



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
Home Page: www.ppga.ufpi.br e-mail: ppga@ufpi.edu.br

LAYLA DE SÁ ANDRADE MEDEIROS

**RT-PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE TRÊS VÍRUS EM
FEIJÃO-CAUPI**

Orientador: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Jr.

**Teresina
2024**

LAYLA DE SÁ ANDRADE MEDEIROS

**RT-PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE TRÊS VÍRUS EM
FEIJÃO-CAUPI**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA da Universidade Federal do Piauí, na área de concentração Manejo de Espécies Vegetais e linha de pesquisa Fitossanidade como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**Teresina
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

M488r Medeiros, Layla de Sá Andrade.
RT-PCR multiplex para detecção simultânea de três vírus em
feijão-caupi. / Layla de Sá Andrade Medeiros. -- 2021.
52 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia,
2024.
“Orientador: Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior.”

1. Carlavirus. 2. Comovirus. 3. Cucumovirus. 4. Diagnose. 5.
Vigna unguiculata. I. Beserra Júnior, José Evando Aguiar. II. Título.

CDD 635.6592

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

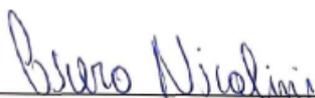
LAYLA DE SÁ ANDRADE MEDEIROS

**RT-PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE TRÊS VÍRUS
EM FEIJÃO-CAUPI**

Tese apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Agronomia

APROVADA em 26 de abril de 2024.

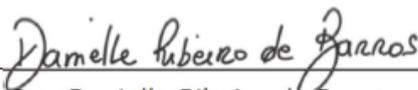
Comissão Julgadora:



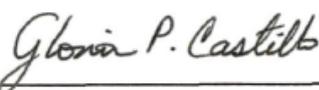
Prof. Dr. Cícero Nicolini – UESPI



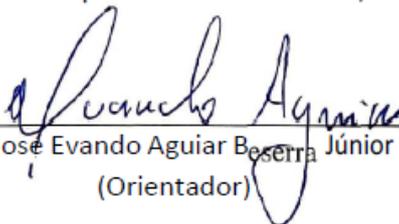
Prof^a. Dr^a. Beatriz Meireles Barguil – UESPI



Profa. Dra. Danielle Ribeiro de Barros – UFPel



Prof. Dra. Gloria Patricia Castillo Urquiza – UniMAGDALENA/Colômbia



Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – UFPI
(Orientador)

À minha amada filha, Maria, minha razão para buscar dias melhores. Ao meu esposo, Bruno, por ser meu melhor amigo e companheiro em todos os momentos, por compreender minhas ausências, ser meu maior incentivador e segurar minha mão quando necessário.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS por sempre me guiar pelos melhores caminhos.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Jr pela orientação, amizade, paciência, compreensão e seus ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fitopatologia, Kelvin, Kaline, Layse, Elys e Joana pela amizade, apoio e companheirismo a mim oferecidos.

Aos meus amigos de graduação e de vida, Alane, Claudyanne, Cleiton e Mara por me incentivarem e me ouvirem quando precisei.

As minhas vizinhas e amigas amadas, Nathália e Nina, que sempre estiveram ao meu lado pacientes, acolhedoras e mostrando-me o verdadeiro sentido de amizade.

Ao meu amigo Gustavo Carvalho, servidor da Embrapa Meio-Norte, por toda ajuda.

Aos amigos das Coordenações de Manutenção – UFPI, pela amizade e pelo incentivo.

À Divisão de Gestão Ambiental – PREUNI - UFPI, em especial, meu chefe imediato Dr. Agenor Rocha, pelo constante incentivo, pela amizade genuína e por estar sempre presente para ouvir meus medos e inseguranças, trazendo sempre uma palavra amiga que conforta e encoraja.

Às minhas amigas do Beach Tennis, em especial, Patrícia, Vívian, Izabela, Aline, Ingrid, Nayra e Gabriela por proporcionarem momentos diários de felicidade e, com isso, contribuíram para o fortalecimento de minha saúde mental durante esse processo de aprendizagem.

À minha família, pelo carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, minha sincera gratidão.

RESUMO

As fitoviroses representam uma ameaça à segurança alimentar da população mundial. As consequências econômicas e sociais tendem a ser mais evidentes em regiões tropicais e subtropicais do globo, onde a subsistência da maioria da população depende da agricultura. Nesse contexto, torna-se importante desenvolver estratégias eficazes para diagnosticar e manejar essas doenças. No presente estudo, foi desenvolvido um protocolo RT-PCR Multiplex para a detecção simultânea de cowpea severe mosaic virus (CPSMV), cucumber mosaic virus (CMV) e cowpea mild mottle virus (CPMMV). Os isolados de CPSMV, CMV e CPMMV foram obtidos de plantas de feijão-fava. Para a síntese das moléculas de DNA complementar (cDNA) foram utilizados oligonucleotídeos específicos para cada vírus, além de oligonucleotídeos para detecção do mRNA vegetal endógeno denominado NADH desidrogenase subunidade. O protocolo de reação para a PCR Multiplex foi otimizado para a amplificação dos três conjuntos de oligonucleotídeos com seus respectivos cDNAs alvo em uma única reação. Foram realizados ensaios de especificidade e sensibilidade dos pares de oligonucleotídeos utilizados para cada espécie de vírus, além de temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. Amostras foliares de feijão-caupi com sintomas característicos de virose foram coletadas em dez produtores, distribuídos em cinco municípios nos estados do Piauí e Maranhão. A confirmação da ocorrência e da incidência das diferentes espécies de vírus foi realizada por RT-PCR Multiplex, assim como por RT-PCR Simplex. As amostras também foram analisadas por RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados para o gênero *Comovirus* e oligonucleotídeos específicos para cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). Os três pares de oligonucleotídeos amplificaram fragmentos de tamanhos esperados, isto é, 300 pb, 500 pb e 890 pb para CMV, CPMMV e CPSMV, respectivamente, quando utilizados na amplificação dos alvos de forma separada. A temperatura de anelamento ótima para a RT-PCR Multiplex foi 52 °C. O limite de detecção para o CPMMV na RT-PCR Simplex foi o mesmo para a RT-PCR Multiplex. Porém, para o CMV e CPSMV, os limites de detecção da RT-PCR Simplex foram maiores quando comparados com a RT-PCR Multiplex. A capacidade do ensaio RT-PCR Multiplex de detectar CPSMV, CMV e CPMMV simultaneamente em um único ensaio, em vez dos ensaios simples correspondentes, proporcionou uma economia de aproximadamente 70% do tempo de detecção, 20% do volume da Taq DNA polimerase, 12,5% do volume de dNTPs e 7,14% do volume dos oligonucleotídeos. Os resultados das análises de RT-PCR Multiplex em amostras de campo revelaram que as incidências de infecção única foram de 67,8% (59 em 87 amostras) para CPSMV, 40,2% (35/87) para CMV e nenhuma infecção (0,0%) para CPMMV. No âmbito das coinfeções, verificou-se que 24,1% (21/87) amostras estavam infectadas simultaneamente com CPSMV e CMV. Esses resultados contribuirão para tornar a diagnose de CPSMV, CMV e CPMMV um processo mais ágil e menos oneroso, além de subsidiar a geração de conhecimentos sobre a epidemiologia desses patógenos em campo.

Palavras-chave: *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, diagnose, *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Plant viruses represent a threat to the food security of the world's population. The economic and social consequences tend to be more evident in tropical and subtropical regions of the globe, where the subsistence of the majority of the population depends on agriculture. In this context, it becomes important to develop effective strategies for diagnosing and managing these diseases. In the present study, a Multiplex RT-PCR protocol was developed for the simultaneous detection of cowpea severe mosaic virus (CPSMV), cucumber mosaic virus (CMV), and cowpea mild mottle virus (CPMMV). Isolates of CPSMV, CMV, and CPMMV were obtained from fava bean plants. Specific oligonucleotides for each virus were used for the synthesis of complementary DNA (cDNA), along with oligonucleotides for the detection of the endogenous plant mRNA named NADH dehydrogenase subunit. The reaction protocol for Multiplex PCR was optimized for the amplification of the three sets of oligonucleotides with their respective target cDNAs in a single reaction. Specificity and sensitivity assays of the oligonucleotide pairs used for each virus species were performed, as well as annealing temperature optimization for the oligonucleotides. Leaf samples from cowpea plants with characteristic virus symptoms were collected from ten producers, distributed in five municipalities in the states of Piauí and Maranhão. Confirmation of the occurrence and incidence of the different virus species was performed by Multiplex RT-PCR, as well as Simplex RT-PCR. The samples were also analyzed by RT-PCR with degenerate oligonucleotides for the *Comovirus* genus and specific oligonucleotides for cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). The three pairs of oligonucleotides amplified fragments of expected sizes, i.e., 300 bp, 500 bp, and 890 bp for CMV, CPMMV, and CPSMV, respectively, when used for separate target amplification. The optimal annealing temperature for Multiplex RT-PCR was 52°C. The detection limit for CPMMV in Simplex RT-PCR was the same as for Multiplex RT-PCR. However, for CMV and CPSMV, the detection limits of Simplex RT-PCR were higher when compared to Multiplex RT-PCR. The capability of the Multiplex RT-PCR assay to detect CPSMV, CMV, and CPMMV simultaneously in a single assay, instead of the corresponding single assays, provided approximately 70% time savings, 20% volume savings of Taq DNA polymerase, 12.5% volume savings of dNTPs, and 7.14% volume savings of oligonucleotides. The results of Multiplex RT-PCR analyses on field samples revealed that the incidences of single infection were 67.8% (59 out of 87 samples) for CPSMV, 40.2% (35/87) for CMV, and no infection (0.0%) for CPMMV. Regarding coinfections, it was found that 24.1% (21/87) of samples were simultaneously infected with CPSMV and CMV. These results will contribute to making the diagnosis of CPSMV, CMV, and CPMMV a more agile and less expensive process, as well as to support the generation of knowledge about the epidemiology of these pathogens in the field.

Keywords: *Carlavirus*, *Comovirus*, *Cucumovirus*, diagnosis, *Vigna unguiculata*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Feijão-caupi.....	12
2.2 Vírus que infectam o feijão-caupi no Brasil	14
2.3 Diagnose de fitoviroses	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Material vegetal e isolados virais	30
3.2 Extração de RNA e transcrição reversa	30
3.3 PCR.....	31
3.4 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos	32
3.5 RT-PCR Multiplex	32
3.6 Amplificação de diferentes concentrações dos cDNAs alvo.....	32
3.7 Avaliação da incidência do CPSMV, CMV e CPMMV	32
3.8 RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados e específico	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos	34
4.2 Otimização e estabelecimento da RT-PCR Multiplex.....	36
4.3 Sensibilidade dos ensaios de RT-PCR Simplex e RT-PCR Multiplex	38
4.4 Avaliação da RT-PCR Multiplex em amostras de campo.....	39
4.5 RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados e específico em amostras de campo	42
5. CONCLUSÕES	42
6. CONSIDERAÇÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

As doenças virais são restrições importantes para as plantas cultivadas, provocando redução do crescimento, diminuição do teor de proteína da semente e perdas de rendimento (Moreno; López-Moya, 2020). O conhecimento limitado sobre os vírus que infectam as leguminosas dificulta o controle de doenças provocadas por esse grupo de patógenos, particularmente em relação à instalação de cultivos livres de vírus e ao desenvolvimento de variedades resistentes (Palanga *et al.*, 2016).

A mais de 85% dos vírus que infectam leguminosas são transmitidos por insetos e vários deles também são transmitidos por sementes, que constituem a fonte de inóculo primário na cultura, assumindo assim, importância na quarentena e na epidemiologia (ICTV, 2024). A introdução precoce do vírus em campos de cultivo permite a disseminação para plantas em estágios iniciais de desenvolvimento, provocando danos mais severos, pois quanto mais jovens, maiores serão os danos causados às plantas (Rezende; Kitajima, 2018).

A diagnose de doenças de plantas, ou seja, a identificação de uma doença e de seu agente causal, assume importante função como etapa inicial do controle de doenças, uma vez que diagnoses incorretas podem acarretar a adoção de medidas de controle ineficientes. Inúmeros métodos diagnósticos de vírus de plantas podem ser usados para identificar os agentes causais de doenças, os quais se agrupam em métodos biológicos, sorológicos e moleculares (Boonham *et al.*, 2014). Os métodos moleculares vêm sendo utilizados para a diagnose de vírus vegetais desde 1979, por serem sensíveis, rápidos, específicos e apresentarem melhor custo/benefício (Morris; Dodds, 1979).

Desse modo, a reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) é um método eficiente para diagnosticar vírus que possuem genoma constituídos de RNA e, portanto, vem sendo largamente usada na identificação desses vírus (Alemu, 2015). No entanto, esse método permite a detecção apenas de um patógeno por reação, o que torna o processo lento e oneroso.

Alternativamente, baseado nas sequências genômicas de diferentes alvos, oligonucleotídeos específicos podem ser desenhados e utilizados na detecção de vírus distintos, mesmo aqueles não relacionados filogeneticamente, a partir de uma mesma amostra (Pallás; Sánchez-navarro; James, 2018). A técnica é chamada PCR Multiplex (quando o alvo é o DNA) e RT-PCR Multiplex (quando o alvo é o RNA). Essa

técnica permite a detecção simultânea e sensível de diferentes alvos em uma única reação, sendo, portanto, útil quando vírus distintos estão presentes em infecções mistas em uma única planta (Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020). A RT-PCR Multiplex possui algumas vantagens, como rapidez, elevada sensibilidade, confiabilidade, além de ser menos onerosa, permitindo a análise de um número maior de amostras em menor tempo. Há a possibilidade também de amplificação simultânea de diferentes regiões alvo do mesmo vírus, aumentando a especificidade e acurácia do teste (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018).

A maioria dos sistemas de diagnóstico baseados em RT-PCR Multiplex é capaz de detectar de dois a quatro patógenos em uma única reação, muito embora, a detecção de até nove alvos já tenha sido alcançada (Gambino; Gribaudo, 2006; Minutolo *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2023). Diversos protocolos de RT-PCR Multiplex foram desenvolvidos para a detecção simultânea de duas ou mais espécies virais em diferentes culturas, como tabaco, solanáceas e arroz. No Brasil, há casos de sucesso no desenvolvimento de RT-PCR Multiplex para a detecção de vírus nas culturas da melancia (Aguiar *et al.*, 2019) e do mamoeiro (Maurastoni *et al.*, 2020). No entanto, apesar da importância das viroses em leguminosas no país, ainda não foram desenvolvidas RT-PCR Multiplex para a detecção simultânea de vírus em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).

Dentre os vírus relatados em feijão-caupi no Brasil se destacam por sua predominância as espécies com genoma de RNA sentido positivo: *Comovirus severum* (cowpea severe mosaic virus, CPSMV), capaz de causar perdas qualitativas e quantitativas, inviabilizando a produção; e *Cucumovirus CMV* (cucumber mosaic virus, CMV), que não provoca danos significativos, porém, possui a maior gama de cultivares suscetíveis e é capaz de interagir sinergicamente com outros vírus (Abreu *et al.*, 2012; Cruz; Aragão, 2014; Pio-Ribeiro; Assis Filho; Andrade, 2016).

A espécie *Carlavirus vignae* (cowpea mild mottle virus, CPMMV), é um vírus com genoma de RNA sentido positivo. Está presente no Brasil desde 1979 em feijão-comum, quando foi relatado nos estados do Paraná e São Paulo (Costa; Gaspar; Veja, 1983). Em 2003 foi relatado em plantas de soja nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Maranhão e Paraná (Almeida *et al.*, 2003). Também foi encontrado no estado de Pernambuco, infectando feijão-comum e plantas não cultivadas pertencentes a várias famílias botânicas (Lamas *et al.*, 2017), feijão-fava nos estados do Piauí e Ceará (Medeiros *et al.*, 2022). Ou seja, o vírus está disperso no país e é capaz de

infectar naturalmente diversas espécies de leguminosas. Além disso, o vírus é capaz de infectar artificialmente o feijão-caupi (Costa; Gaspar; Veja, 1983). Na região Nordeste, é comum o cultivo do feijão-caupi em áreas próximas, e por vezes até nas mesmas áreas do feijão-comum e do feijão-fava. Isso levanta a possibilidade do feijão-caupi também servir como hospedeiro natural desse patógeno.

Um método de detecção que permita a identificação simultaneamente de três vírus distintos (CPSMV, CMV e CPMMV) em feijão-caupi ainda não foi desenvolvido. Dessa forma, esse estudo tem o objetivo de desenvolver um protocolo RT-PCR Multiplex para a detecção simultânea desses patógenos, a qual contribuirá para tornar a diagnose desses vírus um processo mais ágil, menos oneroso e que subsidiará a geração de conhecimentos sobre a epidemiologia desses patógenos em campo, revelando padrões de distribuição, e possibilitando o monitoramento dos patógenos e adoção das medidas de controle.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Feijão-caupi

O feijão-caupi é uma planta herbácea que pertence à família Leguminosae e possui aparente origem na África. É cultivado no Brasil desde meados do século XVI, a partir do estado da Bahia, onde foi inicialmente introduzido pelos colonizadores, distribuindo-se na região Nordeste e desta para todo o país (Freire Filho *et al.*, 2005). É uma das principais fontes de proteína, contribuindo para a segurança alimentar e nutricional da população brasileira, especialmente nas regiões Norte e Nordeste (Gonçalves *et al.*, 2016). Ademais, o feijão-caupi contribui para o desenvolvimento socioeconômico dessas regiões, onde a produção abrange desde a agricultura familiar até grandes empreendimentos agrícolas, com adoção de tecnologias, como irrigação, adubação, plantio escalonado e controle de pragas e doenças.

Essa planta é conhecida por vários nomes populares, alguns dos mais usados são: feijão-macassar e feijão-de-corda, na região Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia e feijão-de-estrada, na região Norte; feijão-miúdo, na região Sul. Na região Norte, há ainda um tipo de feijão-caupi muito importante para a culinária local chamado de manteiguinha, que tem grãos pequenos de cor creme. O feijão-caupi é

também chamado de feijão-gurutuba e feijão-catador em algumas regiões do estado da Bahia e do norte de Minas Gerais (Freire Filho *et al.*, 2005).

Cultivada nas regiões tropicais e subtropicais, os produtos dessa planta podem ser utilizados como hortaliça, grãos e forragem (Panzeri *et al.*, 2022). As características ambientais mais interessantes dessa espécie são representadas pelas baixas exigências de insumos agroquímicos e a tolerância à seca, quando comparadas a outras culturas (Horn; Nghituwamhata; Isabella, 2022; Panzeri *et al.*, 2022).

O alto número de subespécies selvagens de feijão-caupi encontradas exclusivamente na África apoia fortemente a ideia de sua origem africana, porém não há um consenso na comunidade científica. Acredita-se que o centro de origem da espécie está, provavelmente, localizado nas regiões mais ao sul da África, onde a maioria das subespécies é encontrada e onde a maior parte da diversidade genética ainda pode estar escondida (Fang *et al.*, 2007; Panzeri *et al.*, 2022). Alguns marcadores morfológicos e de DNA levantaram a hipótese de que a domesticação da espécie ocorreu apenas uma vez. Porém, análises em genomas inteiros fornecem evidências de eventos de domesticação independentes na África e de eventos de diversificação fora da África (Xiong *et al.*, 2016; Panzeri *et al.*, 2022).

O feijão-caupi é cultivado principalmente para alimentação humana, forragem, adubo verde e utilizado como cobertura do solo. Colabora, também, para a fixação de nitrogênio atmosférico, contribuindo com a fertilidade de solos pobres e arenosos inadequados para o estabelecimento de outras culturas, onde se adapta bem, mesmo em clima seco e com precipitação deficiente (Horn; Nghituwamhata; Isabella, 2022). Essa aptidão deve-se à capacidade de manutenção do estado hídrico foliar e, com isso, manutenção da aptidão fotossintética, mesmo em condições de estresse hídrico. Tais características importantes encontradas em espécies de feijão-caupi permitem que as plantas superem as condições estressantes e se recuperem mais rapidamente após a reidratação (Boukar *et al.*, 2018; Rivas *et al.*, 2016)

Os grãos possuem de 20 a 30% de proteína, aproximadamente de duas a quatro vezes mais que os cereais e os tubérculos. Contém, ainda, grandes quantidades de aminoácidos essenciais, como lisina, triptofano, minerais (zinco, ferro e cálcio), vitaminas (tiamina, ácido fólico e riboflavina) e fibras (6%) e alta proporção de carboidratos, sendo o amido o principal componente e fonte de energia (Boukar *et al.*, 2018). Semelhante a outras leguminosas, o amido do feijão-caupi necessita de

mais tempo para digestão que o amido dos cereais, produzindo mudanças menos abruptas na glicose e insulina plasmáticas após a ingestão, resultando em baixo índice glicêmico; o que é benéfico para a saúde humana, além de contribuir para o aumento da saciedade (Gonçalves *et al.*, 2016; Jayathilake *et al.*, 2018).

No Brasil, a produção de feijão-caupi tem sua concentração mais significativa na região Nordeste, impulsionada pela extensão de terras dedicadas ao cultivo e pelo considerável consumo desse tipo de leguminosa. No entanto, o estado de Mato Grosso se destaca como o líder em produtividade, alcançando em 2023 uma média de 1.141 kg/ha (Conab, 2023). O feijão-caupi é cultivado em três safras em alguns estados. Durante o ciclo produtivo de 2022/2023, apresentou área plantada de 1.204.800 ha, produtividade de 509 kg/ha e 561.200 t de produção. O Piauí é o terceiro estado que mais produz, com 193.300 ha plantados, produção de 76.400 t e produtividade de 652 kg/ha, maior que a média nacional (Conab, 2023).

Contudo, é na região Nordeste onde se observam as produtividades mais baixas do país, pois é um mercado que predomina a agricultura familiar e a produção depende do trabalho manual, principalmente na colheita, além da baixa adoção de tecnologias no cultivo, como utilização de sementes certificadas, mecanização agrícola, manejo de nutrientes no solo, áreas irrigadas e manejo de pragas e doenças (Freire Filho *et al.*, 2005; Conab, 2023).

No contexto de doenças, as provocadas por vírus exercem impactos adversos no desenvolvimento das culturas, comprometem a eficiência produtiva, incidem sobre a vitalidade das mudas e prejudicam a qualidade dos frutos, resultando em perdas econômicas da ordem de mais de 30 bilhões de dólares (Jones; Naidu, 2019; Wang *et al.*, 2022). Diminuir os riscos de doenças nas culturas alimentares é crucial para que a humanidade alcance o aumento de 60% na produção de alimentos até 2050 e atenda às suas futuras necessidades nutricionais. Para isso, é necessário um manejo eficaz de doenças de plantas em diversos sistemas de cultivo em todo o mundo sem prejudicar os ecossistemas naturais (Jones; Naidu, 2019).

2.2 Vírus que infectam o feijão-caupi no Brasil

As doenças de plantas estão entre os obstáculos mais desafiadores para a promoção da segurança alimentar e global, em face do aumento da população humana e das alterações climáticas que, no século XXI, serão afetadas principalmente

pelas elevadas concentrações de CO₂ e temperatura, e baixa disponibilidade de água (Velásquez *et al.*, 2018). As perdas nas colheitas atingem todo o mundo, no entanto, as consequências econômicas e sociais tendem a ser mais evidentes em regiões tropicais e subtropicais do globo, onde a subsistência da maioria da população depende da agricultura (Jones; Naidu, 2019).

A intensidade de uma doença depende da interação entre o patógeno, o hospedeiro e o ambiente. Contudo, quando o hospedeiro tem relevância econômica, o estabelecimento da doença provocará um efeito socioeconômico mais devastador. Estima-se que as perdas de produtividade provocadas por pragas e patógenos cheguem a 40% ao ano. Entre os principais patógenos de plantas que ameaçam a segurança alimentar global, os vírus representam quase metade das endemias de plantas e causam perdas econômicas superiores a US\$ 30 bilhões anualmente, consolidando-se como ameaças para a agricultura sustentável (Yang; Li; Wang, 2021). O surgimento frequente de novas doenças virais deve-se principalmente ao comércio internacional, às mudanças climáticas e à capacidade de evolução rápida dos vírus (Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020).

Os vírus que infectam plantas pertencem a mais de 40 famílias taxonômicas distintas, apresentam uma notável diversidade em suas estruturas, genomas e modos de infecção. Cada família possui características específicas que as diferenciam umas das outras (ICTV, 2024). Essa ampla diversidade é resultado das múltiplas interações dos vírus com suas plantas hospedeiras, além de refletir os processos evolutivos ao longo do tempo, o que os torna um dos grupos de patógenos mais abundantes e responsáveis por uma extensa gama de doenças nas plantas. É importante ressaltar que a classificação e o conhecimento sobre vírus continuam em constante evolução, à medida que novas descobertas são feitas na área da virologia vegetal.

As fitoviroses ameaçam as plantas cultivadas, não só por prejudicarem seu crescimento e vigor, o que resulta em decréscimo dos rendimentos brutos, mas também por prejudicarem a qualidade dos produtos e, com isso, diminuir os rendimentos comercializáveis. Além disso, a falta de medidas curativas diretas e o aumento da prevalência de doenças virais estão expondo os sistemas agrícolas a maiores riscos (Jones; Naidu, 2019).

Os fitovírus são parasitas intracelulares obrigatórios, possuem DNA ou RNA como material genético. São envolvidos por proteína(s) de revestimento, replicam-se apenas em células vivas, utilizando o maquinário dessas células para sua replicação.

Algumas vezes possuem ampla gama de hospedeiros, desde espécies cultivadas para fins alimentares, que fornecem 60% das necessidades mundiais de ingestão de energia alimentar, como leguminosas, sementes oleaginosas, vegetais e frutas, até culturas utilizadas na indústria para produção de roupas, produtos medicinais, plantas ornamentais e espécies espontâneas, as quais representam um importante reservatório natural para esses patógenos (Jones; Naidu, 2019).

A maioria dos fitovírus possui o material genético do tipo de RNA de fita simples sentido positivo (ssRNA). Uma vez dentro da célula e liberado da capa proteica, o vírus se associa aos ribossomos da célula hospedeira, ocorrendo a tradução que dá origem a RNA polimerase e outras proteínas virais. A RNA polimerase transcreve a fita positiva em fitas negativas, que serão moldes para novas fitas positivas e grande quantidade de proteínas capsidiais (Rezende; Kitajima, 2018). Muitos vírus de ssRNA apresentam a capacidade de induzir doenças em plantas de significativa relevância econômica. Por essa razão, esses vírus têm sido intensamente estudados, com o objetivo de compreender os processos virais essenciais. Isso inclui a análise da desmontagem viral, tradução, replicação do genoma, transcrição, formação de mRNA subgenômico e empacotamento, além da identificação dos elementos funcionais gerados durante esses processos e seu impacto na dinâmica fisiológica do hospedeiro (Newburn; White, 2015).

Como os vírus não replicam fora de uma célula hospedeira, sua sobrevivência a longo prazo depende de sua transmissão para novos hospedeiros. Portanto, a disseminação é um dos processos mais importantes na ecologia e epidemiologia de vírus de plantas (Cunniffe *et al.*, 2021). A disseminação de muitos vírus de plantas depende significativamente dos vetores. Essa dependência está diretamente relacionada ao ciclo de vida do vetor, comportamento durante a alimentação, preferências hospedeiras, capacidade de dispersão e reprodução nas plantas (Cunniffe *et al.*, 2021).

O processo de transmissão do vírus pelo vetor envolve, primeiramente, encontrar a planta infectada; adquirir o vírus, muitas vezes por sondagem ou alimentação, como no caso de alguns vetores fitófagos; e transportar e inocular a uma nova planta hospedeira. As preferências dos vetores por uma determinada planta podem condicionar o processo de disseminação do vírus (Moreno; López-Moya, 2020).

Além da transmissão horizontal de planta a planta por vetores, a transmissão vertical é comum entre os fitovírus e é a principal via de introdução de patógenos em áreas de cultivo, pois dará origem a focos primários de inóculo. Ocorre através da propagação vegetativa de material de plantio infectado por vírus, por sementes com embriões infectados ou pólen parental, fertilizando suas próprias plantas descendentes, o que possibilita a dispersão de vírus de plantas a longas distâncias (Bueso *et al.*, 2017; Pagán, 2022). As mudanças associadas ao aquecimento global podem, inclusive, alterar a incidência e severidade das fitoviroses transmitidas por sementes, pois fatores ambientais como temperatura, radiação solar e umidade da semente influenciam diretamente na taxa de transmissão dos vírus (Montes; Pagán, 2019; Pagán, 2022).

O controle das fitoviroses é essencialmente preventivo e depende de medidas profiláticas que são cruciais para mitigar as perdas econômicas e evitar as epidemias (Nicaise, 2014). O sucesso da transmissão de vírus em plantas depende de ações do próprio vírus, do vetor e da planta. Os vírus manipulam características fenotípicas das plantas para torná-las mais atraentes para seus insetos vetores e assim aumentar sua transmissão. A eficiência na dispersão viral está ligada ao tipo de relacionamento vírus-vetor, que pode ser: não persistente, no qual os vírus de plantas são retidos nos estiletos de seus insetos vetores por alguns segundos ou minutos; semipersistente, quando os vírus são retidos nos intestinos anteriores ou nas glândulas salivares por horas ou dia; e o relacionamento persistente, no qual os vírus são retidos no intestino dos insetos e podem alcançar as glândulas salivares, continuando no corpo do inseto por toda sua vida útil e, em alguns casos, se replicar (transmissão persistente propagativa) (Shi *et al.*, 2021).

Nos feijões, os fitovírus são os principais responsáveis pela diminuição do rendimento e da qualidade dos grãos. Para lidar com essas doenças virais, é crucial implementar estratégias eficazes de manejo. Isso inclui a gestão integrada, combinando o uso de variedades que sejam resistentes a múltiplas doenças, o controle da população de insetos transmissores e a utilização de sementes livres de patógenos. Manter-se atualizado sobre a incidência e a distribuição dos vírus nos campos de cultivo de feijão é imprescindível. Essas informações serão fundamentais para aplicar medidas de manejo de doenças virais de forma mais eficaz, visando alcançar maior produtividade nas culturas dos feijões (Ogunsola; Yusuf; Elegbaku, 2023).

No Brasil, os feijões podem ser infectados naturalmente por pelo menos 17 espécies de vírus de diferentes gêneros, que causam danos econômicos (Kitajima, 2020), de modo que já foram relatadas quatro espécies de vírus infectando o feijão-caupi, dentre os quais se destacam, por sua prevalência, os vírus de RNA sentido positivo: CPSMV e CMV (Lima *et al.*, 1986; Freitas *et al.*, 2012).

O CPSMV pertence à família *Secoviridae*, gênero *Comovirus*. Os vírus desse gênero possuem uma estreita gama de hospedeiros: das 15 espécies identificadas, 11 são restritas à família *Leguminosae*. O CPSMV foi relatado infectando naturalmente 23 espécies botânicas, causando perdas em culturas de importância econômica e social no Brasil, como o feijão-comum, feijão-fava, feijão-caupi e soja (Paz *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2005b; Abreu *et al.*, 2012; Medeiros *et al.*, 2022; ICTV, 2024).

O genoma do CPSMV é composto por duas moléculas de RNA sentido positivo, que são encapsidadas separadamente em duas partículas de formato icosaédrico de diferentes tamanhos (Fig. 1). O RNA-1 é traduzido em uma única poliproteína que é clivada em cinco proteínas responsáveis pela replicação viral, enquanto o RNA-2 é responsável por produzir proteínas do capsídeo e proteínas para o movimento célula a célula e a longa distância (Fig. 2) (Thompson *et al.*, 2017). Os dois RNAs devem estar presentes para que a infecção sistêmica ocorra (Thompson *et al.*, 2017).

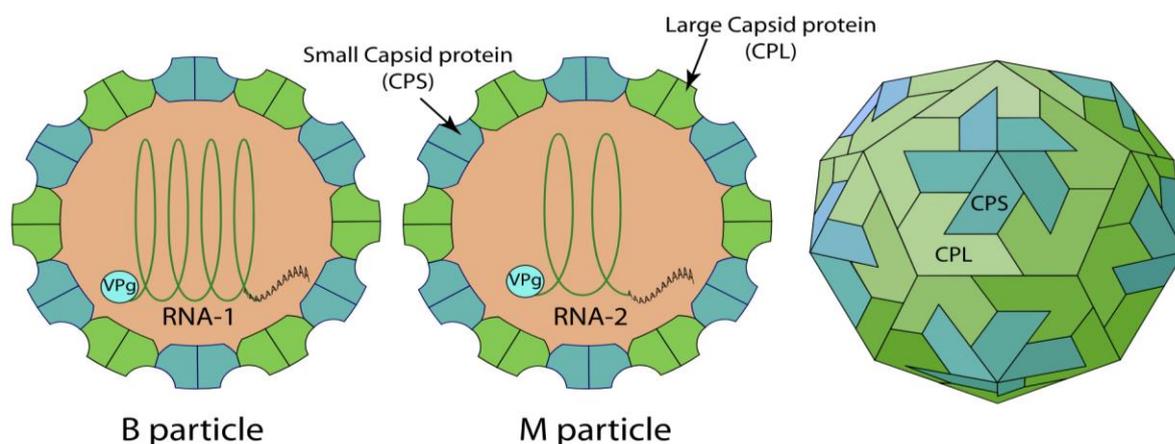


Figura 1. Representação esquemática da morfologia da partícula viral do CPSMV. Fonte: ViralZone (2024).

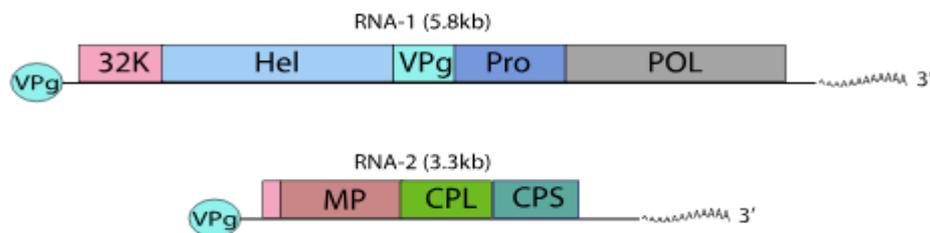


Figura 2. Representação esquemática do genoma do CPSMV. Ilustrações representando o RNA-1 (maior segmento do genoma) e o RNA-2 (menor segmento do genoma), ambos ligados à proteína VPg na extremidade 5' e poliadenilado na extremidade 3'.

Fonte: ViralZone (2024).

Este comovírus é transmitido por diversas espécies de coleópteros da família Chrysomelidae, destacando-se *Cerotoma arcuata* Oliv. (1791) e *Diabrotica speciosa* Germar (1824), sendo *C. arcuata* o mais comum em plantações de feijão-caupi no Brasil (Santos; Freire Filho; Cardoso, 1982). O relacionamento vírus-vetor é persistente e circulativo; o vírus atinge a hemolinfa do inseto, persistindo no corpo do vetor por vários dias sem se replicar. A transmissão ocorre, de fato, quando o inseto se alimenta de plantas sadias, ao introduzir saliva com partículas virais (Fereres; Raccah, 2015). No entanto, não existe consenso na comunidade científica quanto à possibilidade de transmissão desse vírus por meio de sementes, uma vez que os resultados são contrastantes (Assis Filho *et al.*, 1992; Ndiaye *et al.*, 1993).

Considerado um dos maiores problemas do feijão-caupi no mundo, CPSMV é responsável por importantes perdas na produção e produtividade da cultura, pois plantas de feijão-caupi suscetíveis sofrem drástica redução de crescimento e desenvolvimento (Booker; Umaharan; Mcdavid, 2005). Os sintomas típicos em feijão-caupi suscetível são mosaico severo, clorose, bolhosidades, distorção e alterações na morfologia foliar; que levam à redução de alguns parâmetros fisiológicos, com redução no conteúdo de clorofila, do complexo coletor de luz (LHC) e dos processos relacionados à fotossíntese como interferência na fase fotoquímica, na condutância estomática e na assimilação de CO₂ (Varela *et al.*, 2017).

Os sintomas provocados pelo CPSMV geralmente são visíveis em todos os órgãos aéreos de 3 a 4 dias após a inoculação (Lima; Sittolin; Lima, 2005a). Em plantas jovens observa-se nanismo, necrose na extremidade superior do caule, morte de brotos terminais, bolhosidade e deformação do limbo, com posterior queda prematura das folhas (Lin; Kitajima; Rios, 1981; Santos; Freire Filho; Cardoso, 1982; Lin; Anjos; Rios, 1982; Lima; Sittolin; Lima, 2005a). Infecções tardias promovem poucas perdas de rendimento em feijão-caupi, quando comparadas a infecções no

início do cultivo. Citologicamente, o CPSMV induz à formação de inclusões vacuoladas, distribuídas nas células da epiderme, visíveis ao microscópio eletrônico (Lin *et al.*, 1984).

O CMV é a espécie tipo do gênero *Cucumovirus* da família *Bromoviridae*. Esta espécie tem a maior gama de hospedeiros entre os vírus de plantas, com mais de 1.000 espécies suscetíveis em 85 famílias. Além disso, CMV pode infectar e replicar em organismos de outros reinos, como oomicetos (reino Chromista), ascomicetos e basidiomicetos (reino Fungi), ampliando sua gama de hospedeiros (Edwardson; Christie, 1991; Andika *et al.*, 2017, Mascia *et al.*, 2018; ICTV, 2024). Em todo o mundo, as estirpes de CMV são endêmicas ou periodicamente epidêmicas, e regularmente causam perdas de produção em tomate, batata, pimenta, pepino, espinafre, feijão-caupi e em muitas outras plantas cultivadas (Flasinski *et al.*, 1995; Jacquemond, 2012).

O CMV possui o genoma dividido em três segmentos denominados RNA-1, RNA-2 e RNA-3, encapsidados individualmente em partículas icosaédricas de 29 nm de diâmetro (Fig. 3) (Jacquemond, 2012).

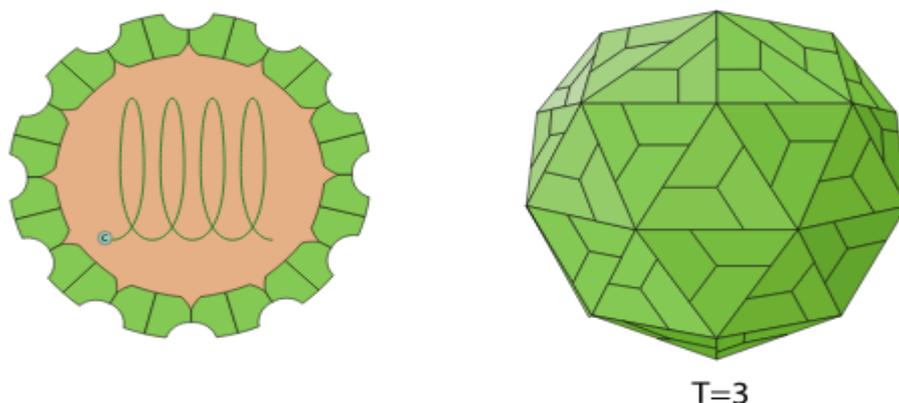


Figura 3. Representação esquemática da morfologia da partícula viral do CMV. Fonte: ViralZone (2024).

O RNA-1 e o RNA-2 possuem uma única região de leitura aberta (“Open Reading Frame” – 1a e 2a) (Fig. 4); ORF 1a contém os domínios de metiltransferase e helicase associados à replicação e a ORF 2a contém um domínio RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e uma pequena proteína 2b é expressa a partir de um RNA subgenômico adicional que pode ou não ser encapsidado (Fig. 4) (ICTV, 2024). Essas proteínas 2b estão envolvidas no movimento célula a célula, supressão do silenciamento gênico pós-transcricional e indução de sintomas (Bujarski *et al.*, 2019).

O RNA-3 é bicistrônico com uma ORF (3a) associada à proteína de movimento (MP), separada pela região intergênica (IGR) da ORF (3b) que é responsável pela codificação da proteína capsidial (CP) expressa a partir de sgRNA, como demonstrado na figura 4 (Bujarski *et al.*, 2019).

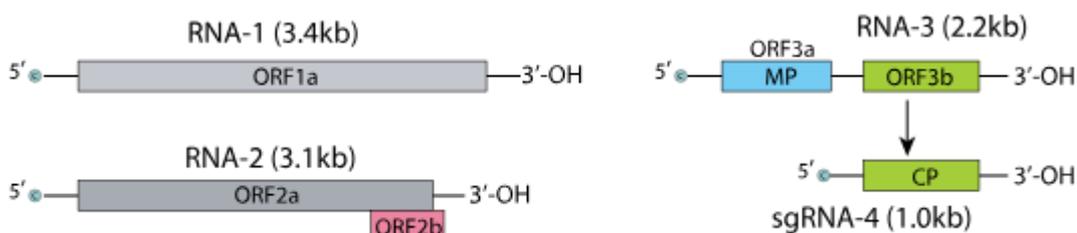


Figura 4. Representação esquemática do genoma do CMV. Ilustração representando os três segmentos do genoma, RNA1, RNA2 e RNA3 (3.300, 3.000 e 2.200 nucleotídeos, respectivamente). O RNA1 é monocistrônico e os RNAs 2 e 3 são bicistrônicos com as segundas ORFs expressas a partir de RNAs subgenômicos.
Fonte: ViralZone (2023).

O CMV é transmitido por várias espécies de afídeos de maneira não circulativa e não-persistente. Foi relatado induzindo o aumento da atratividade em abóbora e *Arabidopsis thaliana*, o que resultou no aumento da atração de *Aphis gossypii* e *Mizus persicae*, respectivamente (Mauck; Moraes; Mecher, 2014; Wu *et al.*, 2017). *A. thaliana* transgênica expressando a proteína 2b, um supressor viral do RNAi do hospedeiro, induziu a atração de pulgões dependentes de odor (Wu *et al.*, 2017). O relacionamento vírus-vetor e a ampla gama de hospedeiras do CMV desfavorecem as medidas de manejo do patógeno (Gallitelli, 2000). As taxas de transmissão pela semente são geralmente baixas (abaixo de 2,5%), embora suficientes para iniciar com sucesso epidemias. Taxas mais altas foram relatadas para lentilha (até 9,5%), tomate (8%), espinafre (15%), feijão-comum (10%) e feijão-caupi (21%) (Jacquemond, 2012).

No Brasil, a primeira ocorrência do CMV infectando feijão-caupi foi descrita em Goiânia, GO, por Lin, Kitajima e Rios (1980; 1981). No estado do Piauí, a ocorrência desse vírus foi detectada pela primeira vez em 1982, na cultivar Seridó de feijão-caupi e, posteriormente, no estado do Ceará, nas cultivares Seridó e Macaíbo (Lin; Santos; Munoz, 1982).

No feijão-caupi, a partir do terceiro dia de inoculação do vírus, é possível observar forte epinastia nas folhas primárias, seguida de mosaico suave. Os rendimentos das colheitas são reduzidos e são frequentemente mais baixos em qualidade. Esses danos fazem dessa doença uma virose de importância econômica,

apesar de geralmente não causarem significativa redução no crescimento da planta. O CMV é capaz de interagir sinergicamente com outros vírus de importância econômica, como os do gênero *Potyvirus*, principalmente a espécie *Potyvirus vignae* (cowpea aphid borne mosaic virus, CABMV), agravando os sintomas quando comparados às infecções simples (Costa, 1995; Pio-Ribeiro; Assis Filho; Andrade, 2016).

O CPMMV é reconhecido como um vírus emergente que infecta soja e feijão-comum em várias regiões do Brasil, incluindo Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Esse vírus é responsável por causar prejuízos significativos, mesmo na ausência de sintomas visíveis. Inicialmente identificado como um agente causador de perdas econômicas no feijão-comum, foi detectado em plantações de soja em diversos estados brasileiros (Almeida, 2008; Zanardo *et al.*, 2014; Zanardo; Carvalho, 2017). Na região Nordeste do país, foi detectado em elevada incidência infectando feijão-comum e plantas daninhas (Lamas *et al.*, 2017). Além disso, apresentou elevada incidência em feijão-fava na mesma região (Medeiros *et al.*, 2020). Isso evidencia sua capacidade de disseminação rápida nos campos agrícolas, demonstrando elevada adaptabilidade a leguminosas cultivadas. Além disso, é sabido que o CPMMV também infecta outras leguminosas experimentalmente como o feijão-caupi, feijão mungo, feijão bambara etc. Em países africanos, há registro do CPMMV infectando naturalmente o feijão-caupi (Brunt; Kenten, 1973). Já no Brasil não há registro desse vírus infectando naturalmente o feijão-caupi, possivelmente pela escassez de estudos de levantamento.

O CPMMV pertence à família *Betaflexiviridae* e ao gênero *Carlavirus*. Sua capacidade de infecção se estende a diversas espécies botânicas, incluindo o amendoim (*Arachis hypogaea*), a soja (*Glycine max*), o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), o feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) entre outras culturas, além de plantas não cultivadas que pertencem a várias famílias botânicas, como Fabaceae, Nyctaginaceae, Cleomaceae e Asteraceae (Menzel; Winter; Vetten, 2010; Lamas *et al.*, 2017; Medeiros *et al.*, 2020). Embora as principais espécies hospedeiras sejam da família Fabaceae, é importante destacar que alguns isolados desse vírus podem, em condições experimentais, infectar espécies de outras famílias, como Chenopodiaceae e Solanaceae (Wendland *et al.*, 2016).

O CPMMV é composto de uma única partícula viral de RNA de fita simples, sentido positivo com 8.127 a 8.198 nucleotídeos (excluindo a cauda poli (A) do

terminal 3') (Menzel; Winter; Vetten, 2010; Zanardo; Carvalho, 2017). Os vírions são filamentosos levemente flexionados, medindo aproximadamente 650 nm de comprimento e 12 a 15 nm de diâmetro (Fig. 5) (Menzel; Winter; Vetten, 2010; Adams *et al.*, 2012). Apresenta seis ORFs e uma pequena UTR nos terminais 5' e 3' (Fig. 6).



Figura 5. Representação esquemática da morfologia da partícula viral do CPMMV. Fonte: ViralZone (2024).

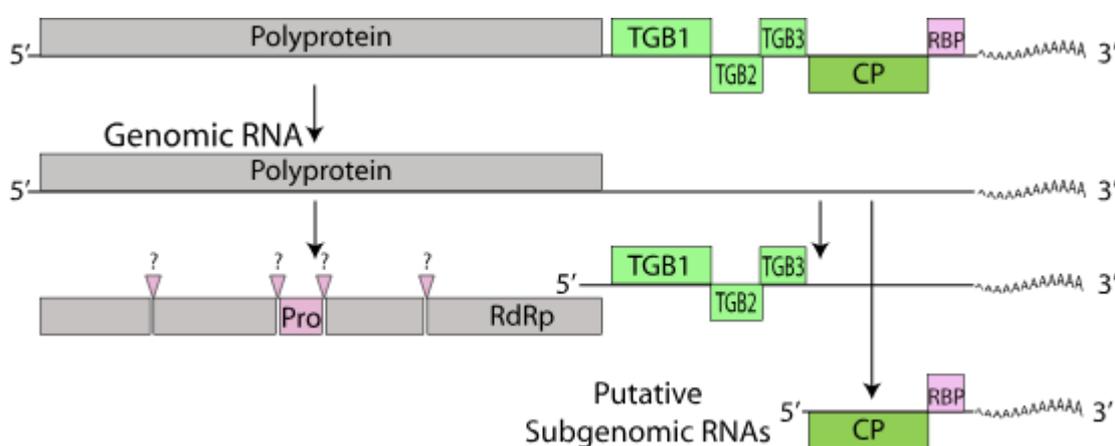


Figura 6. Representação esquemática do genoma do CPMMV. Ilustração representando o genoma contendo seis ORFs. A ORF 1 é traduzida a partir de RNA genômico e as demais ORFs a partir de RNAs subgenômicos. A extremidade 5' é limitada e a extremidade 3' é poliadenilada. Fonte: ViralZone (2024).

A ORF 1 é maior e seu produto é um RdRp. As ORFs 2, 3 e 4 codificam proteínas do bloco triplo de genes (TGB1, TGB2 e TGB3, respectivamente) responsáveis pelo movimento célula a célula e a longa distância. A ORF 5 codifica a proteína do capsídeo (CP) e a ORF 6 codifica uma proteína capaz de ligar RNA e um suposto sinal de localização nuclear (RBP). As ORFs, com exceção da ORF 1, são traduzidas a partir de RNAs subgenômicos que podem ser encontrados em tecidos infectados (Fig. 6) (Adams *et al.*, 2012; Zanardo; Carvalho, 2017).

A transmissão de CPMMV por semente depende do isolado. No Brasil não foi observada a transmissão por sementes em feijão-comum e soja, enquanto na Venezuela e em Uganda foi relatado taxa de transmissão de 40% em sementes de feijão de metro (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) e 20,3% em feijão-caupi,

respectivamente (Costa; Gaspar; Veja, 1983; Almeida *et al.*, 2003; Amayo *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2012).

A mosca branca *Bemisia tabaci* Gennadius (1889) é responsável pela transmissão de maneira não persistente. Os vírus não persistentes são conhecidos por serem adquiridos rapidamente dos tecidos superficiais de plantas infectadas e transmitidos por vetores em períodos curtos. Sabe-se que os vírus podem afetar o desempenho e o comportamento das moscas brancas de diferentes maneiras, exigindo investigações caso a caso. Estudos recentes demonstraram que plantas infectadas por CPMMV são preferidas por moscas brancas com o vírus. Esse cenário pode potencializar a aptidão das moscas brancas e, por conseguinte, aumentar a disseminação do vírus (Chen *et al.*, 2013; Bello *et al.*, 2021). Como resultado, o CPMMV tem se tornado endêmico em muitas regiões, principalmente devido à elevada população de moscas brancas, o que impulsiona a rápida disseminação, além do grande número de plantas hospedeiras disponíveis (Wendland *et al.*, 2016; Bello *et al.*, 2021).

O CPMMV desencadeia uma variedade de sintomas, os quais variam conforme o genótipo do hospedeiro e o isolado viral. No feijão-comum, observa-se o surgimento de um mosaico angular ou manchas angulares delimitadas pelas nervuras secundárias ou terciárias, além de deformações e curvaturas foliares, manchas cloróticas e um menor desenvolvimento das plantas (Brito *et al.*, 2012; Lamas *et al.*, 2017). Em feijão-fava, foram notados sintomas sistêmicos de mosaico leve e amarelecimento, bem como a formação de bolhas e curvatura no limbo das folhas (Medeiros *et al.*, 2020). Algumas espécies suscetíveis, uma vez infectadas, podem manifestar sintomas leves, como clareamento, ou até permanecerem assintomáticas (Martelli *et al.*, 2007; Wendland *et al.*, 2016). É importante mencionar que o CPMMV também é responsável por causar inclusões intracelulares incomuns, organizadas em feixes; uma característica distintiva da infecção por carlavírus (Badge *et al.*, 1996; Almeida *et al.*, 2003).

Esse vírus foi identificado no Brasil em 1979 em feijão-comum, cultivar Jalo, nos estados de Paraná e São Paulo (Costa; Gaspar; Veja, 1983). Por quase duas décadas foi considerado de menor relevância, até ressurgir e se transformar no principal fator limitante da produtividade da soja no estado de Goiás, nos anos 2000 (Almeida *et al.*, 2003). Três anos após esse ressurgimento, o vírus foi identificado no estado da Bahia (Barreiras) e em novas localidades de Goiás (Acreúna, Luzitânia,

Porteirão, Quirinópolis e Vianópolis), além de ser detectado no Mato Grosso (Sorriso), Maranhão (Balsas) e Paraná (Palotina) (Almeida *et al.*, 2003, 2005; Almeida, 2008). Em 2010, observou-se a presença do CPMMV infectando soja em várias regiões dos estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Tocantins e Maranhão (Almeida, 2008; Zanardo *et al.*, 2014). Ademais, o vírus foi detectado no estado de Pernambuco em feijão-comum e em plantas não cultivadas pertencentes a várias famílias botânicas (Lamas *et al.*, 2017). Em 2019, foi relatada a incidência de 52,72% do CPMMV em feijão-fava nos estados do Piauí e Ceará (Medeiros *et al.*, 2020).

Doenças causadas por vírus ocorrem em infecções simples ou infecções provocadas por mais de um vírus, conhecidas como infecções mistas ou coinfeções. Na natureza, as coinfeções parecem ser a regra e não a exceção, resultando, na maioria dos casos estudados, em intensificação da doença provocada pela interação facilitadora entre dois ou mais vírus que infectam a mesma célula. Nesse caso, há promoção do aumento da replicação viral, a maior eficiência no movimento viral e a interferência nos mecanismos de defesa do hospedeiro, fenômeno conhecido como sinergismo (Moreno; López-Moya, 2020; Tatineni; Alexander; Qu, 2022). Em outros casos, as infecções mistas podem evoluir para o antagonismo, relação em que a presença de mais de um vírus na célula é prejudicial para pelo menos um deles (Moreno; López-Moya, 2020).

Em relação ao hospedeiro, já foi relatada uma ampla gama de efeitos resultantes da presença simultânea de múltiplos vírus em uma planta hospedeira. Esses efeitos variam desde a resposta aditiva que se espera dos vírus individuais até alterações significativas que exercem considerável influência sobre o estresse oxidativo. As respostas ao estresse oxidativo podem ser desencadeadas por diversos fatores bióticos, incluindo a ação de vários patógenos (Giribaldi *et al.* 2011).

Infecções mistas entre CPSMV e CMV são comuns. O CMV, em infecções isoladas, não ocasiona perdas consideráveis na produção do feijão-caupi, contudo, quando associados a outras espécies de vírus, pode provocar redução de até 86,4% da produção (Pruss *et al.*, 1997). Infecções múltiplas em feijão-caupi causadas por até seis vírus foram relatadas em Uganda, e dentre esses estão o CPSMV, CPMMV e CMV (Amayo *et al.*, 2012; Orawu *et al.*, 2015).

O controle de vírus em plantas se baseia em duas vertentes: no controle químico através do uso de inseticidas contra os vetores de vírus, apesar de serem muitas vezes ineficientes para esse fim; e no manejo cultural, aliado à utilização de

cultivares resistentes. Porém, o controle genético não está disponível para todos os vírus e culturas, e as resistências podem ser superadas por novas estirpes virais (Aranda; Astúa, 2017). Nesse contexto, é necessário gerir os sistemas agrícolas com o objetivo de mitigar o impacto das viroses em plantas.

O manejo deve ser baseado em conhecimento e, com isso, torna-se importante entender o papel dos fatores ecológicos no surgimento e no desenvolvimento de epidemias, como estes interferem em interações vírus-vírus, vetores e hospedeiros, expressão de sintomas, tropismo tecidual, modos e mecanismos de transmissão e persistência do vírus. Além disso, é essencial compreender a diversidade genética das espécies através da correta identificação dos patógenos associados às doenças. Esse conhecimento possibilita a avaliação da evolução e distribuição das populações de vírus em plantas (Aranda; Astúa, 2017; Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020).

2.3 Diagnose de fitoviroses

Para os pesquisadores em fitossanidade, é um grande desafio global acelerar a compreensão dos processos moleculares, epidemiológicos e ecológicos das doenças de plantas e desenvolver soluções verdadeiramente eficazes e duradouras para prevenir, reduzir ou gerenciar algumas das doenças de plantas mais importantes da agricultura moderna (Velásquez *et al.*, 2018). Com o rápido desenvolvimento de tecnologias moleculares e bioquímicas, iniciou-se uma nova era de detecção de vírus nas últimas décadas, tornando o processo de diagnose mais eficiente (Wang *et al.*, 2022).

A detecção precoce dos vírus associados à doença é o crucial para a adoção de medidas de controle eficientes. Os sintomas provocados por CPSMV, CMV e CPMMV, por exemplo, são semelhantes, não sendo possível a distinção desses patógenos a olho nu. Por outro lado, os vetores e as medidas de controle são, em parte, diferentes para cada um desses patógenos. As fitoviroses podem ser detectadas diretamente pela identificação da sequência genômica e da proteína viral, ou avaliadas indiretamente por meio da resposta fenotípica da planta ao vírus. Essa avaliação indireta apresenta baixa confiabilidade e precisão, uma vez que sintomas semelhantes podem se manifestar a partir de interferências por fatores bióticos e abióticos, como deficiência de nutrientes, doenças fúngicas ou bacterianas, fatores ambientais ou danos mecânicos às plantas (Wang *et al.*, 2022).

Com o surgimento de técnicas de biologia molecular aliadas à caracterização contínua de novos agentes etiológicos, melhorou significativamente a sensibilidade, a especificidade e a rapidez necessárias para um diagnóstico preciso de vírus fitopatogênicos (Boonham *et al.*, 2014). A confiabilidade dos testes diagnósticos disponíveis é um ponto chave no manejo de doenças virais, para minimizar a propagação dos vírus (Nicaise, 2014).

Os principais objetivos das pesquisas em diagnose de fitoviroses durante os últimos anos têm sido o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico com alta especificidade, capaz de detectar vírus em baixas concentrações e redução de tempo e custos, porque aumentam sua viabilidade para uso rotineiro (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018). As técnicas de detecção à base de ácido nucleico e proteínas são especialmente adequadas para essa finalidade e melhorou significativamente o diagnóstico de doenças virais em plantas (Katsarou *et al.*, 2019).

Existem alguns métodos de detecção direta de vírus em plantas disponíveis no mercado, sendo os mais amplamente difundidos: o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e a PCR (polymerase chain reaction). O ELISA é um teste sorológico que se baseia na interação entre antígeno e anticorpo. Nesse método, anticorpos marcados com enzimas se ligam a proteínas virais específicas (antígenos), possibilitando uma detecção e mensuração facilitadas por meio de espectrofotometria.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método fundamental para detecção de ácido nucleico e é amplamente empregado no diagnóstico de vírus. Sua eficácia reside na capacidade de identificar o patógeno mesmo em concentrações baixas, amplificando milhões de cópias de uma região específica do ácido nucleico viral (Scagliusi *et al.*, 2009).

Durante o processo de PCR, são utilizadas três etapas, das quais três são repetidas de 20 a 50 vezes. Um conjunto dessas três temperaturas constitui um ciclo. A primeira temperatura (94 – 96 °C) de cada ciclo é empregada para desnaturar as duas fitas de DNA alvo, separando-as pela quebra das ligações de hidrogênio entre as bases, resultando em duas cadeias de DNA individuais. A segunda etapa é o anelamento (45 – 60 °C), na qual os dois oligonucleotídeos se ligam em uma sequência complementar na fita simples de DNA. Os oligonucleotídeos selecionados são complementares a extremidades específicas do gene desejado em cada uma das fitas. Enquanto um oligonucleotídeo se liga a uma extremidade de uma fita, o outro oligonucleotídeo se liga à extremidade oposta na outra fita, formando ligações de

hidrogênio com suas sequências complementares, resultando em uma molécula estável de fita dupla. A temperatura de anelamento é calculada com base na composição de nucleotídeos dos oligonucleotídeos, especialmente levando em consideração a porcentagem de guanina e citosina (GC) na sequência. Quanto maior a porcentagem de GC, maior será a temperatura de anelamento necessária para uma ligação específica. Normalmente essa temperatura é cerca de 5 – 10 °C abaixo da temperatura de fusão dos oligonucleotídeos. A temperatura de fusão é aquela na qual metade das moléculas de oligonucleotídeo estão ligadas ao DNA-alvo (Ye *et al.*, 2012).

A terceira fase é a extensão ou alongamento (72 °C), onde ocorre a síntese de uma nova fita de DNA. A enzima DNA polimerase utiliza os oligonucleotídeos como ponto de partida e adiciona nucleotídeos à extremidade 3' do oligonucleotídeo, criando uma nova fita de DNA complementar à região alvo (Noflindawati *et al.*, 2021). Essas etapas são repetidas em ciclos sucessivos no termociclador, resultando em aumento exponencial do número de cópias da sequência de DNA desejada. Ao final do processo, obtém-se uma quantidade significativa de DNA amplificado, possibilitando análises detalhadas e diagnósticos precisos.

O método RT-PCR consiste em uma adaptação do PCR, necessário para a diagnose de alvos de RNA. Assim, o RNA, uma molécula mais instável que o DNA, é convertida em DNA complementar (cDNA) mais estável, para isso utiliza-se a enzima Transcriptase Reversa e, posteriormente, com a enzima DNA-polimerase faz-se várias cópias desse cDNA. Essa transcrição e amplificação são realizadas com a ajuda de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia curta (até 21 nucleotídeos) (Ye *et al.*, 2012).

O desenho dos oligonucleotídeos é um fator crítico para o sucesso da RT-PCR, pois a amplificação específica do alvo pretendido é a principal característica de um bom iniciador e requer que estes não tenham correspondências com outros alvos em certas orientações e dentro de certas distâncias, que permitam à amplificação indesejada (Ye *et al.*, 2012). Os oligonucleotídeos de cadeia curta são desenhados a partir de uma região conservada do genoma. São capazes de detectar o ácido nucléico viral que permitiu melhorar a especificidade e sensibilidade do teste quando comparado ao ELISA (Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020). O produto da PCR é visualizado por eletroforese em gel de agarose, podendo, ainda, ser caracterizado pelo sequenciamento Sanger (sequenciamento de primeira geração), permitindo uma

identificação mais precisa, por comparação com sequências conhecidas em bancos de dados como o GenBank.

A RT-PCR Multiplex é um método derivado da RT-PCR convencional e promove a identificação de vários alvos (vírus) utilizando um único protocolo de reação, através do uso de mais de um par de oligonucleotídeos específicos, com o intuito de reduzir custo de material, reagentes, mão de obra e tempo, e aumentar a eficiência, uma vez que é capaz de amplificar ácidos nucleicos de diferentes vírus. Também é possível amplificar simultaneamente várias regiões de um vírus alvo, melhorando, assim, a confiabilidade da detecção (Pallás; Sánchez-Navarro; James, 2018).

O desenvolvimento de um ensaio de RT-PCR Multiplex é complexo, pois os oligonucleotídeos iniciadores devem atender a várias condições, como temperaturas de fusão, comprimento e conteúdo de GC semelhantes para que todos os oligonucleotídeos possam funcionar sob as mesmas condições de PCR (Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020), além de serem compatíveis, o que evita vinculação cruzada e concorrência. Devem, ainda, ter sensibilidade semelhante e flanquear regiões genômicas de diferentes tamanhos para que os amplicons de cada alvo possam ser separados e visualizados por eletroforese em gel (Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020). Diversos trabalhos têm demonstrado ser uma técnica rápida, sensível e reprodutível. Alguns protocolos RT-PCR Multiplex já foram desenvolvidos para a detecção simultânea de espécies de vírus em diferentes culturas, como cucurbitáceas, solanáceas, alho e uva (Kwak *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2014; Cating *et al.*, 2015; Gambino, 2015; Nam *et al.*, 2015).

No Brasil, a diagnose de CMV é realizada frequentemente por teste sorológico (ELISA), utilizando antissoros policlonais com especificidade e sensibilidade reduzidas, ou por RT-PCR convencional com oligonucleotídeos específicos; enquanto o CPSMV e CPMMV vêm sendo identificados exclusivamente por RT-PCR (Oliveira *et al.*, 2012; Medeiros *et al.*, 2020). Exemplos disso são os programas de melhoramento do feijão-caupi, os quais vêm utilizando as técnicas descritas acima nos processos de seleção para a obtenção de cultivares com elevada resistência ao CPSMV e ao CMV (Santos *et al.*, 1987; Assunção *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e isolados virais

Os isolados de CPSMV, CMV e CPMMV foram obtidos de plantas de feijão-fava (Medeiros *et al.*, 2020) e encontram-se preservados em material foliar dessecado a -20 °C. Os isolados foram inoculados mecanicamente em plantas de feijão-caupi e mantidos separadamente em gaiolas com tela antiáfídeo. A pureza dos isolados foi confirmada por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos.

3.2 Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA total do tecido foliar de plantas sadias e de plantas mecanicamente inoculadas com os vírus (infecções simples) foi extraído com o reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Os 'pellets' foram lavados com etanol 70%, secos ao ar e ressuspensos em 20 µL de água livre de nucleases. O RNA foi analisado em gel de agarose 1,5 % e, posteriormente, armazenado a -20 °C. O cDNA viral foi sintetizado usando SCRIPT® Transcriptase Reversa (Cellco, São Carlos, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a síntese das moléculas de DNA complementares (cDNA) de CPSMV, CMV e CPMMV foram utilizados oligonucleotídeos específicos (Tab. 1). Para o CPSMV foram usados os oligonucleotídeos específicos, CPSMV-F-POL e CPSMV-R-POL, desenhados a partir da região codificadora das proteínas VPg/Pro e RdRp (Teixeira *et al.*, 2021). Para o CMV, foram utilizados os oligonucleotídeos específicos para a ORF 3b do RNA 3, incluindo a região de codificação da proteína do capsídeo (Kim *et al.*, 2014). Para o CPMMV, foram usados os oligonucleotídeos específicos para a região de codificação da proteína RdRp (Lamas *et al.*, 2017). Os oligonucleotídeos AtropaNad2.1a e AtropaNad2.2b foram usados como controle interno para a amplificação do mRNA vegetal endógeno denominado NADH desidrogenase subunidade ND2 (NAD) (Thompson *et al.*, 2003).

Tabela 1. Informações sobre os pares de oligonucleotídeos específicos utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo	Sequência (5' - 3')	Alvo	Amplicon (pb)
CMV F	5'-TGGTCGTCCAACCTATTAACCAC-3'	CMV	300
CMV R	5'-TACTGATAAACCAGTACCGGTGA-3'
CPMMV-4000F	5'-AACTTGGCCTTAGTGAACCTCTACA-3'	CPMMV	500
CPMMV-4500R	5'-ATTAGCTCTGTGCCTGGGGT-3'
CPSMV-F-POL	5'-CGGAGGTTCAACACGTCTCA-3'	CPSMV	890
CPSMV-R-POL	5'-CTGGCATTACCAAAAACGCA-3'

3.3 PCR

As reações de amplificação foram realizadas separadamente para cada espécie viral, utilizando o cDNA obtido na transcrição reversa. Essa etapa tinha como objetivo verificar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos para cada vírus. Nas reações de PCR foram utilizados 4 µL do cDNA, 5 µL do tampão da PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µL dos dNTPs (10 mM), 2,5 µM de cada oligonucleotídeo e 5 u da Go Taq® DNA polimerase (Cellco, São Carlos, SP, Brasil), com o volume completado para 50 µL com água ultrapura estéril. As condições de amplificação foram estabelecidas após a seleção dos oligonucleotídeos.

O protocolo de reação para a PCR multiplex foi ajustado até alcançarmos a temperatura e o tempo ideais para a amplificação dos três conjuntos de oligonucleotídeos com seus respectivos cDNAs alvo em uma única reação. O procedimento final para a amplificação simultânea dos vírus CMV, CPMMV e CPSMV consistiu em um aquecimento inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72 °C durante 7 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, intercalados com solução de brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados pela comparação com marcador o 1Kb Plus DNA Ladder (Cellco, São Carlos, SP, Brasil).

3.4 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos

Foram realizados ensaios de PCR, visando avaliar a especificidade dos pares de oligonucleotídeos utilizados para cada espécie de vírus. Os ensaios consistiram na mistura de cada cDNA vírus-específico com cada um dos três pares de oligonucleotídeos. As reações de PCR e eletroforese foram as mesmas descritas na seção 3.3.

3.5 RT-PCR Multiplex

O protocolo da PCR Multiplex foi otimizado para realização de amplificações simultâneas de três fragmentos alvos em uma única reação, usando três pares de oligonucleotídeos específicos para as espécies de vírus. As reações de PCR e eletroforese foram as mesmas descritas na seção 3.3.

3.6 Amplificação de diferentes concentrações dos cDNAs alvo

Visando conhecer se as diferentes concentrações de vírus poderiam influenciar a eficiência de detecção da RT-PCR Multiplex, foram preparadas diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) em água ultrapura estéril dos diferentes cDNAs virais. Os três pares de oligonucleotídeos foram misturados com os três cDNAs virais em iguais volumes, nas diferentes concentrações.

3.7 Avaliação da incidência do CPSMV, CMV e CPMMV

Durante a estação de cultivo (janeiro a junho de 2023), foram realizadas coletas de amostras foliares de feijão-caupi que exibiam sintomas característicos de virose, isto é, mosaico, bolhosidades e deformação foliar. Essas coletas foram conduzidas em dez produtores, distribuídos em sete municípios: Água Branca, Pau D'Arco, Piripiri e Teresina, no estado do Piauí; e Balsas, Codó e Matões, no estado do Maranhão (Fig. 7). Vale ressaltar que os campos de produção estavam distantes em mais de 5 km entre si.

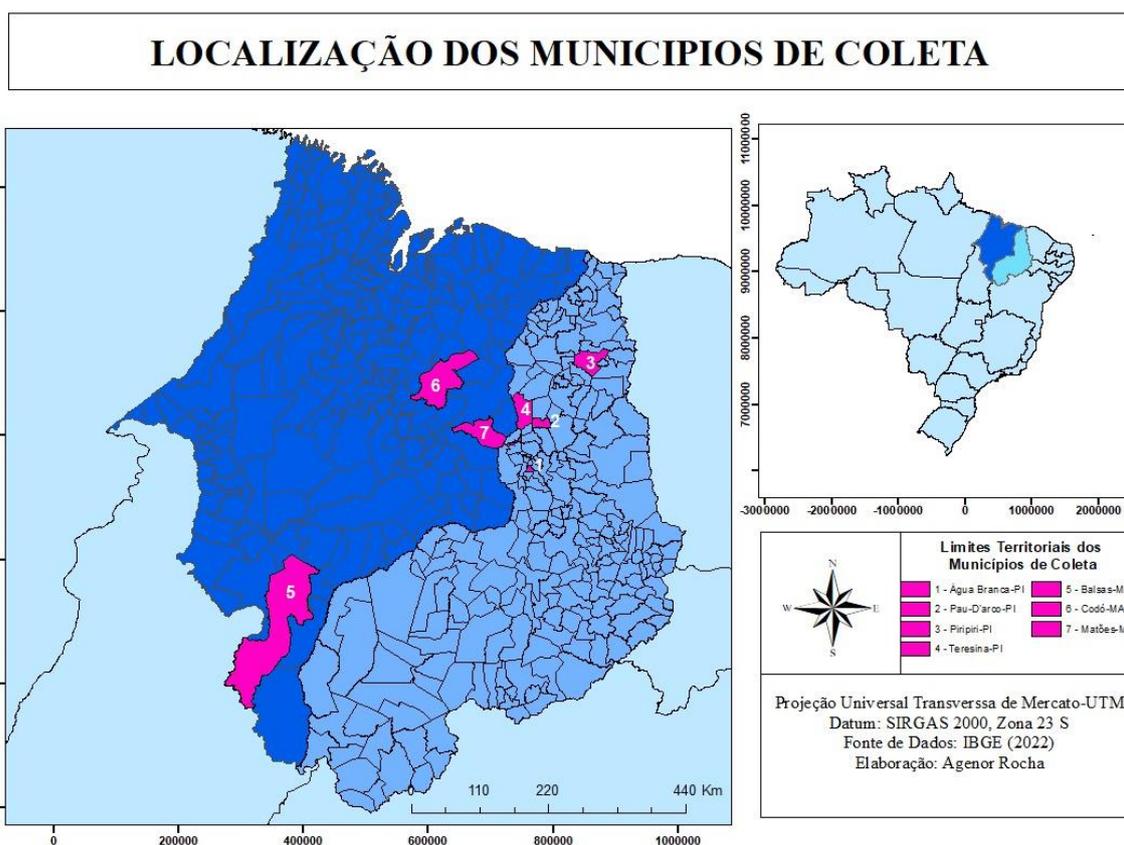


Figura 7. Mapa de distribuição geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras foliares de feijão-caupi nos estados do Piauí e Maranhão.

Para cada propriedade, foram coletadas amostras de dez plantas por hectare. O processo de coleta foi direcionado a plantas com idades compreendidas entre três e oito semanas, seguindo um padrão diagonal ao longo do cultivo. Cada amostra foi devidamente identificada e levada ao laboratório para, em seguida, proceder com a extração de RNA total conforme descrito na seção 3.2. A confirmação da ocorrência e da incidência das diferentes espécies virais foi realizada por RT-PCR Multiplex.

3.8 RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados e específico

Como as plantas coletadas poderiam estar infectadas com outras espécies de vírus, além de CMV, CPSMV e CPMMV, as amostras foram também analisadas por RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados para o gênero *Comovirus* e com oligonucleotídeos específicos para a espécie CABMV. O RNA total das plantas foi extraído de acordo com a seção 3.2. Foram utilizados os oligonucleotídeos degenerados, ComovirusF e ComovirusR, para *Comovirus*, que correspondem às sequências de nucleotídeos que codificam os aminoácidos conservados AWSTQV e

RGPN/GFEN, presentes nas subunidades do capsídeo de espécies desse gênero (Brioso *et al.*, 1996). Para o CABMV, utilizamos oligonucleotídeos CABMV-R e CABMV-F (TTCACACCCATCCTCACACC e AGCCTGGTGAGACATGAACC) desenhados a partir de uma região conservada da proteína do capsídeo. Foram observados todos os parâmetros necessários para a obtenção de oligonucleotídeos eficientes, tais como: comprimento do iniciador, temperatura de fusão do iniciador, conteúdo de GC, grampo de GC, estruturas secundárias de iniciador (grampos, autodímeros e dímeros cruzados), repetições, execuções, estabilidade de extremidade 3', evitar homologia cruzada, comprimento dos amplicons, posição do produto, tm do produto e temperatura ótima de anelamento. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies Inc., San Diego, EUA). Os produtos das PCRs, com exceção das PCRs para CABMV, foram purificados e sequenciados pela ACTGene, Alvorada, RS, Brasil.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de especificidade dos oligonucleotídeos

Os três pares de oligonucleotídeos amplificaram fragmentos de tamanhos esperados, isto é, 300 pb, 500 pb e 890 pb para CMV, CPMMV e CPSMV respectivamente, quando utilizados na amplificação dos alvos de forma separada (Fig. 8). Ademais, evidenciou-se que esses oligonucleotídeos foram capazes de amplificar exclusivamente o cDNA correspondente ao vírus específico, mesmo quando os cDNAs de CMV, CPMMV e CPSMV foram misturados com conjuntos de oligonucleotídeos não relacionados, destacando, assim, a especificidade do processo de amplificação (Fig. 8).

É importante destacar que uma etapa crítica no desenvolvimento de um método de RT-PCR Multiplex é encontrar conjuntos de oligonucleotídeos apropriados. Esses oligonucleotídeos devem ser capazes de amplificar de forma específica e simultânea os cDNAs alvo, sem gerar amplificação cruzada com outros cDNAs virais ou do hospedeiro. Além disso, é necessário que os amplicons gerados tenham tamanhos diferentes para permitir a detecção clara dos vírus alvos por meio da eletroforese em gel de agarose padrão, conforme ilustrado na Figura 8. Também é importante que esses oligonucleotídeos compartilhem uma temperatura de anelamento semelhante,

a fim de permitir condições de reação análogas (Kwon *et al.*, 2014; Rubio; Galipienso; Ferriol, 2020).

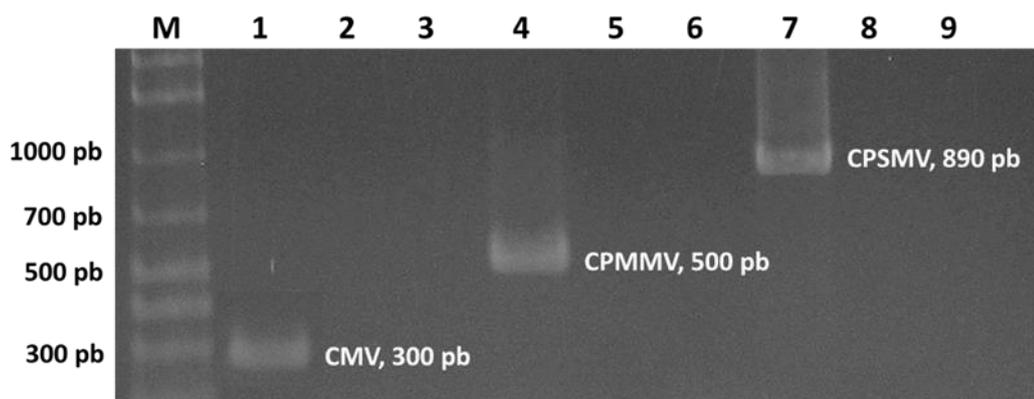


Figura 8. Análise em gel de agarose (1,5%), revelando a especificidade de três pares de oligonucleotídeos utilizados no ensaio de RT-PCR simples para CMV, Carlavirus vignae e CPSMV. M. marcador de comprimento, em pb (1 Kb Plus DNA Ladder); 1-3. cDNA de CMV com oligonucleotídeos específicos para CMV, CPMMV e CPSMV respectivamente; 4-6. cDNA de Carlavirus vignae com oligonucleotídeos específicos para Carlavirus vignae, CMV e CPSMV respectivamente; 7-9. cDNA de CPSMV com oligonucleotídeos específicos para CPSMV, CMV e CPMMV respectivamente.

O processo de anelamento de oligonucleotídeos é uma etapa fundamental na reação de PCR; refere-se à temperatura na qual os oligonucleotídeos pareiam e ligam-se de forma complementar às sequências-alvo no DNA e determina a especificidade e a eficiência da ligação entre os oligonucleotídeos e o DNA-alvo (Noflindawati *et al.*, 2021). Softwares especializados são usados para calcular a temperatura de anelamento ideal para os oligonucleotídeos específicos utilizados em uma reação de PCR e para isso características, como comprimento do oligonucleotídeo, temperatura de fusão, conteúdo de GC, grampo de GC, estruturas secundárias de iniciador (grampos, autodímeros e dímeros cruzados), repetições de nucleotídeos, estabilidade da extremidade 3', comprimento dos amplicons, posição do iniciador e temperatura de fusão devem ser analisadas ao determinar a temperatura de anelamento (Ye *et al.*, 2012).

A obtenção de um método diagnóstico com alta especificidade é crucial para garantir um diagnóstico eficiente. A identificação precisa do vírus presente em um determinado hospedeiro é fundamental para desenvolver estratégias de manejo eficazes e alcançar o controle de doenças virais. O método de RT-PCR Multiplex proposto neste estudo demonstrou ser altamente específico, sendo capaz de detectar de forma precisa os vírus CMV, CPMMV e CPSMV em plantas de feijão-caupi.

4.2 Otimização e estabelecimento da RT-PCR Multiplex

Foi observada a ausência de amplificação do CPSMV ao utilizar quantidades equivalentes dos oligonucleotídeos e dos cDNAs-alvo no protocolo de RT-PCR Multiplex. Com isso, foi necessário ajustar a quantidade de cada par de oligonucleotídeo e de cDNA-alvo para alcançar amplificações consistentes e estáveis dos três vírus-alvo aqui estudados. Essa estabilidade foi atingida ao utilizar oligonucleotídeos com concentrações específicas – para o CPSMV, a concentração utilizada foi três vezes maior, ou seja, de 30 mM, em relação aos demais oligonucleotídeos específicos como CMV e CPMMV. Além disso, melhores amplificações ocorreram quando foram utilizados os seguintes volumes de cDNA-alvo: 2 µl de CMV, 3 µl de CPSMV e 2 µl de CPMMV, com um volume total de reação para 50 µl.

O ensaio de RT-PCR Multiplex descrito foi capaz de amplificar simultaneamente os três cDNAs do CMV, CPMMV e CPSMV, produzindo amplicons com tamanhos correspondentes e facilmente distinguíveis em gel de agarose (Fig. 9). Também foram incluídos os oligonucleotídeos *AtropaNad2.1a* e *AtropaNad2.2b* (188 pb) para a amplificação de RNA vegetal endógeno como controle interno. Esse acréscimo teve o propósito de avaliar a integridade dos cDNAs dos vírus-alvo e verificar a presença de quaisquer inibidores do ensaio de RT-PCR. Verificamos que houve amplificação específica do mRNA endógeno, o que demonstra que os oligonucleotídeos virais não se ligaram ao cDNA vegetal endógeno, confirmando a especificidade dos oligonucleotídeos para os cDNAs dos vírus-alvo.

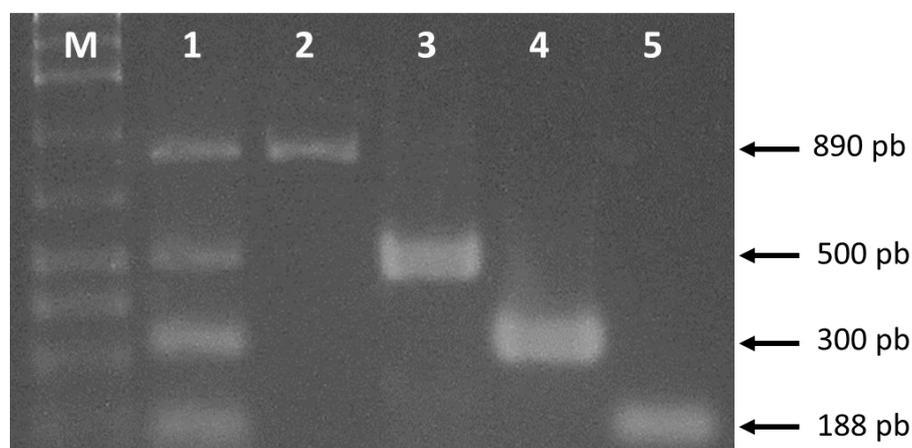


Figura 9. Análise em gel de agarose (1,5%) dos amplicons gerados por RT-PCR Multiplex (1) ou Simplex (2-5) para CMV, CPMMV e CPSMV, além do mRNA endógeno NAD. M. marcador de

comprimento, em pb (1 Kb Plus DNA Ladder); 1. RT-PCR Multiplex; 2. CPSMV; 3. CPMMV; 4. CMV; 5. NAD (gene endógeno).

Os oligonucleotídeos empregados neste estudo foram eficazes na amplificação, mesmo quando as temperaturas de anelamento foram ajustadas para temperatura única aplicável aos três pares de oligonucleotídeos. Ainda que as bandas amplificadas associadas aos vírus analisados neste estudo não tenham exibido a mesma intensidade, cada banda foi claramente discernível e não houve evidências de reações cruzadas (Fig. 9).

A otimização da temperatura de anelamento desempenha um papel fundamental no êxito de um ensaio RT-PCR Multiplex. Geralmente, essa otimização é realizada por meio de testes de gradientes de temperatura em múltiplas reações de PCR com o objetivo de identificar a temperatura ideal para a amplificação específica do DNA alvo, utilizando os conjuntos de iniciadores. Para alcançar essa temperatura ideal, foram avaliadas diferentes temperaturas: 52, 55 e 60 °C (Fig. 10). Dentre elas, a temperatura de 52 °C destacou-se ao exibir a melhor eficiência na amplificação dos três alvos desejados.

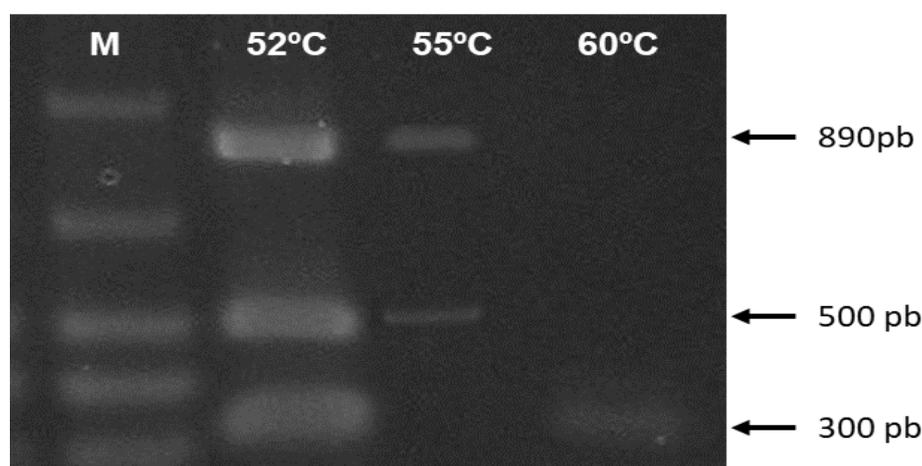


Figura 10. Análise em gel de agarose (1,5%) dos amplicons gerados por RT-PCR Multiplex em três temperaturas de anelamento diferentes. M. marcador de comprimento, em pb (1 Kb Plus DNA Ladder); 1. RT-PCR Multiplex a 52 °C; 2. RT-PCR Multiplex a 55 °C; 3. RT-PCR Multiplex a 60 °C.

A cinética de hibridização no sistema de RT-PCR Multiplex pode variar entre os diferentes pares de oligonucleotídeos utilizados. Isso ocorre porque alguns oligonucleotídeos possuem maior eficiência de ligação quando estão em um meio com altas concentrações de oligonucleotídeos e componentes de reação, o que pode levar ao consumo preferencial dos componentes da reação de PCR. Como resultado, outros amplicons podem ter seu rendimento reduzido. Isso pode levar à ausência ou

à baixa amplificação de sequências de DNA que deveriam ser amplificadas durante o processo de PCR (Anitha, Monyo, Okori 2014).

4.3 Sensibilidade dos ensaios de RT-PCR Simplex e RT-PCR Multiplex

Nos testes para determinar o limite de detecção do CMV, CPSMV e CPMMV, os RNAs virais foram utilizados como moldes para a síntese do cDNA. Os cDNAs obtidos foram submetidos às diluições seriadas até a concentração 10^{-6} , isto é, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} de cDNA por reação.

O limite de detecção para o CPMMV na RT-PCR simples foi o mesmo para a RT-PCR Multiplex, ou seja, 10^{-2} (Fig. 11B e 11D). Porém, para o CMV e o CPSMV, os limites de detecção da RT-PCR Simplex foram maiores quando comparados com a RT-PCR Multiplex (Fig. 11D). Para o ensaio RT-PCR Simplex com cDNA de CMV, foi observado banda nítida do fragmento esperado até a diluição de 10^{-3} , já na RT-PCR Multiplex, foi possível observar banda correspondente ao fragmento esperado até a diluição de 10^{-2} (Fig. 11A). Para o cDNA do CPSMV, na reação única foi observado banda correspondente ao fragmento esperado até a diluição de 10^{-6} , enquanto na RT-PCR Multiplex foi 10^{-2} (Fig. 11C).

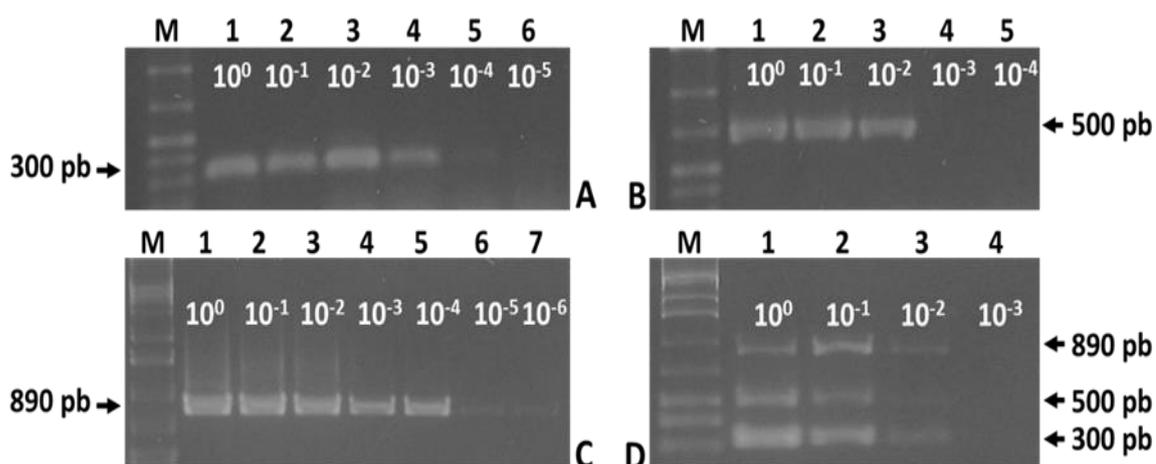


Figura 11. Comparação da sensibilidade dos ensaios RT-PCR Simplex (A – C) e RT-PCR Multiplex (D) para a detecção de CMV (A), CPMMV (B) e CPSMV (D), usando diluições seriadas em dez vezes do cDNA, preparado de feijão-caupi infectado com os três vírus. Coluna M. Marcador de comprimento, em pb (1 Kb Plus DNA Ladder); 1–6: diluições em série de dez vezes do cDNA.

A sensibilidade da RT-PCR Multiplex comparada à da RT-PCR Simplex para o CPMMV foi a mesma, para o CMV foi aproximadamente dez vezes menor e para o CPSMV foi vinte vezes menor. Discrepâncias desse tipo foram relatadas em vários

estudos (Feng *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2021; Xue *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2023). Alguns fatores podem afetar a eficiência da RT-PCR Multiplex, como altas concentrações de oligonucleotídeos e o rendimento e qualidade do RNA total extraído. A presença de mais de um par de oligonucleotídeos pode favorecer a competição entre os amplicons em síntese, pelos reagentes de PCR, e, assim, pode reduzir o rendimento de qualquer um dos amplicons. Além disso, os títulos de vírus podem ser a principal razão para diferenças na intensidade dos amplicons. Assim, é de fundamental importância selecionar oligonucleotídeos específicos para cada vírus para ser uma ferramenta de diagnóstico eficiente (Uga; Tsuda, 2005; Feng *et al.*, 2020; Lim *et al.*, 2021).

4.4 Avaliação da RT-PCR Multiplex em amostras de campo

Com a finalidade de avaliar a eficiência do protocolo RT-PCR Multiplex em amostras de campo, 87 amostras de plantas de feijão-caupi com sintomas de mosaico e deformação foliar (Fig. 12), provenientes de campos de cultivo em sete municípios no estado do Piauí e Maranhão, foram testadas.

Os resultados das análises de RT-PCR Multiplex revelaram que a incidência dos vírus foi variável, isto é, 67,8% (59 em 87 amostras) para CPSMV, 40,2% (35/87) para o CMV e nenhuma planta infectada (0,0%) para o CPMMV (Fig. 13). Notavelmente, o CPSMV exibiu a maior taxa de infecção. Esse resultado evidencia a persistente prevalência desse vírus no feijão-caupi, reforçando-o como o principal vírus da cultura e, por conseguinte, uma ameaça à sua produção.

Nenhuma amostra estava infectada com o CPMMV. É um resultado curioso, pois esse vírus já foi relatado em plantas de feijão-fava no estado do Piauí (Medeiros *et al.*, 2020), em plantas de feijão-comum e em plantas não cultivadas em Pernambuco (Lamas *et al.*, 2017). Entretanto, o vírus pode possuir baixa incidência na área geográfica onde as amostras foram coletadas. Isso pode estar relacionado à baixa atratividade para a oviposição do vetor, a mosca-branca *Bemisia tabaci* MEAM1 (Middle East-Asia Minor 1, conhecida como biótipo B), em algumas cultivares de feijão-caupi, como BRS-Urubuquara, BR 17-Gurgueia, BRS-Marataoã e BRS-Rouxinol, uma vez que esses genótipos apresentam resistência pelo mecanismo de não preferência para oviposição (Cruz *et al.*, 2012). Vale ressaltar que essa hipótese

não pôde ser comprovada, pois não temos informações sobre quais variedades de feijão-caupi foram coletadas.



Figura 12. A-D Folhas de feijão-caupi com sintoma de mosaico, bolhosidade, deformação do limbo, pontos necróticos, além de subdesenvolvimento da planta.

No âmbito das coinfeccções, verificou-se que 24,1% (21/87) das amostras analisadas apresentaram simultaneamente CPSMV e CMV. A presença de infecção mista pode desencadear mudanças citopatológicas e influenciar a regulação, tanto positiva quanto negativa, de genes ligados aos sistemas de defesa das plantas. Essas alterações podem ser responsáveis por intensificar ou reduzir os sintomas da doença (Mascia; Gallitelli, 2016).

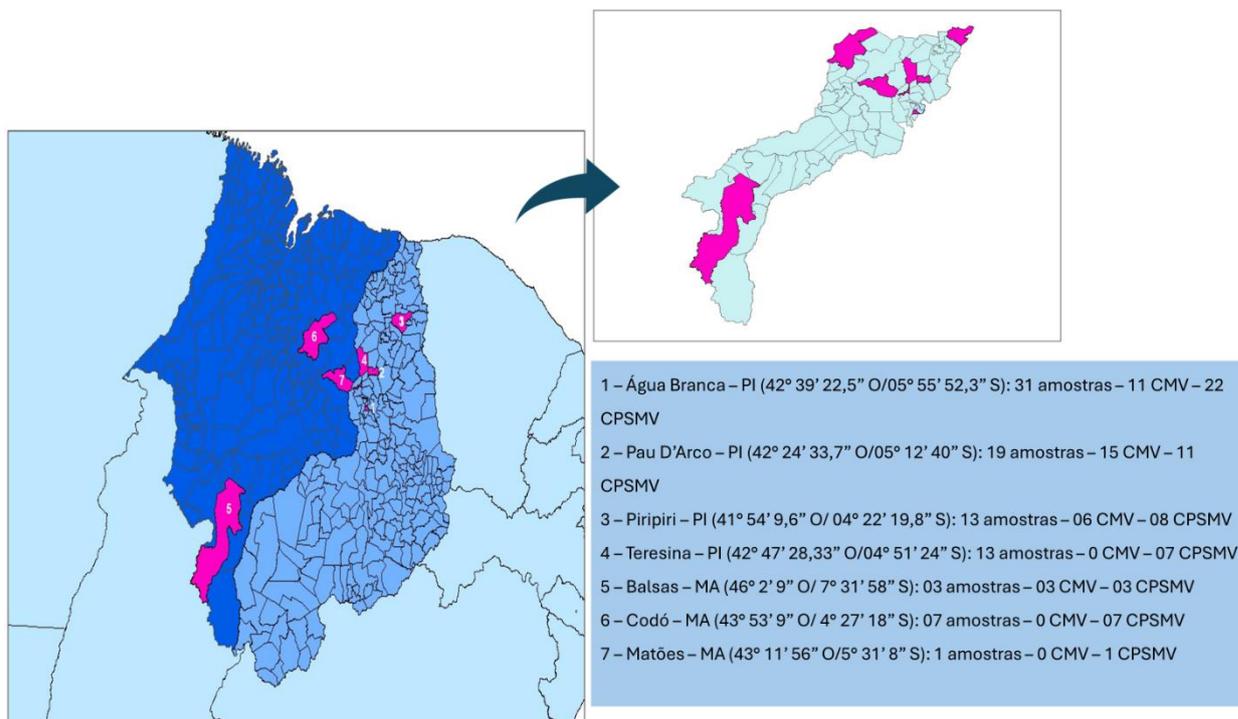


Figura 13. Municípios de coleta e os respectivos valores de incidência para CMV e CPSMV.

Os resultados obtidos neste estudo pela RT-PCR Multiplex (Fig. 14) foram inteiramente consistentes com aqueles obtidos pelos ensaios individuais com RT-PCR. Essa convergência de resultados reforça a confiabilidade do método de RT-PCR Multiplex desenvolvido nesta pesquisa para a detecção precisa desses três vírus em amostras coletadas em campo.

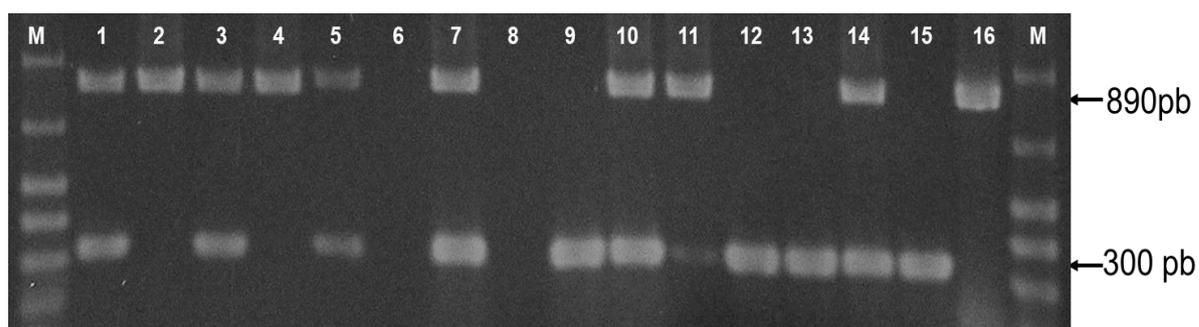


Figura 14. Detecção de vírus em 16 amostras foliares de feijão-caupi utilizando o ensaio RT-PCR Multiplex para a detecção de CMV, CPMMV e CPSMV. Coluna M. Marcador de comprimento, em pb (1 kb Plus DNA Ladder); 1–16: Amostras de campo.

Além disso, a capacidade do ensaio RT-PCR Multiplex de detectar CPSMV, CMV e CPMMV simultaneamente em um único ensaio, em vez dos ensaios simples correspondentes, proporcionou uma economia de aproximadamente 70% do tempo

de detecção, 20% do volume da Taq DNA polimerase, 12,5% do volume de dNTPs e 7,14% do volume dos oligonucleotídeos.

4.5 RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados e específico em amostras de campo

As mesmas amostras avaliadas na seção anterior, isto é, 87, também foram avaliadas para a presença de possíveis outros comovírus e para o potyvírus CABMV, uma vez que vírus desses gêneros ocorrem comumente em feijões no Brasil (Kitajima, 2020). Dessas amostras, 12 não revelaram infecção pelo CPSMV, CMV e CPMMV. A detecção de outros vírus do gênero *Comovirus*, além do CPSMV, foi avaliada com os oligonucleotídeos degenerados ComovirusR e ComovirusF (Brioso *et al.*, 1996). Observou-se que, das 12 amostras, cinco estavam infectadas por um vírus pertencente ao gênero *Comovirus*, embora não correspondesse ao CPSMV. Essas amostras com comovírus desconhecido foram enviadas para sequenciamento de DNA, com isso, poderemos conhecer o comovírus presente nas amostras.

Para a detecção do CABMV, empregamos oligonucleotídeos específicos para essa espécie nas 87 amostras de feijão-caupi e não detectamos a presença desse vírus em nenhuma das amostras. Esse resultado é inesperado, dado que o CABMV já foi documentado em diversos estudos como um patógeno de elevada incidência em feijão-caupi (Lima *et al.*, 1981; Freitas *et al.*, 2012; Pio-Ribeiro; Assis Filho; Andrade, 2016).

5. CONCLUSÕES

O protocolo de detecção elaborado neste estudo é eficiente para identificar de maneira específica e sensível três espécies de vírus (CMV, CPSMV e CPMMV) em feijão-caupi.

A RT-PCR Multiplex revelou o CPSMV como o vírus de maior incidência na cultura do feijão-caupi na região avaliada, enquanto o CPMMV não foi detectado nas amostras analisadas.

A implementação do RT-PCR Multiplex desenvolvido proporciona agilidade, reduzindo em 70% o tempo despendido para a detecção e, adicionalmente, resulta em diminuição de 20% do volume da Taq DNA polimerase, 12,5% do volume de dNTP

e 7,14% do volume dos oligonucleotídeos específicos o que proporciona redução nos custos associados ao processo.

6. CONSIDERAÇÕES

O feijão-caupi representa uma cultura em franca expansão no Brasil, de elevada importância econômica, sobretudo na região Nordeste. Contudo, as doenças virais constituem um desafio significativo para o seu contínuo desenvolvimento. Neste estudo pioneiro, um teste de RT-PCR Multiplex foi desenvolvido, possibilitando a detecção simultânea, específica e sensível de CPSMV, CMV e CPMMV, sem ocorrência de reações cruzadas entre os três pares de oligonucleotídeos e os genomas virais e do hospedeiro.

A relevância desse método de detecção é considerável, pois viabilizará a identificação rápida e precisa de infecções virais, fornecendo suporte para um manejo adequado das doenças tanto em feijão-caupi, como nas demais espécies de feijões como o feijão-fava e o feijão comum. Além disso, propiciará economia de tempo e redução de custos. A RT-PCR Multiplex para CPSMV, CMV e CPMMV é uma ferramenta de diagnóstico adequada tanto para pesquisas em larga escala, como estudos de melhoramento de feijão-caupi, quanto para detecção rotineira desses vírus em laboratórios de virologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, p. 3146-3153, 2012.

ADAMS M. J, CANDRESSE, T.; HAMMOND J.; KREUZE, J. F.; MARTELLI, G. P.; NAMBA, S.; PEARSON, M. N.; RYU, K. H.; SALDARELLI, P.; YOSHIKAWA, N. Family *Betaflexiviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds). **Virus Taxonomy**. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2012, p. 920-941.

AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, A. R.; NASCIMENTO, V. L.; CAPONE, A.; COSTA, L. T. M.; CAMPOS, F. S.; FIDELIS, R. R.; SANTOS, G. R.; RESENDE, R. O.; NAGATA, T. Multiplex RT-PCR identification of five viruses associated with the watermelon crops in the Brazilian Cerrado. **African Journal of Microbiology Research**, v. 13, p. 60-69, 2019.

ALEMU, K. Detection of diseases, identification and diversity of viruses: A Review. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 5, p.204-213, 2015.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; VALENTIN, N.; BENATO, L. C.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; OLIVEIRA, T. G.; NBELINTANI, P.; GUERZONI, R. A.; NUNES JÚNIOR, J.; HOFFMANN, L.; NORA, P. S.; NEPOMUCENO, A. L.; MEYER, M. C.; ALMEIDA, A. L. **Necrose da haste da soja**. Série Documentos 221, Embrapa Soja, Londrina, 48p., 2003.

ALMEIDA, A. M. R.; PIUGA, F. F.; MARIN, S. R. R.; KITAJIMA, E. W.; GASPAR, J. O.; OLIVEIRA, T. G.; MORAES, T. G. Detection and partial characterization of a carlavirus causing stem necrosis of soybean in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 191-194. 2005.

ALMEIDA, A. M. R. **Viroses da soja no Brasil: sintomas, etiologia e controle**. Série Documentos 306, Embrapa Soja, Londrina, 62p., 2008.

ANITHA, S.; MONYO, E. S.; OKORI, P. Simultaneous detection of groundnut rosette assistor virus (GRAV), groundnut rosette virus (GRV) and satellite RNA (satRNA) in groundnuts using multiplex RT-PCR. **Archives of Virology**, v.159, p. 3059-3062, 2014.

AMAYO, R.; ARINAITWE, A. B.; MUKASA, S. B.; TUSIIME, G.; KYAMANYWA, S.; RUBAIHAYO, P. R.; EDEMA, R. Prevalence of viruses infecting cowpea in Uganda and their molecular detection. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 14132-14139, 2012.

ANDIKAA, I. B.; WEI, S.; CAO, C.; SALAIPETHA, L.; KONDO, H.; SUN, L. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, p. 12267-12272, 2017.

ARANDA, M. A.; FREITAS-ASTÚA, J. Ecology and diversity of plant viruses, and epidemiology of plant virus-induced diseases. **Annals of Applied Biology**, v. 171, p. 1-4, 2017.

ASSIS FILHO, F. M.; LIMA, J. A. A.; PIO RIBEIRO, G.; MARIANO, R. L. R. Ausência de transmissão por sementes do vírus do mosaico severo do caupi. **Caderno Ômega**, Universidade Federal Rural, PE, Serviço Agronômico, Recife, n. 4, p. 9-17, 1992.

ASSUNÇÃO, I. P.; M.-FILHO, L. R.; RESENDE, L. V.; BARROS, M. 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, p. 274-278, 2005.

BADGE, J.; BRUNT, A.; CARSON, R.; DAGLESS, E.; KARAMAGIOLI, M.; PHILLIPS, S.; SEAL, S.; TURNER, R.; FOSTER, G. D. A carlavirus-specific PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition

of Cowpea mild mottle virus as a whitefly-transmitted carlavirus. **European Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 305-310, 1996.

BELLO, V. H.; SILVA, F. B.; WATANABE, L. F. M.; VICENTIN, E.; MULLER, C.; BUENO, R. C. O. F.; SANTOS, J. C.; MARCHI, B. R.; NOGUEIRA, A. M.; YUKI, V. A.; MARUBAYASHI, J. M.; SARTORI, M. M. P.; PAVAN, M. A.; GHANIM, M.; KRAUSE-SAKATE, R. Detection of *Bemisia tabaci* Mediterranean cryptic species on soybean in São Paulo and Paraná States (Brazil) and interaction of cowpea mild mottle virus with whiteflies. **Plant Pathology**, v. 70, p. 1508-1520, 2021.

BOOKER, H. M.; UMAHARAN, P.; MCDAVID, C. R. Effect of Cowpea severe mosaic virus on growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Disease**, v. 89, p. 515-520, 2005.

BOONHAM, N.; KREUZE, J.; WINTER, S.; VAN DER VLUGT, R.; BERGERVOET, J.; TOMLINSON, J.; MUMFORD, R. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. **Virus Research**, v. 186, p. 20-31, 2014.

BOUKAR, O.; BELKO, N.; CHAMARTHI, S.; TOGOLA, A.; BATIENO, J.; OWUSU, E.; HARUNA, M.; DIALLO, S.; UMAR, M. L.; OLUFAJO, O.; FATOKUN, C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 38, p. 415-424, 2018.

BRIOSO, P. S. T.; SANTIAGO, L. J. M. ANJOS, J. R. N.; OLIVEIRA, D. E. Identificação de espécies do gênero *comovirus* através de "Polymerase chain reaction". **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, p. 219-225, 1996.

BRITO, M.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, T.; GARRIDO, M. J.; MEJÍAS, A.; ROMANO, M.; MARYS, E. First report of *Cowpea mild mottle carlavirus* on yardlong bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) in Venezuela. **Viruses**, v. 4, p. 3804-3811, 2012.

BRUNT, A. A.; KENTEN, R. H. Cowpea mild mottle, a newly recognized virus infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) in Ghana. **Annals of Applied Biology**, v. 74, n. 1, p. 67-74, 1973.

BUESO, E.; SERRANO, R.; PALLÁS, V.; NAVARRO, J. A. S. Seed tolerance to deterioration in arabidopsis is affected by virus infection. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 116, p. 1-8, 2017.

BUJARSKI, J.; GALLITELLI, D.; GARCÍA-ARENAL, F.; PALLÁS, V.; PALUKAITIS, P.; REDDY, M. K.; WANG, A. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Bromoviridae*, **Journal of General Virology**, v. 100, p. 1206-1207, 2019.

CATING, R. A.; FUNKE, C. N.; KAUR, N.; HAMM, P. B.; FROST, K. E. A Multiplex Reverse Transcription (RT) high-fidelity PCR protocol for the detection of six viruses that cause potato tuber necrosis. **American Journal of Potato Research**, v. 92, p. 536-540, 2015.

CHEN, G.; PAN, H.; XIE, W.; WANG, S.; WU, Q.; FANG, Y.; SHI, X.; ZHANG, Y. Virus infection of a weed increases vector attraction to and vector fitness on the weed. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2253, 2013.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 11, safra 2023/24, n. 2 segundo levantamento, novembro 2023.

COSTA, A. S.; GASPAR, J. O.; VEJA, J. Mosaico angular do feijoeiro Jalo causado por um carlavírus transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 8, p. 325-337, 1983. (Resumo).

COSTA, A. F. Doenças causadas por vírus em hortaliças leguminosas. **Informe Agropecuário**, v.17, p. 75-85, 1995.

CRUZ, P. L.; BALDIN, E. L. L.; CASTRO, M. J. P.; FANELA, T. L. M.; SILVA, P. H. S. Atratividade de genótipos de feijão-caupi para oviposição de *Bemisia tabaci* biótipo B. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.11, p.1563-1571, 2012.

CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-based enhanced resistance to Cowpea severe mosaic virus and Cowpea aphid-borne mosaic virus in transgenic cowpea. **Plant Pathology**, v. 63, p. 831-837, 2014.

CUNNIFFE, N. J.; TAYLOR, N. P.; HAMELIN, F. M.; JEGER, M. J. Epidemiological and ecological consequences of virus manipulation of host and vector in plant virus transmission. **PLOS Computational Biology**, n. 17, v. 12, p. e1009759, 2021.

EDWARDSON, J. R.; CHRISTIE, R. G. Cucumoviruses. In **CRC Handbook of Viruses Infecting Legumes**. CRC Press, p. 293-319, 1991.

FANG, J.; CHIN-CHENG, T. C.; ROBERTS, P. A.; EHLERS, J. D. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 1197-1209, 2007.

FENG, X. Y.; WANG, W. Z.; SHEN, L. B.; WANG, J. G.; XIONG, G. R.; FENG, C. L.; ZHAO, T. T.; ZHANG, S. Z. Multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection and identification of five sugarcane viruses. **Sugar Tech**, v. 22, p. 662-670, 2020.

FERERES, A.; RACCAH, B. Plant virus transmission by insects. In: **eLS**. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2015.

FLASINSKI, S.; SCOTT, S. W.; BARNETT, O. W.; SUN, C. Diseases of *Peperomia*, *Impatiens* and *Hibbertia* caused by Cucumber mosaic virus. **Plant Disease**, v. 79, p. 843-848, 1995.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S. (Ed.). **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. 1ª ed., Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005.

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

GALLITELLI, D. The ecology of Cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. **Virus Research**, v. 71, p. 9-21, 2000.

GAMBINO, G.; GRIBAUDO, I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. **Phytopathology**, v. 96, p.1223-1229, 2006.

GIRIBALDI, M.; PURROTTI, M.; PACIFICO, D.; SANTINI, D.; MANNINI, F.; CACIAGLI, P.; ROLLE, L.; CAVALLARIN, L.; GIUFFRIDA, M. G; MARZACH`Y, C. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 306-315, 2011.

GONÇALVES, A.; GOUFO, P.; BARROS, A.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; TRINDADE, H.; ROSA, E. A. S.; FERREIRA, L.; RODRIGUES, M. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 2941-2951, 2016.

HORN, L. N.; NGHITUWAMHATA, S. N.; ISABELLA, U. Cowpea production challenges and contribution to livelihood in Sub-Saharan region. **Agricultural Sciences**, v. 13, p. 25-32, 2022.

HUANG, A.; GU, P.; WANG, Y.; LI, J.; YANG, Z.; YI, L. Simultaneous detection and differentiation of four viruses in passion fruit plants by a multiplex RT-PCR. **Tropical Plant Pathology**, v. 48, p. 23-29, 2023.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <<https://ictv.global/report>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

JACQUEMOND, M. Cucumber mosaic virus. **Advances in Virus Research**, v. 84, p. 439-504, 2012.

JAYATHILAKE, C.; VISVANATHAN, R.; DEEN, A.; BANGAMUWAGE, R.; JAYAWARDANA, B. C.; NAMMIC, S.; LIYANAGEA, R. Cowpea: an overview on its nutritional facts and health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 4793-4806, 2018.

JONES, R. A. C.; NAIDU, R. A. Global dimensions of plant virus diseases: current status and future perspectives. **Annual Review of Virology**, v. 6, p. 387-409, 2019.

KATSAROU, K.; BARDANI, E.; KALLEMI, P.; KALANTIDIS, K. Viral detection: past, present, and future. **Bio Essays**, v. 41, p. 1900049, 2019.

KIM, M. K.; JEONG, R. D.; KWAK, H. R.; LEE, S. H.; KIM, J. S.; KIM, K. H.; CHA, B.; CHOI, H. S. First Report of Cucumber mosaic virus isolated from wild *Vigna angularis* var. *nipponensis* in Korea. **The Plant Pathology Journal**, v. 30, p. 200-207, 2014.

KITAJIMA, E. W. An annotated list of plant viruses and viroids described in Brazil (1926-2018). **Biota Neotropica**, v. 20, n. 2, p. e20190932, 2020.

KWAK, H. R.; KIM, M. K.; SHIN, J. C.; LEE, Y. J.; SEO, J. K.; LEE, H. U.; JUNG, M. N.; KIM, S. H.; CHOI, H. S. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of Multiplex RT-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. **Plant Pathology Journal**, v. 30, p. 416-424, 2014.

KWON, J. Y.; HONG, J. S.; KIMA, M. J.; CHOI, S. H.; MINA, B. E.; SONG, E. G.; KIM, H. H.; RYU, K. H. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 206, p. 133-139, 2014.

LAMAS, N. S.; MATOS, V. O. R. L.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; MELO, F. L.; COSTA, A. F.; FARIA, J. C.; RIBEIRO, S. G. Occurrence of *Cowpea mild mottle virus* in common bean and associated weeds in Northeastern Brazil. **Plant Disease**, v. 101, p. 1828, 2017.

LIM, M. S.; MIN, D. J.; HONG, J. S.; CHOI, S. H. Simultaneous detection of four lily-infecting viruses by a multiplex. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, p. 219-224, 2021.

LIMA, J. A. A.; OLIVEIRA, F. M. E. W.; KITAJIMA, E. W.; LIMA, M. G. A. Propriedades biológicas, citológicas e sorológicas de um potyvirus isolado de feijão-de-corda no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 205-216, 1981.

LIMA, J. A. A.; SANTOS, C. D. G.; SILVEIRA, L. F. S. Comportamento de genótipos de Caupi em relação aos dois principais vírus que ocorrem no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, p. 151-161, 1986.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnoses e estratégias de controle de doenças ocasionadas por vírus. In: FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S. (Ed.). **Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos**. 1ª.ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2005a. p. 405-459.

LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; SILVA, G. S.; CAMARÇO, R. F. E. A. *Crotalaria paulinea*, novo hospedeiro natural do vírus do mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 429-433, 2005b.

LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; RIOS, G. P. Detecção serológica de dois vírus previamente desconhecidos em caupi (*Vigna unguiculata*) no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 73-85, 1981.

LIN, M. T.; ANJOS, J. R. N.; RIOS, G. P. Cowpea severe mosaic virus in five legumes in Brazil central. **Plant Disease**, v. 66, p. 67-70, 1982.

- LIN, M. T.; SANTOS, A. A.; MUNOZ, J. O. Ocorrência de vírus do Mosaico do pepino, no estado do Piauí. In: **I Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi**, 1982, Teresina. Resumos. Goiânia: Embrapa-CPAMF, p. 101-102, 1982.
- LIN, M. T.; HILL, J. H.; KITAJIMA, E. W.; COSTA, C. L. Two new serotypes of Cowpea severe mosaic virus. **Phytopathology**, v. 74, p. 581-585. 1984.
- LOPEZ, M.; LIBURD, E. O. Effects of intercropping marigold, cowpea and an insecticidal soap on whiteflies and aphids in organic squash. **Journal of Applied Entomology**, v. 147, p. 452-463, 2023.
- MARTELLI, G. P.; ADAMS, M. J.; KREUZE, J. F.; DOLJA, V. V. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, p. 73-100, 2007.
- MASCIA, T.; GALLITELLI, D. Synergies and antagonisms in virus interactions. **Plant Science**, v. 252, p. 176-192, 2016.
- MASCIA, T.; VUČUROVIĆ, A.; MINUTILLO, S. A.; NIGRO, F.; LABARILE, R.; SAVOIA, M. A.; PALUKAITIS, P.; GALLITELLI, D. Infection of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora infestans* by taxonomically different plant viruses. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, p. 1001-1017, 2019.
- MAUCK, K. E.; MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. **Plant Cell and Environment**, v. 37, p. 1427-1439, 2014.
- MAURASTONI, M.; ANTUNES, T. F. S.; OLIVEIRA, S. A.; SANTOS, A. M. C.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. A Multiplex RT-PCR method to detect papaya meleira virus complex in adult pre-flowering plants. **Archives of Virology**, v. 165, p. 1211-1214, 2020.
- MEDEIROS, L. S. A.; OLIVEIRA, I. A.; KITAJIMA, E. W.; EIRAS, M.; PEREIRA, H. J.; RIBEIRO, S. G.; MATOS, K. S.; BESERRA JÚNIOR, J. E. A. A survey of RNA genome viruses in Lima bean crops of Northeastern Brazil. **Bragantia**, v. 79, p. 407-416, 2020.
- MENZEL, W.; WINTER, S.; VETTEN, H. Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. **Archives of Virology**, v. 155, p. 2069-2073, 2010.
- MINUTOLO, M.; SERIO, F.; CINQUE, M.; LOMBARDI, P.; NAVARRO, B.; ALIOTO, D. Simultaneous detection of citrus concave gum-associated virus (CCGaV) and citrus virus A (CiVA) by Multiplex RT-PCR. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, p. 655-661, 2020.
- MONTES, N.; PAGÁN, I. Light intensity modulates the efficiency of virus seed transmission through modifications of plant tolerance. **Plants**, v. 8, p. 304, 2019.

MORENO, A. B.; LÓPEZ-MOYA, J. J. When viruses play team sports: mixed infections in plants. **Phytopathology**, v. 110, p. 29-48, 2020.

MORRIS, T. J.; DODDS, J. A. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. **Phytopathology**, v. 69, p. 854-858, 1979.

NAM, M.; LEE, Y. H.; PARK, C. Y.; LEE, M. A.; BAE, Y. S.; LIM, S.; LEE, J. H.; MOON, J. S.; LEE, S. H. Development of Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, p. 90-96, 2015.

NEWBURN, L. R.; WHITE, K. A. Cis-acting RNA elements in positive-strand RNA plant virus genomes. **Virology**, v. 479-480, p. 434-443, 2015.

NDIAYE, M.; BASHIR, M.; KELLER, K.; HAMPTON, R. Cowpea viruses in Senegal, West Africa: identification, distribution, seed transmission and sources of genetic resistance. **Plant Disease**, v. 77, p. 999-1003, 1993.

NICAISE, V. Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 660, 2014.

NOFLINDAWATI, N.; ANWAR, A.; SUTANTO, A.; YUSNIWATI, Y. Optimization of annealing cycle and temperature SNAP T12 primer distinguishing markers for male, female and hermaphrodite plants in papaya (*Carica papaya* L). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 715, p. 012040, 2021.

OGUNSOLA, K. E.; YUSUF, A.; ELEGBEKU, O. A. Updates on cowpea viruses in Southwest Nigeria: distribution, prevalence and coinfection. **Indian Phytopathology**, v. 76, p. 201-213, 2023.

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 coinfeccções pelo Cucumber mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus e Cowpea severe mosaic virus. **Bragantia**, v. 71, p. 59-66, 2012.

ORAWU, M.; OBUO, J.; OMADI, R. Distribution and detection of cowpea viruses infecting cowpea in Uganda. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 574-581, 2015.

PAGÁN, I. Transmission through seeds: The unknown life of plant viruses. **PLOS Pathogens**, v.18, p. e1010707, 2022.

PALANGA, E.; FILLOUX, D.; MARTIN, D. P.; FERNANDEZ, E.; GARGANI, D.; FERDINAND, R.; ZABREÂ, J.; BOUDA, Z.; BOUMA, J. N.; SAWADOGO, M.; TRAORE, O.; PETERSCHMITT, M.; ROUMAGNAC, P. Metagenomic-based screening and molecular characterization of cowpea-infecting viruses in Burkina Faso. **PLOS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0165188, 2016.

PALLÁS, V.; SÁNCHEZ-NAVARRO, J. A.; JAMES, D. Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroides. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2087, 2018.

PANZERI, D.; NISSIM, W. G.; LABRA, M.; GRASSI, F. Revisiting the domestication process of African *Vigna* Species (Fabaceae): background, perspectives and challenges. **Plants**, v. 11, p. 532, 2022.

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

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M.; ANDRADE, G. P. Doenças do Feijão-Caupi. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**, v. 2, p. 373-381, 2016.

PRUSS, G.; GE, X.; SHI, X. M.; CARRINGTON, J. C.; BOWMAN, V. V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v. 9, p. 859-868, 1997.

REZENDE, J. A. M.; KITAJIMA, E. W. Vírus e viróides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos**, v. 1, p. 161-180, 2018.

RIVAS, R.; FALCÃO, H. M.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; PIMENTEL, C.; SANTOS, M. G. Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 101-107, 2016.

RUBIO, L.; GALIPIENSO, L.; FERRIOL, I. Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 17, p.1092, 2020.

SANTOS, A. A.; FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. BR 10 – Piauí: cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata*) com resistência múltipla a vírus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 12, p. 400-402, 1987.

SANTOS, A. A.; FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J. **Ocorrência de viroses em feijão macássar *Vigna unguiculata* no estado do Piauí**. Circular Técnica. Teresina: Embrapa. 1982. 11p.

SCAGLIUSI, S. M.; BASU, S.; GOUVÊA, J. A. D.; VEGA, J. Comparison of two diagnostic methods for evaluation of Sugarcane yellow leaf virus concentration in Brazilian sugarcane cultivars. **Functional Plant Science Biotechnology**, v. 3, p. 26-30, 2009.

SHI, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.; ZHOU, X.; ZHANG, D.; LIU, Y. The molecular mechanism of efficient transmission of plant viruses in variable virus–vector–plant interactions. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, p. 501-508, 2021.

TATINENI, S.; ALEXANDER, J.; QU, F. Differential synergistic interactions among four different wheat-infecting viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p.a. 800318, 2022.

TEIXEIRA, K. J. M. L.; CASCARDO, R. S.; LEAL, L. L.; F. MURILO ZERBINI, M.; BESERRA JR, J. E. A. First complete genome sequence of an isolate of cowpea severe mosaic virus from South America. **Virus Genes**, v. 57, p. 238-24, 2021.

THOMPSON, J. R.; WETZEL, S.; KLERKS, M. M.; VASKOVÁ, D.; SCHOEN, C. D.; SPAK, J.; JELKMANN, W. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 111, p. 85-93, 2003.

THOMPSON, J. R.; DASGUPTA, I.; FUCHS, M.; IWANAMI, T.; KARASEV, A. V.; PETRZIK, K.; SANFAÇON, H.; TZANETAKIS, I. E.; VAN DER VLUGT, R.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N.; ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: Secoviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, p. 529-531, 2017.

UGA, H.; TSUDA, S. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. **Phytopathology**, v. 95, p. 166-171, 2005.

VARELA, A. L. N.; KOMATSU, S.; WANG, X.; SILVA, R. G. G.; SOUZA, P. F. N.; LOBO, A. K. M.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Gel-free/label-free proteomic, photosynthetic, and biochemical analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) resistance against Cowpea severe mosaic virus (CPSMV). **Journal of Proteomics**, v. 163, p. 76-91, 2017.

VELÁSQUEZ, A. C.; CASTROVERDE, C. D. M.; HE, S. Y. Plant–pathogen warfare under changing climate conditions. **Current Biology Review**, v. 28, p. 619-634, 2018.

WANG, Y. M.; OSTENDORF, B.; GAUTAM, D.; HABILI, N.; PAGAY, V. Plant viral disease detection: from molecular diagnosis to optical sensing technology-A multidisciplinary review. **Remote Sensing**, v. 14, p. 1542, 2022.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A. S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J. S.; LOBO JÚNIOR, M. Doenças do Feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. F. A. **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**, v. 2, p. 383-396, 2016.

WU, D.; QI, T.; LI, W. X.; TIAN, H.; GAO, H.; WANG, J.; GE, J.; YAO, R.; REN, C.; WANG, X. B.; LIU, Y.; KANG, L.; DING, S. W.; XIE, D. Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. **Cell Research**, v. 27, p. 402-415, 2017.

XIONG, H.; SHI, A.; MOU, B.; QIN, J.; MOTES, D.; LU, W.; MA, J.; WENG, Y.; YANG, W.; WU, D. Genetic Diversity and Population Structure of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e016094, 2016.

XUE, B.; SHANG, J.; YANG, J.; ZHANG, L.; DU, J.; YU, L.; YANG, W.; NAEEM, M. Development of a multiplex RT-PCR assay for the detection of soybean mosaic virus, bean common mosaic virus and cucumber mosaic virus in field samples of soybean. **Journal of Virological Methods**, v. 298, p. 114278, 2021.

WANG, M. B.; MASUTA, C.; SMITH, N. A.; SHIMURA, H. RNA silencing and plant viral diseases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, p. 1275-1285, 2012

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T. L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.

ZANARDO, L. G.; SILVA, F. N.; BICALHO, A. A. C.; URQUIZA, G. P. C.; LIMA, A. T.; ALMEIDA, A. M. R.; ZERBINI, F. M.; CARVALHO, C. M. Molecular and biological characterization of *Cowpea mild mottle virus* isolates infecting soybean in Brazil and evidence of recombination. **Plant Pathology**, v. 63, p. 456-465, 2014.

ZANARDO, L. G.; CARVALHO, C. M. *Cowpea mild mottle virus* (*Carlavirus*, *Betaflexiviridae*): a review. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, p. 417-430, 2017.