inoculation onto ‘Ouro Negro’ and ‘Novirex’ beans, the total weight of pods per plant was reduced by 44,6% and 65,7%, respectively. Single infection by BCMV led to a smaller reduction of pod weight in ‘Novirex’ (13,1%) compared to ‘Ouro Negro’ (50,4%). When BRMV was inoculated first, followed by BCMV, total pod weight was reduced by up to 69,3% in ‘Novirex’ and 91,5% in ‘Ouro Negro’. No statistically significant differences were observed in total weight or number of pods after inoculation with BCMV followed by BRMV.

INTRODUÇÃO

O feijão representa importante fonte de proteína, vitaminas e sais minerais na dieta humana, tanto na forma de grãos secos quanto de vagens verdes (Filgueira, 2000; Vieira *et al.*, 1998). Dentro as doenças que afetam a produtividade do feijoeiro, as de natureza fúngica são as mais numerosas, a que se seguem as de etiologia viral. Algumas destas exibem expressiva

importância econômica, como o mosaico-comum, causado pelo potyvirus *Bean common mosaic virus* (BCMV) e o mosaico-dourado, pelo begomovirus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (Yokoyama, 2000). Também infectam o feijoeiro os potyvirus *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) e *Soybean mosaic virus* (SMV), o begomovirus *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) e o comovirus *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) (Hall, 1991).

A doença causada pelo *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) foi relatada pela primeira vez na Costa Rica (Gamez, 1972). No Brasil, doença com sintomatologia similar foi inicialmente denominada mosaico-em-desenho e o seu agente, de “vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro”, relatado pela primeira vez em São Paulo (Camargo *et al.*, 1969), posteriormente no Distrito Federal (Kitajima *et al.*, 1980) e nos estados do Paraná (Bianchini *et al.*, 1985), Minas Gerais e Goiás (Anjos *et al.*, 1986). Lin *et al.* (1981), baseando-se no agrupamento dos comovirus em cinco serogrupos (Fulton & Scott, 1977), propuseram a inclusão do “vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro” no serogrupo do BRMV.

Estimativas de perdas causadas pelo BRMV em feijoeiro indicam que a doença pode adquirir considerável importância econômica sob condições que lhe sejam favoráveis, com reduções de produtividade de até 59%. Maiores reduções no rendimento da cultura resultam quando a infecção das plantas ocorre mais cedo (14 dias após do plantio) e quando ocorrem infecções mistas com outro(s) vírus (Anjos *et al.*, 1994; Bianchini & Bergamin Filho, 1994; Costa, 1983; Martins *et al.*, 1994).

A gama de hospedeiros do BRMV está restrita a espécies de Chenopodiaceae e Fabaceae (Cupertino *et al.*, 1991; Gamez, 1972; Gamez, 1982). O vírus é transmitido naturalmente por besouros crisomelídeos, como *Cerotoma arcuata* e *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Costa *et al.*, 1981; Fulton & Scott, 1977; Martins *et al.*, 1994). Não é transmitido via semente em feijoeiro ou soja (Galvez *et al.*, 1977; Gamez, 1972; Martins *et al.*, 1994; Sperandio, 1982), mas é facilmente transmitido via extrato vegetal tamponado empregando-se abrasivo fino.

O BRMV pertence ao gênero *Comovirus* da família *Comoviridae* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). O genoma dos comovirus é composto de duas moléculas de RNA de fita simples, sentido positivo, encapsuladas separadamente em partículas icosaédricas com diâmetro de 28 a 30 nm. Os dois RNAs possuem uma proteína viral (VPg) ligada covalentemente à suas extremidades 5', e uma cauda poli-A nas extremidades 3'.

Em 2002, um isolado do BRMV foi obtido a partir de plantas de feijão-vagem do cultivar Novirex, coletadas no município de Cordisburgo, MG (Torres *et al.*, 2003). As plantas apresentavam um sintoma atípico de vagens encurvadas em semicírculo, além de

mosaico leve, sem ocorrência de deformação foliar. O vírus foi identificado inicialmente como um comovírus por meio de observações em microscópio eletrônico de transmissão, testes determinantes da massa molecular das proteínas componentes do capsídeo viral e o comprimento dos RNAs genômicos. O resultado positivo obtido no ELISA indireto com anti-soro ao vírus (cedido por E.W. Kitajima, ESALQ-USP, Piracicaba, SP), confirmou a identidade do isolado. Esse foi o primeiro relato de infecção de feijoeiro pelo BRMV em Minas Gerais em 17 anos (Torres *et al.*, 2003).

O presente trabalho objetivou caracterizar este isolado de BRMV obtido de plantas de feijão-vagem ‘Novirex’ utilizando-se métodos biológicos e sorológicos, e estudar os efeitos da interação *in vivo* deste isolado de BRMV com outro vírus do feijoeiro (BCMV).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e manutenção do isolado viral

O isolado de BRMV proveio de plantas infectadas de feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Novirex, coletadas em um cultivo localizado no município de Cordisburgo, MG e apresentando mosaico leve e encurvamento das vagens.

O isolado foi mantido e multiplicado em feijoeiros do cultivar Ouro Negro, mediante inoculação via extrato vegetal tamponado preparado a partir da trituração de folhas trifoliadas jovens com sintomas, em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,2, contendo sulfito de sódio a 0,1% (p/v). As plantas infectadas foram mantidas em condições de casa-de-vegetação e distante de outros vírus passíveis de infectar o feijoeiro. O inóculo recorrente consistiu de fragmentos finos recortados de folíolos sintomáticos jovens, que foram dessecados (4 a 10 °C) e mantidos a -20 °C dentro de pequenos frascos lacrados contendo sílica-gel.

Purificação do vírus

Folhas de feijoeiro ‘Ouro Negro’ infectadas pelo BRMV foram homogeneizadas, entre 15 e 30 dias após a inoculação, na proporção 1:2 (p/v) de folhas para tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 contendo sulfito de sódio a 0,5% (p/v), e filtradas em gaze dupla. Em seguida foi adicionado ascorbato de sódio até a concentração final de 0,5% p/v, e o extrato foi centrifugado a 4.000 g por 10 min. O sobrenadante foi clarificado com clorofórmio e *n*-butanol nas concentrações finais de 2,5% (v/v) e 8% (v/v), respectivamente, sob forte agitação. A emulsão foi centrifugada a 4.000 g por 10 min e recolheu-se a fase aquosa. O

vírus foi precipitado por meio da adição de polietilenoglicol 6.000, concentração final de 6% (p/v), com a mistura mantida sob agitação constante durante 60 min. Seguiu-se centrifugação a 7.800 g por 10 min. O vírus no sedimento foi solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,5, contendo EDTA a 0,01 M e sulfito de sódio, a 0,5% (p/v), seguindo-se nova centrifugação a 7.000 g por 10 min. O vírus foi reprecipitado ajustando-se em 5,0 o pH com ácido acético 10% (v/v). Após uma hora em repouso, o precipitado resultante foi recolhido por centrifugação a 4.000 g por 10 minutos. O vírus foi solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 7,5, uréia 0,5 M e Triton X-100 0,1% (v/v) e centrifugado a 7.000 g por 10 min, descartando-se o sedimento. O vírus foi concentrado mediante ultracentrifugação a 58.000 g por 165 min. O “pellet” foi ressuscitado em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,5, seguindo-se centrifugação a 4.000 g por 10 min. Por fim, realizou-se segunda ultracentrifugação, a 58.000 g por 165 min, e o “pellet” foi ressuscitado em água destilada estéril.

Qualidade e rendimento do vírus purificado

As preparações purificadas de BRMV foram avaliadas qualitativamente mediante análise do espectro de absorção nos comprimentos de onda de 220 a 340 nm. Foram calculadas as razões entre as absorções máxima e mínima e as absorções medidas em 260 e 280 nm, quocientes que auxiliam na avaliação da pureza da solução viral. A concentração do vírus purificado foi estimada medindo-se a absorção a 260 nm e utilizando-se o coeficiente de extinção de $7 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ determinado para o BRMV não fracionado (Ramirez *et al.*, 1987).

Produção de anti-soro

O vírus purificado foi injetado em dois coelhos brancos, da raça Nova Zelândia, com cerca de 30 dias de idade no início da série imunogênica. Após a coleta de sangue para a obtenção do soro normal (pré-imune), foi realizada injeção intravenosa com 1 mg de vírus, veiculado em solução salina estéril. Posteriormente, foram efetuadas 5 injeções intramusculares ou subcutâneas, com intervalos semanais, com quantidades variadas de imunógeno (Tabela 1). A preparação viral foi emulsificada em igual volume de adjuvante incompleto de Freund antes de cada injeção intramuscular. Duas semanas após a última injeção, foi retirada amostra de sangue a partir da veia marginal da orelha do coelho, para a verificação preliminar da qualidade e título do anti-soro. Cinco sangrias semanais adicionais foram realizadas após a sangria inicial.

A especificidade de cada amostra semanal de anti-soro foi verificada em testes de difusão dupla em gel de agarose a 0,9% (p/v) em tris-HCl 0,02 M, pH 7,3, contendo NaCl a 0,85% (p/v) e azida sódica a 0,01% (p/v).

Absorção do anti-soro com proteína total de feijoeiro

Tendo-se verificado necessária, a absorção do anti-soro foi realizada conforme descrito por Sperandio (1982). A fim de obter a 'proteína total' de feijoeiro, folíolos sadios do cultivar Ouro Negro foram triturados a seco, em almofariz, e o extrato coado em gaze tripla. A seguir adicionou-se clorofórmio ao extrato na proporção 1:2 (v/v), e a solução foi mantida sob agitação constante por 10 min a 4°C. Após centrifugação a 700 g por 5 min, a fase aquosa com a proteína total foi recolhida e armazenada a 4°C.

Para a absorção do anti-soro com a proteína total, alíquotas de 2 ml da solução de proteína total foram misturadas com igual volume de anti-soro em tubos sorológicos, e esta mistura mantida em banho-maria a 37°C por 1 hora. Os tubos foram agitados freqüentemente, permanecendo um terço do tubo submerso, para formação de uma corrente de convecção. Essas alíquotas permaneceram em repouso por uma noite a 4°C, e em seguida foram centrifugadas a 3.800 g por 10 min, para remover do anti-soro os anticorpos inespecíficos, agora presentes no precipitado. O sobrenadante, constituindo o anti-soro absorvido, foi armazenado a -20°C.

Análise do anti-soro

O título e a especificidade dos anti-soros foram avaliados em ELISA indireto (Clark *et al.*, 1986). O título foi determinado utilizando-se diluições 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:40.000, 1:50.000, 1:60.000 e 1:70.000 de cada anti-soro em tampão PEP (Clark & Adams, 1977). Os extratos foliares foram diluídos 1:5 em tampão de extração (Clark *et al.*, 1986). Os resultados foram avaliados 25 min após a adição do substrato, em leitora Titertek Multiskan Plus MK II, a 405 nm.

Para os estudos de interação entre o BRMV e o BCMV, utilizou-se anti-soro à estirpe ATCC do BCMV, conservado a -20 °C.

Gama de hospedeiros

A determinação da gama de hospedeiros parcial do isolado de BRMV foi realizada utilizando-se plantas de 22 espécies/cultivares, membros das famílias *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* e *Fabaceae* (Tabela 2), selecionadas com base em referências

bibliográficas (Gamez, 1982). Para cada espécie/cultivar foram inoculadas oito plantas, e duas plantas foram utilizadas como testemunhas não inoculadas. Todas as plantas foram inoculadas via extrato vegetal tamponado conforme descrito, e reinoculadas dois dias após a primeira inoculação. A fonte de inóculo consistiu de feijoeiros do cultivar Ouro Negro, apresentando sintomas de infecção pelo BRMV. As plantas inoculadas foram mantidas em casa-de-vegetação, e a presença de sintomas foi avaliada visualmente 30 dias depois da inoculação. A ocorrência de infecções latentes foi verificada por meio de ELISA indireto, realizado com amostras de todas as plantas que permaneceram assintomáticas até o fim do período de avaliação.

Transmissão por besouros

A transmissão do isolado de BRMV pelo vetor foi testada utilizando-se besouros de *Cerotoma arcuata* coletados em soja, em área do Campo Experimental Diogo Alves de Mello (UFV). Esses besouros coletados no campo passaram por um período prévio de alimentação em feijoeiros sadios ‘Ouro Negro’, com transferências sucessivas para assegurar que estivessem avirulíferos (Meyer *et al.*, 1992). Em seguida os insetos foram transferidos para plantas de feijoeiro ‘Ouro Negro’ infectadas com o BRMV, aonde foram mantidos por 48 horas (período de aquisição). A seguir foram transferidos para 6 novas plantas sadias de ‘Ouro Negro’, depositando-se 3 insetos por planta. Os vasos foram sempre confinados a gaiolas teladas e desta forma o acesso dos insetos às plantas foi garantido nas próximas 24 horas (período de inoculação). Ao término desta fase, as plantas receberam inseticida (Imidacloprid) e permaneceram em casa-de-vegetação para a avaliação visual da presença de sintomas. A infecção viral foi comprovada por meio de ELISA indireto, realizado em todas as plantas.

Interação entre BRMV e BCMV

A fim de avaliar possíveis efeitos da infecção simples e mista pelo BCMV e o BRMV em feijoeiro, plantas de ‘Ouro Negro’ e ‘Novirex’ foram estabelecidas em vasos plásticos grandes, contendo 10 kg de solo esterilizado, e inoculadas via extrato vegetal tamponado com o BRMV, BCMV ou ambos. O experimento foi estabelecido segundo delineamento inteiramente casualizado, constando de oito tratamentos: (i) plantas inoculadas apenas com o BRMV; (ii) inoculação apenas com o BCMV; (iii) BRMV e BCMV inoculados simultaneamente; (iv) inoculação do BRMV seguido do BCMV, após 7 dias; (v) inoculação do BRMV seguido do BCMV, após 21 dias; (vi) inoculação do BCMV seguido do BRMV, após 7 dias; (vii) inoculação do BCMV seguido do BRMV, após 21 dias; e (viii) testemunha

inoculada apenas com solução tamponada. A primeira inoculação foi realizada 8 dias após a emergência das plântulas. Cada tratamento foi composto por seis vasos com duas plantas, num total de 12 plantas por tratamento, e os vasos distribuídos nas mesas aleatoriamente. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação até 50 dias após a primeira inoculação. Os resultados foram avaliados em termos de número médio de vagens por planta e peso médio das vagens produzidas por plantas. A fim de comprovar a infecção de cada vírus, ou dos dois simultaneamente, nos diferentes tratamentos, folíolos de todas as plantas (0,5 a 1 g) foram retirados cerca de uma semana antes da colheita e analisados em ELISA indireto. Os resultados foram analisados por ANOVA (SAS Institute, EUA) e as médias dos tratamentos comparadas com o teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Purificação do vírus

O procedimento adotado possibilitou a obtenção do vírus purificado em rendimento e pureza satisfatórios. O espectro de absorção do vírus purificado nos comprimentos de onda entre 220 e 340 nm mostrou-se típico de uma nucleoproteína, cuja absorção mínima ocorreu em 240 nm e a máxima em 259 nm (Figura 1). O rendimento médio calculado foi de 7,44 mg de vírus/kg de folhas. As preparações virais purificadas apresentaram uma relação entre a absorbância a 260 nm e a 280 nm de 1,73, compatível com a descrita por Gamez (1972) para o BRMV não fracionado.

Produção, avaliação e tratamento dos anti-soros ao BRMV

Na avaliação inicial dos anti-soros retirados dos dois coelhos imunizados, efetuada em testes de imunodifusão dupla em gel, não se constatou banda de precipitado antígeno-anticorpo entre o soro normal e extratos foliares de plantas sadias ou infectadas. Entretanto, linhas de precipitação se formaram entre anti-soros e amostras de plantas sadias, indicando a ocorrência de reação inespecífica. A fim de remover os anticorpos contra proteínas da planta sadia, foi realizada a absorção do anti-soro com proteína total de feijoeiro. Concluído o tratamento, o anti-soro foi testado novamente por imunodifusão, constatando-se reação positiva restrita às plantas infectadas. A titulação dos anti-soros absorvidos foi realizada por meio de ELISA indireto, verificando-se reações positivas na diluição máxima testada (1:70.000) e nenhuma reação desses anti-soros diante de extratos foliares de plantas sadias.

Gama de hospedeiros

As reações das plantas de 22 espécies/cultivares, pertencentes a 4 famílias botânicas, inoculadas via extrato vegetal tamponado como o isolado de BRMV, estão listadas na Tabela 2. Além da soja e do feijoeiro, o vírus infectou apenas *C. quinoa*. Em *C. quinoa*, foram observadas inicialmente lesões cloróticas nas folhas inoculadas, seguindo-se infecção sistêmica, com mosaico e distorção foliar (Figura 2A). Em soja e feijoeiro os sintomas evidentes foram mosaico foliar e bolhosidades (Figuras 2B-F), e necrose do ápice da planta. As demais espécies testadas não manifestaram nenhum sintoma e foram negativas no ELISA, confirmando-se assim sua condição de não hospedeiras do vírus. Estes resultados estão de acordo com os dados na literatura para o BRMV (Gamez, 1982).

Transmissão por besouros

O BRMV foi transmitido pelo besouro *Cerotoma arcuata* para plantas de feijoeiro ‘Ouro Negro’, que apresentaram os mesmos sintomas observados em plantas inoculadas via extrato vegetal tamponado. A transmissão do isolado pelo besouro crisomelídeo foi confirmada em todas as plantas que apresentavam sintomas, mediante ELISA indireto. A transmissão ocorreu em 33,3% dos casos (duas plantas das seis que receberam os besouros virulíferos).

Estudo de interação entre BRMV e BCMV

A análise estatística não detectou interação significativa entre cultivares e tratamentos ($P = 0,05$), porém detectou-se efeito significativo de cultivar e tratamento para as variáveis analisadas (número e peso de vagens por planta). A porcentagem de redução no peso das vagens apresentou efeito significativo entre tratamentos, porém não significativo para a interação entre tratamentos e cultivares. Dessa forma, a análise foi realizada entre os tratamentos em cada cultivar.

Embora ambas as variáveis testadas tenham levado a resultados semelhantes, a variável “peso de vagens por planta” permitiu diferenciar melhor os efeitos dos tratamentos em comparação à variável “número de vagens por planta” (Tabela 3). O peso médio das vagens produzidas pelas plantas sadias de ‘Novirex’ foi de 12,03 g. Quando as plantas estiveram infectadas apenas com o BRMV, a redução foi de 65,17%, estatisticamente significativa em relação à testemunha (Tabela 3). Infecção pelo BCMV causou redução de 13,05%, estatisticamente igual à testemunha. Os tratamentos em que a inoculação do BRMV precedeu à do BCMV levaram a reduções acentuadas e equivalentes entre si, de 67,6% e

69,3%, em relação àquela observada quando apenas o BRMV foi inoculado (65,2%). Os três tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha. Analogamente, os dois tratamentos nos quais o BCMV foi inoculado antes do BRMV levaram a reduções equivalentes àquela observada quando apenas o BCMV foi inoculado, de forma proporcional ao intervalo entre as duas inoculações (maior quando o BRMV foi inoculado 7 dias após o BCMV, e menor quando o BRMV foi inoculado 21 dias após). Em conjunto, os dados sugerem que apenas o BRMV reduziu significativamente o peso das vagens no cultivar 'Novirex'.

Para o cultivar Ouro Negro, os dois vírus apresentaram efeito semelhante (estatisticamente significativo) quanto inoculados de forma isolada ou simultânea, reduzindo o peso das vagens em 44,58% (BRMV), 50,37% (BCMV) e 44,13% (ambos simultaneamente). A inoculação do BRMV antes do BCMV levou a reduções drásticas, de 90,34% (BCMV sete dias após) e 91,53% (BCMV 21 dias após), em relação ao testemunha. Em contraste, a inoculação do BCMV antes do BRMV causou redução equivalente à observada na inoculação isolada ou simultânea dos dois vírus. Em conjunto, os resultados sugerem que 'Ouro Negro' é suscetível aos dois vírus e que, neste cultivar, a infecção pelo BRMV seguida do BCMV leva a efeitos mais severos.

Plantas do cultivar Novirex inoculadas com os dois vírus (simultaneamente ou com intervalos de 7 e 21 dias) foram negativas para o BCMV em ELISA indireto. A porcentagem de plantas positivas para o BRMV foi maior quando este foi inoculado antes do BCMV, tanto aos sete quanto aos 21 dias (47 e 55,6%) (Tabela 4).

O BCMV não foi detectado em plantas do cultivar Ouro Negro inoculadas simultaneamente com os dois vírus. Entretanto, 60% destas plantas foram positivas para o BRMV. Os maiores percentuais de plantas positivas para o BCMV (75% e 77,8%) foram verificados em plantas nas quais este vírus foi inoculado 7 ou 21 dias antes do BRMV, respectivamente. O BRMV foi detectado em 14 e 7% das amostras quando inoculado 7 e 21 dias antes do BCMV, respectivamente. Entretanto, não foi detectado quando o BCMV foi inoculado inicialmente. O maior porcentagem de plantas positivas para os dois vírus (35,8%) foi verificada em plantas inoculadas inicialmente com o BRMV seguido do BCMV após 21 dias.

DISCUSSÃO

Os resultados dos estudos iniciais de gama de hospedeiros, sorologia, microscopia eletrônica e eletroforese da proteína e ácido nucléico virais indicaram que o vírus coletado em

Cordisburgo em 2002 em feijoeiros Novirex é um comovírus (Torres *et al.*, 2003). Ao microscópio eletrônico de transmissão foram observadas inclusões citoplasmáticas poligonais, visualmente idênticas às relatadas para o *Bean rugose mosaic virus* e o “vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro”. A sintomatologia observada nas plantas infectadas das espécies vegetais selecionadas foi a mesma descrita para a virose do mosaico-em-desenho/ BRMV por Cupertino *et al.* (1991), Cupertino *et al.* (1982) e Gamez (1982). Em seguida verificou-se que o isolado é transmitido de forma circulativa por besouros crisomelídeos, uma propriedade excludente de potyvírus e begomovírus causadores de mosaico no feijoeiro. Finalmente, anti-soro para BRMV reagiu com o isolado no ELISA e no teste de difusão dupla em gel. Desta forma, tornaram-se desnecessárias a identificação molecular e a aferição de algumas propriedades físicas das partículas virais, uma vez o vírus purificado.

Embora bem sucedido o processo de purificação adotado, cujo intento principal foi permitir preparar anti-soro de alta especificidade para este isolado de BRMV, estranhou-se a dificuldade encontrada em obtê-lo na forma pura. Sabe-se que comovírus como *Squash mosaic virus* e *Bean pod mottle virus*, e o próprio BRMV, não requerem cuidados maiores nas purificações (Acosta *et al.*, 1986; Galvez *et al.*, 1977; Gamez, 1972; Martins *et al.*, 1994). Entretanto, com o isolado em estudo, foi preciso sofisticar o método e não se logrou separar em gradiente de sacarose, nas etapas finais da purificação, os três componentes (“top”, “middle” e “bottom”), provavelmente presentes na preparação viral. Também não se encontrou banda viral depois de 18 horas de ultracentrifugação isopícnica em CsCl. No entanto, foi satisfatória a preparação viral final, cujo espectro de absorbância em UV é típico de nucleoproteínas, além de ter sido possível preparar anti-soro específico e de bom título (1:70.000, ELISA indireto). Foi eficaz o método adotado de remoção dos anticorpos específicos para imunógenos celulares, porque ele conferiu ao anti-soro a especificidade indispensável, com a eliminação completa de qualquer reação inespecífica. A reatividade inicial do anti-soro diante de extratos de folha sadia era esperada, visto que, verificada inviável a centrifugação de equilíbrio em CsCl, não havia como remover moléculas protéicas e nucleoproteínas de origem celular. Como esperado para o BRMV, o isolado tolerou bem a precipitação em pH 5,0, que é reversível para este vírus, mas à qual não resistem particulados de origem celular e talvez a maior parte dos vírus já purificados, que se tornam insolúveis. A propósito, a tolerância a este tratamento acrescenta às propriedades esperadas para um comovírus.

A maneira pela qual os patógenos interagem com o suscetível, e entre si, nas infecções e no desencadeamento de prejuízos às plantas cultivadas, tem implicações importantes na

avaliação dos danos finais às culturas, na identificação das causas das doenças e na seleção adequada das medidas de controle a adotar. As interações entre patógenos são entendidas de acordo com os efeitos decorrentes da ação recíproca entre eles próprios, e daqueles que, em separado ou conjunto, exercem sobre o hospedeiro. Os danos causados ao hospedeiro na infecção mista podem ser maiores, menores ou iguais à soma dos prejuízos atribuídos a cada patógeno em infecção simples (Waller & Bridge, 1984).

Em ‘Novirex’, a redução de peso das vagens diferiu significativamente da testemunha em quatro tratamentos, e em ‘Ouro Negro’, em dois. No presente estudo, e de acordo com as variáveis avaliadas, os percentuais de redução dependeram da espécie viral, da idade e da seqüência segundo a qual a planta foi infectada. ‘Novirex’ e ‘Ouro Negro’ apresentaram porcentagens de redução na produção de vagens de 65% e 44%, respectivamente, na infecção simples pelo BRMV. Em estudo semelhante (Yokoyama, 2000), os maiores percentuais de redução da produção de feijoeiro ‘Capixaba Precoce’ e ‘Carioca’ infectados com o BRMV em diferentes épocas foram de 54% e 57%, respectivamente, para plantas infectadas mais cedo (14 dias após a emergência), com reduções muito menores nas inoculações aos 28 e 48 dias. Costa (1983) relatou que o rendimento do feijão ‘Rosinha G-2’ decresceu 48% na infecção simples pelo BRMV, e em 67% na infecção mista com o BCMV. Esses percentuais assemelham-se aos observados neste estudo, especialmente em ‘Ouro Negro’, que mostrou-se igualmente suscetível aos dois vírus, e em que a infecção pelo BRMV seguida do BCMV conduziu a prejuízos mais severos, de forma aditiva. Os dados obtidos neste trabalho não evidenciaram efeito sinérgico entre o BCMV e o BRMV, visto que, para tanto, os danos causados pelos dois vírus juntos deveriam ser maiores que a soma dos efeitos de cada qual em infecção simples e sob as mesmas condições. Entretanto, Martins *et al.* (1994) reporta sinergismo em soja ‘OCEPAR-4-Iguaçu’ quando inoculada simultaneamente com BRMV e o potyvírus *Soybean mosaic virus* (SMV), com base em uma redução de 83% no peso da matéria seca e de 82% na área foliar, em relação à testemunha não inoculada. Os decréscimos foram de apenas 61% e 52% para plantas inoculadas com BRMV e 68% e 62% com o SMV. O autor atribuiu a ação sinérgica à necrose apical tendendo para necrose sistêmica, que ocorreu apenas naquele cultivar e na infecção mista.

O peso de vagens das plantas testemunha do cultivar Novirex diferiu significativamente das plantas inoculadas apenas com o BRMV. A isso se acrescenta que todas as vezes que o BCMV precedeu ao BRMV na infecção de ‘Novirex’, as reduções no peso das vagens sempre foram menores do que nas plantas onde a infecção foi iniciada pelo BRMV e seguida pelo BCMV. Caso isso seja confirmado em outro experimento, a implicação

será de que este cultivar é tolerante ou resistente ao BCMV. Em contraste com o BCMV, 'Novirex' mostrou-se altamente suscetível à infecção pelo BRMV.

O cultivar Ouro Negro mostrou-se igualmente suscetível tanto ao BRMV como ao BCMV. Com a inoculação simultânea, efetuada nas folhas primárias, o nível de dano mostrou-se equivalente, numérica e estatisticamente, aos provocados na infecção simples por um ou outro vírus e também nos dois tratamentos em que o BCMV antecedeu ao BRMV. Isso contrasta com os dados dos tratamentos na ordem inversa, ou seja, o BRMV antecedendo ao BCMV, onde se verificou os dois maiores níveis de dano observados no experimento, 90% e 91%, e os únicos significativamente diferentes em relação à testemunha. Em aparência, cada um destes dois percentuais representa a adição dos danos ocasionados pelos dois vírus, agindo em separado. Esse resultado indica que 'Ouro Negro' é mais suscetível ao BCMV que 'Novirex'.

No teste de ELISA indireto feito em todas as plantas dos tratamentos onde os dois vírus estariam presentes, a fim de comprovar inoculações bem sucedidas, os maiores porcentagens de plantas positivas (77%) foram encontrados em 'Ouro Negro' para BCMV. No entanto, no cultivar Novirex foi detectada somente a presença do BRMV. Esta observação reforça a hipótese de resistência desse cultivar ao BCMV.

As conclusões gerais deste trabalho são: (i) todos os resultados obtidos confirmam a identidade do isolado como BRMV; (ii) o roteiro de purificação viral adotado permitiu obter anti-soros de alta especificidade para este isolado; (iii) o cultivar Novirex apresentou maior porcentagem de redução de peso das vagens quando foi inoculado com BRMV, de forma isolada ou antes que o BCMV; (iv) 'Ouro Negro' sofreu reduções pelo BRMV equiparadas às ocasionadas pelo BCMV, sendo igualmente suscetível aos dois vírus, entretanto mostrou altas porcentagens de redução (91%) quando o BRMV foi inoculado previamente ao BCMV; e (v) as porcentagens de redução de peso de vagens estão relacionadas ao isolado viral, idade da planta e seqüência de infecção.

LITERATURA CITADA

- ACOSTA, O., ALEGRÍA, A. & LASTRA, R. Some biological and physicochemical properties of *Bean rugose mosaic virus*. *Phytopathology* 76:1182-1189. 1986.
- ANJOS, J.R.N., COSTA, A.S., SPERANDIO, C.A. & COSTA, C.L. Mosaico-em-desenho. In: SARTORATO, A. & RAVA, C.A. (Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília, EMBRAPA/CNPAF. 1994. pp. 285-300

- ANJOS, J.R.N., COSTA, C.L. & KITAJIMA, E.W. Levantamento de viroses em cultura de feijão irrigado na região dos Cerrados. *Fitopatologia Brasileira* 11:391. 1986.
- BIANCHINI, A. & BERGAMIN FILHO, A. Reação induzida em feijoeiro pela interação do vírus do mosaico dourado e do mosaico-em-desenho. In: Seminário sobre pragas, doenças e plantas daninhas do feijoeiro. Piracicaba. FEALQ. 1994. p. 21
- BIANCHINI, A., KITAJIMA, E.W. & LIN, M.T. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira* 10:307. 1985.
- CAMARGO, I.J.B., KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Inclusões cristalinas de um vírus isodiamétrico que afeta o feijoeiro. *Ciência e Cultura* 21:490. 1969.
- CLARK, M.F. & ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475-483. 1977.
- CLARK, M.F., LISTER, R.M. & BAR-JOSEPH, M. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-766. 1986.
- COSTA, A.F. Efeito das infecções simples e duplas de quatro vírus do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) na produção e em algumas características da planta. (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 1983.
- COSTA, C.L., LIN, M.T. & SPERANDIO, C.A. Besouros crisomelídeos vetores do sorotipo IV do "Cowpea severe mosaic virus" isolado de feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 6:523. 1981.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L. & KITAJIMA, E.W. Infecção natural da soja pelo vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro, no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 16:246-250. 1991.
- CUPERTINO, F.P., COSTA, C.L., LIN, M.T. & KITAJIMA, E.W. Infecções simples e mistas dos vírus do mosaico-do-sul e do mosaico-em-desenho em feijão-vagem no Brasil central. *Fitopatologia Brasileira* 7:269-274. 1982.
- FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção de hortaliças. Viçosa. UFV. 2000.
- FULTON, J.P. & SCOTT, H.A. Bean rugose mosaic and related viruses and their transmission by beetles. *Fitopatologia Brasileira* 2:9-16. 1977.
- GALVEZ, G., CARDENAS, M., KITAJIMA, E.W., DIAZ, A. & NIETO, M. Purification, serology, electron microscopy and properties of Ampollado strain of *Bean rugose mosaic virus*. *Turrialba* 27:343-350. 1977.
- GAMEZ, R. Los virus del frijol en Centro América. II. Algunas propiedades y transmisión por crisomélidos del virus del mosaico rugoso del frijol. *Turrialba* 22:249-257. 1972.
- GAMEZ, R. Bean rugose mosaic virus. In: CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 246. 1982. pp.

- HALL, R. (Ed.) Compendium of bean diseases. St. Paul. APS Press. 73p. 1991.
- KITAJIMA, E.W., LIN, M.T., COSTA, C.L. & BATISTA, M.F. Ocorrência do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira* 5:408. 1980.
- LIN, M.T., GÁMEZ, R.G. & KITAJIMA, E.W. Bean "mosaico-em-desenho" virus is a member of the bean rugose mosaic virus serogroup. *Fitopatologia Brasileira* 6:293-298. 1981.
- MARTINS, T.R., ALMEIDA, A.M.R., ALMEIDA, L.A., NEPOMUCENO, A., CHAGAS, C.M. & TOLEDO, J.F.F. Sinergismo observado em plantas de soja infectadas pelos vírus do mosaico comum da soja e do mosaico-em-desenho do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 19:430-436. 1994.
- MEYER, M.C., COSTA, C.L. & SANTOS, O.R. Inter-relações de *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) com quatro virus de leguminosas. *Fitopatologia Brasileira* 17:314-320. 1992.
- RAMIREZ, P., ESPINOZA, A.M., FUENTES, A.L. & LEÓN, P. Physicochemical properties of Bean rugose mosaic virus. *Phytopathology* 77:1317-1321. 1987.
- SPERANDIO, C.A. Caracterização do vírus do mosaico-em-desenho do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). (Tese de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília. 1982.
- TORRES, L.B., MOREIRA, A.G., CASTILLO-URQUIZA, G.P., CARVALHO, M.G., MATSUOKA, K. & ZERBINI, F.M. Detection of an isolate of *Bean rugose mosaic virus* (BRMV) infecting beans in Minas Gerais state. *Virus Reviews and Research* 8:no prelo. 2003.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., CARSTENS, E., ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. & WICKNER, R.B. (Eds.) *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* San Diego. Academic Press. 1162p. 2000.
- VIEIRA, C., PAULA, J.T.J.D. & BORÉM, A. Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas. Viçosa. Imprensa Universitaria. 1998.
- WALLER, J.M. & BRIDGE, J. Effects of pathogen interactions on tropical crop production. In: WOOD, R.K.S. & JELLIS, G.J. (Eds.) *Plant diseases: infection, damage and loss.* Oxford. Blackwell scientific publications. 1984. pp. 311-320
- YOKOYAMA, L.P. *Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção.* Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 2000.

Tabela 1. Calendário das imunizações de coelhos realizadas com as preparações virais purificadas do *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).

Semana	Tipo de injeção	Quantidade de virus injetada (g)	
		Coelho 1	Coelho 2
1 ^a	Intravenosa ^a	110	1000
2 ^a	Intramuscular	100	100
3 ^a	Intramuscular	150	150
4 ^a	Intramuscular	150	150
5 ^a	Intramuscular	200	(-)
6 ^a	Intramuscular	200	(-)

^a Retirados 20 ml de sangue para obtenção de soro pré-imune (“normal”).

Tabela 2. Sintomas constatados em espécies/cultivares de plantas inoculadas via extrato vegetal tamponado com o isolado do *Bean rugose mosaic virus*.

Família	Espécie/cultivar	Sintomas
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>	llc/m*
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	-/-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	-/-
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i> “White Burley”	-/-
Fabaceae	<i>Glycine max</i>	
	cv. Cristalina	-/-
	cv. Bossier	llc/mb
	cv. Bragg	-/mb
	cv. Doko	-/mb
	cv. IAC 12	llc/mb
	cv. Davis	llc/mb
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	
	cv. Jalo	llc/m, na
	cv. Ouro Negro	llc/mb, na
	cv. Manteigão	-/m
	cv. Rainha	-/m, na
	cv. Carnaval	-/mb, na
	cv. Pérola	-/-
	cv. Novirex	llc/m
	cv. Turmalina	-/mb
	<i>Vigna unguiculata</i>	
	cv. Clay	-/-
	cv. Pitiúba	-/-
<i>Vigna radiata</i>	-/-	
<i>Vigna umbellata</i>	-/-	

* Os sintomas em folhas inoculadas/não inoculadas, 30 dias após da inoculação, estão representados por: llc, lesão local clorótica; m, mosaico; mb, mosaico com bolhosidade; na, necrose do ápice; - ausência de sintomas.

Tabela 3. Número e peso de vagens por planta (média de seis plantas) obtidos de plantas de feijoeiro Novirex e Ouro Negro inoculadas com BRMV e BCMV, em diferentes combinações, em condições de casa-de-vegetação.

Cultivar	Tratamento	Número de vagens/planta			Peso de vagens/planta		
		número		% red.**	gramas		% red.
Novirex	BRMV	4,72*	ab	32,95	4,19	cd	65,17
	BCMV	7,0	a	0,57	10,46	ab	13,05
	Simultâneo	6,28	ab	10,79	8,89	abcd	26,10
	BCMV-BRMV 7 dias	6,50	ab	7,67	6,38	bcd	46,97
	BRMV-BCMV 7 dias	4,78	ab	32,1	3,89	d	67,66
	BCMV-BRMV 21 dias	5,61	ab	20,31	9,37	abc	22,11
	BRMV-BCMV 21 dias	3,89	b	44,74	3,69	d	69,33
	Testemunha	7,04	a	-	12,03	a	-
Ouro Negro	BRMV	4,36	ab	20,73	3,73	ab	44,58
	BCMV	3,39	ab	38,36	3,34	ab	50,37
	Simultâneo	4,47	ab	18,72	3,76	ab	44,13
	BCMV-BRMV 7 dias	2,83	ab	48,54	2,08	ab	69,09
	BRMV-BCMV 7 dias	1,0	b	81,81	0,65	b	90,34
	BCMV-BRMV 21 dias	3,14	ab	42,90	3,33	ab	50,52
	BRMV-BCMV 21 dias	1,8	ab	67,27	0,57	b	91,53
	Testemunha	5,5	a	-	6,73	a	-

* Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas, para a cada cultivar, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Porcentagem de redução no número e no peso das vagens em relação à testemunha.

Tabela 4. Porcentagem de plantas de feijoeiro Novirex Ouro Negro, positivas mediante teste de ELISA indireto ao BRMV e BCMV.

Tratamentos	BRMV (%)	BCMV (%)	BRMV/BCMV (%)
cv. 'Novirex'			
Simultâneo	29,4	0	0
BCMV – BRMV 7 dias	27,8	0	5,6
BRMV – BCMV 7 dias	47,1	0	0
BCMV – BRMV 21 dias	22,2	0	0
BRMV – BCMV 21 dias	55,6	0	0
cv. 'Ouro Negro'			
Simultâneo	60	0	0
BCMV – BRMV 7 dias	0	75	0
BRMV – BCMV 7 dias	14,3	57,1	14,3
BCMV – BRMV 21 dias	0	77,8	11,1
BRMV – BCMV 21 dias	7,7	30,8	38,5

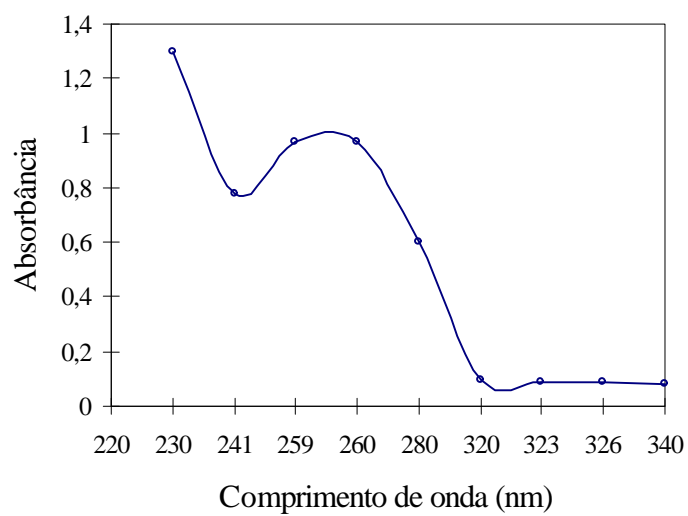


Figura 1. Espectro de absorção de luz ultravioleta da preparação purificada de *Bean rugose mosaic virus* (BRMV).

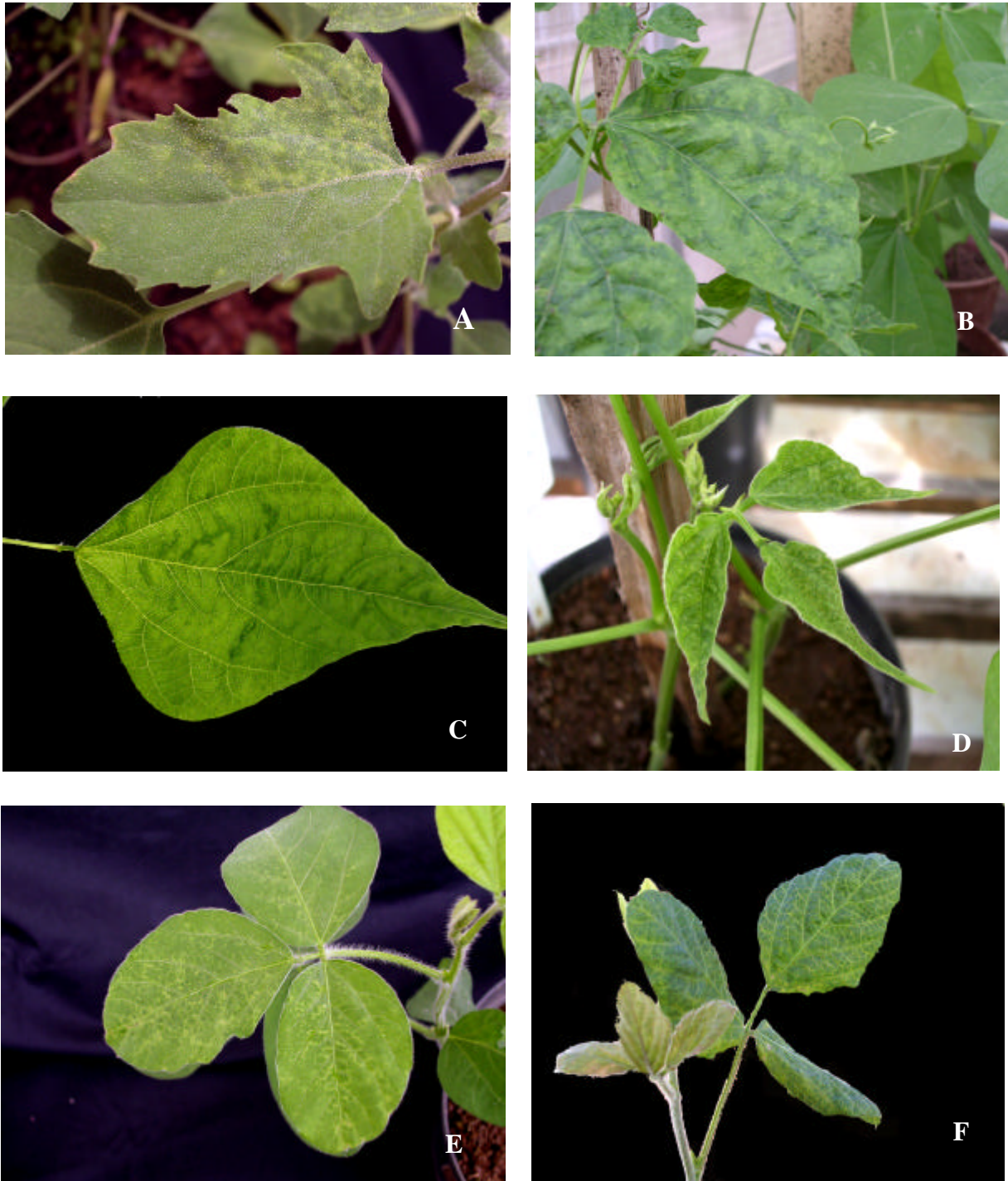


Figura 2. Sintomas em plantas hospedeiras inoculadas via extrato vegetal tamponado com o isolado de BRMV. **A.** Mosaico e leve deformação foliar em *Chenopodium quinoa*. **B.** Mosaico em desenho em *Phaseolus vulgaris* 'Ouro Negro'; **C.** Mosaico suave em *P. vulgaris* 'Novirex'. **D.** Mosaico bolhoso em *P. vulgaris* 'Turmalina'. **E.** Mosaico em *Glycine max* 'IAC-12'. **F.** Mosaico bolhoso e deformação foliar em *G. max* 'Doko'.