



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

ANA KELLY FIRMINO DA SILVA

**VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Cowpea severe mosaic virus* POR MEIO DE
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, SOROLÓGICA E MOLECULAR**

FORTALEZA

2017

ANA KELLY FIRMINO DA SILVA

VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Cowpea severe mosaic virus* POR MEIO DE
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, SOROLÓGICA E MOLECULAR

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Agronomia/Fitotecnia. Linha de Pesquisa: Fitossanidade.

Orientador: Prof. Fernando Antonio Souza de Aragão
Co-orientador: Prof. José Albersio de Araújo Lima

FORTALEZA

2017

ANA KELLY FIRMINO DA SILVA

VARIABILIDADE ENTRE ISOLADOS DE *Cowpea severe mosaic virus* POR MEIO DE
CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA, SOROLÓGICA E MOLECULAR

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora em Agronomia/Fitotecnia. Linha de Pesquisa: Fitossanidade.

Aprovada em: 31/03/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. PhD. José Emilson Cardoso
Embrapa Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Renato Innecco
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Aline Kelly Queiroz do Nascimento
Syngenta

Dr. Francisco de Assis Câmara Rabelo Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S578v Silva, Ana Kelly Firmino da.
Variabilidade entre isolados de Cowpea severe mosaic virus por meio de caracterização biológica, sorológica e molecular / Ana Kelly Firmino da Silva. – 2017.
82 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Fernando Antonio Souza de Aragão .
Coorientação: Prof. Dr. José Albersio de Araújo Lima.
1. *Vigna unguiculata*. 2. Feijão caupi. 3. Metodologia. 4. Diagnose. 5. Sequenciamento. I. Título.
CDD 630|
-

A minha mãe e ao meu pai
Maria de Fátima e Francisco Rosário
Aos meus filhos
Bianca, Luís Felipe e Maria Isabel

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e a graça de perseverar sempre, mesmo diante de dificuldades e obstáculos enfrentados durante todo o percurso da vida acadêmica.

A minha família, que é meu apoio, em especial a minha mãe, que por meio de sua ajuda e intercessão conseguiu ir adiante.

Ao Luís Alex, pelo companheirismo e conselhos, por sua paciência, e pelo incentivo de sempre ir além dos meus limites.

Aos meus pequenos Maria Isabel, Luís Felipe e Bianca, por momentos especiais com cada um deles, muitas vezes espectadores das minhas apresentações, mesmo estudando ou escrevendo estavam lá de vez em quando tirando minha atenção e concentração, mas por eles fui até onde cheguei.

Ao orientador e professor José Albérico de Araújo Lima, por seus ensinamentos e orientação.

Ao prof. Dr. Fernando Aragão pela orientação e sugestões neste trabalho.

Aos membros da banca Prof. Dr. Emilson Cardoso, Dra. Aline Kelly e Dr. Francisco Câmara pela participação e sugestões pertinentes para melhorar este trabalho.

Aos colegas de caminhada acadêmica por bons momentos de estudos e descontrações, em especial: Aline, Ana Lúcia, Everton Nogueira, Elisangela, Fabiana Silva, Gerefeson, Graziela, Laianny, Maciel, Marilena, Maria do Carmo, Natália e Olienaiide.

Ao Dr. Francisco Câmara pela colaboração nas análises molecular.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Agronomia/Fitotecnia pela formação acadêmica e ensinamentos.

Sem esquecer, uma companheira de todas as horas Lidiane, sempre com seu cafezinho e atenção.

A Capes pela concessão de bolsa de estudo, durante o curso de doutorado.

A todos que passaram por meu caminho durante esta jornada acadêmica e que contribuíram de alguma forma direta e indiretamente para realização deste trabalho e também pela formação acadêmica.

RESUMO

O feijão caupi *Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata* constitui um alimento básico das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste, possui grande importância como gerador de emprego e renda, sendo cultivado por pequenos e médios produtores. O Brasil é o maior produtor de feijão [feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e feijão caupi] com produção de 2,5 mil toneladas, na safra de 2015/16, sendo os estados do Paraná e Minas Gerais os maiores produtores de feijão comum, ficando o estado do Ceará na nona posição. Vários fatores afetam a cultura do feijão caupi, influenciando na qualidade e na quantidade produzida, destacando as viroses como responsáveis por grandes perdas na cultura. Várias espécies de vírus podem infectar naturalmente o feijão caupi, destacando-se o *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). O objetivo desta pesquisa foi estudar a variabilidade genética de isolados de CPSMV, de diferentes estados da Região Nordeste, por meio da caracterização biológica, sorológica e molecular. Os experimentos realizados foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará. O isolado de CPSMV-MC foi purificado a partir de plantas de feijão caupi cultivar Macaibo, obtendo uma preparação viral com concentração de 64,83 mg de vírus por Kg de tecido infectado e título do antissoro de 1:1.024, em teste de Dupla Difusão em Ágar (DDA). No estudo biológico, por gama parcial de plantas hospedeiras, mostrou diferença sintomatológica entre o isolado CPSMV-MC e os demais. O resultado do estudo sorológico mostrou que o isolado CPSMV-MC pode ser sorologicamente distinto, quando utilizado antissoro produzido a partir deste isolado. As análises eletroforética revelaram bandas referentes ao peso da proteína capsial, formada por duas proteínas estruturais de aproximadamente 22,5 kDa e de 39 kDa. Estudo de comparação entre PTA-ELISA e IP-PTA-ELISA, variações da técnica de ELISA, mostrou que o IP-ELISA foi eficiente e confiável para a detecção do CPSMV, contornando alguns problemas de vírus do gênero *Comovirus* que não aderem adequadamente aos fundos dos orifícios das placas de ELISA. No estudo molecular, os *primers* desenhados para o genoma parcial de regiões dos RNA1 e RNA2 podem ser utilizados tanto para detecção quanto para sequenciamento do vírus. As análises filogenéticas das sequências dos isolados de CPSMV, utilizando *primers* para a região do RNA1, revelaram diferença entre o isolado CPSMV-MC e os demais, enquadrando os mesmos em dois grupos. Um grupo que causam sintomas severos, agregando sete isolados de CPSMV e o outro grupo com apenas um isolado, que causa sintoma leve (CPSMV-MC) em feijão caupi. O estudo de interação entre vírus que infecta o feijão caupi ‘Setentão’ mostrou forte sinergismo entre CPSMV, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV), levando em alguns casos morte da planta,

principalmente, quando da interação desses três vírus, sendo que dois desse isolados apresentaram sintomas severos nas plantas, quando em infecção simples. Estudos desta natureza, envolvendo aspectos relacionados ao patógeno e a planta produzem informações importantes aos programas que visam o desenvolvimento de cultivares resistentes a vírus.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*. Feijão caupi. Metodologia. Diagnose. Sequenciamento.

ABSTRACT

Cowpea *Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata* is grown as staple food for the rural and urban populations in the North and Northeast regions, has great importance as a generator and income, being cultivated by small and medium producers. Brazil is the largest producer of beans (*Phaseolus vulgaris*) and cowpea, with production of 2.5 thousand tons in the 2015/16 harvest, with the States of Paraná and Minas Gerais the largest producers of common bean, and the State of Ceará in ninth position. Several factors affect cowpea crop, influencing the quality and quantity produced, highlighting the viruses as responsible for large losses in the crop. Several species of virus can naturally infect the cowpea, especially the *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). The objective of this research was to study the genetic variability of CPSMV isolates, from different States of the Northeast Region, through biological, serological and molecular characterization. The experiments were carried out in a greenhouse and in the Plant Virology Laboratory of the University Federal of Ceará. The CPSMV-MC isolate was purified from 'Macaibo' cowpea plants, obtaining a virus preparation with a concentration of 64.83 mg of virus per kg of infected tissue and antiserum titre of 1: 1024 in a Double-Diffusion in Agar test (DDA). The biological study, by partial range of host plants, showed symptomatological difference between the CPSMV-MC isolate and the others. The results of the serological study showed that the CPSMV-MC isolate may be serologically distinct when using antiserum produced from this isolate. The electrophoretic analyzes revealed two bands related to the weight of the capsid protein, formed by structural proteins of approximately 22.5 kDa and 39 kDa. Comparison between PTA-ELISA and IP-PTA-ELISA, variations of the ELISA technique showed that IP-ELISA was efficient and reliable for the detection of CPSMV, suppressing the problems of virus of the genus *Comovirus* that do not adequately adhere to the funds of the ELISA plates. In the molecular study, the primers designed for the partial genome of RNA1 and RNA2 regions could be used for both detection and sequencing of the virus. The phylogenetic analyzes of the sequences of CPSMV isolates, using primers for the RNA1 region, revealed a difference between the CPSMV-MC isolate and the others, and classified them into two groups. One group that causes severe symptoms, adding seven isolates of CPSMV and the other group with only one isolate that causes mild symptom (CPSMV-MC) in cowpea. The study of the interaction between the virus that infects 'Setentão' cowpea showed strong synergism between CPSMV, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV), leading in some cases to death of the plant, mainly when interacting of these three viruses, and two of these isolates showed severe symptoms in the plants, when in simple infection. Studies of this nature, involving aspects

related to the pathogen and the plant produce important information in the programs that aim at the development of resistant cultivars to virus.

Keywords: *Vigna unguiculata*. Cowpea. Molecular Characterization. Diagnosis. Sequencing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Roteiro do processo de purificação de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> isolado de <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Macaibo.....	34
Figura 2	Esquema de desenho dos <i>primers</i> para <i>Cowpea severe mosaic virus</i> representando as regiões do RNA1 e RNA2.....	42
Figura 3-	Plantas de feijão caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) inoculadas com isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV). A- Plantas de feijão caupi ‘Pitiuba’ infectadas com CPSMV isolado do Ceará (CPSMV-CE); B- Plantas de feijão caupi ‘Macaibo’ infectadas com CPSMV isolado da cultivar Macaibo (CPSMV-MC).....	48
Figura 4-	Espectros de absorção ultravioleta das preparações purificadas de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> , isolado Macaibo (CPSMV-MC) obtidos de <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Macaibo.....	49
Figura 5-	Eletroforese em gel de poliacrilamida da preparação purificada do isolado de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> isolado Macaibo (CPSMV-MC), em duas diluições 1:20 e 1:40, corados com Coomassie Azul Brilhante G, metanol e ácido acético glacial. M- Marcador molecular de proteína (Promega – Madison, WI, USA).....	50
Figura 6-	Parte da avaliação do título por Dupla Difusão em Ágar utilizando diluições de antissoro (AS) obtido de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> isolado da cultivar Macaibo. Nos orifícios periféricos estão os extratos foliares obtidos de feijão caupi infectado com os isolados virais: CE- CPSMV- CE, MC- CPSMV- MC; CROT- CPSMV- CROT; PB- CPSMV-PB; PE- CPSMV- PE; AL- CPSMV-AL; RN- CPSMV- RN; PI- CPSMV-PI e Sd- extrato foliar de feijão caupi sadio. Nos orifícios centrais foram preenchidos com AS-MC: A- Diluição 1:2; B- Diluição 1:4 e C- Diluição 1:8.....	52
Figura 7-	Titulação de antissoros obtidos para diferentes isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV), pela técnica de PTA-ELISA. (A) Antissoro obtido para CPSMV-MC, (B) Antissoro obtido para CPSMV-CROT, (C) Antissoro obtido para CPSMV-PE, (D) Antissoro obtido para isolado CPSMV-PB, (E) Antissoro obtido para CPSMV-AL, (F) Antissoro obtido para CPSMV-PI.....	59
Figura 8-	Titulação de antissoros obtidos para diferentes isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV) pela técnica de IP-ELISA. (G) Antissoro obtido para CPSMV-MC, (H) Antissoro obtido para CPSMV-CROT, (I) Antissoro obtido para CPSMV-PE, (J) Antissoro obtido para CPSMV-PB, (K) Antissoro obtido para CPSMV-AL, (L) Antissoro obtido para CPSMV-PI.....	60
Figura 9-	Comparação sorológica entre as técnicas de PTA-ELISA e IP-ELISA, utilizando diferentes antissoros obtidos para isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV) na diluição 1:1.000.....	61
Figura 10-	Árvores Filogenéticas de isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV). Os números correspondem aos valores de bootstrap para 2.000 repetições. (A). Árvore filogenética de uma poliproteína do genoma parcial do RNA1. (B). Árvore filogenética baseado no gene da capa proteica presente no RNA2.....	65

- Figura 11- Comparação entre métodos de extração utilizando reagente comercial *versus* extração com Imunoprecipitação (IP). M-Marcador molecular 1Kb Ladder; SD- Amostra sadia de feijão caupi; 25-100: quantidade inicial de tecido vegetal de feijão caupi infectado com CPSMV-CE..... 66
- Figura 12- Interação com três espécies de vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) em *Vigna unguiculata* cultivar Setentão. A - Sadia e infecção simples com CPSMV; B – Sadia e infecção simples com CABMV; C - Sadia e infecção tripla com CPSMV-CE+ CABMV-BV+CMV e D - Sadia e infecção tripla entre CPSMV-MC+CABMV-BV+CMV..... 71
- Figura 13 Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com ampliações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 1.700 pb, esperado para vírus do gênero *Potyvirus*. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cultivar Setentão; 2 – CABMV-BV, 3- CABMV-Fort, 4 - CPSMV-CE + CABMV- BV, 5 - CPSMV-CE + CABMV-Fort, 6 - CPSMV-MC + CABMV- Bv, 7 - CPSMV-MC + CABMV- Fort, 8 - CABMV-Bv + CMV, 9 - CABMV-Fort + CMV, 10 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 11 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 12 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 13 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV..... 72
- Figura 14- Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com ampliações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 1.085 pb, esperado para CPSMV. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cultivar Setentão; 2 – CPSMV-CE, 3- CPSMV-MC, 4 - CPSMV-CE + CABMV-Bv, 5 - CPSMV-CE + CABMV-Fort, 6 - CPSMV-MC + CABMV-Bv, 7 - CPSMV-MC + CABMV-Fort, 8 – CPSMV-CE + CMV, 9 – CPSMV-MC + CMV, 10 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 11 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 12 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 13 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV..... 72
- Figura 13- Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com ampliações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 500 pb, esperado para CMV. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cultivar Setentão; 2 – CMV, 3 – CPSMV-CE + CMV, 4 – CPSMV-MC + CMV, 5- CABMV-Bv + CMV, 6 – CABMV-Fort, 7 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 8 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 9 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 10 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> coletado em diferentes Estados da Região Nordeste do Brasil.....	31
Tabela 2-	<i>Primers</i> utilizados na PCR para detecção dos isolados virais de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV).....	42
Tabela 3-	Esquema de interação entre CPSMV, CABMV e CMV inoculadas mecanicamente em <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Setentão.....	46
Tabela 4-	Reações sintomatológicas e resultadas de dupla difusão em ágar em diferentes espécies de plantas inoculadas com isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV-CE e CPSMV-MC).....	56
Tabela 5-	Determinação do título de antissoro de isolado de <i>Cowpea severe mosaic virus</i> obtido em diferentes anos.....	55
Tabela 6-	Combinação dos <i>primers</i> utilizados para detecção e sequenciamento do <i>Cowpea severe mosaic virus</i>	62
Tabela 7-	Reações sintomatológicas da infecção mista entre <i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> (CABMV-BV e CABMV-Fort) x <i>Cowpea severe mosaic virus</i> (CPSMV-CE e CPSMV-MC) x <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) em <i>Vigna unguiculata</i> cultivar Setentão.....	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Feijão caupi.....	16
2.2	Aspectos fitossanitários do feijão caupi.....	18
2.3	Métodos de diagnose.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Origem e manutenção dos isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i>	31
3.2	Purificação química do isolado viral de CPSMV-MC.....	32
3.3	Obtenção de antissoro policlonal para o isolado de CPSMV.....	35
3.4	Caracterização Biológica e Sorológica.....	35
3.4.1	<i>Gama de plantas hospedeiras.....</i>	36
3.4.2	<i>Avaliação de título e especificidade dos antissoros e antígenos.....</i>	36
3.4.2.1	<i>Determinação do título de antissoro por Dupla Difusão em Ágar.....</i>	37
3.4.2.2	<i>Determinação do título de antissoro por PTA-ELISA e IP-ELISA.....</i>	37
3.5	Caracterização Molecular.....	39
3.5.1	<i>Desenho de primers específicos para CPSMV.....</i>	39
3.5.2	<i>Análise molecular de isolados de CPSMV obtidos de feijão caupi.....</i>	41
3.5.2.1	<i>Extração de RNA total e RT-PCR.....</i>	41
3.5.2.2	<i>Sequenciamento e análise filogenética.....</i>	43
3.5.3	<i>Comparação entre técnicas de extração.....</i>	43
3.6	Interações entre espécies de vírus que infectam o feijão caupi.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Origem e manutenção dos isolados de <i>Cowpea severe mosaic virus</i>	48
4.2	Purificação química do isolado viral de CPSMV-MC.....	49
4.3	Obtenção de antissoro policlonal para o isolado de CPSMV.....	50
4.4	Caracterização Biológica e Sorológica.....	52
4.4.1	<i>Gama de plantas hospedeiras.....</i>	52
4.4.2	<i>Avaliação de título e especificidade dos antissoros e antígenos.....</i>	55
4.4.2.1	<i>Determinação do título de antissoro por Dupla Difusão em Ágar.....</i>	55
4.4.2.2	<i>Determinação do título de antissoro por PTA-ELISA e IP-ELISA.....</i>	56
4.5	Caracterização Molecular.....	62

4.5.1	<i>Desenho de primers específicos para CPSMV.....</i>	6
4.5.2	<i>Análise molecular de isolados de CPSMV obtidos de feijão caupi.....</i>	63
4.5.2.1	<i>Extração de RNA total e RT-PCR.....</i>	63
4.5.2.2	<i>Sequenciamento e análise filogenética.....</i>	63
4.5.3	<i>Comparação entre técnicas de extração.....</i>	66
4.6	<i>Interações entre espécies de vírus que infectam o feijão caupi.....</i>	68
5	CONCLUSÕES.....	74
	REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira vem passando por grandes mudanças tecnológicas. A globalização do agronegócio tem proporcionado reflexos na cadeia produtiva de várias culturas, principalmente daquelas que dependem do uso de grande volume de insumos. As culturas vêm tendo um custo de produção mais elevado a cada ano e, em consequência disso, os produtores têm buscado novas opções para seus arranjos produtivos (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

O Brasil está entre os principais produtores do mundo de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subespécie *unguiculata*]. O feijão caupi é uma leguminosa muito utilizada como alimento básico, sobretudo na região Nordeste onde é considerado uma das principais fontes de proteína vegetal e importante componente da dieta da população, além de gerador de emprego e renda para a região. Possui alto valor protéico, além de ser rico em minerais e fibras, e constituir um componente alimentar básico das populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste. A cultura do feijão caupi apresenta vários nomes populares conhecido como feijão-de-corda ou feijão macassar na região Nordeste, sendo o primeiro o mais usado no estado do Ceará e feijão-da-colônia ou feijão-de-praia na região Norte, variando de região para região e até mesmo dentro do mesmo estado (BERTINE *et al.*, 2009; FREIRE FILHO *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2014).

Na região Nordeste, a produção tradicionalmente concentra-se nas áreas semiáridas, onde outras culturas leguminosas anuais, em razão da irregularidade das chuvas e das altas temperaturas não se desenvolvem satisfatoriamente (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). A cultura é considerada de importância estratégica para subsistência de pequenos produtores, incluindo associações de agricultores familiares e como opção para os grandes produtores.

Muitos fatores podem afetar a produtividade do feijão caupi, destacando-se a incidência de doenças infecciosas causadas por fitopatógenos como fungos, vírus e nematoides (CARDOSO, 2000). As viroses têm sido responsáveis por grandes prejuízos, uma vez que a cultura assume relevância econômica e social tanto para o Nordeste quanto para o Norte. Vários pesquisadores apontam as viroses como um dos fatores responsáveis por grandes prejuízos da cultura, ocasionando perdas acentuadas na sua produção em diferentes partes do mundo (HAMPTON *et al.*, 1997; LIMA, 1978; LIMA *et al.*, 1991, 2005a). No Estado do Ceará, as doenças de etiologia viral têm sido consideradas como um dos principais

problemas fitopatológicos do feijão caupi, provocando elevadas reduções na sua produtividade (LIMA *et al.*, 1981, 1991, 2003).

Entre os principais vírus que infetam o feijão caupi no Ceará, destacam-se as espécies das seguintes famílias e gêneros: família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*, *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV); família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, estirpe Cowpea (CABMV-C), família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*, *Cucumber mosaic virus* (CMV) e família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV) (LIMA *et al.*, 2005a, LIMA, 2015). Levantamentos efetuados por Lima e Nelson (1974) mostraram o CPSMV como sendo o vírus mais prevalecente sobre o feijão caupi no Ceará, na década de 1970. Portanto estudos acerca da ocorrência dos vírus que infectam o feijão caupi são de grande importância para que se possam estabelecer as medidas mais adequadas de controle (FREITAS *et al.*, 2012).

Diante do exposto e devido à importância socioeconômica da cultura do feijão caupi para a Região Nordeste, esta pesquisa teve como objetivo estudar as características biológicas, sorológicas e moleculares de isolados de CPSMV visando avaliar diferenças entre os isolados coletados em diferentes Estados da Região Nordeste. E avaliar, também, a infecção mista de espécies de vírus que infectam o feijão caupi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Feijão caupi

Originário da África o feijão caupi foi introduzido no Brasil no final do século XVI pelos colonizadores espanhóis e portugueses. A entrada se deu pelo estado da Bahia, sendo levado pelos colonizadores para outras áreas da região Nordeste e para outras regiões do país (FREIRE FILHO *et al.*, 2005; 2011). Esta leguminosa apresenta ampla adaptação edafoclimática, o que permite seu cultivo durante todo o ano, em quase todas as unidades da federação brasileira, nas diferentes épocas e safras (SALVADOR, 2014).

No mundo, o feijão caupi ocupa uma área estimada de 12,5 milhões de hectares, com uma produção mundial média entre o período de 2010 a 2013 de 23,3 milhões de toneladas. Os principais países produtores de feijões secos e que juntos respondem por 52% da produção média mundial são: Índia (14%), Mianmar (13%), Brasil (11%), EUA (4%), China e México (4%) e Tanzânia (3%) (SALVADOR, 2015).

O feijão caupi é uma planta herbácea, dicotiledônea, autógama, anual que pertence à ordem Fabales, família Fabaceae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*. Apresenta folhas trifolioladas, são raramente pubescentes. O porte varia de ereto até prostrado e hábito de crescimento determinado ou indeterminado. As plantas que apresentam hábitos de crescimento determinado param de crescer após emissão da inflorescência na extremidade da haste principal, por outro lado, as plantas com crescimento indeterminado os ramos continuam crescendo até o fim do ciclo e não produzem inflorescência terminal. Apresentam ciclo precoce quando a maturidade é atingida até 60 dias após a semeadura, ciclo médio: a maturidade é atingida 60 e 90 dias após a semeadura e ciclo tardio: a maturidade é atingida acima de 90 dias após a semeadura (BARROS, 2010; FREIRE FILHO *et al.*, 2011; LIMA, 2015).

A cultura do feijão caupi possui baixa exigência hídrica e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade e, por meio da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que possui a habilidade de fixar nitrogênio do ar. Pelo seu valor nutritivo, o feijão caupi é cultivado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, para o consumo humano, *in natura*, na forma de conserva ou desidratado. Além disso, feijão caupi também é utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, como adubação verde e proteção do solo (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2002).

O clima constitui fator preponderante no desenvolvimento das plantas, visto que determina condições para a manutenção da dinâmica da vida. O caupi necessita de um mínimo de precipitação em torno de 300 mm para uma produção satisfatória, embora seja considerada uma planta relativamente adaptada à seca, reagindo a diferentes níveis de estresse ao longo dos diversos estádios de desenvolvimento (CARDOSO *et al.*, 2000; PINHO *et al.*, 2005).

As deficiências hídricas iniciais podem afetar sensivelmente o processo germinativo e estimular um maior desenvolvimento radicular das raízes, porém estresse hídrico próximo ao florescimento pode ocasionar severa retração do crescimento vegetativo limitando a produção. O bom desenvolvimento da cultura ocorre na faixa de temperatura entre 18 a 37°C, altas temperaturas prejudicam o crescimento e o desenvolvimento da planta. (CARDOSO *et al.*, 2000). O feijão, por suas características de ciclo curto e tolerância ao estresse hídrico, ocupa essencial relevância no cenário da produção agrícola (FROTA; PEREIRA, 2000).

No Brasil, várias espécies de feijão são cultivadas, mas somente as espécies de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão caupi são considerados feijão pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não havendo divisão entre os dados estatísticos do feijão comum e os do feijão caupi, sendo essas duas espécies as mais importantes social e economicamente para o país. Na região Nordeste, a produção concentra-se nas áreas semiáridas, porém por ser uma espécie adaptada às condições tropicais e subtropicais, produz bem em todas as regiões do país. Para fins de preços mínimos de garantia, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) classifica em duas tipificações: feijão anão (feijão comum) e feijão macassar (feijão caupi). O feijão anão é cultivado em todo o território nacional. O cultivo do feijão macassar, ou caupi, está localizado principalmente nas regiões Nordeste e Norte. O cultivo dessa leguminosa é realizado em três safras, sendo a primeira denominada “safra das águas”, a segunda “safra da seca” e a terceira “safra de outono/inverno”. (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; SALVADOR, 2014).

A produção de feijão caupi concentra-se nas regiões Nordeste e Norte do país, no entanto, a cultura está conquistando espaço na região Centro-Oeste, em razão do desenvolvimento de cultivares com características que favorecem o cultivo mecanizado (DAMASCENO e SILVA, 2017).

O feijão caupi possui grãos de alto valor biológico alimentar, devido ao seu elevado teor protéico, sendo cultivado principalmente por agricultores familiares, quer como cultura de subsistência ou comercial nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, adaptando-se bem às adversidades climáticas e edáficas, em virtude das suas características de rusticidade e precocidade (DANTAS *et al.*, 2002)

O feijão caupi representa excelente alternativa para o cultivo, em rotação ou em consórcio com outras culturas, uma vez que permite a incorporação de nitrogênio no sistema por meio de simbiose com bactérias fixadoras que nodulam em suas raízes (GONÇALVES *et al.*, 2009).

O feijão caupi tem uma grande importância, tanto como alimento quanto gerador de emprego e renda. É uma excelente fonte de proteína (23% - 25%, em média), e apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%, em média), vitaminas, minerais, fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2%, em média) e não contém colesterol, constituindo um componente básico das populações rurais e urbanas da região Norte e Nordeste (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2002; FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Nas áreas urbanas não metropolitanas do Nordeste, o caupi contribui com 41% do feijão consumido, constituindo-se no alimento básico para a população, exercendo a função de supridor das necessidades alimentares das camadas carentes. Suas propriedades nutricionais, relativamente superiores às do feijão comum, além do baixo custo de produção, fazem com que esta cultura seja socialmente e economicamente importante para a região (DANTAS *et al.*, 2002).

2.2. Aspectos fitossanitários do feijão caupi

Os vetores de vírus de plantas são na sua maioria, artrópodes, principalmente insetos (e alguns ácaros), mas também incluem nematoides e fungos plasmodioforídeos. A ordem de insetos *Hemiptera* constitui o grupo mais comum e concentram grande parte de vetores de vírus de planta (CARVALHO; COSTA, 2015).

Os insetos geralmente atacam as culturas no momento em que o estágio fenológico da planta está produzindo o alimento ideal para eles. O conhecimento da relação inseto-planta é importante para o monitoramento do nível populacional de uma praga visando o manejo (SILVA; CARNEIRO, 2000; SILVA *et al.*, 2005).

De acordo com o local de ataque na planta, as pragas podem ser agrupadas em: pragas subterrâneas, pragas de parte aéreas: pragas das folhas, pragas dos órgãos reprodutivos e pragas dos grãos armazenados (SILVA, 2005).

Os insetos-pragas são considerados um fator limitante por afetar a produção, produtividade, sanidade da planta e do grão, afetando o rendimento agrônômico da cultura, causando danos diretos e indiretos (SILVA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2013).

Dentre os insetos pragas do feijão caupi, a vaquinha *Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcauta* (Coleoptera: Chrysomelidae), pulgão preto *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphididae), mosca branca *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae), se destacam por serem vetores de vírus (LIMA, 2015; BLEICHER; SILVA, 2017).

O controle de insetos vetores por meio de inseticidas pode não ser efetivo para impedir o estabelecimento da doença, mas pode inibir a disseminação, e de qualquer forma só é efetivo para aqueles vírus de relação circulativa com os seus vetores. É importante conhecer o tipo de relacionamento entre vírus e vetor (CARVALHO; COSTA, 2015).

Poucos são os ingredientes ativos registrados para eventual uso na redução de pragas que ocorrem no caupi, além do mais, uma opção de controle pode ser eficiente na redução de determinada praga, porém pode não ser eficaz para resolver o problema (BLEICHER; SILVA, 2017).

O uso de inseticidas eficientes para o controle de outros vírus é ineficiente para o controle de vírus transmitidos por afídeos de forma não persistente, incluindo o CABMV e CMV em feijão caupi, em virtude da rapidez com que tais vírus são adquiridos nas plantas infectadas e inoculadas em plantas saudáveis, já que o vírus pode ser transmitido até na picada de prova. Embora os vetores morram algum tempo após terem se alimentado em plantas tratadas, a transmissão de forma não persistente não é evitada, pois a maioria dos inseticidas age no sistema nervoso central do inseto, o que estimula bastante o inseto antes de morrer e faz com que a eficiência de transmissão seja maior e assim o inseto pica mais vezes e transmite mais o vírus (CARVALHO; COSTA, 2015; LIMA, 2015).

As doenças do feijão caupi têm provocado perdas expressivas no processo de produção, sendo um dos principais fatores limitantes da cultura (SOBRINHO *et al.*, 2000). Dentre os vários fatores que limitam a produção do feijão caupi no Brasil encontram-se as doenças causadas por agentes patogênicos, as quais influenciam na qualidade e na quantidade do produto. Vários são os patógenos que afetam a produtividade do feijão caupi, entre eles estão os vírus, fungos, bactérias e nematoides (BARROS, 2010; LIMA, 2015).

As doenças causadas por fungos têm sua importância relacionada com a região, a forma de cultivo e a época de colheita, destacando entre elas as podridões causadas por *Rhizoctania soloni*, a antracnose, (*Colletotrichum gloesporioides*), a cercosporiose (*Pseudocercospora cruenta*) e a murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* sp. *Tracheiphilum*) (LIMA, 2015). O crestamento bacteriano causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* constitui a doença bacteriana de maior importância para o feijão caupi devido sua frequência e severidade (PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

Das espécies de nematoides associadas ao feijão-caupi no Brasil, apenas o gênero *Meloidogyne*, conhecido como nematoides das galhas é considerado limitante para cultura por debilitar a planta, induzindo o abortamento de flores e vagens novas (PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

As viroses têm sido responsáveis por grandes prejuízos da cultura, ocasionando perdas acentuadas e até causar perda total da produção (BARROS, 2010; LIMA *et al.*, 2005a).

O feijão caupi pode ser infectado por mais de 20 espécies de vírus de diferentes famílias e/ou gêneros (HAMPTON *et al.*, 1997). Entre os principais vírus que infetam o feijão caupi no Ceará, destacam-se as espécies das seguintes famílias e gêneros: família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*, *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV); família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*, *Cucumber mosaic virus* (CMV) e família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*, *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV) (LIMA, 2015). Na Região Nordeste, essas viroses continuam sendo os principais fatores limitantes a produção de feijão caupi (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

Levantamentos efetuados por Lima, Nelson (1974) mostraram o CPSMV como sendo o vírus mais prevalente sobre o feijão caupi no Ceará, na década de 1970. Posteriormente, LIMA *et al.* (1981) isolaram um vírus do gênero *Potyvirus* em plantas de feijão caupi cultivadas no Ceará e o identificaram como uma possível estirpe do CABMV, sendo também responsáveis por danos e perdas no feijão caupi se tornando uma das viroses mais difundida no Ceará e estados vizinhos (LIMA *et al.*, 1984; LIMA *et al.*, 1991).

Uma possível estirpe do CABMV foi isolada de plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.), com sintomas de mosaico, distorção foliar, clorose e atrofiamento, em áreas experimentais de feijão caupi, em Quixadá, CE, sendo capaz de infectar o feijão caupi em experimentos de casa de vegetação (LIMA *et al.*, 1991). SREENIVASULU *et al.* (1994) isolaram na Flórida (USA) um outro vírus do gênero *Potyvirus* de plantas de gergelim, com

clorose de nervuras, mosaico e enrolamento foliar, capaz de infectar experimentalmente o feijão caupi o qual mostrou sorologicamente relacionado ao *Blackeye cowpea mosaic virus* (BLCMV), sendo atualmente considerado estirpe do *Bean common mosaic virus* (BCMV), da família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*. Um vírus isolado de *Clitoria ternatea* L., no Estado do Ceará, mostrou-se sorologicamente relacionado ao BLCMV e foi capaz de infectar experimentalmente mais de 10 genótipos de feijão caupi (FLORINDO; LIMA, 1991; LIMA *et al.*, 1993).

Os vírus são patógenos que merecem atenção especial devido às grandes reduções que causam na cultura, portanto é importante ter um diagnóstico correto e definitivo das fitomoléstias causada por vírus, pelo fato destes patógenos serem de difícil controle.

Além das infecções causadas por vírus isoladamente, infecções mistas ou coinfeções são comuns em muitas espécies de plantas cultivadas, constituindo-se, portanto, em fatores responsáveis por mudança no curso das doenças. São muitos os exemplos existentes em que vírus não relacionados, capazes de infectar e se multiplicar independentemente, interagem quando juntos na mesma planta. Nas infecções mistas podem ocorrer relações sinérgicas ou antagônicas, levando a alterações nos sintomas da doença, na movimentação sistêmica dos vírus e aumento ou diminuição da concentração dos vírus na planta (LIMA, 2015; MATTHEWS, 1981; SANTOS *et al.*, 1999).

As viroses vegetais causadas por infecção mista de dois ou mais vírus não relacionados, normalmente envolvem espécies do gênero *Potyvirus*, sendo exemplos clássicos a interação do *Potato virus X* (PVX) gênero *Potexvirus* com várias espécies do gênero *Potyvirus*, incluindo *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) e *Tobacco etch virus* (TEV), infectando espécies de *Nicotiana* e diversas outras solanáceas. O fenômeno de sinergismo foi observado nessas interações, onde a severidade dos sintomas é maior do que a adição dos efeitos dos vírus isolados (FREITAS *et al.*, 2010; 2012).

Estudos acerca da ocorrência dos vírus que infectam o feijão caupi são de grande importância para que se possam estabelecer as medidas mais adequadas de controle (FREITAS *et al.*, 2012).

Principais viroses que infectam o feijão caupi no Estado do Ceará

Mosaico de Potyvirus – *Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)*

Os vírus responsáveis pelo Mosaico de Potyvirus pertencem a família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus* que constitui um dos grupos taxonômicos de vírus com o maior número de espécies que infectam plantas. No Brasil, há relatos de ocorrência do CABMV em feijão caupi desde 1974, estando atualmente distribuído nas principais regiões produtoras do país (LIMA, 2015; PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

O gênero *Potyvirus* possui partículas filamentosas e flexuosas medindo de 680-900 nm de comprimento por 11-14 nm de diâmetro, genoma de RNA de hélice simples senso positivo, é transmitido mecanicamente, por sementes de plantas sistemicamente infectadas, no entanto na natureza os afídeos são seus principais vetores. Os vírus do gênero *Potyvirus* são transmitidos de forma não-persistente, por diferentes espécies de afídeos, destacando-se *Aphis craccivora* Koch como principal vetor dos isolados de CABMV que infectam o feijão caupi (LIMA, 2015; PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

Os sintomas de CABMV em plantas de feijão caupi podem variar em função da cultivar envolvida, época e forma de inoculação. Em geral, os sintomas são: mosqueado, mosaico, clorose, manchas cloróticas, bolhosidade, deformação foliar e redução no crescimento das plantas (LIMA, 2015).

As medidas de controle dessas viroses são as que visam reduzir fontes de inóculo, dentro e fora dos plantios: uso de variedades resistentes e de sementes livres de vírus e, algumas práticas culturais apropriadas.

Mosaico leve – *Cucumber mosaic virus (CMV)*

O mosaico leve embora não ocasione significativa redução no crescimento e no desenvolvimento das plantas infectadas é considerado problema em potencial em razão do CMV possuir ampla gama de cultivares de caupi suscetíveis e interagir sinergicamente com vírus do gênero *Potyvirus*. O CMV é considerado um vírus importante economicamente, por sua ampla gama de plantas hospedeiras que inclui espécies de leguminosas e cucurbitáceas de importância econômica (LIMA, 2015; PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

O CMV é a espécie tipo do gênero *Cucumovirus*, da família (*Bromoviridae*), apresenta partículas poliédricas, com 28-30 nm de diâmetro. Possui genoma dividido em três espécies de RNA de hélice simples, senso positivo (KING *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2015). O CMV pode ser transmitido mecanicamente por extrato de plantas infectadas e na natureza por afídeos de forma não-persistente (LIMA *et al.*, 2005a).

Os sintomas causados por CMV são mosaico leve e manchas anelares sistêmicas em algumas cultivares suscetíveis de feijão caupi. Quando em infecção mista com espécies do gênero *Potyvirus*, o CMV interage de forma sinérgica, ocasionando o nanismo, que apresenta mosaico intenso, distorção foliar, e em determinadas cultivares, necrose sistêmica (LIMA, 2015; PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

As principais estratégias de controle para o CMV devem ser fundamentadas no uso de variedades resistentes, devido o difícil controle do inseto vetor pelo caráter não-persistente de transmissão. Fontes de resistência a mais de uma espécie de vírus constituem alternativas para a obtenção de novas cultivares resistentes (LIMA *et al.*, 2011, LIMA, 2015).

Mosaico dourado – *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV)

As geminiviroses constituem um grupo de importantes doenças em diversas espécies vegetais constituindo um dos principais problemas fitossanitários de muitas culturas agrícolas em todo o mundo (ASSUNÇÃO *et al.*, 2006; LIMA, 2015). O CGMV foi relatado no Brasil em 1983 em feijão caupi (LIMA, 2015).

O vírus responsável pelo Mosaico dourado do feijão (CGMV) pertence à família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*. Os vírus do gênero *Begomovirus* possuem genoma bipartido, apresentando morfologia icosaédrica, incompleta e geminada, composta por duas moléculas de DNA circular de fita simples, denominadas DNA-A e DNA-B, cada uma com aproximadamente 2.500 a 2.600 nucleotídeos. (ZERBINI *et al.*, 2006; KING *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2012). São transmitidos, naturalmente, por mosca branca *Bemisia tabaci* na modalidade persistente-circulativa. Há relatos de sua passagem transestadial e de transmissão à progênie (transovariana), o que torna o vetor importante na disseminação e manutenção do vírus nas lavouras (SANTOS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2010).

As plantas infectadas apresentam sintoma de mosaico amarelo brilhante, bem característico e que pode ser facilmente identificado no campo. A redução na produção pode atingir até 75% (FREITAS *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2005a).

Infecções com mais de um begomovírus são comuns no campo, favorecendo o surgimento de novas espécies devido a eventos de mutação, recombinação e pseudo-recombinação, levando o surgimento de novas estirpes ou espécies mais adaptadas a novos hospedeiros (ROCHA, 2011).

Mosaico severo - *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)

A partir de 1947, o mosaico severo vem sendo observado em todas as regiões do território nacional onde o feijão caupi é cultivado, registrando-se maior ou menor perda quantitativa ou qualitativa da produção, na dependência da interação de fatores como: estirpe do vírus, cultivar empregado, idade em que as plantas foram infectadas e abundância de hospedeiros naturais e vetores do vírus presentes na área de cultivo. A distribuição geográfica desta doença inclui, além do Brasil, os Estados Unidos, Trinidad, Porto Rico, El Salvador, Venezuela, Costa Rica, Suriname e Peru (BOOKER *et al*, 2005; CAMARÇO *et al*, 2009; PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 1997).

O CPSMV pertence à família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*, as partículas possuem forma isométricas com aproximadamente 28 nm de diâmetro, possui genoma bipartido, constituído por duas moléculas de RNA de fita simples, senso positivo de 6,0 Kb (RNA-1) e 3,73 Kb (RNA-2) mais a região Vpg e Poly A. Ambas as moléculas de RNA são necessárias para a infecção, embora sejam encapsidadas em partículas distintas. Uma terceira partícula sem ácido nucléico é normalmente produzida durante o processo de infecção. As estruturas dos capsídeos são formadas por duas proteínas estruturais de 22 kDa e de 42 kDa, aproximadamente. A maioria dos vírus do gênero *Comovirus* infectam, naturalmente, a leguminosa, são transmitidos por coleópteros, principalmente das espécies da família *Chrysomelidae* de forma semi-persistente. É transmitido facilmente por inoculação mecânica e a transmissão por sementes varia de 3 e 10% (PIO-RIBEIRO, ASSIS FILHO, 1997; HULL, 2009; KING *et al.*, 2011).

Os sintomas apresentados por plantas de feijão caupi infectadas pelo CPSMV, são geralmente severos nas cultivares suscetíveis. Quando os sintomas ocorrem em plantas jovens, os sintomas são mais drásticos e visíveis em todas as partes aéreas da planta, causando inclusive necrose da extremidade superior do caule, morte dos brotos terminais e queda prematura das folhas. Os sintomas nas folhas são: manchas cloróticas e necróticas, mosaico severo, distorção foliar, redução da lâmina foliar, bolhosidade, necrose sistêmicas e mortes de

algumas cultivares. Os danos na produção são bastante significativos, dependendo da cultivar envolvida e da época da inoculação (LIMA *et al.*, 2001; LIMA, 2015).

Devido à severidade da doença e da inexistência de compostos químicos para o controle de virose vegetais, o uso de medidas preventivas se destina a reduzir fontes do inóculo dentro e fora dos plantios, tais como: uso de sementes certificadas, erradicação de fontes de vírus, controle de vetores e uso de cultivares resistentes (FREIRE FILHO *et al.*, 2001; LIMA, 2015).

Dentre as práticas efetivas para o manejo das doenças do caupi, destaca-se o uso de variedades resistentes aos diferentes isolados do CPSMV (LIMA, 2015; PIO RIBEIRO *et al.*, 2016).

Estudos voltados para identificação de fontes de resistência e desenvolvimento de cultivares resistente a vírus são de grande importância por ser uma estratégia eficiente de controle de viroses. Alguns genótipos têm sido usadas como fontes de resistência no programa de melhoramento de feijão caupi como as cultivares CNC 0434, Macaíbo e TVu 612, que participaram dos primeiros cruzamentos e deram origem a algumas das cultivares lançadas comercialmente e a linhagens que continuam sendo usadas como parentais. (FREIRE-FILHO *et al.*, 2001; ASSUNÇÃO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2012).

2.3. Métodos de diagnoses

Para o manejo e controle efetivo das viroses o passo inicial mais importante é a correta identificação do vírus em questão, ou diagnose. Diversos tipos de testes e técnicas de diagnose disponível, em geral o teste de diagnóstico ideal deve ser rápido, preciso e custos reduzidos (DIANESE; MEDEIROS, 2015) Entretanto a rapidez e precisão do teste geralmente são inversamente proporcionais ao seu custo. Testes biológicos são precisos e de custo reduzido, porém o tempo necessário para diagnose é longo, levando até semanas. Os testes sorológicos e moleculares proporcionam respostas rápidas (horas) e precisas, mas a um custo bem elevado (ZERBINE Jr *et al.*, 2006).

Vários são os métodos utilizados para se chegar a um diagnóstico correto e definitivo de uma doença causada por vírus divididos em: biológicos, baseados nas propriedades biológicas dos vírus; sorológicos, baseados na detecção da proteína capsial do

vírus e moleculares, baseados na detecção do ácido nucléico viral (ZERBINE Jr *et al.*, 2006; LIMA *et al.*; 2015).

Vários métodos são descritos na literatura, serão discutidos apenas os métodos utilizados neste estudo.

Teste Biológico

Gama Parcial de Plantas Hospedeiras

Consiste na inoculação mecânica (por meio de extrato vegetal infectado) ou natural (por meio de vetores) de vírus em uma série de espécies e variedades de plantas, que apresentam sintomas característicos para determinado vírus ou grupo de vírus, em condições controladas de casa de vegetação. O diagnóstico é feito com base na comparação dos sintomas observados com aqueles relatados na literatura. O teste de gama de hospedeiros proporciona resultados bastante preciso, seu custo é reduzido, pois basta apenas um espaço em casa de vegetação para o cultivo de plantas e material para inoculação. Embora auxilie bastante na identificação e na caracterização biológica dos vírus, em razão das variações naturais resultantes da ação de fatores ligados ao vírus, às plantas e às condições climáticas, o estudo de gama de plantas hospedeiras raramente deve ser usado como único método para diagnóstico conclusivo. Além do tempo longo para a observação dos resultados, o número de espécie de vírus aumentou logaritmicamente, impossibilitando sua identificação por esse método (ZERBINE Jr *et al.*, 2006; DIANESE; MEDEIROS, 2015; LIMA *et al.*; 2015).

Testes Sorológicos

Dupla Difusão em Ágar

O teste de dupla difusão em ágar (DDA) baseia no fato dos reagentes Anticorpo (Ac) e Antígeno (Ag), depois de depositados nos orifícios aberto em meio ágar, difundirem-se radialmente, dentro do meio. O Ac e o Ag difundem-se radialmente em direção um do outro, encontrando-se em um determinado ponto entre os dois orifícios em que foram depositado. Ao se encontrarem e caso haja especificidade entre Ac e Ag, as linhas de precipitação serão formadas. Nos testes de rotina, o orifício central destina-se ao antissoro e os periféricos aos diferentes antígenos. A correta interpretação das linhas de precipitação formadas possibilita a identificação dos vírus e a determinação dos seus relacionamentos sorológicos (ALMEIDA; LIMA, 2001; LIMA *et al.*; 2015).

Quando vários antígenos distintos são testados contra o mesmo anticorpo em um teste de DDA, o relacionamento sorológico entre os antígenos pode ser determinado com base no padrão de formação de bandas. Antígenos idênticos produzirão bandas que se unem perfeitamente. Antígenos sorologicamente distintos, porém relacionados, produzirão bandas e esporão. Antígenos não relacionados com os anticorpos não produziram bandas (ZERBINE Jr *et al.*, 2006).

O teste de DDA, embora não muito sensível, ainda é usado na avaliação de títulos dos antissoros, na diagnose viral de rotina e no estudo de relacionamento sorológico de estirpes de um mesmo vírus ou mesmo entre espécies de vírus de um mesmo grupo taxonômico (LIMA *et al.*; 2015).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O teste ELISA é o principal teste sorológico e inúmeras variações desse teste podem ser encontradas no mercado e na literatura ajustadas a fins específicos. É um teste altamente sensível e específico que possibilita detectar partículas de vírus em baixas concentrações, podendo ser usado com vírus de diferentes características morfológicas. Esse teste é usado numa ampla gama de situações, especialmente, na indexação de grande número de amostras em curto período de tempo devido a sua elevada sensibilidade, adaptabilidade, especificidade e economia no uso de reagentes (DIANESE; MEDEIROS, 2015; LIMA *et al.*; 2015).

O teste baseia-se numa reação enzimática que amplia a reação sorológica, aumentando em muito sua sensibilidade. O teste é realizado, normalmente, em placa de polisterina com 96 orifícios, através da adição dos reagentes antígenos e antissoros contendo os anticorpos, nos orifícios das placas, numa sequência que envolve vários estágios (descrito no material e métodos). Devido á grande sensibilidade do teste, o método permite o uso de antissoro altamente diluído, permitindo dessa forma quantidades de antissoro muito reduzidas. Na etapa final, as reações específicas Ag-Ac, são detectadas, quando após adição do substrato reconhecido pela enzima em questão, ocorrem mudanças no substrato incolor para uma reação visível (em geral resulta num produto de cor amarela). É sempre recomendada a inclusão de um antígeno homólogo ao anticorpo específico para o vírus e extrato de plantas sadias para comparação das leituras de absorção e interpretação correta dos resultados (ZERBINE Jr *et al.*, 2006; LIMA, 2015).

O teste de PTA-ELISA, também conhecido como ELISA indireto foi desenvolvida, a fim de evitar o inconveniente e a dificuldade de conjugar a enzima com as IgGs específicas para cada vírus. Por esta razão, o teste ELISA indireto requer anticorpos produzidos em dois animais diferentes. Este teste é menos sensível e menos específico que o DAS-ELISA. Entretanto, sua maior simplicidade torna-o vantajoso. Sua menor especificidade é convertida em vantagens, uma vez que um mesmo conjugado universal pode ser usado para detectar uma ampla gama de vírus de plantas, tornando-se prática e apropriada para detecção de vírus em programas de indexação de viroses vegetais e de quarentena (ZERBINE Jr *et al.*, 2006; LIMA *et al.*; 2015).

Immune Precipitation-ELISA (IP-ELISA)

Devido aos problemas das partículas virais do gênero *Comovirus* de não aderirem, adequadamente, aos fundos dos orifícios das placas de ELISA, uma variação na técnica de ELISA foi adaptada no Laboratório de Virologia Vegetal-UFC. Uma prévia precipitação das partículas dos vírus (descrita no material e métodos) foi adicionada como etapa inicial do teste.

A técnica de Imune Precipitação – ELISA (IP-ELISA) ou também conhecida como IP-PTA-ELISA, mostrou-se eficiente para detecção de vírus de diferentes gêneros e famílias, sobretudo do gênero *Comovirus* (LIMA *et al.*, 2011).

Embora as técnicas de ELISA sejam bastante versáteis e suas diferentes etapas sejam simples, os métodos são complexos em razão das suas etapas envolverem o uso de diferentes reagentes. Muitos fatores influenciam a sensibilidade e segurança dos resultados, como: preparação e estoque de reagentes; tempo e temperatura de incubação; processamento e extração das amostras; reações inespecíficas e qualidade do antissoro (LIMA, 2015). A qualidade do anticorpo é um parâmetro relativamente complexo de ser mensurado, o que torna o resultado de testes sorológicos, algumas vezes sob suspeita (DIANESE; MEDEIROS, 2015).

Teste Molecular

Embora a sorologia seja uma técnica bastante utilizada na identificação de vírus, para fins de diagnóstico, as técnicas baseadas na detecção do ácido nucléico viral, vem se tornando cada vez mais comuns (ZERBINE Jr *et al.*, 2006). As aplicações das ferramentas moleculares não se restringem ao diagnóstico, possibilitando também a determinação da

concentração de vírus nos tecidos vegetais, a localização das partículas virais a nível subcelular, além de permitirem o estudo das interações vírus-hospedeiro, possibilitando um maior entendimento dos mecanismos moleculares de infecção (ALMEIDA; LIMA, 2001).

Reação de Polimerase em Cadeia-PCR

Vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para identificar e caracterizar vírus de plantas e a técnica de polimerase em cadeia (PCR) pode ser usada para detecção de vírus de planta e sua caracterização. A sensibilidade do sistema de detecção de ácidos nucléicos tem sido largamente melhorada, através da amplificação *in vitro* de fragmentos de moléculas de ácido desoxiribonucleico (DNA) (LIMA, 2015).

Enquanto que as técnicas sorológicas se baseiam nas propriedades antigênicas da proteína capsidial (CP) dos vírus, correspondendo em torno de 10% do genoma total dos vírus responsável pela sua detecção e identificação, as técnicas moleculares apresentam a vantagem de, qualquer parte do genoma pode ser usada para o desenvolvimento de métodos de diagnose (ZERBINE Jr *et al.*, 2006; LIMA *et al.*; 2015).

A técnica é bastante difundida e relativamente simples e vários laboratórios especializados, possuem os reagentes e equipamentos específicos para realização de procedimento. É um procedimento extremamente sensível para a detecção de vírus, e baseia-se na amplificação de DNA ou cDNA.

A técnica de PCR passou a possibilitar uma nova estratégia nas análises de genes por meio de um método simples e rápido de amplificação de fragmentos de ácidos nucléicos, envolvendo basicamente as seguintes etapas: a) Extração do DNA que contém o fragmento a ser amplificado; b) Obtenção dos *primers* específicos para reconhecimento das extremidades do fragmento a ser amplificado; c) Amplificação dos fragmentos através do uso de um termociclador; d) Eletroforese em gel de agarose para detectar os fragmentos de DNA amplificados e estimar seus tamanhos em números de bases de DNA; e) Observação do produto amplificado, em gel de agarose, após sua coloração, através de um transiluminador ultravioleta (LIMA, 2015).

Devido à alta sensibilidade, são comuns resultados falso positivo, resultante de contaminação mínima das amostras no laboratório ou no campo (DIANESE; MEDEIROS, 2015).

Para a detecção de vírus de RNA utiliza uma pequena variação da técnica, chamada de RT-PCR. Uma reação inicial transforma RNA em cDNA (DNA complementar)

por meio da utilização da enzima transcriptase reversa. Essa variação no método possibilita a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR para detecção, amplificação e quantificação de RNA, sendo de fundamental importância para a Virologia Vegetal, em razão da maioria dos vírus que infectam as plantas possuírem genoma do tipo RNA (DIANESE; MEDEIROS, 2015; LIMA, 2015).

Immunoprecipitation Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction-IP-RT-PCR

A técnica de IP-RT-PCR foi desenvolvida no Laboratório de Virologia Vegetal da UFC, combinando as vantagens das propriedades imunológicas dos vírus com a RT-PCR para identificação e caracterização de várias espécies de vírus de plantas (LIMA *et al.*, 2011).

A técnica envolve uma etapa inicial de imunoprecipitação de partículas virais através do uso de antissoro específico, promovendo uma purificação parcial das partículas virais no processo de extração viral.

É uma técnica bastante prática e específica que minimiza possíveis problemas com a extração dos RNAs de vírus nos tecidos vegetais das plantas infectadas, combinando a avaliação das propriedades sorológicas dos vírus e as vantagens das técnicas de amplificação de seus ácidos nucleicos (LIMA, 2015).

O conhecimento prévio das doenças ocasionadas por vírus na cultura do feijão caupi e sua correta diagnose facilitarão as tomadas de decisão para as medidas de manejos recomendadas para cada situação específicas, minimizando as possíveis perdas decorrentes do ataque do patógeno.

O uso de variedades resistentes no controle de viroses, em feijão caupi, tem constituído prática de importância econômica, inclusive para o controle de CPSMV (LIMA, 2015), e esse trabalho deve ser permanente, pois nem sempre a resistência incorporada permanece duradora. Os vírus no seu processo evolutivo desenvolvem estratégias de mutação ou recombinações coevoluindo com a hospedeira, sendo capazes de quebrar a resistência incorporada.

Devido às perdas ocasionadas pelas viroses na cultura do feijão caupi, o objetivo deste estudo foi identificar diferenças biológicas, sorológicas e moleculares entre isolados de CPSMV coletados em diferentes estados da Região Nordeste e os resultados desta pesquisa ser utilizados como base em aplicações no desenvolvimento de estratégias de manejo para o controle do *Cowpea severe mosaic virus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem e manutenção dos isolados de *Cowpea severe mosaic virus*

Os oito isolados de CPSMV utilizados como fonte de inóculo viral neste estudo que fazem parte do Banco Ativo de Vírus, do Laboratório de Virologia Vegetal da UFC. Cada isolado foi obtido em diferentes épocas e locais, sendo todos mantidos *in vivo* em casa de vegetação e também dessecados a 4°C. A denominação de cada isolado foi determinada segundo o local de coleta ou em função das hospedeiras em que foram isolados. Os isolados de CPSMV foram obtidos de *V. unguiculata*, exceto o isolado CPSMV-CROT que foi obtido de *Crotalaria paulinea* L (LIMA *et al.*, 2005b). As denominações dos isolados virais foram: CPSMV-CE (Obtido no Estado do Ceará); CPSMV-MC (Isolado da cultivar Macaibo, no Estado do Piauí); CPSMV-CROT (Isolado em *Crotalaria paulinea* no Estado do Maranhão); CPSMV-AL (Isolado do Estado de Alagoas); CPSMV-PI (Isolado do Estado do Piauí); CPSMV-RN (Obtido no Estado do Rio Grande do Norte); CPSMV-PE (Isolado do Estado de Pernambuco) e CPSMV- PB (Isolado do Estado da Paraíba) (TABELA 1).

Tabela 1- Isolados virais de *Cowpea severe mosaic virus* coletados em diferentes Estados da Região Nordeste do Brasil

Isolado Viral	Local de Coleta	Hospedeira Original	Sintomatologia*
CPSMV-CE	Ceará	<i>Vigna unguiculata</i>	MS
CPSMV-MC	Piauí	<i>V. unguiculata</i> ('Macaibo')	ML
CPSMV-CROT	Maranhão	<i>Crotalaria paulinea</i>	MS
CPSMV-AL	Alagoas	<i>V. unguiculata</i>	MS
CPSMV-PI	Piauí	<i>V. unguiculata</i>	MS
CPSMV-RN	Rio Grande do Norte	<i>V. unguiculata</i>	MS
CPSMV-PE	Pernambuco	<i>V. unguiculata</i>	MS
CPSMV-PB	Paraíba	<i>V. unguiculata</i>	MS

* MS- Mosaico Severo, ML- Mosaico Leve

As fontes dos isolados virais eram renovadas, sempre quando necessário por meio de inoculação mecânica em plantas sadias de feijão caupi cultivar Pitiúba, com exceção do isolado CPSMV-MC que foi mantido na 'Macaibo'.

O isolado CPSMV-MC foi obtido no ano de 1990 em campo experimental de caupi, no Estado do Piauí. Este isolado foi capaz de quebrar a imunidade do ‘Macaibo’ identificada, na década de 70, como imune aos isolados de CPSMV conhecido até então no Brasil (LIMA *et al.*, 2012). Até o presente trabalho esse isolado vem sendo mantido nesta cultivar.

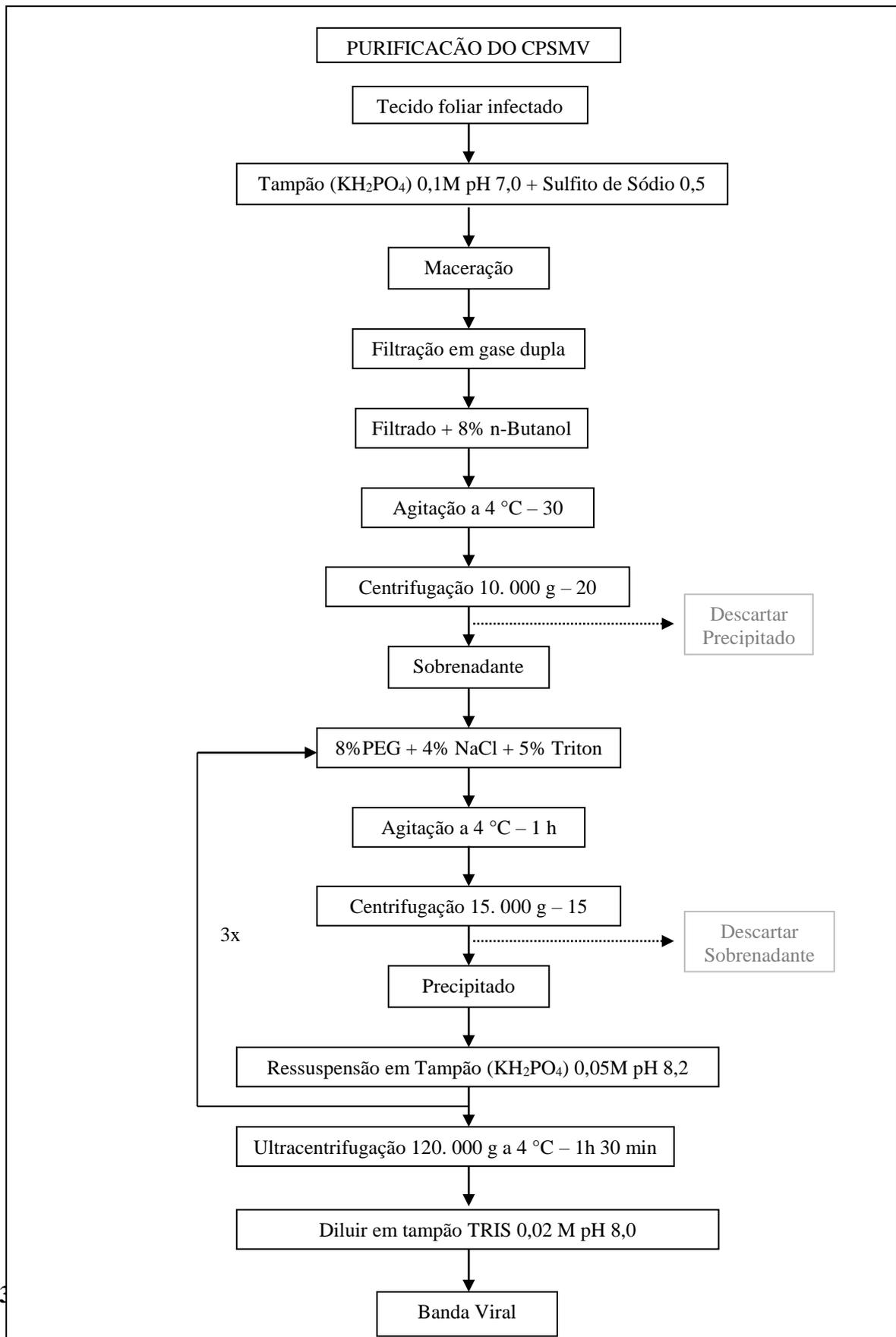
Visando manutenção *in vivo* dos isolados, amostras foliares infectadas foram maceradas em almofariz, na presença de tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7,5, na proporção 1:2 (p/v), filtrado em gaze dupla e aos extratos obtidos foram adicionados pequena quantidade de carbeto de silício - carborundum (400 Mesh) mantendo-se os inóculos em gelo até o momento da inoculação. Plantas jovens de feijão caupi sadias foram inoculadas sete dias após a germinação. As inoculações eram efetuadas, mediante a fricção do inóculo em gaze nas superfícies adaxiais das folhas de plantas sadias, contendo o isolado viral correspondente. Os vasos foram etiquetados com as informações necessárias, contendo data da inoculação, nome do isolado viral e cultivar utilizada. Todas as plantas inoculadas eram mantidas em casa de vegetação para a observação e acompanhamento dos sintomas.

3.2. Purificação química do isolado viral de CPSMV-MC

O isolado de CPSMV-MC foi mantido e multiplicado em plantas de feijão caupi ‘Macaibo’, em condições de casa de vegetação. Vinte dias após a primeira inoculação, folhas com sintomas de mosaico leve característico deste isolado viral, foram coletadas para o processo de purificação, segundo protocolo usado por Lima, Amaral (1985), com algumas modificações. Aproximadamente 181g de material foliar foi macerado na presença de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄) 0,1 M pH 7,0, na proporção de 1:2 (p/v), acrescentando 0,5% de sulfito de sódio. Após a maceração, o extrato foi filtrado em gaze dupla e submetido a uma clarificação com 8% de *n*-butanol, sob agitação lenta e constante por 30 min. Em seguida, a mistura foi submetida a uma centrifugação de 10.000 g, durante 20 min em centrífuga Sorvall RC5B. Ao sobrenadante foram adicionados 8% de PEG 8.000, 4% de NaCl e 5% de Triton, e a mistura foi submetida a agitação lenta e constante, por um período de 1 h. Uma nova centrifugação de 15.000 g por 15 min, foi realizada para a precipitação do vírus, ao qual foi ressuspenso em tampão de fosfato 0,05 M pH 8,2. O processo de precipitação do vírus com PEG seguido de clarificação foi repetido por três vezes e o último precipitado, contendo o vírus foi submetido à ultracentrifugação de 120.000 g, em temperatura de 4 °C, por 1 h e 30 min, na ultracentrífuga Beckman L7-55, e o precipitado foi ressuspenso em tampão TRIS

0,02M pH 8,0 (FIGURA 1). A preparação final foi avaliada quanto a sua integridade biológica por meio de inoculação em plantas sadias de feijão caupi 'Macaibo' e analisada em espectrofotômetro de luz ultravioleta, CIRRUS 80ST, para obtenção de espectro de adsorção, utilizando a faixa de comprimento de onda entre 220 a 340 nm, a fim de analisar o grau de pureza e concentração do vírus.

Figura 1- Roteiro do processo de purificação do *Cowpea severe mosaic virus* isolado de *Vigna unguiculata* cultivar Macaibo



A produção de antissoro policlonal, a partir isolado de CPSMV-MC purificado foi obtido em coelho da Raça Nova Zelândia Branco sadio, o qual foi criado e mantido em gaiola, com alimentação e água fresca. Antes da primeira imunização foi realizada uma primeira coleta de sangue para obtenção do antissoro normal. O animal foi imunizado com preparação purificada do isolado de vírus para obtenção de antissoro específico. O esquema de imunização adotado consistiu de três injeções de sete em e dias nos dedos das patas traseira do animal. A preparação viral foi homogeneizada com partes iguais do adjuvante incompleto de Freund (1:1), utilizando um homogeneizador HomoMix, sendo todo processo realizado em baixa temperatura, utilizando isopor com gelo. Duas semanas após a última imunização, o animal foi sangrado para a produção de antissoro, em intervalos de oito a 15 dias, por um período de dez meses. As amostras de 30 a 40 mL de sangue foram obtidos por meio de pequenos cortes efetuados nas veias marginais das orelhas do coelho e o sangue coletado em tubos de vidros. As amostras de sangue coletadas foram incubadas em banho-maria, à temperatura de 37 °C por uma hora, em seguida, centrifugadas a 4.000 g durante 10 min, a fim de precipitar os coágulos de células vermelhas formados. O sobrenadante coletado, foi então clarificado em uma centrifugação de 10.000 g por 10 min. Após testados por dupla difusão contra plantas infectadas por CPSMV-MC e plantas sadias, o antissoro produzido foi armazenado em temperatura de -20 °C.

Os antissoros foram previamente absorvidos com proteína purificada de feijão caupi, visando remover possíveis anticorpos reativos com proteínas de plantas. Amostras sadias de feijão caupi foram macerados com tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 na proporção de 1:2 (g/mL). A absorção do antissoro seguiu a proporção de 1:1, com extrato concentrado de plantas sadias e em seguida foi incubado a 37 °C em estufa por um período de 2 h. Após este período a mistura antissoro com extrato de planta sadia foi centrifugada a 5.000 g por 10 min. O sobrenadante que constitui o antissoro policlonal absorvido foi recolhido e transferido para tubo de vidro devidamente etiquetado e acondicionados a -20°C.

3.4. Caracterização Biológica e Sorológica.

3.4.1 Gama de plantas hospedeiras

O experimento para avaliação da gama de plantas hospedeiras foi conduzido em casa de vegetação, no Campus do Pici/UFC. Dois isolados virais foram selecionados com base na sintomatologia para este experimento: o isolado CPSMV-CE que causa sintoma severo e o isolado CPSMV-MC que causa sintoma leve em feijão caupi. Como a maioria dos isolados de CPSMV apresentam sintomas severos, foi selecionado apenas um isolado desse grupo. As espécies vegetais das famílias Amarantaceae e Fabaceae foram utilizadas, a fim de observar e registrar os sintomas induzidos por cada isolado viral. Espécies e cultivares das referidas famílias botânicas foram inoculadas com os dois isolados virais: Amarantaceae: *Chenopodium amaranticolor* Costa & Reyn e *C. quinoa* Wild; Fabaceae: *Cassia occidentalis* L.; *Clitoria ternatea* L.; *Leucena leucocephala* (Lam.) R. de Wit.; *Macroptilium atropurpureum* (DC) Urb. (Sirato); *M. lathyroides* (L.) Urb. (Feijão de rola); *Phaseolus vulgaris* L. (feijão comum); *Vigna unguiculata* ‘Canapú’; ‘Canapuzinho’; ‘Corujinha’; ‘Costela- de-Vaca’; ‘Feijão Preto’; ‘Lizão’; ‘Macaibo’; ‘Maroatã’; ‘Manteigão’; ‘Milagroso’; ‘Paulistinha’; ‘Pingo de ouro’; ‘Pitiúba’; ‘Rouxinho’ e ‘Sempre verde’. As plantas foram inoculadas ainda jovens, com extratos infectados provenientes dos isolados de CPSMV. Os extratos de plantas sistemicamente infectadas pelos isolados do vírus foram obtidos mediante a maceração de folhas infectadas em tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,5 na proporção de 1:5 (p/v), adicionando uma pequena quantidade do abrasivo carborundum (400 Mesh). As inoculações foram realizadas por meio da fricção de gaze estéril embebidas nos extratos sobre as superfícies das folhas mais jovens. Após dez dias da primeira inoculação foi realizada uma segunda inoculação nas plantas que não apresentaram sintomas para evitar possíveis casos de escape. Aos 25 dias foram realizadas avaliações sorológicas por dupla difusão em Agar para confirmação da infecção pelo o vírus.

O experimento constou de, por espécie, quatro plantas/vaso (parcela) com três repetições, ficando uma parcela para ser utilizada como testemunha (sem inoculação). As plantas foram avaliadas individualmente, a partir da severidade dos sintomas e testadas por sorologia.

3.4.2 Avaliação de título e especificidade dos antissoros

Todos os isolados de CPSMV deste ensaio foram utilizados como controle positivo e amostras sadias de feijão caupi foram utilizadas como controle negativo para os testes de Dupla difusão em ágar (DDA), PTA-ELISA e IP-ELISA.

3.4.2.1 Determinação do título de antissoro por Dupla Difusão em Ágar

Com o intuito de observar o título máximo dos antissoros por dupla difusão em ágar, foram empregados sete antissoros (AS) obtidos para diferentes isolados de CPSMV, sendo os AS produzidos em diferentes anos, armazenados a -20°C e os quais foram identificados, neste estudo, como: AS-PI (1980); AS-AL (2005); AS-PE (2006); AS-CE (2010); AS-CROT (2011); AS-PB (2011) e AS-MC (2014).

Os extratos obtidos de tecidos foliares de feijão caupi infectados e sadios foram macerados, separadamente, em presença de água destilada, na proporção de 1:2 (p/v) em seguida foram filtrados em gaze. Aproximadamente 30 μl de cada extrato foram colocados nos orifícios periféricos de arranjos hexagonais, abertos em Placas de Petri, contendo meio ágar (0,8% de Ágar-ágar em pó; 0,8% de NaCl e 0,05% de NaN_3) e nos orifícios centrais dos hexágonos foram adicionados antissoros de CPSMV nas seguintes diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 e 1:1.024 em solução salina a 0,85%. Em seguida as placas foram incubadas em BOD com temperatura de 24°C , durante um período de 24 a 48 h, após o que as análises foram realizadas por meio da visualização de linhas de precipitação, indicando resultados positivos.

Neste ensaio também foi avaliada a máxima diluição dos antígenos (extratos foliares) de CPSMV, utilizando dois antissoros na diluição 1:4. Os extratos foliares foram diluídos em água destilada, nas proporções: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 e 1:512. A metodologia empregada foi semelhante a descrita acima.

3.4.2.2 Determinação do título de antissoro por PTA-ELISA e IP-ELISA

Os títulos dos antissoros foram determinados por “Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (PTA-ELISA) ou ELISA indireto e por “Imunne Precipitation” (IP-ELISA). Neste ensaio, foi verificada a titulação máxima dos antissoros

selecionados: AS-PI (1980); AS-AL (2005); AS-PE (2006); AS-CROT (2011); AS-PB (2011) e AS-MC (2014), previamente absorvido com extrato de plantas sadias de feijão, conforme metodologia descrita (item 3.3) e de extratos vegetais, obtidos dos diferentes antígenos (isolados), mantidos em regime de casa-de-vegetação.

Amostras foliares de feijão caupi infectadas com os isolados de CPSMV e amostras de plantas sadias utilizando a diluição do extrato 1:10 (p/v) foram testadas utilizando as seguintes diluições para os antissoros: 1:100; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000; 1:64.000. No teste de titulação dos antígenos com os oitos isolados (extratos foliares infectados com CPSMV), foram utilizadas as seguintes diluições dos extratos: 1:10; 1:100, 1:200; 1:400; 1:800; 1:1.000 e diluição do antissoro 1:1000 (v/v). Tanto no teste envolvendo os títulos dos antissoros quanto a dos títulos dos antígenos a mesma metodologia foi utilizada.

No teste de PTA-ELISA, o protocolo utilizado foi segundo Almeida; Lima (2001), com algumas adaptações. Amostras foliares maceradas em tampão carbonato pH 9,6 foram adicionadas aos orifícios das placas de ELISA (100 µl de cada amostra). Em seguida, as placas foram incubadas a 4 °C, por um período de 12 a 18 h, seguido de três lavagens com PBS-Tween deixando a solução nos orifícios por 3 min. entre cada lavagem, e em seguida, foi realizada uma lavagem rápida com água destilada. Foi adicionado, em cada orifício, 100 µl do antissoro de acordo com a concentração testada. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37 °C por um período de 1 h, sendo o processo de lavagem repetido, conforme descrito anteriormente. Foram adicionados aos orifícios 100 µl da solução imunoglobulina G (IgG) de cabra anti-IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina, diluída na proporção 1:2.000, em tampão contendo 2% de polivinil pirrolidona, 0,2% de ovalbumina e 0,02% de azida de sódio, sendo a placa incubada a 37 °C por um período de 1 h. Após esse período mais um processo de lavagem foi realizado. Seguindo com a etapa final, adicionando 100 µl do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração 0,5 mg/mL, dissolvido em tampão contendo 12% de dietanolamina e 0,25% de azida de sódio, pH 9,8 em cada orifício. Após 20 min, foi efetuada a primeira leitura das placas, em aparelho de leitura de ELISA (“Labsystems Multiskan MS”), utilizando o comprimento de onda de 405 nm e após 40 min, uma segunda leitura foi efetuada. Foram considerados resultados positivos as leituras que corresponderem ao dobro dos valores de absorbância registrados para os extratos de plantas sadias, utilizadas como testemunhas.

Para o teste envolvendo IP-ELISA, o protocolo utilizado foi conforme descrito por Lima *et al.* (2015). Amostra de tecido vegetal infectadas com CPSMV e material sadio de feijão caupi foram macerados na proporção de 1:10 (p/v) em tampão carbonato pH 9,6 e o extrato obtido extrato foi misturado na proporção 1:1 com antissoro previamente absorvido 1:500 (v/v), sendo a mistura incubada a 37 °C por 3 h. Seguiu-se uma centrifugação a 5.000 g por 10 min e o precipitado obtido foi ressuscitado em tampão carbonato pH 9,6. Poços de placas de ELISA foram cobertos com 100 µl do ressuscitado e, em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 2 h. As placas foram submetidas a três lavagens com PBS-Tween, ficando a solução nos poços por 3 min em cada lavagem e, em seguida, uma lavagem rápida com água destilada. Após a secagem das placas, foram adicionados aos orifícios 100 µl do antissoro correspondente. As placas foram incubadas novamente a 37 °C por 1 h e, logo depois, foram submetidas a mais três lavagens com PBS-Tween. Após secagem, foram adicionados 100 µl de imunoglobulina G (IgG) de cabra, anti-IgG de coelho conjugada à fosfatase alcalina, diluída na proporção 1:2.000, em tampão contendo 2% de polivinil pirrolidona, 0,2% de ovalbumina e 0,02% de azida de sódio. Mais uma vez as placas foram incubadas a 37 °C por 1 h e depois lavadas. Por último, foram adicionados 100 µl do substrato p-nitrofenil fosfato na concentração 0,5 mg/mL, dissolvido em tampão contendo 12% de dietanolamina e 0,25% de azida de sódio, pH 9,8. Após 20 min, realizou-se a primeira leitura das placas em aparelho de leitura de ELISA (“Labsystems Multiskan MS”), utilizando-se o comprimento de onda de 405 nm, sendo efetuada uma segunda leitura após 40 min. Foram consideradas positivas as leituras que corresponderam ao dobro dos valores de absorbância registrados para os extratos de plantas sadias utilizadas como testemunhas.

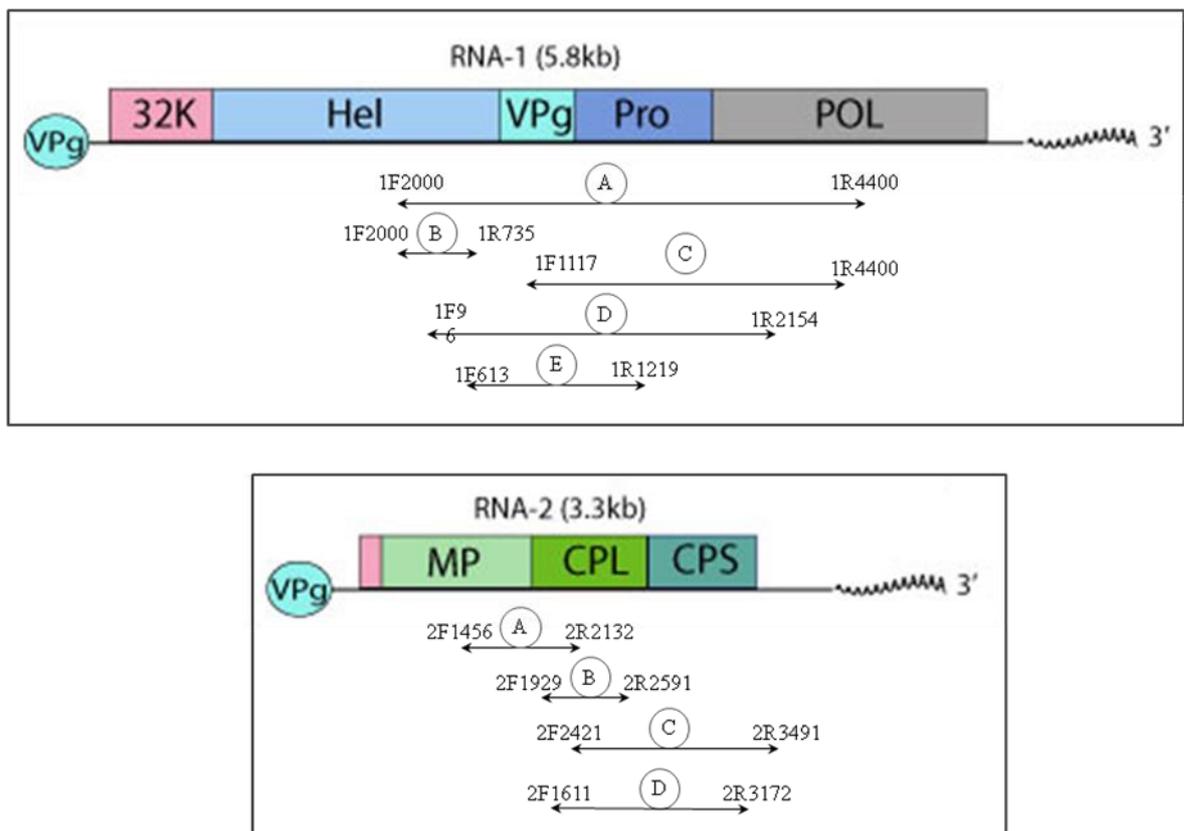
3.5 Caracterização Molecular

3.5.1 Desenho de primers específicos para CPSMV

Foram desenhados vários oligonucleotídeos (*primers*) para as regiões do RNA1 e do RNA2 do genoma do CPSMV, derivados de alinhamentos múltiplos (FIGURA 2). O genoma completo e parte de sequências de CPSMV, disponível no GenBank da National Center of Biotechnology Information (NCBI), foram alinhadas utilizando o software Mega versão 6.0 pelo programa CLUSTAL W (TAMURA *et al.*, 2013). Em seguida, os parâmetros de qualidade dos *primers* foram analisados utilizando os softwares: Primer 3 Plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) que exibem várias sugestões de *primers* e OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyze/>), utilizado para avaliar a qualidade do *primer*, mostrando toda informação necessária para selecionar um bom par de *primers*. Após essas análises foi testada a especificidade dos *primers*, utilizando o software BLAST. Também foi utilizado dois *primers* descrito na literatura (ABREU *et al.*, 2012) que amplifica parte do genoma da região do RNA 1 viral. Os *primers* foram sintetizados pela empresa Macrogen Inc (Seoul, Korea), sendo que seis *primers* foram desenhados para Região do RNA 1 e oito *primers* para Região do RNA 2 (TABELA 2).

Figura 2- Esquema de desenho dos *primers* para *Cowpea severe mosaic virus* representando as regiões do RNA1 e RNA2.



Fonte: Adaptado do ViralZone, 2017

3.5.2 Análise molecular de isolados de CPSMV obtidos de feijão caupi

3.5.2.1 Extração de RNA total e RT-PCR

Os RNAs totais dos isolados de CPSMV foram extraídos de plantas infectadas utilizando o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), conforme o protocolo do fabricante.

Para a síntese de transcrição reversa foi utilizado o kit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, obtendo uma fita de DNA complementar (cDNA) ao RNA genômico do vírus. Inicialmente foram adicionados 3 µg de RNA viral, 2 pmol do *primer* ‘antisense’ ao vírus (Tabela 1) e água livre de nucleases, completando o volume para 10 µL, em um microtubo de 0,2 mL. As misturas foram incubadas em termociclador a 70 °C por 5 min, resfriadas em gelo e, em seguida foram adicionados os demais componentes da reação: 5 µL tampão de transcrição reversa 5x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 2 µL de ditioneitol (0,1 M), 0,7 µL de inibidor de RNase, 1 µL (200 u) da enzima transcriptase reversa e água livre de nucleases, completando o volume final para 25 µL. As misturas foram incubadas a 42 °C por 1 h. Posteriormente, foi realizada a PCR, utilizando o kit GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). A reação foi preparada em volume final de 25 µl, contendo 5 µl de tampão 5X (100 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 2,0 µl de MgCl (25mM), 1,50 µl de dNTPs (10 mM), 1,25 µl de cada *primer* [10 pmol], 0,25 µl (1,25 U) de GoTaq Flexi DNA polimerase e 3 µl do cDNA, ajustando o volume com água estéril deionizada e autoclavada. A amplificação ocorreu em termociclador (Mastercycler gradient – EPPENDORF), utilizando uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de três etapas com 32 ciclos: desnaturação a 95 °C por 1 min; anelamento 52-58 °C por 1 min (TABELA 2) e extensão a 72 °C por 1 min/kb. E aplicada uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%. O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado e fotografado em fotodocumentador (CArestream Gel Logic 212 PRO). Os produtos amplificados da PCR foram sequenciados pela empresa Macrogen Inc (Seoul, Korea).

Tabela 2- *Primers* utilizados na PCR para detecção dos isolados virais de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)

<i>Primers</i>	Sequência 5'- 3'	Orientação	Temperatura de anelamento (°C)	Região amplificada	Literatura
1F2000	GAG AAG GGA ATG CAC TTT GAT T	senso	50	RNA 1	ABREU <i>et al.</i> (2015)
1R4000	AGA TTA TAT TCC ATA GGA AGT A	antisenso	50	RNA 1	ABREU <i>et al.</i> (2015)
1F96	GGC AAG AAC ACA ATA CAG AG	senso	55	RNA 1	SILVA (2017)
1R2154	ACC AGA GCA GGT ACA CTA TC	senso	55	RNA 1	SILVA (2017)
1R735	GCC AAA ACA ACA CCA ACA ACT A	antisenso	55	RNA 1	SILVA (2017)
1F613	GAC AAC AAC AAG CTG GTA TG	senso	55	RNA 1	SILVA (2017)
1R1219	CAA CTT GCG GGA ATA TCT T	antisenso	55	RNA 1	SILVA (2017)
1F1117	TAC AAG CTC TAC TAC AAG	senso	52	RNA 1	SILVA (2017)
2F1456	AGC ACA AGA TTG ACA AGC CA	senso	56	RNA 2	SILVA (2017)
2R2132	GCA CGT CCC ATC CAT CAT TT	antisenso	56	RNA 2	SILVA (2017)
2F1929	GCA TTT AAC CCT AAC CCG TG	senso	58	RNA 2	SILVA (2017)
2R2591	CTT TGA GCC CGA CCA TCT TG	antisenso	58	RNA 2	SILVA (2017)
2F2421	GCA AAG CAA GAC AGG ACG AC	senso	59	RNA 2	SILVA (2017)
2R3491	TAA CAG TCG CTG CCC AAG AC	antisenso	59	RNA 2	SILVA (2017)
2F1611	ATG CTT GGR GCM ATG RTW G	senso	52	RNA 2	SILVA (2017)
2R3172	TKC CAG CAC TTT TCC ATG	antisenso	52	RNA 2	SILVA (2017)

Fonte: Elaborada pela autora

3.5.2.2 Sequenciamento e análise filogenética

No alinhamento das sequências obtidas, neste estudo dos isolados de CPSMV, foram comparadas as sequências NC 003544 e NC 003545-*Cowpea severe mosaic virus*, utilizada como referência e KP223323-*Squash mosaic virus*, como grupo externo obtidas do Genbank. As sequências foram alinhadas, usando o programa Clustal W e, em seguida, a árvore filogenética foi elaborada, utilizando o programa MEGA 6.0, mediante o uso do modelo Tamura 3 parametro, com *bootstrap* de 2.000 repetições.

3.5.3 Comparação entre técnicas de extração de RNA

Foi comparado o método de extração de RNA viral, utilizando o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), com o método de extração constituindo uma etapa inicial por imunoprecipitação (IP), desenvolvido no Laboratório de Virologia Vegetal, UFC.

Os RNAs totais do isolado viral de CPSMV-CE e também de feijão sadio foram extraídos, utilizando o reagente Brazol (LGC Biotecnologia) conforme o protocolo do fabricante, modificando apenas o peso do material vegetal: 25, 50, 75, 100 mg do tecido vegetal. Após extração, seguiu-se a transcrição reversa para obtenção do DNA complementar, seguindo amplificação por PCR usando metodologia descrita abaixo.

Para extração por IP, amostra de feijão caupi infectada com CPSMV-CE nas quantidades de: 25, 50, 75 e 100 mg de tecido vegetal, foram utilizadas para a obtenção de um extrato viral, maceradas em tampão carbonato pH 9,6 na proporção de 1:2 (p/v). O extrato obtido, filtrado em gaze dupla, foi misturado na proporção de 1:1 com antissoro específico para CPSMV, previamente absorvido, na diluição de 1:500, em tampão do antissoro. A mistura foi incubada por 3 h a 37 °C e centrifugada a 5.000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em metade do volume inicial, utilizando o reagente Brazol, seguindo com as demais etapas de extração de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de transcrição reversa foi preparada inicialmente com 5 µl de água estéril deionizada e autoclavada, 2 µl do *primer* reverse e 3 µg do RNA extraído, incubando a 70 °C por 10 min e, em seguida foi incubada em gelo por 5 minutos. Adicionou-se um segundo mix contendo 5 µl de tampão (5x) da enzima, 2 µl de dTT (0,1 mM); 1 µl de dNTPs (10 mM), 1,0 µl da enzima M-MLV, 0,5 µl inibidor de RNase, completando o volume final para 25 µl com água estéril deionizada e autoclavada, logo em seguida a reação foi incubado a

42 °C por uma hora, em aparelho termociclador (Mastercycler gradient – EPPENDORF), obtendo uma fita de DNA complementar ao RNA genômico do vírus.

A reação de PCR foi preparada em volume de 25 µl, contendo 5 µl de tampão 5X (100 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3), 2,5 µl de MgCl (25mM), 0,5 µl de dNTPs, a 10 mM, 0,5 µl de cada oligonucleotídeo [10 pmol], 0,25 µl unidades (1,25) de Taq DNA polimerase (PROMEGA) e 2 µl do cDNA, ajustando o volume com água estéril deionizada e autoclavada. Os fragmentos de RNA foram amplificados em aparelho termociclador (Mastercycler gradient – EPPENDORF), mediante o seguinte ciclo: 94 °C por 4 min para um aquecimento inicial, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 44 seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 56 °C por 40 seg e extensão a 72 °C por 1 min com uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% preparado com tampão TBE (Tris-borato-45 uM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Para cada produto da PCR, 10 µl foi aplicado no gel acrescidos de 3 µl de corante (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 30%). Na eletroforese, foi utilizado um sistema horizontal usando 90 volts por 45 min. O gel foi tratado com brometo de etídeo, fotografado e visualizado em luz ultravioleta em fotodocumentador (CArestream Gel Logic 212 PRO).

3.6 Interações entre espécies de vírus que infectam o feijão caupi

Este experimento foi realizado em casa-de-vegetação, utilizando três espécies de vírus que infectam o feijão caupi. As espécies virais utilizadas fazem parte do banco ativo de vírus, mantidos *in vivo* em feijão caupi. O estudo de interação foi realizado, utilizando a cultivar Setentão, sendo avaliada a sintomatologia das plantas, quando inoculadas com os vírus isoladamente e em combinação com dois e três espécies de vírus. As espécies virais utilizadas foram: CPSMV (isolado CE e MC), dois isolados de CABMV, um obtido em área experimental de feijão caupi no Campus do Pici denominado de CABMV-Fort e outro isolado obtido na fazenda Bela Vista, propriedade particular, no município de Itapiúna-CE denominado de CABMV-BV e um isolado de CMV obtido em área experimental de feijão Caupi no Campus do Pici, UFC.

O experimento foi composto de 18 tratamentos, cada tratamento com nove plantas, sendo três plantas por vaso. Para efeito de controle negativo foi usado como testemunha um tratamento, com não inoculadas com os isolados virais. Os tratamentos foram os seguintes: 1- Plantas inoculadas com CPSMV-CE; 2- Plantas inoculadas com CPSMV-

MC; 3- Plantas inoculadas com CABMV-BV; 4- Plantas inoculadas com CABMV- Fort; 5- Plantas inoculadas CMV; 6- Plantas inoculadas com CPSMV-CE e CABMV-BV; 7- Plantas inoculadas com CPSMV-CE e CABMV-Fort; 8- Plantas inoculadas com CPSMV-MC e CABMV- BV; 9- Plantas inoculadas com CPSMV-MC e com CABMV-Fort; 10- Plantas inoculadas com CPSMV-CE e com CMV; 11- Plantas inoculadas com CPSMV-MC e CMV; 12- Plantas inoculadas com CABMV-BV e CMV; 13- Plantas inoculadas com CABMV- Fort e CMV; 14- Plantas inoculadas com CPSMV-CE, CABMV- BV e CMV; 15- Plantas inoculadas com CPSMV-MC, CABMV- BV e CMV; 16- Plantas inoculadas com CPSMV-CE, com CABMV- Fort e CMV; 17- Plantas inoculadas com CPSMV-MC, CABMV-Fort e CMV e 18- Plantas sadias não inoculadas (TABELA 3).

As inoculações foram realizadas sete dias após o plantio, usando extratos de plantas infectadas. Os extratos virais foram obtidos por meio de maceração das folhas infectadas de cada isolado viral, separadamente, em almofariz esterelizado, na presença de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,5, na proporção 1:5 (p/v), sendo os extratos obtidos filtrados em gaze dupla. No esquema de inoculação, utilizando infecção mista, com dois ou mais vírus, os extratos macerados previamente foram misturados, sempre na mesma quantidade e proporção. Em cada mistura de extrato, foi adicionado carvão de silício, conhecido comercialmente como carborundum (400 Mesh), procedendo a inoculação mecânica através da fricção dos extratos nas superfícies das folhas das plantas sadias.

A avaliação das plantas deste experimento foi realizada diariamente, até 25 dias após inoculação (DAI). Os critérios adotados para avaliação da sintomatologia foram os seguintes: LN- lesões necróticas; LC- lesões cloróticas; Bo- bolhosidade; M-mosaico; ML- mosaico leve; MS- mosaico severo; NS- necrose sistêmica; RdF- redução foliar; DF- deformação foliar; SD- subdesenvolvimento e SS- sem sintoma (LIMA et al.,1986). Decorridos 25 DAI, foram realizados os testes sorológicos para confirmação da presença ou ausência dos vírus, sendo que para as plantas inoculadas com CPSMV a avaliação foi realizada por dupla difusão em ágar e para as plantas inoculadas com CABMV e CMV o teste foi realizado por PTA-ELISA, utilizando antissoros específicos para cada vírus.

Análise molecular da interação entre CABMV x CMV x CPSMV em feijão caupi foi avaliada pela técnica de RT-PCR. Para isso, foi selecionada uma amostra de cada tratamento com resultados positivos nos testes sorológicos. Extração de RNA total foi realizada, utilizando o protocolo do reagente Brazol (LGC Biotecnologia), seguindo recomendações do fabricante.

Tabela 3- Esquema de interação entre CPSMV, CABMV e CMV inoculadas mecanicamente em *Vigna unguiculata* cultivar Setentão

Tratamentos	Inoculação das plantas
1	CPSMV-CE
2	CPSMV-MC
3	CABMV-BV
4	CABMV-Fort
5	CMV
6	CPSMV-CE x CABMV-BV
7	CPSMV-CE x CABMV-Fort
8	CPSMV-MC x CABMV-BV
9	CPSMV-MC x CABMV-Fort
10	CPSMV-CE x CMV
11	CPSMV-MC x CMV
12	CABMV-BV x CMV
13	CABMV-Fort x CMV
14	CPSMV-CE x CABMV-BV x CMV
15	CPSMV-MC x CABMV-BV x CMV
16	CPSMV-CE x CABMV-Fort x CMV
17	CPSMV-MC x CABMV-Fort x CMV
18	Sem inoculação

Para a síntese da fita simples de cDNA, a partir de cada RNA viral extraído dos isolados de CABMV foi usado o *primer* OligodT17M10 (SILVA et al., 2013), para CMV foi utilizado o primer R - 5' - TTATAGCCGTAAGCTGGATGCACAAC-3' e para CPSMV foi utilizado o primer R – 5'- TAACAGTCGCTGCCCAAG - 3'. A reação de transcrição reversa foi preparada, inicialmente, com 5 µl de água estéril deionizada e autoclavada, 2 µl do primer reverse e 3 µg do RNA extraído, incubando a 65 °C por 5 min, e gelo por 5 min. Adicionou-se um segundo mix contendo 2,5 µl de tampão (10x) da enzima, 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de dTT (0,1 mM); 1 µl dNTPs (10 mM), 1,0 µl da enzima M-MLV (Invitrogen), completando o volume final para 25 µl, com água estéril deionizada e autoclavada, logo em seguida a reação foi incubado a 37 °C por uma hora e, em seguida, a 70 °C por 15 min em aparelho termociclador (Mastercycler gradient – EPPENDORF).

Após amplificação do cDNA, foi realizada a técnica de PCR, utilizando, os seguintes pares de *primers* específicos para cada espécie viral. Para CABMV foram usados os *primers* M10-reverse: 5'-GCAGTGTTATCAACGCAGA3; /PY11- foward: 5-GGNAAYAAAYAGYGGXNCAZRC C -3', desenhados para espécies de vírus do gênero *Potyvirus* que englobam porções genômicas do terminal 3' da região não traduzida (UTR) ao terminal 3' da região de inclusões B (NIb) onde está inserida toda a região da capa proteica

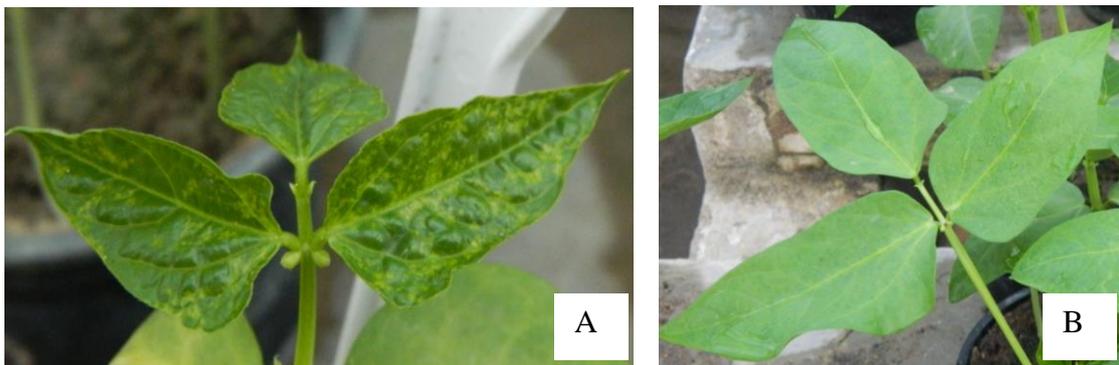
(CHEN et al., 2001). Para o CMV, utilizaram-se os *primers* R- 5' TTATAGCCGTAAGCTGGATGCACAAC-3' e F-5' TATGATAAGCTTGTTCGCGCA-3', desenhados para a região que engloba parte da proteína do movimento e da CP. No caso do CPSMV, os *primers* utilizados foram R – 5'-TAACAGTCGCTGCCCAAG - 3' e F – 5' - GACAAGCAAGACAGGACGAC - 3', desenhados para a região do RNA 2, englobando parte da *cp* do vírus. Na reação da PCR foram utilizados 2,5 µL de cada cDNA amplificado, 5 µL do tampão da PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 3 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL dos dNTPs (10 mM), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo senso e antisenso, 0,5 µL (5 U/µL) da Taq DNA polimerase (Promega, Madison, WI, USA), sendo o volume completado para 25 µL com água ultra-pura. O programa de amplificação consistiu de um aquecimento inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 48 a 52 °C por 1 min (esta temperatura variou em função dos *primers* utilizados para cada isolado viral) e 72 °C por 2 min. Ao final, as preparações foram submetidas a uma extensão de 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1%, preparado com tampão TBE (Tris-borato-45 uM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Em cada amostra da PCR de 7 µl aplicado no gel, foram acrescentados 3 µl de corante (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e glicerol 30%), mediante eletroforese a 90 volts em um sistema horizontal durante 45 min. O gel foi tratado com brometo de etídeo, fotografado e visualizado em luz ultravioleta em fotodocumentador (CArestream Gel Logic 212 PRO).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Origem e manutenção dos isolados de *Cowpea severe mosaic virus*

Todos isolados de vírus do gênero *Comovirus* CPSMV-CE; CPSMV-MC; CPSMV-CROT; CPSMV-AL; CPSMV-PI; CPSMV-RN; CPSMV-PE e CPSMV- PB foram mantidos com sucesso *in vivo*, por meio de inoculações periódicas em plantas jovens de feijão caupi. A maior parte dos isolados de CPSMV, mantidos na cultivar Pitiúba, exibiu sintomas iniciais de mosaico, três a quatro dias após inoculação (DAI) mecânica, evoluindo para mosaico severo, deformação foliar, redução do porte da planta depois de 15 (DAI), aproximadamente, (FIGURA 3A). O isolado CPSMV-MC mantido na ‘Macaibo’ apresentou mosaico leve (FIGURA 3B). Uma característica peculiar deste isolado é que o mesmo apresentou a propriedade de infectar a ‘Macaibo’, considerada imune aos demais isolados. Lima *et al.* (2012) observaram a estabilidade biológica deste isolado por mais de 25 anos mantendo as mesmas características, conforme avaliado neste estudo. Assunção *et al* (2005) também em estudos com a ‘Macaibo’ observaram que a herança imune desta cultivar está condicionada a um gene recessivo.

Figura 3- Plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata*) inoculadas com isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). A- Planta de feijão caupi ‘Pitiúba’ infectada com CPSMV isolado do Ceará (CPSMV-CE); B- Planta de feijão caupi ‘Macaibo’ infectada com CPSMV isolado do cultivar Macaibo (CPSMV-MC).



Fonte: Elaborada pela autora

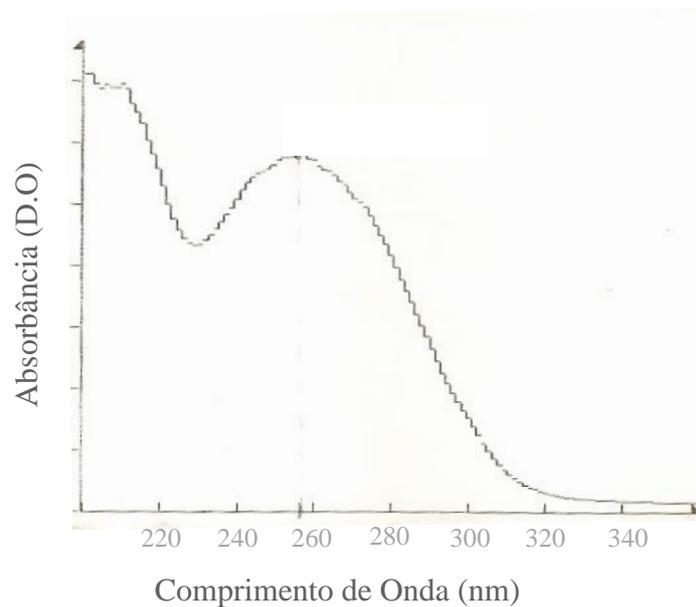
4.2. Purificação química do isolado viral de CPSMV-MC

O protocolo utilizado para purificação do CPSMV-MC mostrou-se bastante eficiente, permitindo a obtenção de uma preparação purificada de concentração final de 64,83 mg de vírus por quilograma de tecido infectado.

A preparação purificada apresentou espectro de absorbância ultravioleta (FIGURA 4) com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,51, valor típico de vírus poliédricos que possuem elevados percentuais de ácidos nucleicos. Silva *et al* (2016), em estudo com *Squash mosaic virus* (SqMV) um outro *Comovirus* encontraram valores próximos ao obtido neste estudo.

A infectividade da preparação purificada foi confirmada em plantas de feijão caupi inoculadas nas diluições 1:10 e 1:20, com as plantas apresentando sintomas de lesões locais nas folhas inoculadas que evoluíram para mosaico leve.

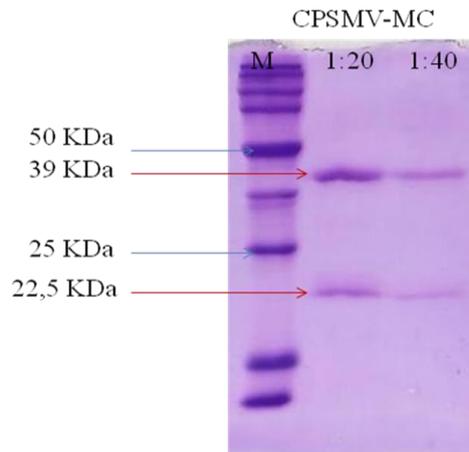
Figura 4- Espectros de absorção ultravioleta da preparação purificada de *Cowpea severe mosaic virus*, isolado Macaibo (CPSMV-MC) obtidos de *Vigna unguiculata* cultivar Macaibo.



A análise eletroforética em gel de poliacrilamida, com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) da preparação purificada do CPSMV-MC, nas diluições 1:20 e 1:40 revelaram a presença de dois componentes protéicos no gel referentes as proteínas capsidiais, permitindo estimar seus pesos moleculares de aproximadamente 22,5 e 39 KDa (FIGURA 5). Esses valores correspondem aos valores dos vírus do gênero *Comovirus*, que apresentam duas

proteínas na sua capa protéica com massas moleculares estimadas entre 40-45 KDa e 21-29 KDa (KING *et al*, 2011)

Figura 5- Eletroforese em gel de poliacrilamida da preparação purificada de *Cowpea severe mosaic virus* isolado Macaibo (CPSMV-MC), em duas diluições 1:20 e 1:40, corados com Coomassie Azul Brilhante G. M- Marcador molecular de proteína (Promega – Madison, WI, USA).



4.3. Obtenção de antissoro policlonal para CPSMV-MC

O método usado para produção de antissoro policlonal por meio da imunização de coelhos com preparações purificadas de vírus, mostrou-se eficiente apresentando resultados satisfatórios com a produção de antissoro de boa qualidade e com títulos elevados atendendo o objetivo principal possibilitando a identificação de CPSMV.

O coelho imunizado com a preparação viral purificada de CPSMV-MC produziu antissoro policlonal reativo com o isolado CPSMV-MC e os demais isolados de CPSMV, mantidos em casa de vegetação.

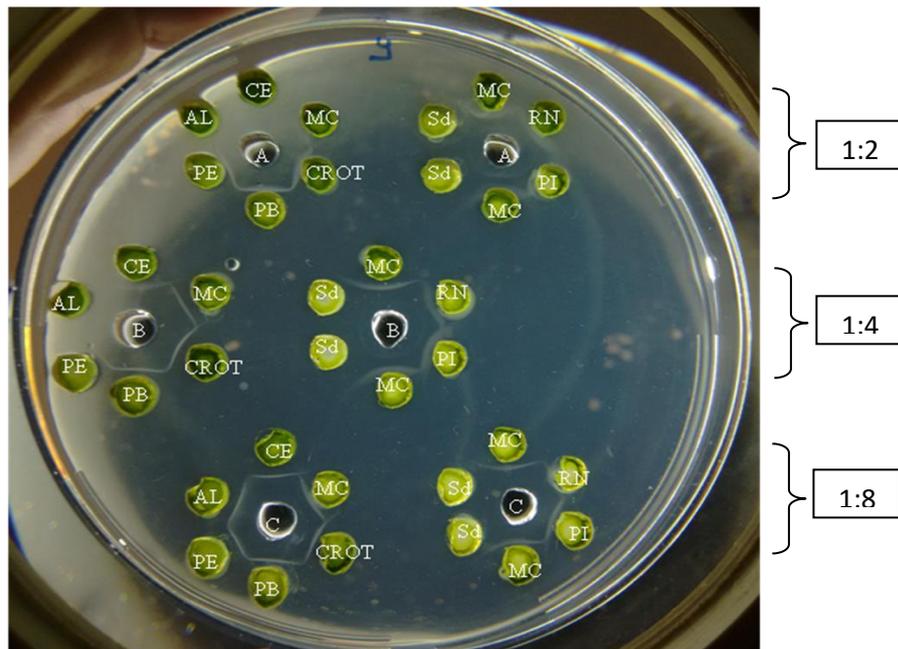
A detecção por meio do teste de dupla difusão em ágar, não apresentou reação com extrato de plantas sadias, evidenciando o sucesso da purificação e a qualidade do antissoro produzido. Quando no processo de purificação o antígeno não se encontra da forma mais pura possível, durante o processo de imunização será também produzido anticorpo para proteína vegetal, conseqüentemente, o anticorpo produzido reagirão com proteínas vegetais, reduzindo a eficiência dos testes sorológicos quanto á diagnose (ALMEIDA; LIMA,2001) podendo até mesmo comprometer os resultados.

A produção de antissoro teve início 15 dias após a última imunização e foi avaliado por um período de 10 meses, durante o período avaliado por meio do teste de dupla difusão em ágar o título do antissoro (AS-MC) foi de 1: 1.024.

Em testes de relacionamento sorológico, entre diferentes isolados do mesmo vírus, o CPSMV-MC mostrou-se sorologicamente relacionado aos demais isolados de CPSMV, pertencente ao banco ativo de vírus do Laboratório de Virologia Vegetal da UFC. O antissoro produzido permitiu uma boa capacidade de diagnose de doenças causadas por CPSMV, observado pela nitidez da linha de precipitação (FIGURA 5).

Os resultados da determinação do título do antissoro possibilitaram a observação do relacionamento sorológico entre os isolados de CPSMV utilizando o antissoro AS-MC, mostrando uma forte reação de todos os isolados testados com o antissoro e também a formação de esporão próximo ao extrato com isolado de CPSMV-MC, demonstrando que esse isolado relacionado aos demais, seja sorologicamente distinto. Para Zerbine *et al.* (2006) antígenos idênticos produzirão bandas que se unem perfeitamente, antígenos sorologicamente distintos, porém relacionados produzirão bandas e o “esporão” e antígenos não relacionados com o anticorpo não produzirão bandas. Esses resultados foram melhor observados nas diluições 1:4 e 1:8 (FIGURA 6). Segundo Almeida, Lima (2001) o teste de dupla difusão é usado no estudo do relacionamento sorológico entre estirpes de um mesmo vírus ou mesmo entre espécies de vírus de um mesmo grupo taxonômico.

Figura 6- Parte da avaliação do título por Dupla Difusão em Ágar, utilizando diluições de antissoro obtido de *Cowpea severe mosaic virus* isolado da cultivar Macaibo. Nos orifícios periféricos foram preenchidos com os extratos foliares obtidos de feijão caupi infectado com os isolados virais: CE: CPSMV- CE; MC: CPSMV- MC; CROT: CPSMV- CROT; PB: CPSMV-PB; PE: CPSMV- PE; AL: CPSMV-AL; RN: CPSMV- RN; PI: CPSMV-PI e Sd- extrato foliar de feijão caupi sadio. Nos orifícios centrais foram preenchidos com AS-MC: A- Diluição 1:2; B- Diluição 1:4 e C- Diluição 1:8.



Fonte: Elaborada pela autora

4.4. Caracterização Biológica e Sorológica

4.4.1 Gama de plantas hospedeiras

No estudo de gama parcial de plantas hospedeiras os resultados sintomatológicos e sorológicos confirmaram a infecção por CPSMV. Esses resultados mostraram diferenças biológicas quanto á reação aos isolados virais CPSMV-CE e CPSMV-MC.

Nas espécies *C. amaranticolor* e *C. quinoa*, os sintomas observados foram de lesões necróticas locais, no entanto, as mesmas diferiram em número, quantidade e tamanho. Em folhas de *C. amaranticolor* inoculadas com CPSMV-CE os sintomas se manifestaram com seis dias após a inoculação sendo 30 o número de lesões locais por folha, enquanto com CPSMV-MC os sintomas surgiram oito dias após a inoculação e foi observado cinco lesões por folha inoculada. As folhas de *C. quinoa* apresentaram sintomas cinco dias após a inoculação com CPSMV-CE e uma média de 28 lesões por folha inoculada, já para o isolado

CPSMV-MC os sintomas surgiram seis dias após a inoculação e as quantidades de lesões por folha inoculada foi de 10 lesões.

A ausência de sintomas nas espécies inoculadas com os isolados CPSMV-MC e CPSMV-CE em: *Cassia occidentalis*; *Clitoria ternatea*; *Leucena leucocephala*; *Macroptilium atropurpureum*; *M. lathyroides* e *Phaseolus vulgaris*, foi confirmado por sorologia. Lima *et al.* (2005b) objetivando identificar e caracterizar um novo isolado de CPSMV encontrado infectando *Crotalaria paulinea* no Estado do Maranhão, realizaram também estudos biológicos por meio da gama de hospedeiros em espécies da família Fabaceae e observaram que o isolado obtido de *C. paulinea* (CPSMV-CROT) também não infectou essas mesmas espécies. O contrário foi observado para cultivares de *V. unguiculata* testadas, ‘Canapú’; ‘Canapuzinho’; ‘Corujinha’; ‘Costela- de-Vaca’; ‘Feijão Preto’; ‘Lizão’; ‘Maroatã’; ‘Manteigão’; ‘Milagroso’; ‘Paulistinha’; ‘Pingo de ouro’; ‘Pitiúba’; ‘Rouxinho’ e ‘Sempre verde’, sendo todas infectadas com os dois isolados de CPSMV, com exceção da ‘Macaibo’ que não foi infectada pelo CPSMV-CE. Lima *et al.* (2005b) também observou que o isolado de CPSMV-CROT infectou quase todas as cultivares de feijão caupi, o que não aconteceu com a ‘Macaibo’, corroborando com os resultados encontrados nessa pesquisa.

A sintomatologia variou entre os isolados virais, o CPSMV- CE apresentou sintomas que variou de Lesões necróticas a Mosaico Severo com Bolhosidade entre as espécies vegetais inoculadas. Para a espécie *V. unguiculata* os sintomas variou de mosaico leve a mosaico severo com bolhosidade, a cultivar Marataoã apresentou sintoma de mosaico leve, para este isolado. O mesmo foi observado por Lima *et al.* (2011a) em estudo de resistência simples e múltipla a vírus em genótipos de caupi. Para o isolado de CPSMV-MC os sintomas observados foram de lesões locais necróticas a mosaico leve. A espécie *V. unguiculata* apresentou sintomas de mosaico leve para a maioria dos genótipos inoculados, com exceção para os genótipos ‘Milagroso’; ‘Pingo de Ouro’ e ‘Sempre verde’, nas quais os sintomas observados foram de mosaico (TABELA 4). Este mesmo comportamento foi observado em estudos realizados por Lima *et al.* (2011a).

Camarço *et al.* (2009); Lima *et al.* (2011a) e Lima *et al.* (2012) observaram também que o CPSMV-MC foi o único isolado de CPSMV capaz de infetar a ‘Macaibo’, o que comprova a existência de diferença biológica entre CPSMV-MC e CPSMV-CE, confirmadas na presente pesquisa e que precisam ser consideradas em programas de melhoramento para a produção de variedades resistentes.

Tabela 4- Reações sintomatológicas e resultados de dupla difusão em ágar, em diferentes espécies de plantas inoculadas com os isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV-CE e CPSMV-MC)

Espécie Vegetal	CPSMV-CE		CPSMV-MC	
	Sintoma*	DDA	Sintoma*	DDA
AMARANTACEAE				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	LINe	+	LINe	+
<i>C. quinoa</i>	LINe	+	LINe	+
FABACEAE				
<i>Cassia occidentales</i>	SS	-	SS	-
<i>Clitoria ternatea</i>	SS	-	SS	-
<i>Leucena</i> sp.	SS	-	SS	-
<i>Macropitilium atropurpureum</i>	SS	-	SS	-
<i>M. lathyroides</i>	SS	-	SS	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SS	-	SS	-
<i>Vigna unguiculata</i>				
‘Canapú’	MS	+	ML	+
‘Canapuzinho’	MS	+	ML	+
‘Corujinha’	M	+	ML	+
‘Costela- de-Vaca’	MS	+	ML	+
‘Feijão Preto’	M	+	ML	+
‘Lizão’	MS	+	ML	+
‘Macaibo’	SS	-	ML	+
‘Maroatã’	ML	+	ML	+
‘Manteigão’	MS/Bo	+	ML	+
‘Milagroso’	M	+	M	+
‘Paulistinha’	MS/Bo	+	ML	+
‘Pingo de ouro’	MS/Bo	+	M	+
‘Pitiúba’	MS/Bo	+	ML	+
‘Rouxinho’	MS/Bo	+	ML	+
‘Sempre verde’	MS/Bo	+	M	+

* LINe- Lesões Necróticas; MS- Mosaico Severo; M- Mosaico; ML- Mosaico Leve; Bo- Bolhosidade; SS- Sem sintoma

4.4.2 Avaliação de título e especificidade dos antissoros e antígenos

4.4.2.1 Determinação do título de antissoro por Dupla Difusão em Ágar

No ensaio envolvendo a titulação dos antissoros (AS), diluição máxima do antissoro capaz de ainda reagir com o antígeno que lhe deu origem (ALMEIDA, 1995), para os isolados de CPSMV, nas diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 e 1:1.024, observou-se uma variação dos títulos dos antissoros analisados pela técnica de DDA. Para os AS obtidos dos isolados virais do CPSMV-CE (AS-CE), CPSMV-MC (AS-MC), CPSMV-PE (AS-PE) e CPSMV-PI (AS-PI), os títulos foram de 1:64, ou seja a diluição máxima destes antissoros que ainda apresentou a formação da linha de precipitação. Para os AS obtidos para CPSMV-Crotalaria (AS-CROT) e para CPSMV-Alagoas (AS-AL), o título foi até 1:256 e para o CPSMV- Paraíba (AS-PB) o título máximo do AS foi de 1:512 (TABELA 5). Essas reações foram observadas para todos os antígenos de CPSMV analisados e sem nenhuma reação com extrato obtido de planta sadia. Silva *et al* (2016) obtiveram, também, títulos elevados, estudando outro isolado viral do gênero *Comovirus: Squash mosaic virus* (SqMV) utilizando a mesma diluição do extrato vegetal pelo teste de dupla difusão em ágar.

Tabela 5- Determinação do título de antissoro de isolados de *Cowpea severe mosaic virus* obtidos em diferentes anos

Antissoros	Título do Antissoro									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1.024
PI (1980)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AL (2005)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PE (2006)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CE (2010)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CROT (2011)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PB (2011)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MC (2011)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Embora os títulos tenham sido altos quando determinados pela técnica de Dupla Difusão em Ágar, observou-se que para todos os antissoros analisados, o melhor resultado, por meio da observação de linhas específicas de precipitação foi das diluições até 1:8, apresentando uma linha bem evidente e não comprometendo a identificação viral, por se tratar

de técnica sorológica não muito sensível em relação as diferentes variações da técnica de ELISA.

No entanto, bons resultados, com visualização das linhas de precipitação foram observados com as diluições de 1:8 e 1:16 com os AS: CE, MC, PE e PI e na diluição de 1:64 com AS: PB, CROT e AL ficando a linha de precipitação bem fraca a partir desse título. Para o AS-PB, o título máximo foi de 1:512 com a formação de uma linha de precipitação muito fraca.

Nesse ensaio, foi observado que o AS-PI obtido no ano 1980, apresentou resultados confiáveis para detecção de CPSMV. Uma purificação de boa qualidade é fundamental para a produção de antissoro de qualidade, podendo o mesmo ser estocado a -20 °C por mais de 20 anos e ainda apresentar confiabilidade para fins de diagnose de doença viral.

Apesar de menos sensível quando comparado com outras técnicas, o teste de dupla difusão em ágar é ainda utilizado para avaliar títulos de antissoros, sobretudo para vírus poliédricos (Gênero *Comovirus*), possibilitando a diagnose de viroses vegetais de rotina e para o estudo do relacionamento sorológico entre algumas espécies de vírus de plantas (LIMA *et al.*, 2012).

A partir das avaliações dos títulos e da qualidade dos antissoros, através da nítida visualização das linhas de precipitação, os antissoros AS-MC e AS-CROT foram selecionados para realização do ensaio envolvendo a diluição máxima dos antígenos. A diluição dos antissoros foi de 1:4. Na diluição máxima dos antígenos, utilizando as diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 e 1:512, foi observado que até a diluição 1:8 do extrato vegetal foi visualizado uma boa linha de precipitação, para todos os isolados de CPSMV analisados neste ensaio.

4.4.2.2 Titulação de antissoro por PTA-ELISA e IP-ELISA

Os valores de absorbância dos isolados de CPSMV, quando avaliados por PTA-ELISA, variaram bastantes entre os antissoros utilizados (FIGURAS 7A-7F). Por esta razão, os títulos dos antissoros se comportaram de maneira diferente entre os isolados nas diluições 1:100; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000; 1:64.000. Os títulos máximos entre os antissoros avaliados variaram de 1:500 a 1:16.000, utilizando a técnica de PTA-ELISA.

O título máximo para os antissoros AS-MC e AS-CROT foi de até 1:16.000 (FIGURA 7A e 7B). Para o antissoro AS-PE, o título máximo foi de 1:1.000 (FIGURA 7C), os valores de absorvência do extrato da planta sadia foram altos, embora esse antissoro tenha sido previamente absorvido com extrato de planta sadia, interferido nos resultados. De outra parte, as variabilidades dos resultados em PTA-ELISA podem indicar que as partículas dos isolados de CPSMV não aderem adequadamente ao fundo dos orifícios das placas de ELISA, comprometendo a diagnose por esse método sorológico.

Na avaliação por PTA-ELISA, o título para o antissoro AS-PB (FIGURA 7D) foi muito baixo 1:500, quando comparado com os demais antissoros obtidos para os isolados de CPSMV. Os resultados, no entanto, foram bastante irregulares, não permitindo uma segura identificação viral, com base nos dados para os extratos de plantas sadias. O mesmo foi observado com o AS-PI, com diferenças nos valores de absorvências entre os isolados testados. Assim, o título do antissoro foi muito baixo.

O título do antissoro AS-AL (FIGURA 7E), para a maior parte dos isolados, foi de 1:1.000, exceto para o isolado de CPSMV-CE, cujo os valores de absorvência foram altos quando comparado com os demais isolados, ficando o título 1:8.000 para o extrato obtido deste isolado.

Para os testes de PTA-ELISA, foram observadas variações nas absorvências dos antígenos de CPSMV, entre os diferentes antissoros testados. Lima *et al.* (2001) também não encontraram bons resultados em PTA-ELISA, utilizando um antissoro para CPSMV isolado do Estado do Ceará, indicando que, provavelmente, as partículas de vírus não adsorvem bem no fundo das placas de ELISA. As análises dos resultados com todos os antissoros e suas diluições indicam inconsistências quanto à correta determinação de resultados positivos e resultados negativos, indicando a inadequação da técnica de PTA-ELISA para identificação de isolados de CPSMV e, possivelmente, para outras espécies do gênero *Comovirus*.

As análises envolvendo os testes de IP-ELISA (FIGURAS 8A-8F) apresentaram maiores consistências nos dados, tanto para as absorvências entre os isolados, quanto para os antissoros testados nas diferentes diluições 1:100; 1:500; 1:1.000; 1:2.000; 1:4.000; 1:8.000; 1:16.000; 1:32.000; 1:64.000. Os títulos para os antissoros foram mais elevados quando comparados com os resultados obtidos por PTA-ELISA, e mais consistentes entre os isolados de CPSMV apresentando valores de absorvência mais próximos entre si. Os títulos variaram 1:8.000 a 1:16.000.

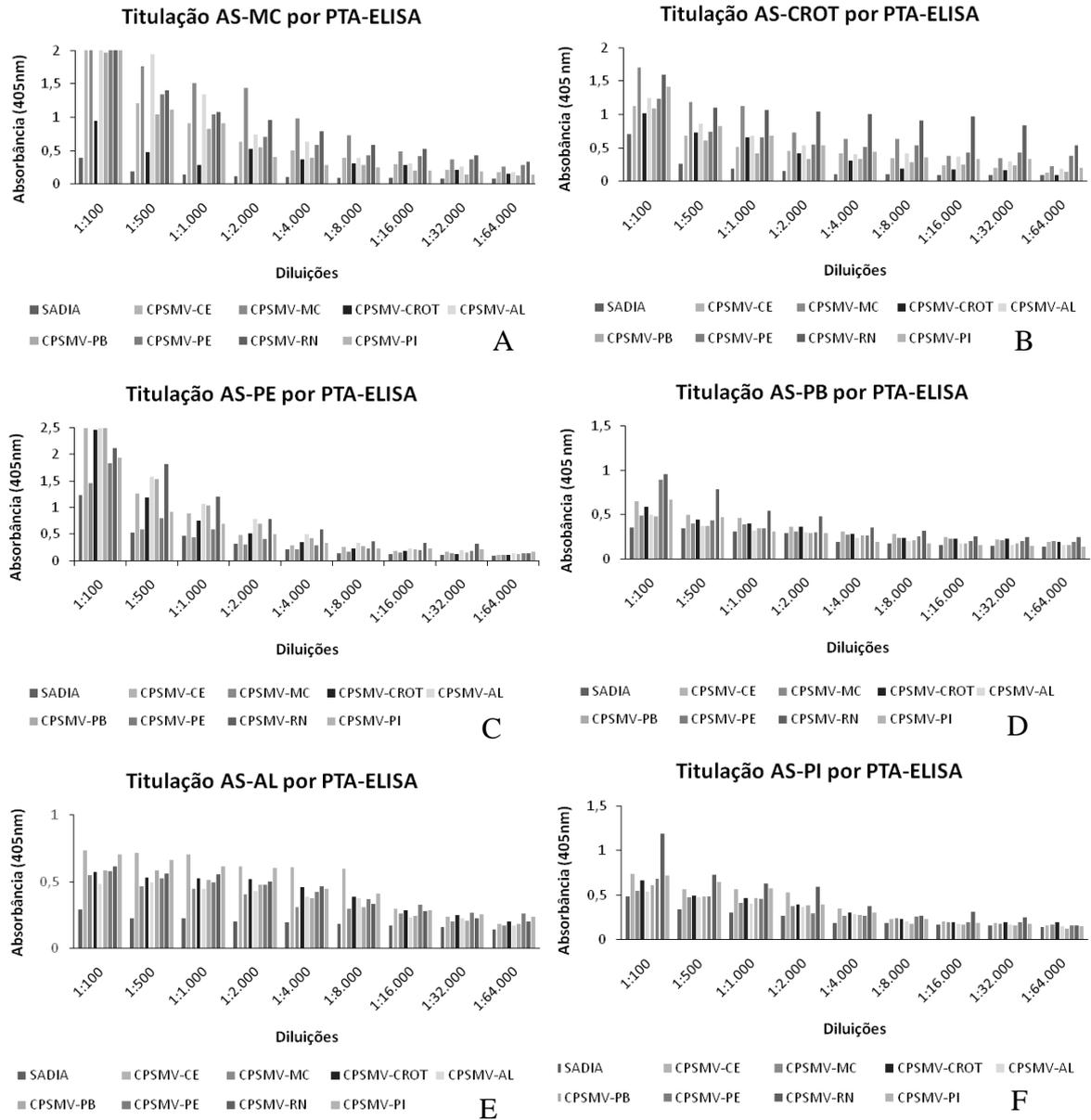
Para o AS-MC, o título máximo foi 1:16.000 (FIGURA 8A), observando um maior valor de absorbância para o isolado de CPSMV- MC quando comparado aos demais isolados utilizando esse antissoro. O título máximo de 1: 16.000 também foi encontrado para o AS-CROT (FIGURA 8B) e AS-AL. Para o AS-CROT ocorreram variações entre os isolados de CPSMV, com baixo valor de absorbância para CPSMV-CE, possivelmente, em razão do seu uso no processo de obtenção do extrato por imunoprecipitação. Utilizando o AS-PB pode-se observar um comportamento semelhante para o isolado CPSMV-CE, quando comparado com o AS-CROT, porém para os demais isolados os títulos variaram de 1: 4.000 a 1:32.000.

Para o AS-PE (FIGURA 8C), o título máximo foi de 1:8.000, porém quando comparado entre os isolados de CPSMV, utilizando esse antissoro, os títulos chegaram até 1:64.000 para os isolados de CPSMV-MC, CPSMV-AL e CPSMV-PI. Utilizando o AS-AL (FIGURA 8E) o título máximo foi de 1:16.000, variando de 1:4.000 a 1:64.000, quando comparado entre os isolados, sendo o menor título encontrado para o CPSMV-MC.

O título máximo do AS-PI (FIGURA 8F) foi de 1:8.000. Este antissoro é o mais antigo da coleção, tendo sido obtido em 1980. No entanto, mesmo com mais de 30 anos armazenado em freezer, o resultado com este antissoro demonstrou confiabilidade para fins de diagnose de doença viral. Possivelmente a preservação da integridade deste antissoro esteja associada ao armazenamento adequado a -20 °C, a qualidade da preparação viral usada na sua produção e a integridade das imunoglobulinas que compõem o antissoro (ALMEIDA, 1995; LIMA, 2015).

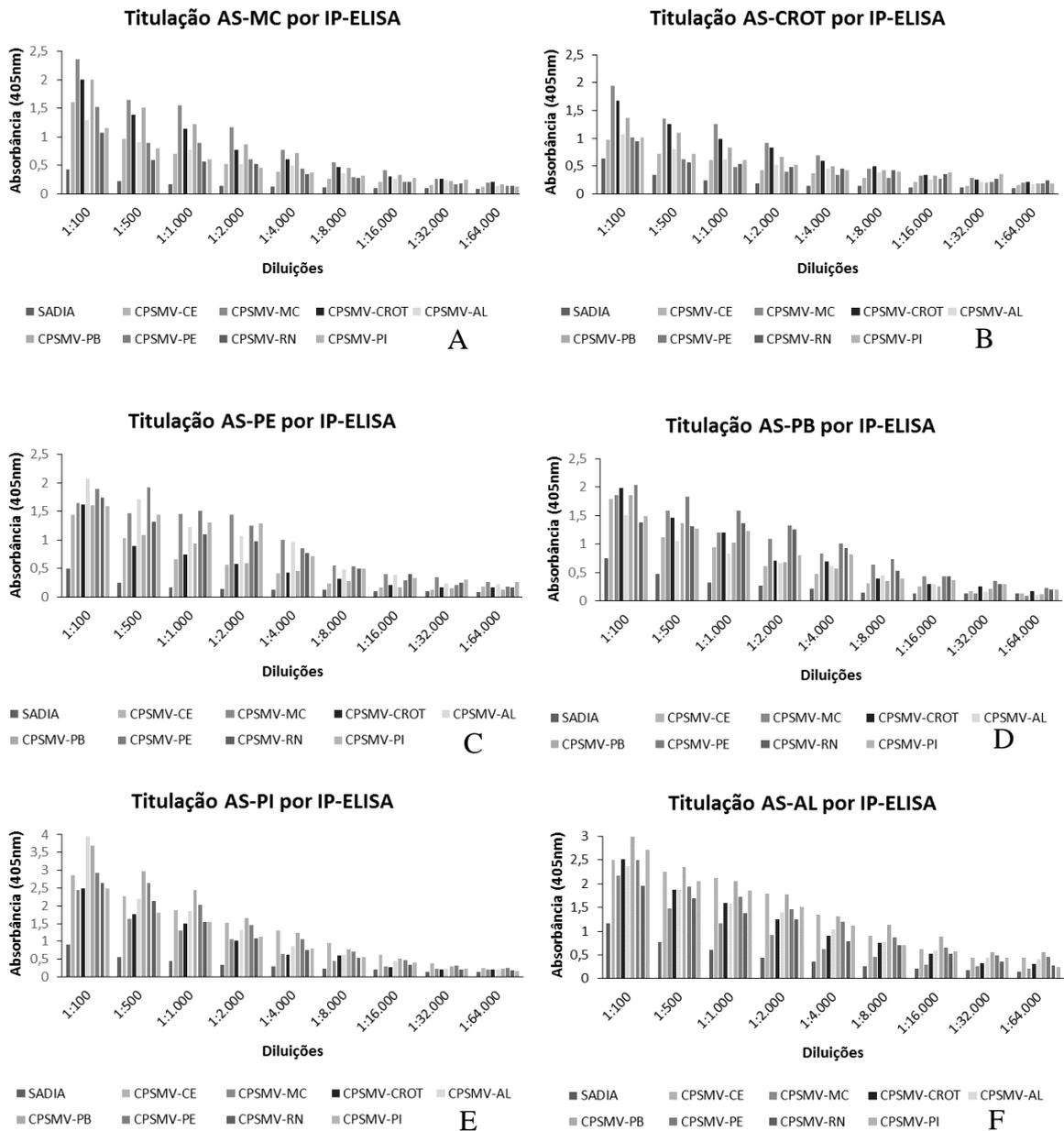
A técnica de IP-ELISA mostrou-se mais adequada para a detecção do CPSMV, quando comparado à PTA-ELISA, indicando que o método de imunoprecipitação associado PTA-ELISA aumentou a eficiência e a especificidade do teste para os isolados de CPSMV.

Figura 7. Titulação de antissoros obtidos para diferentes isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), pela técnica de PTA-ELISA. (A) Antissoro obtido para CPSMV-MC, (B) Antissoro obtido para CPSMV-CROT, (C) Antissoro obtido para CPSMV-PE, (D) Antissoro obtido para CPSMV-PB, (E) Antissoro obtido para CPSMV-AL, (F) Antissoro obtido para CPSMV-PI.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 8. Titulação de antissoros obtidos para diferentes isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) pela técnica de IP-ELISA. (G) Antissoro obtido para CPSMV-MC, (H) Antissoro obtido para CPSMV-CROT, (I) Antissoro obtido para CPSMV-PE, (J) Antissoro obtido para CPSMV-PB, (K) Antissoro obtido para CPSMV-AL, (L) Antissoro obtido para CPSMV-PI.

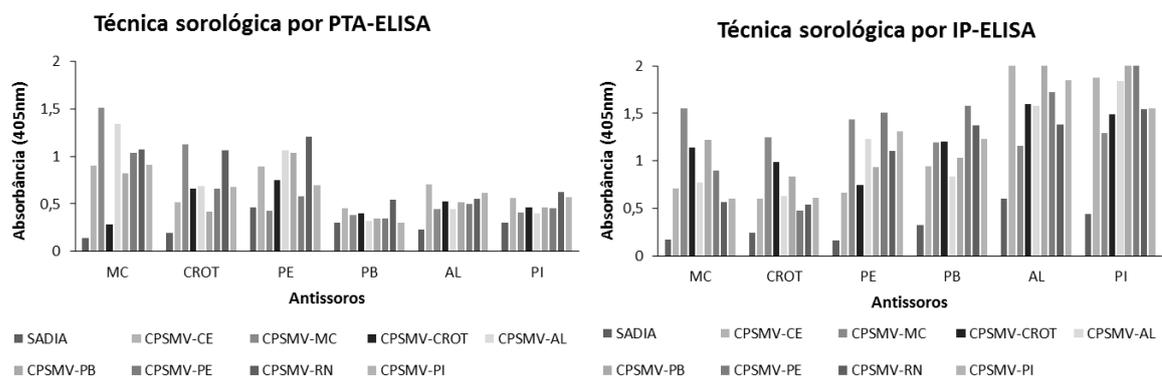


Fonte: Elaborada pela autora

Na comparação das técnicas sorológicas PTA-ELISA e IP-ELISA, utilizando os antissoros (MC, CROT, PE, PB, AL e PI) na diluição 1:1.000 entre os isolados de CPSMV, devido a sensibilidade deste teste, em relação a outros testes sorológicos, essa diluição mostrou-se adequada para detecção viral, sem comprometimento a diagnose viral (Figura 9). Essa diluição é bastante utilizada em testes de rotina na diagnose de doenças ocasionadas por vírus e identificação viral, no Laboratório de Virologia Vegetal. A técnica de PTA-ELISA apresentou absorvância bastante variada entre os isolados de CPSMV utilizando o mesmo antissoro, como também entre os mesmos isolados, utilizando antissoros diferentes. Já na técnica de IP-ELISA essa variação foi bem menor entre os isolados, tanto utilizando o mesmo antissoro para todos quanto quando comparado com os diferentes antissoros testados, reforçando a confiabilidade desta técnica para diagnose e identificação viral. Silva *et al.* (2016) observaram que a técnica de IP-ELISA apresentou melhor resultado para a detecção SqMV, vírus do gênero *Comovirus*, utilizando essa mesma diluição.

Este teste foi desenvolvido e validado por Lima *et al.* (2011b), em razão de problemas com o vírus de plantas, cujas partículas não são adequadamente aderidas aos fundos dos orifícios das placas de ELISA, especialmente para espécies do gênero *Comovirus*. O IP-ELISA foi desenvolvido para a detecção de vírus de plantas de diferentes famílias e gêneros (LIMA, 2015).

Figura 9- Comparação sorológica entre as técnicas de PTA-ELISA e IP-ELISA, utilizando diferentes antissoro obtido para isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) na diluição 1:1.000.



4.5 Caracterização Molecular

4.5.1 Desenho de primers específicos para CPSMV

Parte dos *primers*, utilizados nesse estudo para a reação da RT-PCR, possibilitou a detecção dos isolados virais de CPSMV exceto os *primers* com combinações A e C para a região do RNA1 e o B para a região do RNA2, onde não amplificou o tamanho do fragmento esperado (TABELA 6). Para o sequenciamento parcial das regiões do genoma, a amplificação da poliproteína referente ao RNA 1 produziram um fragmento de 735 pb, utilizando os *primers* senso descrito na literatura (ABREU *et al.*, 2012) e o antisenso desenhado neste estudo (combinação B). Os *primers* desenhados para o RNA2, referente ao gene da capa protéica (*cp*), produziram um fragmento de 1.579 pb (combinação D).

Tabela 6- Combinação dos *primers* utilizado para detecção e sequenciamento do *Cowpea severe mosaic virus*

<i>Primers</i>	Sequência 5'- 3'	Orientação	Combinação	Fragmento Amplificado (pb)
1F2000	GAG AAG GGA ATG CAC TTT GAT T	senso	A	2200
1R4000	AGA TTA TAT TCC ATA GGA AGT A	antisenso		
1F2000	GAG AAG GGA ATG CAC TTT GAT T	senso	B	735
1R735	GCC AAA ACA ACA CCA ACA ACT A	antisenso		
1F1117	TAC AAG CTC TAC TAC AAG	senso	C	1037
1R2135	ACC AGA GCA GGT ACA CTA TC	antisenso		
1F96	GGC AAG AAC ACA ATA CAG AG	senso	D	2058
1R2135	ACC AGA GCA GGT ACA CTA TC	antisenso		
1F613	GAC AAC AAC AAG CTG GTA TG	senso	E	606
1R1219	CAA CTT GCG GGA ATA TCT T	antisenso		
2F1456	AGC ACA AGA TTG ACA AGC CA	senso	A	696
2R2132	GCA CGT CCC ATC CAT CAT TT	antisenso		
2F1929	GCA TTT AAC CCT AAC CCG TG	senso	B	681
2R2591	CTT TGA GCC CGA CCA TCT TG	antisenso		
2F2421	GCA AAG CAA GAC AGG ACG AC	senso	C	1085
2R3491	TAA CAG TCG CTG CCC AAG AC	antisenso		
2F1611	ATG CTT GGR GCM ATG RTW G	senso	D	1579
2R3172	TKC CAG CAC TTT TCC ATG	antisenso		

4.5.2 Análise molecular de isolados de CPSMV obtidos de feijão caupi

4.5.2.1 Extração de RNA total e RT-PCR

O isolamento do RNA viral com o reagente Brazol (LGC), mostrou-se eficaz, quando se utilizou o protocolo descrito pelo fabricante. O método da extração foi uma das vantagens desse ensaio por ser um protocolo bem rápido, com duração em torno de uma hora, além de combinar as propriedades do fenol e do tiocianato de guanidina que são reagentes eficientes para o isolamento de RNA de diferentes espécies de vírus (CHOMCZYNSKI; SACHI, 1987).

As reações de amplificação por RT-PCR revelaram a presença de bandas de tamanho esperado no gel de agarose referente à parte da região do RNA1 e do RNA2 dos oito isolados de CPSMV. Os *primers* 1F2000 (GAG AAG GGA ATG CAC TTT GAT T) (ABREU, 2012) e 1R714 (GCC AAA ACA ACA CCA ACA ACT A), utilizados neste estudo, produziram fragmentos de tamanho esperado de aproximadamente 735 pb referente a parte da região do RNA1. Os *primers* F1611 (ATG CTT GGR GCM ATG RTW G e R3172 TKC CAG CAC TTT TCC ATG) produziram um fragmento de tamanho 1579 pb, referente ao genoma parcial da capa protéica, localizada na região do RNA2.

4.5.2.2 Sequenciamento e análise filogenética

A análise envolvendo o RNA1 apresentou dois grupos. O primeiro grupo contendo os isolados que normalmente causam sintomas severos em feijão caupi compreendendo CPSMV-CE, CPSMV-CROT, CPSMV-PE, CPSMV-AL, CPSMV-RN, CPSMV-PI e CPSMV-PB (CAMARÇO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011) e, no segundo grupo, o isolado de CPSMV-MC que causa sintomas leve em genótipos de caupi (LIMA *et al.*, 2011a; LIMA *et al.*, 2012).

De acordo com os resultados obtidos do sequenciamento parcial do RNA 1, verificou-se que os isolados brasileiros de CPSMV diferiram do isolado americano NC 003545 (FIGURA 10A). A mesma diferença foi relatada em outros estudos, envolvendo esta mesma espécie viral, com outros isolados (ABREU *et al.*, 2012). Essa diferença era esperada, pois os isolados brasileiros apresentaram uma alta distância genética em relação ao isolado

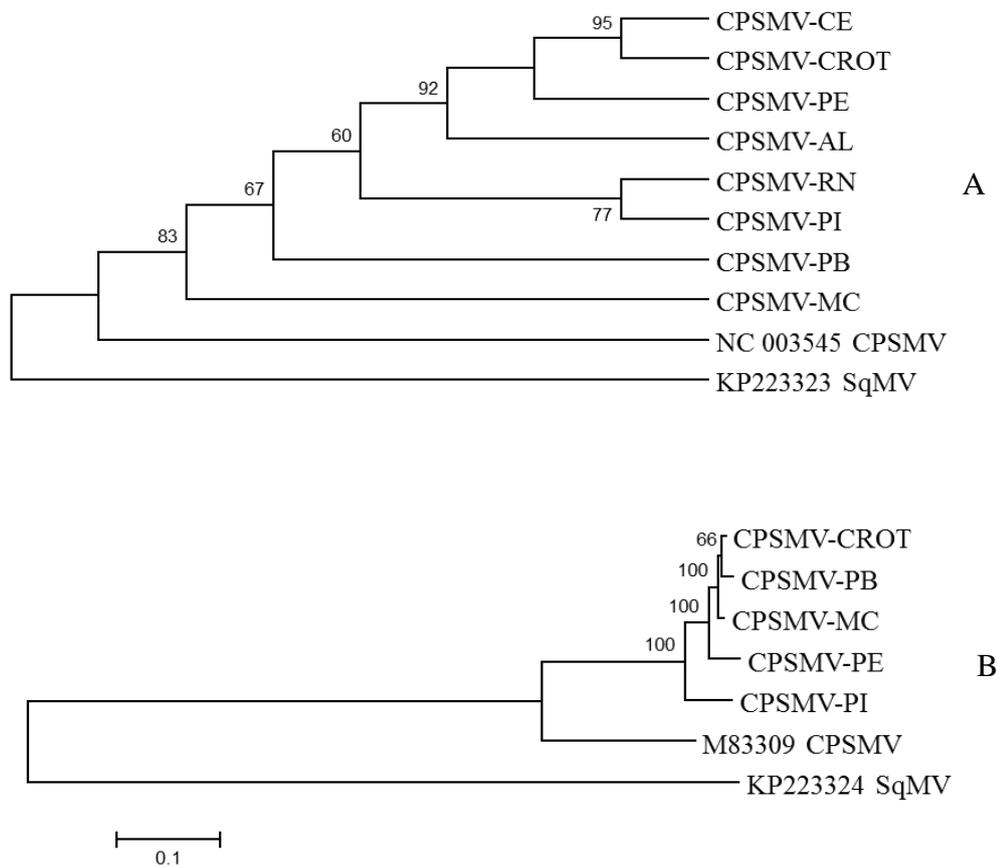
americano, bem como uma baixa identidade de nucleotídeos, quando comparada com o referido isolado. Desse modo, ficou mais distante na árvore filogenética, porém, mais próximo ao CPSMV-MC, embora apresente características biológicas diferentes dos demais isolados avaliados no presente estudo.

Analisando os fragmentos parciais do RNA 1, pode-se observar uma separação entre o CPSMV-MC, formando um clado separado dos demais isolados (FIGURA 10A). Vale ressaltar as diferenças biológicas do CPSMV-MC em relação aos demais isolados quanto à sintomatologia, em que o CPSMV-MC causa sintomas de mosaico leve em alguns genótipos de feijão caupi e o fato da cultivar Macaibo ser infectada por esse isolado, permanecendo imune aos demais isolados de CPSMV (CAMARÇO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011a; LIMA *et al.*, 2012). Diferença sorológica também foi confirmada por dupla difusão em ágar, onde o isolado CPSMV-MC mostrou-se sorologicamente distinto quando utilizou antissor (AS-MC), formando a linha de precipitação e “esporão”. Pode-se observar, também na árvore filogenética gerada, que quatro isolados virais se agrupam, porém, em clados distintos, dois a dois (CPSMV-CROT e CPSMV-CE; CPSMV-PI e CPSMV-RN), os quais apresentaram alta identidade de nucleotídeos com seus pares, diferentemente do observado nos demais isolados avaliados. Esse resultado demonstra que, mesmo apresentando sintomatologia semelhante, com mosaico severo, bolhosidade e deformação foliar pelos isolados, exceto pelo CPSMV-MC, existem diferenças moleculares evidentes na composição e arranjo da sequência de nucleotídeos de cada isolado estudado.

Para a região do RNA 2, referente ao gene parcial da CP, observa-se que os isolados brasileiros diferiram do isolado americano (FIGURA 10B), sendo o mesmo observado em outros estudos, utilizando, a região da CP (CAMARÇO *et al.*, 2009; BEZERRA JR *et al.*, 2011). Resultado semelhante foi também encontrado quando comparado o RNA1, embora os isolados utilizado como referência tenham sido diferentes, tanto para o RNA 1 quanto para o RNA2, em virtude da ausência de dados disponíveis no banco de dados que contemple os dois segmentos genômicos. No RNA 2, observou-se que o CPSMV-MC agrupou-se junto aos isolados severos de CPSMV. Isso pode ser explicado em virtude da alta conservação da proteína capsial e também pode estar relacionado à evolução do vírus. Para finalizar, observou-se que o CPSMV-CROT agrupou junto ao CPSMV-PB, provavelmente em virtude do CPSMV-CE não constar nesse estudo. Ressalta também que esse agrupamento filogenético se deu por conta da baixa distância genética entre esses dois isolados, bem como da alta identidade de nucleotídeos entre eles (perfazendo quase 100% de identidade).

As diversidades genéticas e biológicas dos isolados de CPSMV detectadas enfatizam a necessidade da interação dos melhoristas e geneticistas com os virologistas, nos programas de pesquisa, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes a vírus.

Figura 10. Árvores Filogenéticas de isolados de *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV). Os números correspondem aos valores de bootstrap para 2.000 repetições. (A). Árvore filogenética de uma poliproteína do genoma parcial do RNA1. (B). Árvore filogenética baseado no gene da capa proteica presente no RNA2.

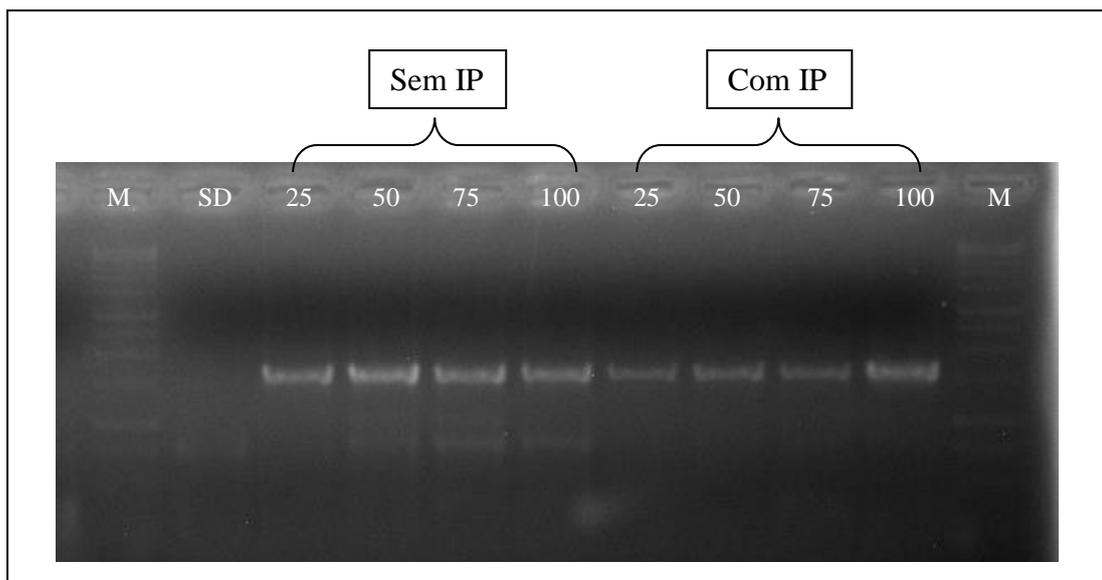


4.5.3 Comparação entre técnicas de extração

Neste ensaio, foi realizada a comparação entre a técnica de extração utilizando o kit comercial de extração (Brazol-LGC Biotecnologia) seguida da RT-PCR com a técnica de imunoprecipitação (IP) que combina as vantagens das propriedades imunológicas dos vírus com as vantagens práticas da RT-PCR, técnica desenvolvida e adaptada no Laboratório de Virologia Vegetal, UFC, para detecção de diferentes espécies de vírus de plantas.

A extração do RNA viral, utilizando uma etapa inicial de imunoprecipitação (IP) e a técnica convencional de extração com o kit comercial foi realizada com sucesso usando o reagente Brazol, porém a técnica de IP mostrou-se mais sensível para amplificação do RNA viral (FIGURA 11). Mesmo com pequena quantidade de tecido vegetal (25 mg), ocorreu amplificação do fragmento de banda de tamanho esperado, indicando que esta técnica pode ser usada para teste de diagnose. Outra vantagem desta etapa inicial de imunoprecipitação foi à redução de bandas inespecíficas nas amostras analisadas quando comparado com a extração sem essa etapa, minimizando alguns problemas resultantes de agentes inibidores.

Figura 11- Comparação entre métodos de extração utilizando reagente comercial *versus* extração com imunoprecipitação (IP). M- marcador molecular 1Kb Ladder, SD- Amostras sadia de feijão caupi. 25-100- Quantidade inicial de tecido vegetal de feijão caupi infectado com CPSMV-CE



Em estudos realizado por LIMA *et al.*, (2014) o IP-RT-PCR mostrou ser uma técnica prática e sensível para a amplificação de RNA de espécies virais de quatro gêneros diferentes: *Comovirus* (CPSMV, SQMV), *Cucumovirus* (CMV), *Potyvirus-Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e *Sobemovirus-Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) em diferentes plantas, indicando que esta técnica poderia também ser usada como um método de diagnóstico e de identificação viral.

A técnica do IP captura as partículas virais (antígeno-Ag) no fundo do tubo, ligadas ao anticorpo (antissoro-As) específico devido à formação do complexo As-Ag. Esse método de extração proporciona uma prévia separação das partículas virais dos constituintes celulares, sobretudo RNAs da própria planta, que ocorre durante o processo de extração, mostrando-se eficaz na purificação parcial das partículas dos vírus por meio da sua imunoprecipitação (LIMA *et al.* 2011b; LIMA, 2015).

Várias estratégias vêm sendo desenvolvidas a fim de evitar falsos negativos em técnicas moleculares e também aperfeiçoar a purificação de ácidos nucleicos reduzindo desta forma o risco de contaminação, durante o processo de extração. Algumas espécies vegetais hospedeiras de vírus contêm vários inibidores, tais como altos níveis de polifenóis e polissacarídeos, que podem interferir com a purificação de ácidos nucleicos, sobretudo RNA, comprometendo as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, muitos desses inibidores são resultantes da ação de fatores intrínsecos e extrínsecos produzidos pela planta como defesa contra patógenos, inclusive contra infecção viral (FERREIRA, 2013; GEUNA *et al.*, 1998; MELO *et al.*, 2008; ZERBINI *et al.*, 2006).

4.6 Interações entre espécies de vírus que infectam o feijão caupi

No estudo de interação, envolvendo três espécies virais [CPSMV (isolados CPSMV-CE e CPSMV-MC); CABMV (isolados CABMV-BV e CABMV-Fort) e CMV] inoculadas individualmente ou em combinação em plantas de feijão caupi cultivar Setentão, foram observados os seguintes sintomas: lesões locais necróticas ou cloróticas, mosaico leve, mosaico, mosaico severo, bolhosidade, redução e deformação foliar, subdesenvolvimento, necrose sistêmica, evoluindo para morte da planta indicando um forte sinergismo entre as espécies virais (TABELA 7).

Na natureza, as infecções ocasionadas por vírus podem ocorrer tanto de forma isolada, infecção simples, quanto em infecções mistas, denominada também de coinfeções. As coinfeções constituem um dos principais problemas enfrentados pelos melhoristas de plantas, pois genótipos com resistência a um vírus podem ter a resistência quebrada quando infectados por dois ou mais vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2005a).

As infecções mistas apresentaram, em geral, forte sinergismo entre CPSMV, CABMV e CMV, tanto em combinação com dois vírus quanto em combinação com os três vírus, com exceção para interação entre CPSMV-MC e CABMV-Fort, pois o sintoma observado foi de mosaico leve. Provavelmente, o efeito ocorrido foi antagônico, uma vez que observado isoladamente, o CABMV-Fort apresenta além de mosaico leve, lesões locais necróticas.

As infecções mistas podem constituir problemas de doenças específicas em muitas espécies cultivadas, podendo ocorrer relações sinérgicas ou antagônicas, ocasionando alterações nos sintomas da doença, alterações na movimentação sistêmicas dos vírus e aumento ou diminuição da concentração dos vírus nas plantas (LIMA *et al.*, 2005a)

Os isolados CPSMV-CE e CABMV-BV apresentaram os sintomas mais severos em comparação com CPSMV-MC, CABMV-Fort e CMV, quando inoculados isoladamente. O mesmo pode ser observado nas coinfeções, ou seja, em infecções com duas ou mais espécies virais, pois se observou uma sintomatologia mais severa e, em alguns casos, até mesmo em morte das plantas, quando inoculadas com a combinação CPSMV-CE+CABMV-BV+CMV (TABELA 7).

Tabela 7- Reações sintomatológicas da infecção mista entre *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV-BV e CABMV-Fort) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV-CE e CPSMV-MC) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em *Vigna unguiculata* cultivar Setentão.

Tratamentos	Sintomatologia *
1 CPSMV-CE	MS, Bo, DF
2 CPSMV-MC	ML
3 CABMV-BV	LN, MS, Bo, DF, SD
4 CABMV-Fort	LL, LN, ML
5 CMV	ML
6 CPSMV-CE + CABMV-BV	LN, MS, Bo, DF, NS, SD
7 CPSMV-CE + CABMV-Fort	LN, MS, DF
8 CPSMV-MC + CABMV-BV	LN, M, Bo, DF, SD
9 CPSMV-MC + CABMV-Fort	ML
10 CPSMV-CE + CMV	LN, MS, Bo, DF
11 CPSMV-MC + CMV	LC, M, Bo, DF
12 CABMV-BV + CMV	LN, M, DF
13 CABMV-Fort + CMV	LN, M, Bo, DF, SD
14 CPSMV-CE + CABMV-BV + CMV	LC, LN, MS, Bo, DF, NS, DF, MP
15 CPSMV-MC + CABMV-BV + CMV	LN, M, Bo, DF, SD
16 CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV	LC, LN, MS, Bo, DF, SD
17 CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV	LC, LN, M, Bo, DF, SD
18 SADIA	SS

*LL- Lesões Locais; LC- Lesões Cloróticas; LN- Lesões Necróticas; M- Mosaico; ML- Mosaico Leve; MS- Mosaico Severo; Bo- Bolhosidade; DF- Deformação Foliar; SD- Subdesenvolvimento; NS- Necrose Sistemica; MP- Morte da Planta; SS- Sem Sintomas

A interação entre o CPSMV-MC e CMV ocasionou sintomas que evoluíram de lesões cloróticas a mosaico, bolhosidade e deformação foliar, esta interação mostrou forte sinergismos entre esses dois vírus, uma vez que nas formas isoladas de infecção ambos apresentam sintomas de mosaico leve.

Segundo Lima *et al.* (2005a), normalmente, plantas com infecção mista, exibem sintomas mais severos do que aqueles observados em infecções isoladas, culminando em reduções significativas na altura da planta, peso e rendimento de grãos, com conseqüente, redução do crescimento e da produtividade. A idade da planta e o tempo de infecção viral têm efeito quantitativo e qualitativo sobre o feijão caupi, ou seja, quanto mais jovens as plantas no

momento da infecção mais severo serão os sintomas da doença e maior será o efeito sobre o rendimento (TAIWO; AKINJOGUNLA, 2006).

As plantas infectadas com CMV e com CPSMV-MC apresentaram sintomas de mosaico leve com reações menos severas para ‘Setentão’. Resultado semelhante foi encontrado por Lima *et al* (2011a) para ambos os vírus inoculados separadamente, com predominância de mosaico leve, em estudo de fonte de resistência em genótipos de feijão caupi.

A figura (12) aborda a interação de forma isolada e de forma mista entre os vírus analisados, comparando cada grupo com o material sadio. As plantas inoculadas com CPSMV apresentaram diferença nos sintomas, no isolado CPSMV-CE os sintomas observados foram mosaico severo, bolhosidade e deformação foliar, enquanto o isolado CPSMV-MC apresentou apenas mosaico leve (FIGURA 12A). Para o CABMV, os sintomas observados foram de lesões necróticas a mosaico leve para o isolado CABM-Fort e sintomas mais severos para o isolado CABMV-BV, que evolui de lesões necróticas a mosaico severo com bolhosidade e deformação foliar, um subdesenvolvimento também foi observado neste isolado (FIGURA 12B).

O efeito sinérgico na interação de CPSMV, CABMV e CMV potencializou os sintomas nas plantas inoculadas. As Figuras (12C e 12D) mostram claramente a diferença entre o desenvolvimento de uma planta sadia e uma planta com infecção mista.

Figura 12- Interação com três espécies de vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) inoculadas em *Vigna unguiculata* cultivar Setentão. A - Sadia e infecção simples com CPSMV; B – Sadia e infecção simples com CABMV; C - Sadia e infecção tripla com CPSMV-CE+ CABMV-BV+CMV e D - Sadia e infecção tripla entre CPSMV-MC + CABMV-BV+CMV.



Fonte: Elaborada pela autora

O resultado da infecção viral foi confirmado para todas as plantas inoculadas com as três espécies virais, por meio dos testes sorológicos. As plantas inoculadas com CPSMV foram confirmadas pelo teste de dupla difusão em ágar reagindo com antissoro específico para CPSMV, e para as plantas inoculadas com CABMV e CMV a detecção foi realizada por PTA-ELISA com os antissoros específicos para cada espécie viral.

A ausência de sintomas para as amostras sadias foi confirmada por sorologia para cada antissoro específico. As infecções virais comprovadas por sintomatologia e por análises sorológicas foram também confirmadas por RT-PCR. De cada tratamento foi escolhido uma amostra para ser analisada por RT-PCR utilizando *primers* específicos para cada espécie viral. A infecção foi confirmada pela visualização de fragmentos de bandas de tamanhos esperados após os géis serem corados com brometo de etídeo. O tamanho dos fragmentos amplificados

foram aproximadamente 1700 pb (FIGURA .13); 1085 pb (FIGURA .14) e 500 pb (FIGURA .15), utilizando os *primers* específicos para CABMV, CPSMV e CMV, respectivamente.

Figura 13 - Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com ampliações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 1.700 pb, esperado para vírus do gênero *Potyvirus*. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cultivar Setentão; 2 - CABMV-BV, 3- CABMV- Fort, 4 - CPSMV-CE + CABMV- BV, 5 - CPSMV-CE + CABMV- Fort, 6 - CPSMV-MC + CABMV- Bv, 7 - CPSMV-MC + CABMV- Fort, 8 - CABMV-Bv + CMV, 9 - CABMV-Fort + CMV, 10 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 11 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 12 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 13 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV.

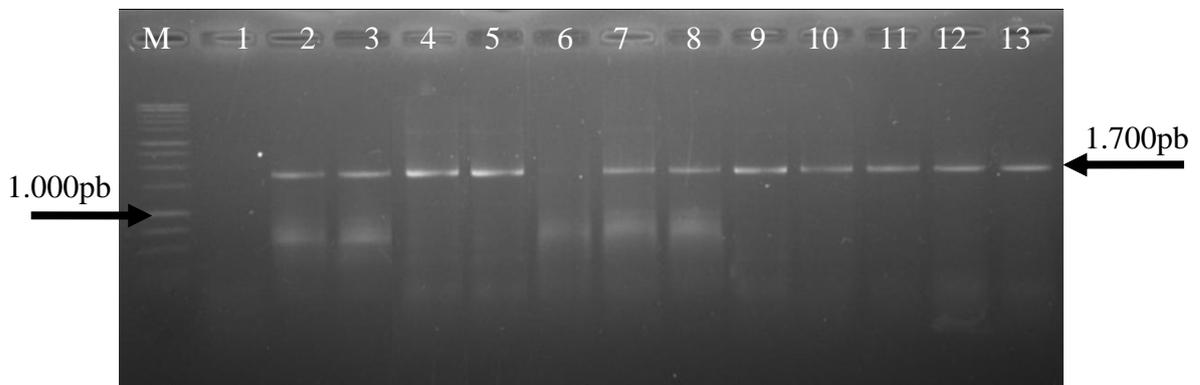


Figura 14 - Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com ampliações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 1.085 pb, esperado para CPSMV. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cv. Setentão; 2 - CPSMV-CE, 3- CPSMV-MC, 4 - CPSMV-CE + CABMV-Bv, 5 - CPSMV-CE + CABMV-Fort, 6 - CPSMV-MC + CABMV-Bv, 7 - CPSMV-MC + CABMV-Fort, 8 - CPSMV-CE + CMV, 9 - CPSMV-MC + CMV, 10 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 11 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 12 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 13 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV.

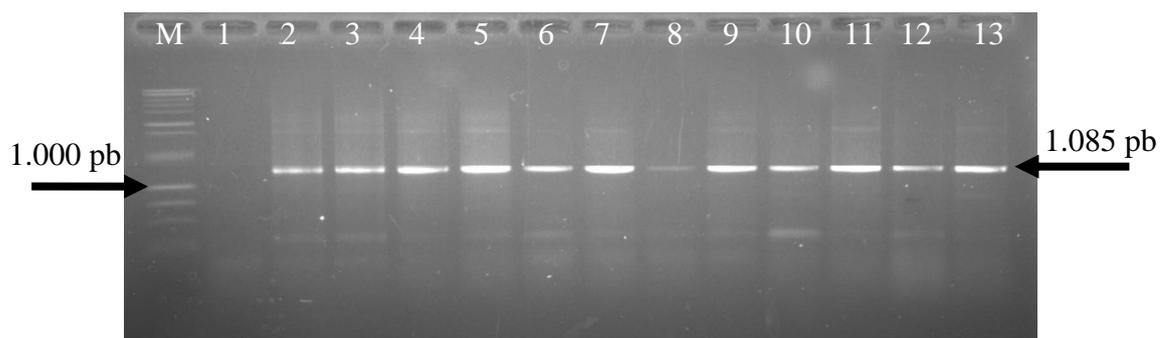
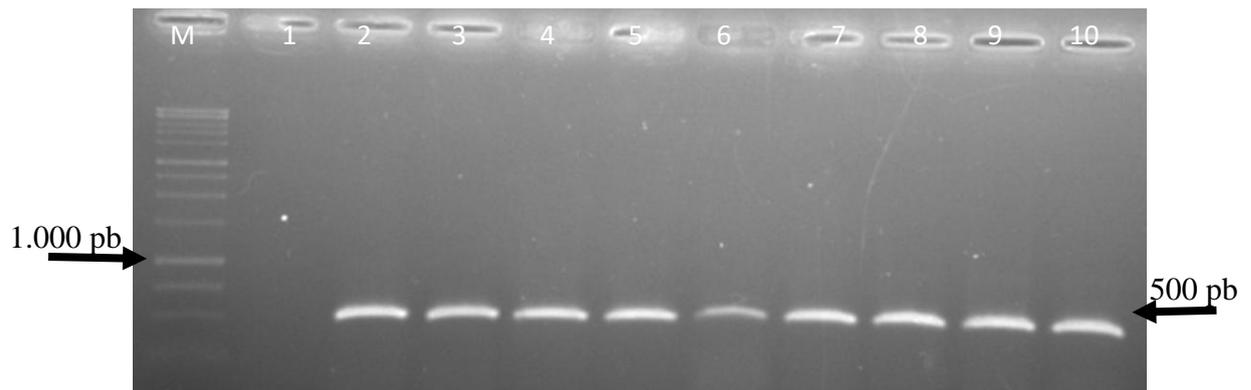


Figura 15 - Resultados de análise de RT-PCR da interação de *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) x *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) x *Cucumber mosaic virus* (CMV) em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta, com amplificações de cDNA com fragmento de tamanho aproximado de 500 pb, esperado para CMV. M- 1 kb DNA ladder (Promega); 1- Amostra de planta sadia de *Vigna unguiculata* cultivar Setentão; 2 - CMV, 3 - CPSMV-CE + CMV, 4 - CPSMV-MC + CMV, 5- CABMV-Bv + CMV, 6 - CABMV-Fort, 7 - CPSMV-CE + CABMV-Bv + CMV, 8 - CPSMV-MC + CABMV-Bv + CMV, 9 - CPSMV-CE + CABMV-Fort + CMV, 10 - CPSMV-MC + CABMV-Fort + CMV.



5 CONCLUSÕES

1- Os isolados foram classificados em dois grupos: Severo - formado por CPSMV-AL, CPSMV-CE, CPSMV-CROT, CPSMV-PB, CPSMV-PE, CPSMV-PI, e CPSMV-RN; e, Fraco - formado pelo isolado CPSMV-MC.

2- Embora sorologicamente relacionados, houve diferenças biológicas entre os isolados de CPSMV.

3- O isolado CPSMV-MC mostrou-se sorologicamente distinto quando utilizou antissoro AS-MC.

4- Os isolados de CPSMV apresentaram diferenças moleculares, sendo o CPSMV-MC o mais divergente.

5- Os *primers* propostos foram eficientes na diagnose e no sequenciamento de CPSMV.

6- O teste sorológico IP-ELISA mostrou-se mais adequado do que PTA-ELISA para detecção de CPSMV.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.F.M.; TINOCO, M. L. P. ANDRADE, E. C.; ARAGÃO, F.J.L. Diversity among isolates of cowpea severe mosaic virus infecting cowpeas in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n.3, p. 3146-3153, 2012.
- ALMEIDA, A. M. R. **Noções de Sorologia aplicadas à fitovirologia**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1995. 105p.
- ALMEIDA, A. M. R. LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Londrina: Embrapa Soja/Brasília: SBF, 2001. 186p.
- ANDRADE Jr. A. S. *et al.* **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp.** Teresina: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2002. 108p.
- ASSUNÇÃO, I. P.; FILHO, L. R.; RESENDE, L. V.; BARROS, C. S.; LIMA, G. S. A.; COELHO, R. S. B.; LIMA, J. A. A. Genes diferentes podem conferir resistência ao *Cowpea severe mosaic virus* em Caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 274-278, 2005.
- BARROS, G. B. **Identificação e caracterização de plantas de feijão-caupi obtidas por meio de retrocruzamento resistentes aos vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)**. 54f. Dissertação (Mestrado)- universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2010.
- BERTINE, C. H. C. M; TEÓFILO, E. M.; DIAS, F. T. C. Divergências genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC. **Revista Ciências Agrônômicas**, v. 40, n.1, p.99-105, 2009.
- BESERRA JUNIOR, J. E. A.; ANDRADE, E. C. ; CAMARÇO, R. F. R. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA, J. A. A. Sequence variability in the coat protein gene of cowpea severe mosaic virus isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 121-124, 2011.
- BLEICHER, E; SILVA, P. H. S. Manejo de Pragas. *In*: VALE, J. C.; BERTINE, C.; BORÉM, A. **Feijão-Caupi: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2017. cap. 8, p.171-203.
- BOOKER, H. M; UMAHARAN, P.; McDAVID, C. R. Effect of *Cowpea severe mosaic virus* on crop growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Disease**, v. 89, n. 5, p. 515-520, 2005.
- CAMARÇO, R. F. E. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; ANDRADE, E. C.; LIMA, J. A. A. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 239-244, 2009.
- CARDOSO, M.J.; MELO, F.B; ANDRADE Jr, A.S.; LIMA, M. G. **Clima e aspectos de plantio**. *In*: CARDOSO, M.J. A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. P 49-63.

CARVALHO, R.C.P; COSTA, C. L. Controle de viroses de plantas. *In*: MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P; DIANESE, E. C.; COSTA, C. L.; SGRO, J. Y. *Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle*. Brasília: Ed. UnB, 2015. cap. 16, p. 593-650.

CHEN, J.; CHEN, J.; ADAMS, M. J. A universal PCR primer to detect members of the POTyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Arch. Virol.* n.146, p. 757-766, 2001.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159. 1987.

DAMASCENO e SILVA, K. J. **Estatística da produção de feijão-caupi**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica: AGEITEC. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/fejao-caupi/arvore/CONTAG01_16_510200683536.html. Acesso em: 12 de fev. 2017.

DANTAS, J.P; MARINHO, F.J.; FERREIRA, M.M.M.; AMORIM, M.S.N; ANDRADE, S.I.O; SALES, A.L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. *Rev.Bras.de Eng. Agrícola e Ambiental*. V.6, n.3, p. 425-430, 2002.

DIANESE, E. C.; MEDEIROS, R. B. Diagnose de vírus de plantas. *In*: MEDEIROS, R. B.; RESENDE, R. O.; CARVALHO, R. C. P; DIANESE, E. C.; COSTA, C. L.; SGRO, J. Y. *Virologia Vegetal: conceitos, fundamentos, classificação e controle*. Brasília: Ed. UnB, 2015. cap. 14, p. 475-509.

FERREIRA, J. **Qualidade alimentar e modo de produção agrícola: os antioxidantes na maçã**. EsmeraldAzul – para uma vida saudável, consciente e sustentável. 2013. Disponível em: <http://www.esmeraldazul.com/pt/blog/qualidade-alimentar-e-modo-deproducao-agricola-os-antioxidantes-na-maca>. Acesso em 11 mar. 2015.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-Caupi: Avanços tecnológicos**, Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. 680p.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, A.A. Melhoramento Genético. *In*: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Silva, P.H.S & Ribeiro, V.Q.(Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica. 2005. p.29-92.

FREIRE FILHO, F. R. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.

FREITAS, A. S.; NAGILLA, R.; CEZAR, M. A.; AMBROSIO, M.M. Q.; LIMA, J. A. A. **Estudo de ocorrência e grau de incidência de viroses no feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) L.Walp. na Região de Pombal-PB**. *In*. VII Congresso de iniciação científico da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

FREITAS, A. S.; CEZAR, M. A.; AMBROSIO, M.M. Q.; SILVA, A. K. F.; ARAGÃO, M. L.; LIMA, J. A. A. Ocorrência de vírus em cultivos de feijão-caupi no Sertão da Paraíba. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n. 4, p. 286-290, 2012.

- FLORINDO, M.I.; LIMA, J.A.A. Danos ocasionados por um potyvirus em *Clitoria ternatea* L. e sua transmissibilidade por ferramentas de corte. **Ciênc. Agron.** 22:97-102, 1991.
- FROTA, A. B; PEREIRA, P.R. Caracterização da Produção de Feijão Caupi na Região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. P 9-25.
- GEUNA, F.; HARTINGS, H.; SCIENZA, A. A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.16, n.1, p.61-67, 1998.
- GONÇALVES, J.R.P.; FONTES, J.R.A.; DIAS, M.C.; ROCHA, M.M.; FREIRE FILHO, F. R. BRS Guariba- **Nova Cultivar de Feijão Caupi para o Estado do Amazonas**. Comunicado Técnico 76. 2009.
- HAMPTON, R.O; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H.W. Viral diseases of cowpea and their control by resistance conferring genes. In: SINGH, B.B.; MOHAN RAJ, D.R.; DASHIELL, K.E. & JACKAI, L.E.N. (eds). **Advances in cowpea research**. IITA & JIRCAS. Ibadan, Nigeria. 1997. pp. 159-175.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy- Classification and Nomenclature of virus. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, 2011.
- LIMA, J. A. A.; NELSON, M.R. Purificação e identificação sorologia de *Cowpea mosaic virus* em *Vigna sinensis* Endl., no Ceará. **Ciências Agronômica**, Fortaleza, 3:5-8, 1974.
- LIMA, J. A. A. **Blackeye cowpea mosaic virus: purification partial characterization, serology and immunochemical and cytological techniques for detection of virus infected legume seeds**. Gainesville, Fl: University of Florida, Tese (Doutorado), 1978. 154p.
- LIMA, J.A.A.; FLORINDO, M.I. & FERNANDES, E.R. Características citológicas e sorológicas, e círculo de hospedeiras de um vírus isolado de *Clitoria ternatea* L. **Fitopatologia Brasileira**, 6:523-524, 1981.
- LIMA, J. A. A.; AMARAL, M. R. G. Purificação e sorologia de “*Squash mosaic virus*” isolado de melancia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n.3, p. 605-611, 1985.
- LIMA, J.A.A.; SILVEIRA, L.F.S.; SANTOS, C.D.G.; GONÇALVES, M.F.B. Infecção natural em gergelim ocasionada por um potyvirus. **Fitopatologia Brasileira** 16:60-62. 1991.
- LIMA, J.A.A.; FLORINDO, M.I. & KITAJIMA, E.W. Some properties of a potyvirus isolated from *Clitoria ternatea*. **Fitopatologia Brasileira**. 18:213-218. 1993.
- LIMA, J.A.A.; LIMA, R. C. A.; GONÇALVES, M.F.B. Production of policlonal antisera specific to plant viruses by rabbit oral immunization. **Fitopatologia Brasileira** v. 26, n. 4, p. 774-777, 2001.

- LIMA, J. A. A.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R.; ROSAL, C. J. S.; LOPES, A. C. A. Resistência de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) de tegumento branco à isolados de vírus das famílias Bromoviridae, Comoviridae e Potyviridae. **Revista Científica Rural** 8: 85-92. 2003.
- LIMA, J.A.A., SITTOLIN, I.M; LIMA, R.C.A . Diagnose e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Silva, P.H.S & Ribeiro, V.Q.(Eds.) Feijão caupi: **Avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica**. 2005a. p.404-459.
- LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; CAMARÇO, R. F. E. A.; GONÇALVES, M. F. B. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do Caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 429-433, 2005b.
- LIMA, J. A. A.; SILVA, A. K. F.; ARAGAO, M. L.; FERREIRA, N. R. A.; TEOFILO, E. M. Simple and multiple resistances to viruses in cowpea genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v. 46, p. 1432-1438, 2011.
- LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; SILVA, A. K. F.; ARAGAO, M. L.; Biological stability of a strain of *Cowpea severe mosaic virus* over 20 years. *Rev. Ciência Agronômica*, v. 46, p. 1432-1438, 2012.
- LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; RADAELLI, P.; SILVA, A. K. F.; SILVA, F. R. A Technique Combining Immunoprecipitation and RT-PCR for RNA Plant Virus Detection. **Journal of Phytopathology**, v. 162, p. n/a-n/a, 2014.
- LIMA, J.A.A. **Virologia essencial e viroses em culturas tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2015. 605p.
- MATTHEWS, R.E.F. **Plant Virology**. 2 a ed. Academic Press, New York. 1981. 897p.
- MELO, E. A. *et al.* Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, 2008.
- OLIVEIRA, C.R.R; FREIRE FILHO, F.R.; NOGUEIRA, M.S.R.; BARROS, G.B.; EIRAS, M.; RIBEIRO, V.Q.; LOPES; A.C.A. Reação de Genótipos de Feijão- caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. **Bragantia**, Campinas, v. 71, n.1, p.59-66, 2012.
- PAIVA, J. B; FREIRE FILHO, F. R.; TEÓFILO, E. M.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: melhoramento genético no Centro de Ciências Agrárias**. Edições: UFC, 2014. 261p.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia vol. 2: Doenças de plantas cultivadas**. 3. Ed. São Paulo: Ceres, 1997. Cap. 21, p. 233-244.
- PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. ANDRADE, G.P. Doenças do Feijão-Caupi. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual**

de Fitopatologia vol. 2: Doenças das Plantas Cultivadas. 5. Ed. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2016. Cap. 38, p. 373-381.

PINHO, J.L.N; TAVORA, F.J.A.F; GONÇALVES, J.A. Aspectos Fisiológicos. In: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Silva, P.H.S & Ribeiro, V.Q.(Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica.** 2005. p.193-210.

ROCHA, C. S. Variabilidade e estrutura genética de população de begomovírus em tomateiro e plantas daninhas em seis localidades do Sudeste brasileiro. Tese (doutorado)-Universidade Federal de Viçosa, MG. 2011. 127p.

SALVADOR, C. A. **Feijão-Análise da Conjuntura Agropecuária.** SEAB: Secretaria de Abastecimento de Estado da Agricultura e Abastecimento/DERAL: Departamento de Economia Rural. 2014. 14p.

SALVADOR, C. A. **Feijão-Análise da Conjuntura Agropecuária.** SEAB: Secretaria de Abastecimento de Estado da Agricultura e Abastecimento/DERAL: Departamento de Economia Rural. 2015. 11p.

SANTOS, F. M. L.; LIMA, J. A. A.; SANTOS, A. A.; BARRETO, P. D. Infecções simples e múltiplas de vários virus em caupi no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, 24:518-522, 1999.

SANTOS, C. D. G.; GONÇALVES, M. F. B.; OLIVEIRA, O. R. Detecção, por ELISA, de begomovírus em plantas daninhas presentes em áreas produtoras de tomateiro no Estado do Ceará. **Fitopatol. Bras.**, v. 28, p. S252, 2003.

SILVA, P.H.S; CARNEIRO, J.S. Pragas do Feijão Caupi e seu controle. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil.** Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. p 187-226.

SILVA, P.H.S; CARNEIRO, J.S; QUINDERÉ, M.A.W. Pragas. In: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Silva, P.H.S & Ribeiro, V.Q.(Eds.) **Feijão caupi: Avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica.** 2005. pp.369-402.

SILVA, A.K.F., SANTOS, C.D.G.; NASCIMENTO, A.K.Q. Transmissão de begomovírus de plantas daninhas para tomateiros pela mosca-branca. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 507-514, 2010. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 28, n. 3, p. 507-514, 2010.

SILVA, F. R; LIMA, J.A.A; NASCIMENTO, A.K.Q; BARBOSA, G.S. Caracterização biológica e sorológica de um isolado de Squash mosaic vírus e efeitos de infecção mista com vírus do gênero Potyvirus. **Revista Ciências Agronômica**, v.47, n. 1, p.195-202, 2016.

SOBRINHO, C.A.; VIANA, F. M. P; SANTOS, A. A. Doenças do Feijão-Caupi. In: CARDOSO, M.J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil.** Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2000. P 157-177.

SREENIVASULU, P., DEMSKI, J.W., PURCIFULL, D.E.; CHRISTIE, R.G. & LOVELL, G.R. A potyvirus causing mosaic disease of sesame (*Sesamum indicum*). **Plant Disease** 78:95-99. 1994.

SOUZA, L. P.; EVANGELISTA Jr, W. S.; PEREIRA, D. L.; LEOPOLDINO NETO, A.; LARANJEIRA Jr, A. L. R.; SANTOS, D. C. A. **Insetos –Pragas associados cultura do Feijão Caupi em Serra Talhada.** *In.*: XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão –UFRPE: Recife. 9-13 dez. 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis** version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 30 p. 2725-2729, 2013.

ZERBINI Jr. R. M.; CARVALHO, M. G.; ZAMBOLIM, E. M. **Introdução a Virologia Vegetal.** Viçosa: UFV, 2006. 145p.