

Universidade Federal do Piauí

**Sequenciamento do genoma do cowpea severe mosaic virus e
caracterização de fator molecular possivelmente envolvido com a
resistência do feijão-caupi**

Kelvin Josemar Marques Lima Teixeira

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina

2020

Kelvin Josemar Marques Lima Teixeira
Bacharel em Ciências Biológicas

Sequenciamento do genoma do cowpea severe mosaic virus e caracterização de fator molecular possivelmente envolvido com a resistência do feijão-caupi

Orientador:

Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

Teresina
2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

T261s Teixeira, Kelvin Josemar Marques Lima
Sequenciamento do genoma do cowpea severe mosaic vírus e caracterização de fator molecular possivelmente envolvido com a resistência do feijão - caupi. / Kelvin Josemar Marques Lima Teixeira – 2020.
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina, 2020.

Orientação: Prof. Dr. José Evandro Aguiar Beserra Júnior

1. *Vigna unguiculata* 2. CPSMV 3. eIF4E I.Título

CDD 635.659 2

Sequenciamento do genoma do cowpea severe mosaic vírus e caracterização de fator molecular possivelmente envolvido com a resistência do feijão-caupi

Kelvin Josemar Marques Lima Teixeira

Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovado em 27/08/2020

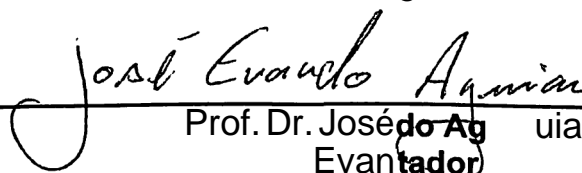
Comissão Julgadora:



Prof. Dr. E



Prof. Dr. Frank Magno da Costa - UESPI



Prof. Dr. José do Aguiar
Evantador



a Jr

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, **Kaline Resende** e **Raimundo Nonato** e a minha querida avó, **Maria de Lurdes**, os primeiros a valorizarem a Educação enquanto instrumento de luz para o mundo e me incentivarem a estudar sempre, pelo suporte em minhas escolhas, pelas oportunidades e facilidades que, sobremaneira, foram fundamentais para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha amada namorada, **Camila de Sousa**, por todo amor, carinho, cumplicidade, paciência, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Esse trabalho não seria possível sem sua companhia no laboratório, na montagem de experimentos e nas sugestões de escrita desse trabalho, deveria receber, assim como eu, o título de mestre em genética e melhoramento.

Dedico, carinhosamente, a todos aqueles que acreditam que seja possível contribuir com a ciência brasileira como um fator de mudança social, mesmo em tempos tão sombrios como o que vivemos. “Que haja uma Luz nos lugares mais escuros, quando todas as outras Luzes se apagarem” - Galadriel.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Piauí (UFPI)**, pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação, apoio institucional e estrutural. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao curso de **Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PPGM)** em especial à coordenação e ao corpo docente, pelo apoio e ensinamentos repassados durante o mestrado.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. **José Evando Aguiar Beserra Júnior**, a quem considero “pai científico”, pela confiança depositada, ensinamentos, orientação, comprometimento, acessibilidade, paciência, exemplo de ética, respeito e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. **Francisco Murilo Zerbini** pelo apoio laboratorial no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV), e de toda equipe laboratorial, em especial ao Dr. **Renan Cascardo** e ao **Lorhan Lima Leal** pela purificação do RNA total e montagem dos reads, a Dra. **Anelise Orílio**, ao Me. **João Paulo Herrera** e a Me. **Tarsiane Barbosa** pelo apoio, conselhos, e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. **José Lindenberg Rocha Sarmiento** pelo apoio laboratorial no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (DZO-UFPI), e toda equipe laboratorial, em especial a Dra. **Bruna Lima** e ao **Arthur Rocha**, pela disposição, apoio e momentos de descontração.

Ao Dr. **Maurisrael de Moura Rocha** pelo fornecimento do material vegetal da Embrapa Meio-Norte, essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus queridos amigos **Andressa Amorim, Bruno Oliveiros, José Wilgney, Matheus Brito, Naide Silva, Samíria Pinheiro, Samylly Lourenço, Victor Passos** e **Yara Pires**, pelo apoio, por compreender as minhas ausências, pelo incentivo, companhia e momentos de distração.

A todos os meus colegas de classe, pelos conselhos, ensinamentos e momentos de lazer. Agradeço de forma especial as Mestras **Cleidiane M. Santos, Vanessa G. de Moura** e **Regina M. S. Sousa** que além de companheiras, sacrificaram de seu tempo e conforto para reativarmos o Núcleo de Estudos em Genética e Melhoramento (GEM).

Aos colegas de laboratório, em especial à Dra. **Enayra Silva Sousa** e aos Mestres **Kelvim Crist**, **Laíse Passos**, **Layla Andrade** e **Mynor García**, pelos ensinamentos, companheirismo e apoio desde a graduação.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

“Transmita o que aprendeu. Força, mestria. Mas fraqueza, insensatez, fracasso também. Sim, fracasso acima de tudo. O maior professor, o fracasso é. Luke, nós somos o que eles crescem além. Esse é o verdadeiro fardo de todos os mestres”.

Mestre Yoda

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. Introdução	5
2. Objetivos	7
3. Revisão Bibliográfica	8
3.1 Feijão-caupi: características gerais	8
3.2 Cowpea severe mosaic virus	10
3.3 Resistência recessiva	14
4. Material e Métodos	17
4.1 Origem e manutenção do isolado viral	17
4.2 Cultivo de plantas e inoculação mecânica	17
4.3 Sequenciamento do genoma do CPSMV	18
4.3.1 Purificação de RNA total	18
4.3.2 Sequenciamento de DNA e análise filogenética	18
4.4 Estudos de resistência recessiva por meio de análise de sequências do fator de iniciação de tradução eIF4E	20
4.4.1 Condução experimental	20
4.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores	20
4.4.3 Extração e purificação de RNA total	21
4.4.4 RT-PCR	21
4.4.5 Sequenciamento, dedução da sequência de aminoácidos e averiguação da existência de polimorfismo	22
5. Resultados e Discussão	23
5.1 Sequenciamento do genoma do CPSMV	23
5.2 Caracterização de um fator molecular possivelmente envolvido com a resistência de feijão-caupi	28
6. Conclusões	35
7. Referências Bibliográficas	36

RESUMO

TEIXEIRA. K. J. M. L. **Sequenciamento do genoma do cowpea severe mosaic virus e caracterização de fator molecular possivelmente envolvido com a resistência do feijão-caupi**. 2020. 52p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2020.

Cowpea severe mosaic virus (CPSMV), causador do mosaico severo do feijão-caupi, é considerado fator limitante para a cultura. Dependendo da cultivar e da época de infecção, o CPSMV pode reduzir a produção em até 80%. A planta infectada pode apresentar sintomas de mosaico, bolhosidade e nanismo. Apesar da importância desse patógeno, não se tem conhecimento da sequência nucleotídica completa de isolados brasileiros de CPSMV. Além disso, embora existam cultivares de feijão-caupi resistentes ao CPSMV, não é conhecido o mecanismo de resistência envolvido. O presente trabalho teve como objetivos: (1) Obter o genoma completo de um isolado de CPSMV, e (2) caracterizar o fator de iniciação da tradução eIF4E de genótipos de feijão-caupi resistentes e suscetíveis ao CPSMV. Plantas de feijão-caupi var. Imponente foram inoculadas via extrato vegetal com o isolado CPSMV THE_18-01. Após 20 dias, o RNA total das plantas sintomáticas foi extraído e, posteriormente, sequenciado por meio da plataforma NovaSeq 6000. Foram obtidas sequências parciais do RNA 1 (98,0%) e RNA 2 (93,3%). As regiões 5' e 3' não traduzidas não foram completamente sequenciadas. O RNA 1 é composto de 5.577 nucleotídeos (nt), codificando uma poliproteína com 1858 aminoácidos (aa). O RNA 2 apresenta 3.005 nt, codificando uma poliproteína de 972 ou 1001 aa. O isolado CPSMV THE_18-01 apresentou baixa identidade de sequências de nt e aa da poliproteína e das proteínas codificadas, quando comparadas com as sequências do isolado de referência CPSMV DG (EUA). As poliproteínas do isolado THE_18-01 apresentaram 78% (nt) e 91% (aa) e 74% (nt) e 83% (aa) dos RNAs 1 e 2 respectivamente, em comparação às sequências do isolado de referência. A região mais variável entre os dois isolados foi aquela codificadora da MP, enquanto VPg foi o cístron que apresentou maior conservação de sequência. Oito plantas de cada genótipo de feijão-caupi (três resistentes e dois suscetíveis) foram inoculadas com CPSMV THE_18-01. Duas plantas de cada genótipo não foram inoculadas (testemunhas). Após 20 dias, o RNA total das folhas foi extraído, amplificadas por RT-PCR com oligonucleotídeos

específicos para o CPSMV e eIF4E, e sequenciadas. Por meio do quadro sintomatológico e da presença ou ausência de fragmento amplificado por RT-PCR, os genótipos foram confirmados como resistentes ou suscetíveis. Os padrões polimórficos do gene eIF4E foram averiguados e revelaram duas substituições não sinônimas, diferindo os genótipos resistentes dos suscetíveis. Uma localizou-se na região I (Pro76 ou Ala/Glu76), enquanto a outra fora das regiões I e II (Lys175/Agr175), ambas as mutações podendo estar associadas a resistência do feijão-caupi ao CPSMV. Esses resultados poderão ser utilizados para subsidiar os programas de melhoramento de feijão-caupi na obtenção de genótipos resistentes, seja por transgenia ou melhoramento genético convencional.

Palavras-chave: CPSMV; eIF4E; *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Cowpea severe mosaic virus (CPSMV), which causes the severe cowpea mosaic, is considered a limiting factor for the crop. Depending on the cultivar and the time of infection, CPSMV can reduce production by up to 80%. The infected plant may show symptoms of mosaic, blistering and dwarfism. Despite the importance of this pathogen, the complete nucleotide sequence of Brazilian CPSMV isolates is unknown. In addition, although there are cowpea cultivars resistant to CPSMV, the resistance mechanism involved is unknown. The present work had as objectives: (1) To obtain the complete genome of a CPSMV isolate, and (2) to characterize the eIF4E translation initiation factor of resistant and susceptible cowpea genotypes to CPSMV. Cowpea plants var. Imponente were inoculated via plant extract with the isolate CPSMV THE_18-01. After 20 days, the total RNA of the symptomatic plants was extracted and subsequently sequenced using the NovaSeq 6000 platform. Partial sequences of RNA 1 (98.0%) and RNA 2 (93.3%) were obtained. The 5' and 3' untranslated regions have not been completely sequenced. RNA 1 is composed of 5.577 nucleotides (nt), encoding a polyprotein with 1.858 amino acids (aa). RNA 2 has 3.005 nt, encoding a 972 or 1.001 aa polyprotein. The CPSMV isolate THE_18-01 showed low identity of nt and aa sequences of the polyprotein and encoded proteins, when compared to the sequences of the reference isolate CPSMV DG (USA). The polyproteins of THE_18-01 isolate showed 78% (nt) and 91% (aa) and 74% (nt) and 83% (aa) of RNAs 1 and 2 respectively, compared to the sequences of the reference isolate. The most variable region between the two isolates was that encoding the MP, while VPg was the cistron that showed the highest sequence conservation. Eight plants of each cowpea genotype (three resistant and two susceptible) were inoculated with CPSMV THE_18-01. Two plants of each genotype were not inoculated (controls). After 20 days, the total RNA of the leaves was extracted, amplified by RT-PCR with specific oligonucleotides for CPSMV and eIF4E, and sequenced. Through the symptoms and the presence or absence of a fragment amplified by RT-PCR, the genotypes were confirmed as resistant or susceptible. The polymorphic patterns of the eIF4E gene were investigated and revealed two non-synonymous substitutions, differing the resistant genotypes from the susceptible ones. One was located in region I (Pro76 or Ala / Glu76), while the other outside regions I and II (Lys175 / Agr175), both mutations may be associated

with cowpea resistance to CPSMV. These results can be used to subsidize cowpea breeding programs in obtaining resistant genotypes, either by transgenics or conventional genetic improvement.

Key words: CPSMV; eIF4E; *Vigna unguiculata*.

1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) é uma leguminosa originária do continente africano, produzida em diversas partes do mundo devido a sua boa adaptabilidade a condições edafoclimáticas distintas, que favorece o seu desenvolvimento (BOUKAR *et al.*, 2018; SALVADOR, 2019).

No Brasil, o feijão-caupi possui elevada relevância socioeconômica, pois desempenha importante papel na segurança alimentar e nutricional, servindo como a principal fonte de proteína para milhões de pessoas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Nessas regiões a produtividade do feijão-caupi é baixa, devido a produção majoritariamente praticada por pequenos agricultores numa exploração de subsistência, com baixa adoção de tecnologia e práticas agrícolas adequadas, como o uso de medidas de controle contra patógenos e pragas (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2020).

Doenças virais, em diferentes culturas, causam enormes perdas ao redor do mundo em termos de quantidade e/ou qualidade dos produtos. Estima-se que as perdas de rendimento, que podem ser atribuídas a vírus de plantas, custem no mundo todo mais de US\$ 30 bilhões anualmente (NICAISE, 2014). *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), família *Secoviridae*, gênero *Comovirus* (THOMPSON *et al.*, 2017) é uma das 20 espécies de vírus que infectam o feijão-caupi (LIMA *et al.*, 2005) podendo provocar perdas de até 85% da produção, além de influenciar na redução da qualidade dos grãos (GONÇALVES; LIMA, 1988; BOOKER *et al.*, 2005).

Os métodos de manejo utilizados no controle do CPSMV baseiam-se em reduzir ou evitar a disseminação do patógeno através da eliminação de plantas de feijão-caupi remanescentes de cultivos anteriores e de outros hospedeiros naturais, bem como o combate ao inseto vetor através de procedimentos culturais, biológicos e químicos, sendo este último o mais utilizado pelos agricultores. Todavia a resistência genética é o método mais eficiente e econômico de controle de vírus e deve ser utilizada sempre que disponível (PIO-RIBEIRO; FILHO, 1997; FAJARDO; NICKE, 2019).

Pesquisas sobre a base genética da resistência ao CPSMV em genótipos de feijão-caupi, têm indicado que a mesma é herdada como uma característica monogênica recessiva (ASSUNÇÃO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2013). Essa resistência resulta da incapacidade do patógeno de infectar o

hospedeiro devido à falta de compatibilidade entre os fatores codificados pelo patógeno e as proteínas do hospedeiro com as quais eles precisam interagir para estabelecer uma infecção. Sucintamente, é a falta de reconhecimento do patógeno como sua hospedeira, estabelecendo um quadro de imunidade. Essa resistência é descrita como resistência passiva em decorrência de nenhuma atividade ser requerida pela planta (MOFFETT, 2009; TRUNIGER; ARANDA, 2009; SCHMITT-KEICHINGER, 2019).

A resistência recessiva é relatada principalmente para vírus da família *Potyviridae*, onde sabe-se que a incompatibilidade ocorre pela ausência de ligação entre fatores de tradução eucariótica (eIFs) e a proteína viral VPg (virus protein, genome linked). Entretanto, não se conhecem o(s) fator(es) de tradução do feijão-caupi que a VPg do CPSMV possa interagir. Acredita-se que assim como os potyvírus, a VPg dos comovírus interaja com o eIF4E. Os comovírus também possuem cauda poli-A nas extremidades 3', sugerindo que essa interação pode ser um recurso geral dos vírus que possuem VPg (TRUNIGER; ARANDA, 2009; JIANG; LALIBERTÉ, 2011; SANFAÇON, 2015; SCHMITT-KEICHINGER, 2019). Assim, conhecer o fator de tradução de feijão-caupi que possa estar associado a resistência contra o CPSMV contribuirá na identificação e obtenção de genótipos resistentes.

Além disso, há apenas uma sequência nucleotídica do genoma completo do CPSMV depositado em bancos de dados genéticos (CHEN; BRUENING, 1992a,b). Não há isolado brasileiro do CPSMV completamente sequenciado. Existem apenas sequências parciais (SOUTO *et al.*, 2002; CAMARÇO *et al.*, 2009; BESERRA JR. *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2012).

Sabe-se que o conhecimento das características moleculares e da variabilidade genética de patógenos fornecem subsídios aos programas de melhoramento, visando obter genótipos de plantas resistentes. Todavia, programas de melhoramento do feijão-caupi frequentemente não levam em consideração a variabilidade genética de vírus que infectam a cultura. Dessa forma, os genótipos resistentes que vem sendo obtidos para algumas espécies de vírus provém de retrocruzamentos (ASSUNÇÃO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Este estudo contribuirá para a geração de informações sobre a sequência do genoma de um isolado brasileiro do CPSMV, bem como das sequências nucleotídicas e proteicas do fator de iniciação de tradução eIF4E de genótipos de feijão-caupi que possam estar relacionados com a resistência ou suscetibilidade ao CPSMV.

2. Objetivos

Obter a sequência completa do genoma do CPSMV, bem como correlacionar padrões de polimorfismos das sequências nucleotídicas e proteicas do fator de iniciação da tradução eIF4E de genótipos de feijão-caupi resistentes e suscetíveis ao CPSMV.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Feijão-caupi: características gerais

O feijão-caupi é uma, dicotiledônea, autógama e anual, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolina (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Essa planta apresenta uma série de nomes comuns que variam entre as regiões como: feijão macassar ou feijão-de-corda no Nordeste; feijão-de-praia, feijão-da-colônia, feijão-de-estrada, na região Norte; feijão miúdo, na região Sul; e feijão-fradinho nos estados da Bahia, Sergipe e Rio de Janeiro (TEIXEIRA *et al.*, 1988; FREIRE FILHO *et al.*, 2005; FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

O feijão-caupi foi domesticado na região oeste do continente africano, mais precisamente na Nigéria, considerada centro primário de diversidade da espécie (D'ANDREA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2019), de onde foi disseminado por todos os continentes e atualmente é amplamente cultivado em muitas partes da Ásia, Europa, EUA e América Central e do Sul (BOUKAR *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2019). No Brasil, o feijão-caupi foi introduzido no século XVI pelos colonizadores portugueses, provavelmente pelo estado da Bahia, passando posteriormente a ser cultivado em todo o país (FREIRE FILHO *et al.*, 2005; FREIRE FILHO *et al.*, 2011). As características edafoclimáticas distintas (quente/úmida na região Norte e quente/seca na região Nordeste) favoreceram seu cultivo durante todo o ano (BOUKAR *et al.*, 2018; SALVADOR, 2019).

O destaque dessa cultura é justificado pelo seu baixo custo de produção, alto valor nutritivo, ciclo curto de produção e, principalmente, sua elevada adaptabilidade a condições edafoclimáticas adversas, capaz de produzir em ambientes sob condições de déficit hídrico (precipitação mínima anual de 300 mm), e em solos de baixa fertilidade e climas quentes (ANDRADE JR, 2002; BEZERRA *et al.*, 2010; LOCATELLI *et al.*, 2014; BOUKAR *et al.*, 2018). O grão do feijão-caupi é apontado pela FAO (Food and Agriculture Organization) como uma das melhores alternativas para o aumento de oferta de proteína derivada de plantas (PHILLIPS *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2019).

No Brasil, o feijão-caupi é comercializado em formas de grão seco, vagens verdes, grãos verdes (feijão-verde) e sementes (FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Há também iniciativas para o processamento industrial do feijão-caupi na produção de farinha e produtos pré-cozidos e congelados. Essa planta também pode ser utilizada

para forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal, adubação verde e proteção do solo (DUTRA; TEÓFILO, 2007; ABREU *et al.*, 2012).

Em 2019, a produção de feijão-caupi no Brasil foi de aproximadamente 640,9 mil toneladas (t), em uma área de cerca de 1,3 milhões de hectares (ha), sendo a região Nordeste responsável por 402,8 mil t. Entretanto, a produtividade média é baixa, apenas 476 kg/ha, equivalente a aproximadamente 1/4 da produtividade dos demais feijões cultivados no país (CONAB, 2020), não refletindo o potencial genético das cultivares melhoradas. Já foram obtidas, em condições experimentais, produtividades de grãos secos acima de 3 t/ha (MENDES *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020).

A baixa produção reflete principalmente a forma de cultivo, feita predominantemente por pequenos agricultores sob exploração de subsistência, sem adoção de tecnologia e de práticas culturais adequadas, como utilização de genótipos recomendados aos ambientes de cultivo, ajustes nos sistemas de produção como determinação do tempo de plantio, correção da fertilidade do solo, densidade da planta, além do controle de pragas e doenças, particularmente as viroses contribuem para baixa produtividade da cultura na região Nordeste brasileira (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2020).

A região Centro-Oeste, principalmente o estado de Mato Grosso, apresenta desde 2006, uma crescente expansão na produção em larga escala do feijão-caupi, provinda principalmente de médios e grandes produtores que praticam agricultura tecnificada. Essa expansão se deve a incorporação do feijão-caupi aos arranjos produtivos de soja, arroz e principalmente milho, cujo plantio ocorre em áreas patronais que ficariam ociosas após o período ideal de semeadura (FREIRE FILHO *et al.*, 2011; DELMONDES *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2018). Como reflexo, o feijão-caupi apresenta nessa região altas taxas de produtividade quando comparado às demais regiões produtoras, com média de 1141 kg/ha e com produção de 151,6 mil t. (CONAB, 2020).

3.2 Cowpea severe mosaic virus

O CPSMV, vírus causador do mosaico severo do feijão-caupi, é o principal patógeno viral da cultura. Sua ocorrência foi relatada pela primeira vez no Brasil por Oliveira (1947) no estado do Rio Grande do Sul. Desde então, surgiram relatos desse vírus em quase todo o território nacional, infectando naturalmente 18 espécies de leguminosas, incluindo feijões e crotalárias (FREIRE FILHO *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2005).

O CPSMV possui genoma bipartido constituído de duas moléculas de RNA de fita simples de sentido positivo, encapsidadas em moléculas distintas, ambas necessárias para que ocorra a infecção viral. Cada RNA é encapsidado por duas proteínas do capsídeo de forma icosaédrica, com aproximadamente 28 nm de diâmetro (THOMPSON *et al.*, 2017). Este vírus é composto por três componentes, o componente B contém o RNA1, que codifica proteínas envolvidas com a replicação, enquanto o componente M contém o RNA2, que codifica proteínas do capsídeo e proteínas envolvidas com o movimento célula a célula e à longa distância. O CPSMV apresenta ainda uma terceira partícula, o componente T, desprovido de material genético (Figura 1). O seu genoma possui 9689 nucleotídeos (nt), sendo o RNA1 constituído de 5.957 nt e o RNA2 com 3.732 nt (CHEN; BRUENING, 1992a,b).

A replicação do CPSMV segue o mesmo padrão de outros vírus de RNA de sentido positivo. Após a inoculação por intermédio de um vetor, o genoma viral (vRNA) é dissociado do capsídeo e liberado no citoplasma, o vRNA é traduzido nas diferentes proteínas virais, incluindo a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), responsável pela cópia do RNA viral (+) em uma fita complementar (-). Concomitantemente, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) utiliza a fita complementar para a geração de inúmeras cópias (+) que são traduzidos, replicados ou montados em vírions que podem se espalhar por toda a planta e / ou serem transmitidos para novos hospedeiros (LALIBERTE; SANFAÇON, 2010).

O CPSMV, assim como outras espécies das famílias *Secoviridae*, *Potyviridae* e *Luteoviridae*, e do gênero *Sobemovirus*, possuem a proteína VPg ligada às extremidades 5' de suas fitas de RNA, e uma cauda poli-A ligada às extremidades 3'. A VPg é uma proteína intrinsecamente desordenada, não possuindo uma estrutura tridimensional fixa ou ordenada, evidenciando a sua diversidade funcional (TRUNIGER; ARANDA, 2009; JIANG; LALIBERTÉ, 2011; SANFAÇON, 2015;

SCHMITT-KEICHINGER, 2019). Essas características se aplicam tanto a VPgs maiores, como dos potyvírus (20-22 kDa) (JIANG; LALIBERTÉ, 2011), quanto para VPgs menores, como dos secovírus (2-4 kDa) (THOMPSON *et al.*, 2017), fazendo da VPg uma proteína central, capaz de ligar-se a várias proteínas de origem viral ou do hospedeiro.

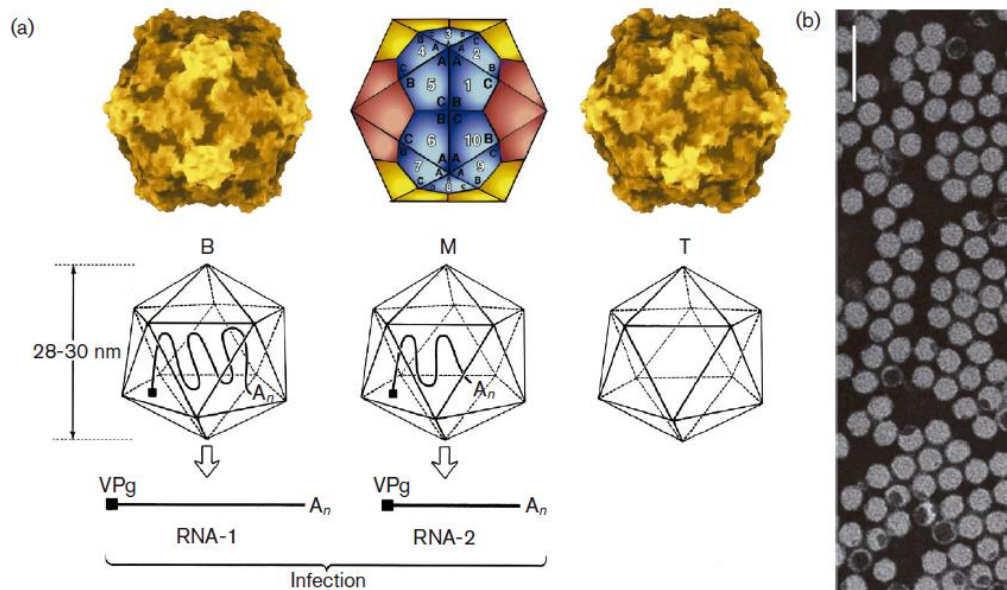


Figura 1. Estrutura e organização de vírion. **(a)** Superior: renderização molecular da partícula do cowpea severe mosaic virus (CPSMV). Abaixo: diagrama dos três tipos de partículas de *Comovirus* com o componente B contendo uma molécula de RNA-1, o componente M contendo uma molécula de RNA-2 e o componente T vazio. **(b)** Microscopia eletrônica de contraste negativa de partículas do CPSMV. A barra representa 100 nm. Fonte: THOMPSON *et al.* (2017).

A VPg é uma proteína essencial para que ocorra a infecção viral no hospedeiro, e é produzida pela clivagem proteolítica de uma poliproteína traduzida a partir do RNA genômico do vírus. A VPg recruta a maquinaria de tradução de células e interage com várias outras proteínas do vírus e do hospedeiro (TRUNIGER; ARANDA, 2009; JIANG; LALIBERTÉ, 2011; BASTET *et al.*, 2017). Quando encontra-se ligada à porção 5' do RNA viral, permite sua interação com os ribossomos da célula vegetal, ou seja, exercendo função análoga ao Cap 5' (resíduo 7-metilguanosina), dando início a síntese das proteínas virais, além de exercer o papel de iniciador (*primer*), fornecendo um grupo hidroxílico livre, podendo ser estendido pela RdRp (JIANG; LALIBERTÉ, 2011; NAGY; POGANY, 2012; BASTET *et al.*, 2017; SAHA; MAKINEN, 2020).

O CPSMV possui um mecanismo que o protege das ribonucleases da célula, consistindo em remodelar o retículo endoplasmático (ER), formando invaginações de

membrana chamada de VRC (do inglês, *Viral Replication Complex*), dando origem a vesículas que protegem o genoma viral das ribonucleases da planta e da degradação mediada por iRNA, permitindo a continuidade da sua replicação. Por fim, a VPg controla o acúmulo de partículas virais e movimento do vírus via floema, além de ser translocada para o núcleo da célula hospedeira (CARETTE *et al.*, 2000; NAGY; POGANY, 2012; SHEN *et al.*, 2020).

Este patógeno destaca-se pela severidade da doença que causa, com perdas de até 85% da produção, além de influenciar na redução da qualidade dos grãos (GONÇALVES; LIMA, 1988; BOOKER *et al.*, 2005). Os sintomas causados pelo CPSMV em plantas infectadas são principalmente morfológicos, como manchas cloróticas e necróticas, mosaico severo, distorção foliar, redução da lâmina foliar, queda prematura das folhas e bolhosidade, os quais reduzem a fotossíntese e, portanto, o rendimento da planta (Figura 2). Quando as infecções são tardias, os sintomas apresentam-se apenas nos tecidos mais novos, reduzindo significativamente o desenvolvimento do hospedeiro. Quando as plantas são infectadas no início de seu desenvolvimento, os sintomas são severos, apresentando intenso nanismo, podendo, inclusive, levar à morte da planta (BOOKER *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2015).



Figura 2. Feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) var. Imponente com sintomas típicos induzidos pelo cowpea severe mosaic virus: manchas cloróticas, mosaico severo, distorção foliar, redução da lâmina foliar e bolhosidade. Fonte: Autor.

O vírus é de fácil transmissão mecânica e em condições naturais é disseminado por diversas espécies de coleópteros dos gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica*, com destaque para a espécie *Cerotoma arcuata* Olivier, popularmente conhecida como vaquinha, considerada o vetor mais importante do CPSMV no Brasil (COSTA *et al.*, 1978; LIMA *et al.*, 2005). Não há indícios que o CPSMV seja transmitido via semente de feijão-caupi, entretanto, quando infectadas, as sementes apresentam-se deformadas e/ou rajadas com baixa taxa de germinação (GONÇALVES; LIMA, 1988; PIO-RIBEIRO *et al.*, 2001).

Desde o primeiro relato da incidência do CPSMV no Brasil (OLIVEIRA, 1947), diversos trabalhos têm indicado certo grau de variabilidade entre isolados. Entretanto, a variabilidade conhecida do CPSMV se restringe às propriedades biológicas e sorológicas (LIN *et al.*, 1981a,b; LIN *et al.*, 1982; LIN *et al.*, 1984). São conhecidos quatro sorotipos de CPSMV no Brasil, os quais podem ser diferenciados, além da sorologia, também pela gama de hospedeiros (LIN *et al.*, 1981a,b; LIN *et al.*, 1982; LIN *et al.*, 1984). De acordo com Hampton *et al.* (1997) existem pelo menos nove sorotipos de CPSMV e um número desconhecido de variantes patogênicas. Contudo, poucos estudos de caracterização de isolados ao nível genético têm sido feitos no Brasil e em outros países (CHEN; BRUENING, 1992a,b; SOUTO *et al.*, 2002; CAMARÇO *et al.*, 2009). Outros trabalhos demonstraram baixa variabilidade genética a partir de sequências parciais dos genomas de isolados brasileiros de CPSMV (BESERRA JR. *et al.*, 2011; ABREU *et al.*, 2012).

O único genoma completo do CPSMV (isolado DG) disponível em bancos de dados foi obtido de um isolado norte-americano na década de 90 (CHEN; BRUENING, 1992a,b), e este apresenta 79% de identidade com a sequência nucleotídica do gene capsidial (CP) de isolados brasileiros (BESERRA JR. *et al.*, 2011), demonstrando haver elevada variabilidade genética entre os isolados brasileiros e o norte-americano.

3.3 Resistência recessiva

A resistência recessiva caracteriza-se pela inabilidade do patógeno em infectar a planta, devido à incompatibilidade entre proteínas codificadas pelo vírus com as proteínas do hospedeiro, processo necessário para que se estabeleça o estado de infecção e de replicação viral (MOFFETT, 2009; TRUNIGER; ARANDA, 2009; SCHMITT-KEICHINGER, 2019). Essa resistência é mais comum para vírus de plantas do que para outros patógenos vegetais e apresenta-se com maior frequência, cerca de 40%, em membros do gênero *Potyvirus*, quando comparada a outras famílias virais (TRUNIGER; ARANDA, 2009; NICAISE, 2014; SCHMITT-KEICHINGER, 2019), nas quais a resistência parece ser predominantemente governada por caracteres dominantes monogênicos (TRUNIGER; ARANDA, 2009; REVERS; NICAISE, 2014). No Brasil, a resistência do feijão-caupi ao CPSMV tem sido demonstrada como heranças recessivas monogênicas (ASSUNÇÃO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2013).

Devido ao tamanho limitado do genoma viral, os vírus necessitam recrutar proteínas do hospedeiro para completar o ciclo de replicação e, também, para escapar das defesas da planta. Os fatores de iniciação da tradução eucarióticas (eIF) são proteínas do hospedeiro importantes para realizar a ligação do RNA viral aos ribossomos. Os eIFs são os principais genes envolvidos na resistência recessiva em plantas contra vírus (NICAISE, 2014; SANFAÇON, 2015; HASHIMOTO *et al.*, 2016; SCHMITT-KEICHINGER, 2019). Existem diversos tipos de eIFs com múltiplas funções, entretanto o fator de iniciação eIF4E destaca-se por atuar no reconhecimento e na ligação ao Cap ou capacete (resíduo 7-metilguanosina) presente na extremidade 5' dos mRNA maduros. Tal evento é essencial para que ocorra o processo de formação de complexos de iniciação da tradução na maioria dos mRNAs eucarióticos. Essa interação está envolvida com a resistência herdada recessivamente contra vários potyvírus (TRUNIGER; ARANDA, 2009; JIANG; LALIBERTÉ, 2011; SANFAÇON, 2015; SCHMITT-KEICHINGER, 2019; SAHA; MAKINEN, 2020).

O complexo proteico conhecido como eIF4F é resultado de uma múltipla interação proteica, composta pelo: Fator eIF4G, uma proteína que interage com vários outros fatores de iniciação, incluindo a eIF4E; a PABP (Poly(A)-binding protein), uma proteína que liga-se a cauda poli-A presente na região 3' do mRNA; a eIF4A, uma

helicase DEAD-box que desenrola estruturas secundárias; e eIF3, um complexo de múltiplas subunidades que se liga ao ribossomo 40S. Essa múltipla interação resulta na circularização do mRNA, e na posterior ligação da subunidade ribossômica 40S, servindo como verificação de controle de qualidade antes da tradução e, conseqüentemente, promovendo a tradução do mRNA (Figura 3) (ROBAGLIA; CARANTA, 2006; SANFAÇON, 2015; SCHMITT-KEICHINGER, 2019; SAHA; MAKINEN, 2020).

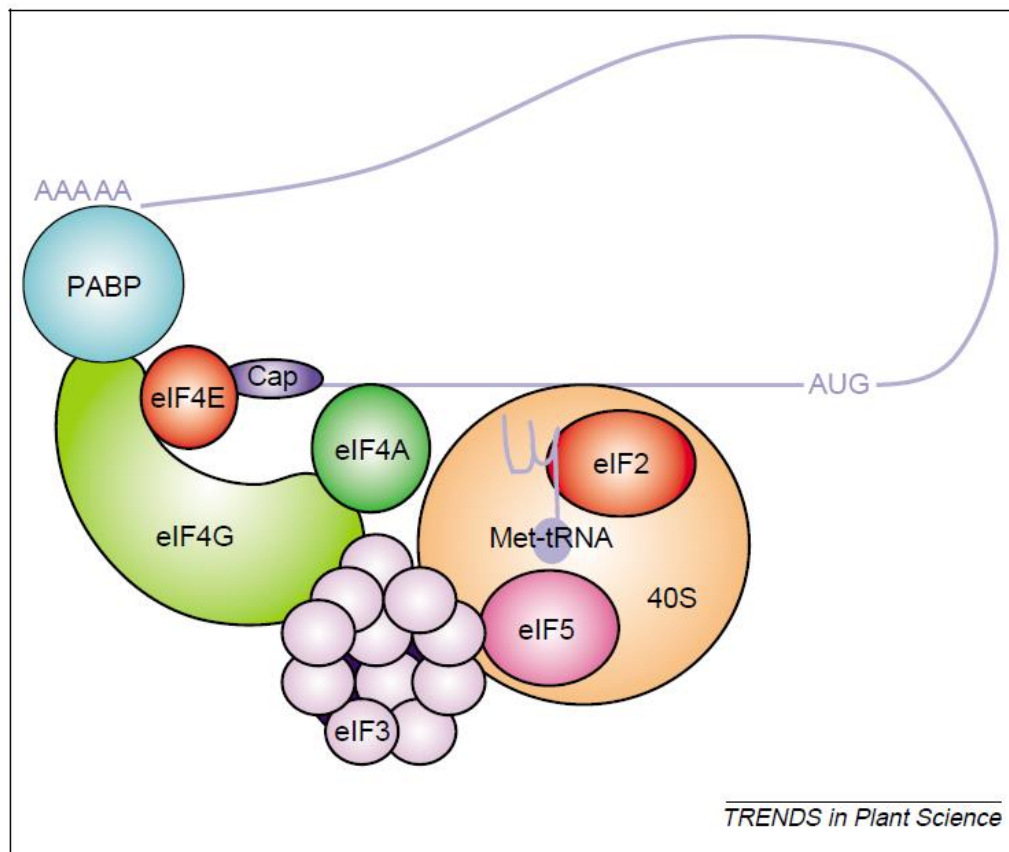


Figura 3. O complexo de iniciação da tradução eucariótica. Diagrama simplificado do início da tradução. Os principais fatores de iniciação são mostrados, bem como as interações bem caracterizadas com os componentes virais. O eIF3 é mostrado como um complexo de subunidades. Fonte: ROBAGLIA; CARANTA (2006).

A proteína VPg, ligada à região 5' do RNA viral, é análoga ao Cap 5' do RNA maduro e se liga à eIF4E mais rapidamente do que ao Cap (SANFAÇON, 2015; HASHIMOTO et al., 2016; SCHMITT-KEICHINGER, 2019; SAHA; MAKINEN, 2020). Dessa forma, a VPg se liga à região C-terminal do eIF4E que, além da importância demonstrada para a tradução viral, pode estar envolvida em outras funções como regulação negativa da expressão do gene hospedeiro, na qual a VPg inibe a tradução de mRNAs celulares e estimula a tradução do RNA viral; replicação do vírus, em que

há um recrutamento dos fatores de tradução para VRCs, interagindo com sequências que atuam em RNAs virais ou com proteínas virais como RdRp, VPg, PABP e a DEAD-box helicase; e o movimento célula a célula e a disseminação sistêmica (SANFAÇON, 2015; BASTET et al., 2017).

A resistência de genótipos de feijão-caupi possivelmente está relacionada à incapacidade da VPg de se ligar ao eIF4E. Essa incapacidade é resultante de mutações na sequência do eIF4E que afetam um único ou alguns aminoácidos expostos na superfície da proteína, podendo ou não ser domínio de ligação do Cap 5' (SANFAÇON, 2015; HASHIMOTO *et al.*, 2016; SCHMITT-KEICHINGER, 2019). Essa mutação deve ocorrer de maneira que confira resistência viral sem efeitos adversos no crescimento das plantas, uma vez que mutações *knockout* de eIF4E resultam em um fenótipo embrião-letal (HASHIMOTO *et al.*, 2016). Por fim, tais mutações nem sempre conferem resistência a todos os vírus de plantas que usufruam desse mecanismo de infecção, devido à redundância funcional parcial entre as isoformas eIF4E, e a variabilidade de VPGs encontradas na natureza (SANFAÇON, 2015).

4. Material e Métodos

4.1 Origem e manutenção do isolado viral

O isolado CPSMV THE_18-01 caracterizado neste estudo foi obtido de planta de feijão-caupi com sintomas de mosaico severo e bolhosidades, coletada no município de Teresina, Piauí, durante o primeiro semestre de 2018. O isolado foi identificado por RT-PCR com oligonucleotídeos degenerados para o gênero *Comovirus* (BRIOSO *et al.*, 1996) e posteriormente sequenciado em ambas as direções na empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) (dados não mostrados). O isolado foi mantido em plantas de feijão-caupi var. Imponente (suscetível ao CPSMV) mantidas em gaiola antiafídeo e na forma de material vegetal dessecado a -20 °C. As sementes de feijão-caupi (Tabela 1) foram cedidas pela Embrapa Meio-Norte (Teresina, Piauí) e mantidas em refrigerador à temperatura de 8 °C.

Tabela 1. Resistência expressa pelo material vegetal ao cowpea severe mosaic virus.

Genótipo	Identificação	Resistência	Referência
Patativa	RV 2	Resistente	(BARROS <i>et al.</i> , 2013)
TE97-309G-9	RV 3	Resistente	(BARROS <i>et al.</i> , 2013)
TVu382	RV 5	Resistente	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2012)
BRS-Tracuateua	SV 2	Suscetível	(BARROS <i>et al.</i> , 2013)
MNC05-828C-2-1-1	SV 3	Suscetível	(LEÃO <i>et al.</i> , 2016)
Imponente	Controle	Suscetível	(SILVA, 2017)

4.2 Cultivo de plantas e inoculação mecânica

As sementes de feijão-caupi foram tratadas com hipoclorito de sódio (0,05% de cloro ativo) por 1 min e, em seguida, submersas em etanol 70% por 1 min e lavadas com água destilada por mais 1 min. As sementes foram semeadas em substrato Basaplant® em bandejas de poliestireno expandido e, após sete dias, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 2,8 L contendo uma mistura de solo e substrato Basaplant® na proporção de 2:1, previamente autoclavado duas vezes (121 °C, 9.8 x 10⁴ Pa, 60 min). As plântulas transplantadas permaneceram em gaiolas antiafídeos em condições de casa de vegetação, foram irrigadas diariamente, no início

da manhã ou fim da tarde e pulverizadas a cada 15 dias com o inseticida Decis 25 EC® visando evitar infecções com outros vírus transmitidos por insetos vetores.

Aos 10 dias pós-semeadura, as plantas foram inoculadas no primeiro par de folhas verdadeiras com extrato vegetal tamponado (tampão fosfato de potássio 0,02M pH 7,0) contendo o isolado CPSMV THE_18-01, com auxílio do abrasivo carborundum e em seguida lavadas em água corrente.

4.3 Sequenciamento do genoma do CPSMV

4.3.1 Purificação de RNA total

Aos vinte dias após a inoculação foram coletadas amostras foliares que exibiam sintomas de mosaico severo, para a purificação do RNA total e posterior sequenciamento. O RNA total foi purificado utilizando o kit RNeasy Plant Mini® (Hilden, DE), de acordo com as recomendações da fabricante. Cerca de 100 mg de tecido foliar foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubo de microcentrifuga de 2 mL, livre de RNase e resfriado com nitrogênio líquido. Após a adição de 450 µL de tampão RLT o microtubo foi agitado em vórtex e incubado por 3 min a 56 °C. A amostra foi transferida para coluna de rotação QIAshredder, centrifugada a 21.000 g por 2 min, e o sobrenadante resultante foi transferido para novo microtubo. Em seguida foi adicionado à amostra 0,5 volume de etanol 100% e em seguida homogeneizado. A amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, foi transferida para coluna de rotação RNeasy e centrifugada a 21.000 g por 15 s. Após o descarte do fluxo foi adicionado 700 µL de tampão RW1 à coluna para lavagem e, posteriormente centrifugada a 21.000 g por 15 s. Foram adicionados 500 µL de tampão RPE à coluna de rotação e em seguida centrifugada a 21.000 g por 15 s. Após o descarte do fluxo, adicionou-se novamente 500 µL de tampão RPE à coluna de rotação e a amostra foi centrifugada a 21.000 g por 2 min.

4.3.2 Sequenciamento de DNA e análise filogenética

Cinco µg do RNA viral obtido na etapa anterior foram enviadas à Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) para síntese do cDNA usando oligonucleotídeos hexâmeros e sequenciamento na plataforma NovaSeq 6000, visando obtenção da sequência nucleotídica completa do genoma viral.

Os *reads* obtidas foram avaliadas pelo software FastQ (WINGETT; ANDREWS, 2018), posteriormente trimadas para remover *reads* de baixa qualidade (Phred ≥ 30) usando o software Trimmomatic (BOLGER *et al.*, 2014) e, em seguida foi utilizado o programa Trinity para a obtenção de *contigs*. Os *contigs* virais foram identificados através do algoritmo BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o banco de dados composto por toda a sequência do genoma viral presente no National Center for Biotechnology Information (NCBI). O resultado total da análise BLASTx foi filtrado para Identidade $\geq 40\%$, Cobertura $\geq 40\%$ e E-value $\leq 10^{-10}$ (GRABHERR *et al.*, 2011).

Para obter as sequências 5' e 3' não traduzíveis dos RNA1 e RNA2, oligonucleotídeos GSP1 (5'-CCATAGGACAGTGTCAGTAA-3') e GSP2 (5'-CGGTGCCTCTTCTCCTTAAT-3') específicos ao RNA1, e os oligonucleotídeos GSP1 (5'-GTCTAACCTTTTCCACAGTT-3') e GSP2 (5'-GGATGGAAGCGAAACAAAGA-3') específicos ao RNA2, foram utilizados em reações de amplificação, com o kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (ThermoScientific®), de acordo com as instruções do fabricante.

O oligonucleotídeo Oligo(dT)₁₆ juntamente com fw-RNA1 (5'-GCTCAGCACAACCTATACAA-3') específico ao RNA1, e com fw-RNA2 (5'-CTCATCAACGAAGGCAGTT-3') específico ao RNA2 foram utilizados em reações de amplificação, com o kit "3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (ThermoScientific®), de acordo com as instruções do fabricante.

A sequência obtida foi comparada com demais sequências depositadas no Genbank por meio da ferramenta BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa MEGA v. 8.0 (www.megasoftware.net) de acordo com o método da máxima parcimônia (KUMAR *et al.*, 2018). O comprimento dos ramos foi indicado por escala na base da árvore, bem como os valores de *bootstrap* (1000 repetições).

Comparações entre as sequências nucleotídicas obtidas e sequências de aminoácidos deduzidas foram feitas com o isolado CPSMV DG, o único genoma completamente sequenciado do CPSMV, por meio do software DNAMAN versão 4.0 (Lynnon Biosoft), usando a opção alinhamento duplo com os seguintes parâmetros: K-tuple = 2, Gap penalty = 7, Gap open = 10, Gap extension = 5. A massa molecular das proteínas deduzidas foi estimada com o uso da ferramenta Protein Molecular Weight (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html).

4.4 Estudos de resistência recessiva por meio de análise de sequências do fator de iniciação de tradução eIF4E

4.4.1 Condução experimental

Foram utilizados cinco genótipos para a condução desse experimento, três genótipos resistentes (Patativa, TE97-309G-9 e TVu382) e dois suscetíveis (BRS-Tracuateua e MNC05-828C-2-1-1). Foram cultivadas dez plantas por genótipo, das quais duas compreenderam a testemunha (plantas não inoculadas), enquanto as demais foram inoculadas com o CPSMV (como descrito no item 4.2). Todas as plantas permaneceram em gaiolas com tela antiafídeo durante todo o período do experimento (20 dias), foram irrigadas diariamente, no início da manhã ou fim da tarde e foram pulverizadas a cada 15 dias com o inseticida Decis 25 EC®.

4.4.2 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene eIF4E de feijão-caupi foram os mesmos utilizados por MAGALHÃES (2011), os quais geram um amplicon de 750 pb. Os oligonucleotídeos específicos para o CPSMV foram construídos com a ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando uma sequência parcial do genoma do CPSMV (AEZ06613), resultando em um amplicon de 980 pb que corresponde às sequências codificantes dos genes VPg, 3C-like proteinase (Pro) e a sequência parcial da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Tabela 2).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do fator de iniciação de tradução (eIF4E) e para o cowpea severe mosaic virus.

Nome	Sequência 5'→3'	TM (°C)	Fator	Fragmento (pb)
eIF4E- FW	GAACACAGAAGGAAAGAAAGG	60	eIF4E	745
eIF4E- RW	CGCTATACTTCATATCACG	60	eIF4E	
CPSMV- F	CATGGCAGATGCTGGAAACG	52	VPg; Pro; RdRp	980
CPSMV- R	TGCTACTGAGAATGCTGGGC	52	VPg; Pro; RdRp	

4.4.3 Extração e purificação de RNA total

Aos vinte dias após a inoculação do isolado THE_18-01 fez-se a coleta de amostras foliares de cada variedade de feijão-caupi, tanto das plantas não inoculadas (testemunhas), quanto das plantas inoculadas e sintomáticas para extração do RNA total e posterior RT-PCR, com oligonucleotídeos específicos para o fator de iniciação de tradução 4E (eIF4E) e para o CPSMV (Tabela 2).

Os oligonucleotídeos CPSMV-R e CPSMV-F tem como finalidade constatar a presença ou ausência de infecção por CPSMV em plantas inoculadas e em testemunhas, enquanto os oligonucleotídeos eIF4E-FW e eIF4E-RW tem como intuito averiguar a existência ou não de polimorfismo para os genes eIF4E.

O RNA total das folhas foi extraído utilizando o reagente Quick-Zol® (Ludwing, Alvorada, Brasil). Cerca de 100 mg do tecido foliar foram macerados com auxílio de 1 mL do reagente Quick-Zol® e incubados por 5 min a temperatura de 25 °C. Em seguida transferiu-se 1 mL da amostra para microtubo livre de RNase e foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, sendo a suspensão resultante agitada por 15 seg e incubada à 25 °C por 15 min. Após centrifugação (12.000 g a 4 °C por 15 min), o RNA presente na fase aquosa (sobrenadante) foi coletado e transferido para microtubo livre de RNase, sendo, posteriormente, precipitado, após adição de 0,5 mL de etanol isopropílico P.A. Após incubação por 10 min, o microtubo foi centrifugado (12.000 g a 4 °C por 10 min), e o sobrenadante descartado. O precipitado resultante foi lavado com 1 mL de etanol 75% (v/v), sendo a lavagem seguida de centrifugação (7.500 g a 4 °C por 5 min). O precipitado contendo o RNA foi seco a temperatura ambiente (25 °C) por 30 min, e, em seguida, dissolvido em 25 µL de água ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC), e estocado a -20 °C.

4.4.4 RT-PCR

A síntese da fita de cDNA, necessária como molde para as reações de PCR, foi obtida através da utilização da transcriptase reversa GoScript® (Promega). Inicialmente, a um volume contendo cerca de 100 ng de RNA total foi adicionado 2 µL do primer Oligo(dT)₁₆, e água livre de RNase. A mistura foi incubada em termociclador (Meclab, Amplitherm, Jacareí, BR) por 5 min a 70 °C e em seguida foi incubada em gelo por 5 min. Depois foi adicionada solução consistindo em 4 µL do tampão da enzima, 1 µL de dNTP 10 nM, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL RNasin®, 1 µL DTT

(Ditiotreitol, β -mercaptoetanol) e 1 μ L da enzima transcriptase reversa (1 unidade/ μ L), perfazendo 25 μ L de volume total. As condições da RT-PCR foram: 25 °C por 5 min; 42 °C por 60 min; 70 °C por 15 min; em seguida adicionou-se 1 μ L RNase H® (Promega) e incubou-se a 37 °C por 15 min; sendo mantidos a 4 °C até quantificação e estocagem a - 20 °C.

As condições da PCR para o gene eIF4E consistiram em uma etapa inicial de desnaturação de 95 °C por 5 min e 40 ciclos posteriores, com cada ciclo contendo desnaturação a 94 °C por 20 s, anelamento a 60 °C e extensão a 72 °C por 45 s, e extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1 % em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV em transiluminador UVB (Loccus do Brasil, São Paulo, Brasil).

4.4.5 Sequenciamento, dedução da sequência de aminoácidos e averiguação da existência de polimorfismo

Os produtos das amplificações de RT-PCR obtidas na etapa anterior foram enviados à ACTgene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada, Brasil) para purificação e sequenciamento de DNA na plataforma AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, EUA).

As sequências consensos geradas após sequenciamento foram confrontadas com sequências já depositadas no Genbank, utilizando a ferramenta BLASTn. De posse dessas sequências nucleotídicas, as sequências de aminoácidos foram deduzidas utilizando a ferramenta ExPASy Translate (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Os alinhamentos para verificar possíveis polimorfismos das sequências nucleotídicas e proteicas foram realizados através da ferramenta MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

5. Resultados e Discussão

5.1 Sequenciamento do genoma do CPSMV

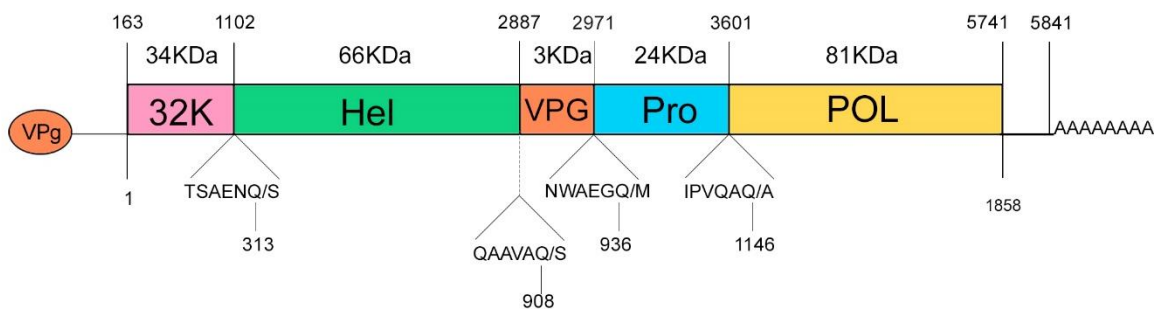
Foram obtidas sequências parciais dos segmentos 1 (98,05%) e 2 (93,32%) do genoma viral, quando comparados com o RNA 1 (NC_003545) e RNA 2 (NC_003544) do isolado CPSMV DG. O genoma do isolado CPSMV THE_18-01 consiste em dois RNAs de sentido positivo, de fita simples poliadenilados (Figura 4). O sequenciamento do RNA 1 revelou uma fase aberta de leitura (do inglês, open reading frame, ORF) de 5577 nt, excluindo a cauda poli-A 3', codificando uma poliproteína de 1858 aa, iniciando a partir do códon de início da tradução AUG, situado nos nucleotídeos 163-165, até o códon de terminação (UAA), nos nucleotídeos 5739-5741. A massa molecular (Mr) estimada da poliproteína codificada pelo RNA 1 é de 209 kDa. A poliproteína é clivada em cinco cistrons típicos dos comovírus: cofator da protease (Co-pro, 939 nt) ou 32K, RNA Helicase (Hel, 1785 nt), virus protein genome-linked (VPg, 84 nt), 3C-like proteinase (Pro, 630 nt), e RdRp (Pol, 2139 nt).

O sequenciamento do RNA 2 revelou uma ORF de 3005 nt, excluindo a cauda poli-A 3', na qual codifica uma poliproteína de 1001 aa, iniciando a partir do códon de início da tradução AUG, situado nos nucleotídeos 187-189, até o códon de terminação (UAG) nos nucleotídeos 3265-3267. Como o CPSMV DG, e demais comovírus, o CPSMV THE_18-01 possui um segundo códon AUG *in-frame* nas posições 460-462 nt (KOMATSU *et al.*, 2007). A massa molecular estimada da poliproteína codificada pelo RNA 2 pode ser de 115 ou 103 kDa, dependendo de qual sítio de início da tradução é considerado. A poliproteína é clivada em três cistrons típicos dos comovírus: movement protein (MP, 1298 nt), large capsid protein (CPL, 1122 nt) e small capsid protein (CPS, 585 nt).

As regiões 5' e 3' não traduzida, não foram completamente sequenciadas, devido ao uso de hexâmeros aleatórios para iniciar a transcrição reversa de RNA em dsDNA, resultando em depleção de leituras nas extremidades 5' e 3' (HANSEN *et al.*, 2010; CORNEY; BASTUREA, 2013). No RNA 1 a região 5' não traduzida não foi completamente sequenciada, estando ausentes cerca de 116 nt em comparação com o RNA 1 do isolado DG. A região 3' não traduzida possui 102 nt. Essa região possui um *gap* de 19 nt em comparação com a mesma região do isolado DG. No RNA 2 as regiões 5' e 3' não traduzidas não foram completamente sequenciadas, estando ausentes cerca de 249 nt em comparação com o RNA 2 do isolado CPSMV DG.

Como os demais comovírus, os processos proteolíticos da poliproteína do RNA 1 do CPSMV THE_18-01 geram cinco polipeptídeos, do terminal amino (N) ao terminal carboxi (C), sendo estes Co-pro, Hel, VPg, Pro e Pol com Mr de 34, 66, 3, 24 e 81 kDa, respectivamente. Outrossim, os processos proteolíticos da poliproteína do RNA 2 geram três polipeptídeos: MP, CPL e CPS, com Mr de 49 (ou 38), 41 e 21 kDa, respectivamente (CHEN; BRUENING, 1992a,b).

RNA 1



RNA 2

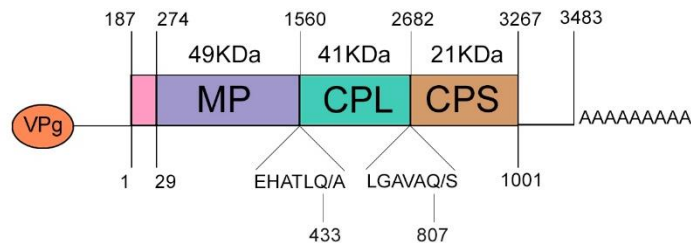


Figura 4. Organização genômica do cowpea severe mosaic virus. O genoma consiste em dois RNAs (RNA 1 e RNA 2). As caixas indicam as regiões codificantes das proteínas preditas: 32K ou cofator da protease, *Hel* RNA helicase, *VPg* virus protein genome-linked, *Pro* 3C-like proteinase, *POL* RNA-dependent RNA polymerase, *MP* movement protein, *CPL* large capsid protein, *CPS* small capsid protein. As linhas horizontais nas extremidades 5' e 3' são regiões não traduzidas. AAAAAAAAA(n) cauda poli-A. As massas moleculares estão listadas acima das regiões de cada proteína; números acima das caixas indicam as posições na sequência de nucleotídeos, enquanto os números abaixo indicam as posições na sequência de aminoácidos.

Cada proteína madura contém domínios característicos dos comovírus. Os sítios de clivagem putativos foram determinados manualmente a partir do alinhamento entre sequências de aminoácidos das poliproteínas dos RNAs 1 e 2 dos isolados de CPSMV, THE_08-01 e DG (CHEN; BRUENING, 1992a,b). Os sítios de clivagem Co-

pro/Hel (TSAENQ/S), Hel/VPg (QAAVAQ/S) e MP/CPL (EHATLQ/A) diferiram dos sítios de clivagem do CPSMV DG: VSAESQ/S, QAVVAQ/S e THATLQ/S. Os demais sítios foram idênticos entre os dois isolados: NWAEGQ/M, IPVQAQ/A e LGAVAQ/S para VPg/Pro, Pro/Pol e CPL/CPS, nesta ordem.

Igualmente aos demais comovírus, os sítios de clivagem do isolado CPSMV THE_18-01 contêm um resíduo de glutamina (Q) na posição -1 (KOMATSU *et al.*, 2007; SANFAÇON *et al.*, 2012). Ademais, os sítios de clivagem Hel/VPg e CPL/CPS apresentam uma região conservada comum para o gênero Comovirus, que possui alaninas nas posições -2 e -4 (AxAQ aonde x pode ser V,W ou A) (KOMATSU *et al.*, 2007; KHANDEKAR *et al.*, 2009).

Baixa identidade foi observada entre as sequências de nt e aa das proteínas codificadas pelos isolados THE_18-01 e DG. A região mais variável entre os dois isolados foi a região codificadora da MP, enquanto a VPg apresentou maior conservação de sequência (Tabela 3). A VPg é a mais conservada dos polipetpídeos codificados pelo RNA 1 nos comovírus apresentando uma sequência motif E/Dx₁₋₃Yx₃Nx₄₋₅R (onde X pode ser qualquer aminoácido) conservada. (MAYO; FRITSCH, 1994; KOMATSU *et al.*, 2007; KHANDEKAR *et al.*, 2009). A VPg do CPSMV THE_18-01 compartilha de 71 a 58% e de 80 a 43% de identidade com as sequências nucleotídicas e de aminoácidos, respectivamente, com os demais comovírus reconhecidos pelo ICTV e que podem ser encontrados na figura 5 (dados não mostrados).

Tabela 3. Porcentagem de identidade das sequências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) das poliproteínas e regiões codificantes individuais e regiões não codificantes (NTR) entre dois isolados de cowpea severe mosaic virus (CPSMV THE_18-01 e DG).

RNA 1	5'-NTR	Poliproteína	32K	Hel	VPg	Pro	RdRp	3'-NTR
nt (%)	*	78	78	77	83	78	78	54
aa (%)	-	91	86	91	100	93	83	-
RNA 2	5'-NTR	Poliproteína	MP	CPL	CPS	3'-NTR		
nt (%)	*	74	72	77	74	*		
aa (%)	-	83	80	88	83	-		

(*): sequência incompleta. (-): não se aplica.

Apesar das sequências dos isolados CPSMV THE_18-01 e CPSMV DG (NC_003545 e NC_003544) demonstrarem variabilidade, o isolado THE_18-01 possui identidade de aa da CPL-CPS acima de 75% e identidade de aa da Pro-Pol acima de 80%, pertencendo a espécie CPSMV, de acordo com os critérios de demarcação de espécies de comovírus do ICTV (SANFAÇON *et al.*, 2012). A análise filogenética das sequências de nucleotídeos de genomas de espécies de comovírus revelou que estes isolados apresentaram agrupamento próximo com elevado suporte (Figura 5), confirmando a identidade do isolado CPSMV THE_18-01.

Esse estudo revelou a sequência 96,2% do genoma de um isolado brasileiro do CPSMV. Esse conhecimento é importante para a adoção de estratégias mais eficientes de resistência para o feijão-caupi em território nacional, uma vez que há elevada variabilidade genética entre o isolado norte americano e o brasileiro. Uma estratégia viável que pode ser adotada é o uso de plantas transgênicas projetadas com o conceito de interferência de RNA (RNAi) para silenciar genes virais. O RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico específico a sequências nucleotídicas, portanto faz-se necessário o conhecimento do genoma viral.

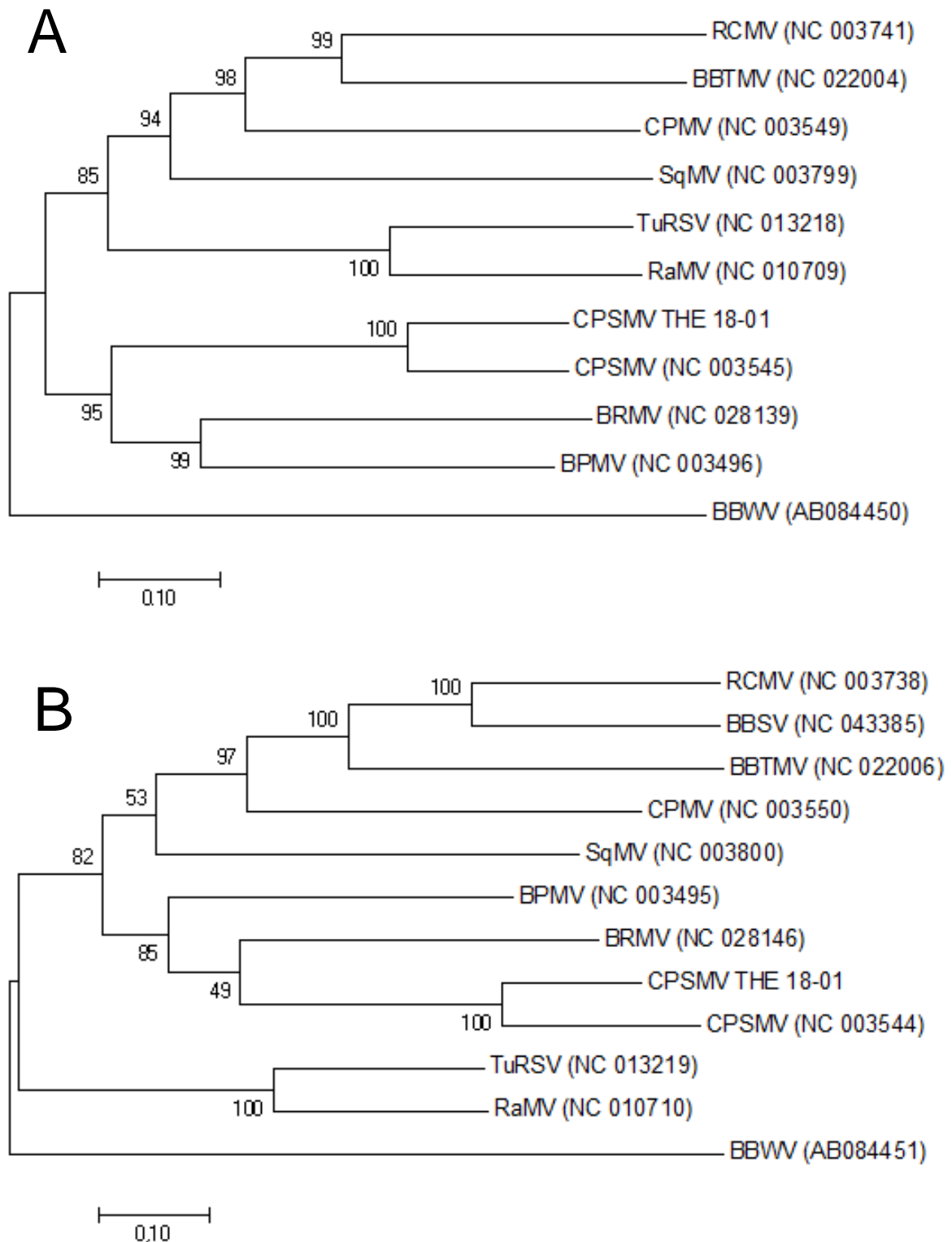


Figura 5. Árvores filogenéticas de comovírus baseada nas sequências nucleotídicas do RNA1 (a) e RNA2 (b). Os valores de *bootstrap* (1000 repetições) são mostradas ao lado dos nós. As distâncias evolutivas foram calculadas pelo método Tamura-Nei de máxima parcimônia. Broad bean wilt virus (BBWV) foi usado como *outgroup*.

5.2 Caracterização de um fator molecular possivelmente envolvido com a resistência de feijão-caupi

Os genótipos de feijão-caupi inoculados com CPSMV apresentaram variações sintomáticas previstas: três apresentaram resistência ao CPSMV (Patativa, TE97-309G-9 e TVu382) e dois apresentaram suscetibilidade (BRS-Tracuateua e MNC05-828C-2-1-1). A resistência e a suscetibilidade dos genótipos foram confirmadas por meio da expressão ou não de sintomas, que variaram desde a ausência de sintomas, até mosaico severo, distorção foliar e bolhosidade (Figura 6) e pela confirmação da presença do vírus nas plantas por RT-PCR (Figura 7).

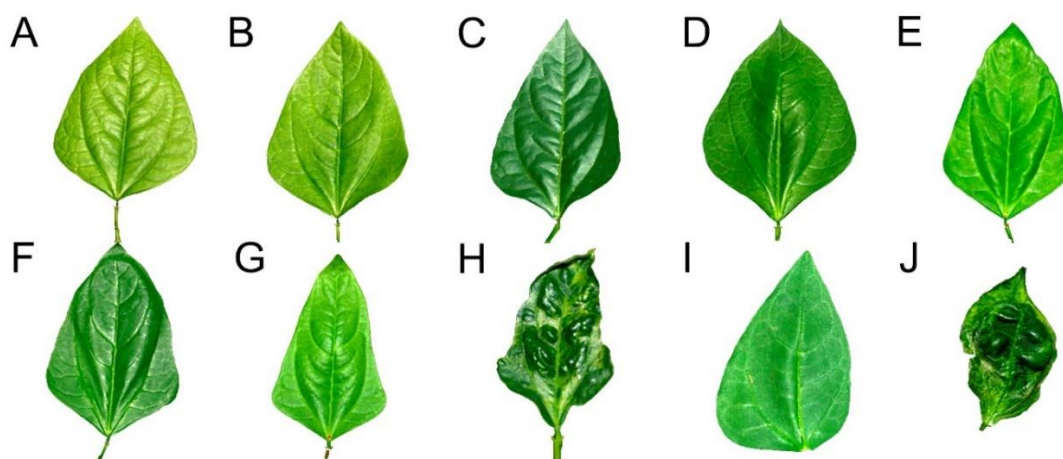


Figura 6. Sintomas de genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) inoculados com cowpea severe mosaic virus. Testemunhas: (A) Patativa; (C) TE97-309G-9; (E) TVu382; (G) BRS-Tracuateua; (I) MNC05-828C-2-1-1. Inoculadas: (B) Patativa; (D) TE97-309G-9; (F) TVu382; (H) BRS-Tracuateua; (J) MNC05-828C-2-1-1.

As sequências obtidas para o gene codificante do fator de iniciação de tradução 4E, dos genótipos de feijão-caupi, foram apenas parciais (526 bp), apresentando uma elevada identidade entre si, de 98% a 99%. O alinhamento das sequências de nucleotídeos apresentou a presença de oito polimorfismos de um único nucleotídeo, sendo duas substituições de C para G, localizadas nos nucleotídeos C124G e C147G; duas de A para G, localizada nos nucleotídeos A445G e A454G; uma de G para C no nucleotídeo G249C; duas de C para A nos nucleotídeos C145A e C148A; e uma de C para T no nucleotídeo C260T (Figura 8).

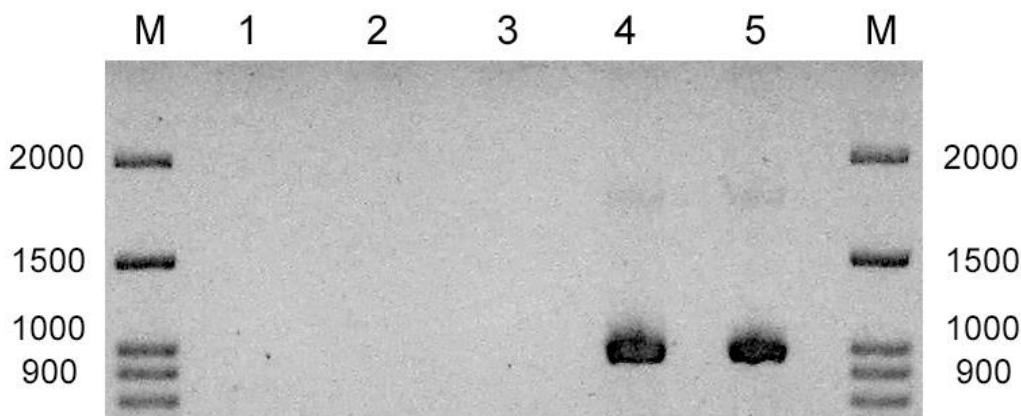


Figura 7. Padrão eletroforético em gel de agarose (1,0%) de produtos amplificados por RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para cowpea severe mosaic virus a partir de genótipos de feijão-caupi inoculados. (1) Patativa (2) TE97-309G-9 (3) TVu382 (4) BRS-Tracuateua (5) MNC05-828C-2-1-1. Os genótipos resistentes não apresentaram padrões de banda, demonstrando que não houve infecção viral, enquanto suscetíveis apresentaram amplificação esperada de um fragmento de 980pb, confirmando a infecção viral. (M) marcador molecular de comprimento (1kb DNA Ladder, em pb).

Dos oito polimorfismos observados, apenas os nucleotídeos 147 e 454 levaram a mudanças não sinônimas na proteína, na qual diferiram os genótipos resistentes dos suscetíveis (Figura 9). O resíduo de prolina (Pro49) foi aquele deduzido para os genótipos suscetíveis SV2 e SV3, enquanto o resíduo de alanina (Ala49) foi revelado para os genótipos resistentes RV2 e RV3, enquanto o RV5 apresentou no mesmo aminoácido o ácido glutâmico (Glu49). Os genótipos suscetíveis SV2 e SV3 possuem o resíduo lisina (Lys148), enquanto os genótipos resistentes RV2, RV3 e RV5 apresentaram arginina (Arg148).

Em estudos de resistência em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), Hart e Griffiths (2013) associaram uma única substituição no aminoácido 76 (A76E) à resistência a um isolado de clover yellow vein virus (CIYVV), e uma única substituição no aminoácido 111 (D111G) à resistência a um isolado de bean common mosaic necrosis virus (BCMNV). Naderpouret *al.* (2010) relacionaram a resistência ao bean common mosaic virus (BCMV) a substituição em quatro aminoácidos, 53 (N53K), 65 (D65Y), 76 (A76E) e 111 (N111G). Nota-se que há uma correlação nas mutações pontuais no aminoácido 76 em outras espécies botânicas, que também leva a resistência a potyvírus. Esse mecanismo pode ocorrer mediante a substituição de um resíduo de aminoácido alanina na posição 76 por um resíduo aspártico (em *Capsicum*

annuum e *Pisum sativum*), resíduo de prolina (em *P. sativum*) ou resíduo de ácido glutâmico (em *P. vulgaris*) (HART; GRIFFITHS, 2013).

Com base em duas sequências peptídicas do gene eIF4E de *P. vulgaris*, obtidas do trabalho de Hart e Griffiths (2013), realizou-se um alinhamento, utilizando um genótipo suscetível, Midnight (AG_I41289.1) e um genótipo resistente, IVT 7214 (AG_I41304.1), com duas sequências parciais do presente trabalho (SV3 e RV2). Esse alinhamento revelou a ausência 27 aa na região 5' e 13 aa na região 3' das sequências SV3 e RV2. Dessa forma, pode-se pressupor que as substituições de aminoácidos que ocorreram no aminoácido 49 e 148 dos isolados do presente trabalho, na verdade podem representar os aminoácidos 76 e 175, respectivamente (Figura 10). O aminoácido 76 é associada à resistência, visto que, localiza-se na região I, próxima e parcialmente sobreposta ao bolsão de ligação de tampa na superfície de eIF4E (ROBAGLIA; CARANTA, 2006; WANG; KRISHNASWAMY, 2012).

A substituição observada no aminoácido 76 em eIF4E no presente trabalho, apresenta características que a difere das encontradas nas demais espécies botânicas, nessa mesma posição. A alanina, em outras espécies, está relacionada a suscetibilidade, o que contradiz os resultados encontrados neste trabalho, visto que a alanina apresentou, na mesma posição, possível relação com mecanismos de resistência. Da mesma forma, a prolina apresentou-se como mecanismo de suscetibilidade, contrariando o que foi relatado em *P. sativum* (HART; GRIFFITHS, 2013). A diferença observada possivelmente pode ser explicada pela distância filogenética entre as espécies virais, uma vez que CPSMV e CIYV pertencerem a diferentes classes taxonômicas e apresentam tamanhos diferentes de VPgs. Além disso, as hospedeiras apresentam diferenças genéticas e fisiológicas. Ou seja, as substituições de aminoácidos podem resultar em suscetibilidade ou resistência, de acordo com a espécie viral e o genótipo do hospedeiro. Desse modo, não se pode descartar a possibilidade de a alanina ocasionar suscetibilidade em feijão comum, e resistência em feijão-caupi.

Mutações em eIF4E, envolvidas na resistência, são geralmente localizadas nas regiões I e II (ROBAGLIA; CARANTA, 2006; WANG; KRISHNASWAMY, 2012; LEBARON *et al.*, 2016). Entretanto estudos demonstraram que mutações pontuais fora dessas duas regiões também podem ocasionar esse mecanismo. Bastet *et al.* (2019) demonstraram que, a substituição da asparagina em lisina no aminoácido 176, resultou na resistência ao CIYVV. Kang *et al.* (2005) obtiveram a mesma mutação na

posição 175, que também resultou em resistência. Dessa forma, pode-se inferir que essa mutação também pode estar envolvida na resistência do feijão-caupi ao CPSMV.

Considerando que a perda de 27 aminoácidos na região 5' e que as substituições nos aminoácidos 49 e 148 representam, respectivamente, as posições 76 e 175, pode-se sugerir que a resistência está associada a mutações na sequência de eIF4E que afetam um único ou alguns aminoácidos expostos ou não na superfície da proteína, podendo ou não ser domínio de ligação do Cap 5'. Conseqüentemente, as substituições não sinônimas nos aminoácidos P76A, P76E e K175R podem estar associadas à resistência do feijão-caupi ao CPSMV.

SV2	TGAAGATGGGGAGATCCTCGAAGATGCCGACGACGCCGCTCCGCCGCCTCCAAGCCTC	60
SV3	TGAAGATGGGGAGATCCTCGAAGATGCCGACGACGCCGCTCCGCCGCCTCCAAGCCTC	60
RV2	TGAAGATGGGGAGATCCTCGAAGATGCCGACGACGCCGCTCCGCCGCCTCCAAGCCTC	60
RV3	TGAAGATGGGGAGATCCTCGAAGATGCCGACGACGCCGCTCCGCCGCCTCCAAGCCTC	60
RV5	TGAAGATGGGGAGATCCTCGAAGATGCCGACGACGCCGCTCCGCCGCCTCCAAGCCTC	60

SV2	CGTCCGCACTCCTCCGCAACCCCCACCCTCTCGAGAATTCCTGGACCTTCTGGTTCGACA	120
SV3	CGTCCGCACTCCTCCGCAACCCCCACCCTCTCGAGAATTCCTGGACCTTCTGGTTCGACA	120
RV2	CGTCCGCACTCCTCCGCAACCCCCACCCTCTCGAGAATTCCTGGACCTTCTGGTTCGACA	120
RV3	CGTCCGCACTCCTCCGCAACCCCCACCCTCTCGAGAATTCCTGGACCTTCTGGTTCGACA	120
RV5	CGTCCGCACTCCTCCGCAACCCCCACCCTCTCGAGAATTCCTGGACCTTCTGGTTCGACA	120

SV2	ACCCTTCGCGCAAGTCCAAACAAGCCCGCATGGGGCAGTTCCATCCGACCTATATACACCT	180
SV3	ACCCTTCGCGCAAGTCCAAACAAGCCCGCATGGGGCAGTTCCATCCGACCTATATACACCT	180
RV2	ACCCTTCGCGCAAGTCCAAACAAGCCCGCATGGGGCAGTTCCATCCGACCTATATACACCT	180
RV3	ACCCTTCGCGCAAGTCCAAACAAGCCCGCATGGGGCAGTTCCATCCGACCTATATACACCT	180
RV5	ACCCTTCGCGCAAGTCCAAACAAGCCCGCATGGGGCAGTTCCATCCGACCTATATACACCT	180
	*** ***** *	
SV2	TCGCCACCGTCGAAGAGTTTTGGAGCATTTACAATAACATTCACCATCCGAGCAAGTTGG	240
SV3	TCGCCACCGTCGAAGAGTTTTGGAGCATTTACAATAACATTCACCATCCGAGCAAGTTGG	240
RV2	TCGCCACCGTCGAAGAGTTTTGGAGCATTTACAATAACATTCACCATCCGAGCAAGTTGG	240
RV3	TCGCCACCGTCGAAGAGTTTTGGAGCATTTACAATAACATTCACCATCCGAGCAAGTTGG	240
RV5	TCGCCACCGTCGAAGAGTTTTGGAGCATTTACAATAACATTCACCATCCGAGCAAGTTGG	240

SV2	GTGTGGGGCGGACTTTCATGCTTCAAGTATAAGATCGAGCCCAAATGGGAGGACCCTA	300
SV3	GTGTGGGGCGGACTTTCATGCTTCAAGTATAAGATCGAGCCCAAATGGGAGGACCCTA	300
RV2	GTGTGGGGCGGACTTTCATGCTTCAAGTATAAGATCGAGCCCAAATGGGAGGACCCTA	300
RV3	GTGTGGGGCGGACTTTCATGCTTCAAGTATAAGATCGAGCCCAAATGGGAGGACCCTA	300
RV5	GTGTGGGGCGGACTTTCATGCTTCAAGTATAAGATCGAGCCCAAATGGGAGGACCCTA	300

SV2	TCTGCGCCAATGGTGGAAAATGGACTATGACTTTCCAAAGGGGAAAATCTGATACCAGTT	360
SV3	TCTGCGCCAATGGTGGAAAATGGACTATGACTTTCCAAAGGGGAAAATCTGATACCAGTT	360
RV2	TCTGCGCCAATGGTGGAAAATGGACTATGACTTTCCAAAGGGGAAAATCTGATACCAGTT	360
RV3	TCTGCGCCAATGGTGGAAAATGGACTATGACTTTCCAAAGGGGAAAATCTGATACCAGTT	360
RV5	TCTGCGCCAATGGTGGAAAATGGACTATGACTTTCCAAAGGGGAAAATCTGATACCAGTT	360

SV2	GGTTGTATACGTTGTTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCACGGAGATGAAATCTGTG	420
SV3	GGTTGTATACGTTGTTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCACGGAGATGAAATCTGTG	420
RV2	GGTTGTATACGTTGTTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCACGGAGATGAAATCTGTG	420
RV3	GGTTGTATACGTTGTTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCACGGAGATGAAATCTGTG	420
RV5	GGTTGTATACGTTGTTGGCAATGATTGGAGAACAGTTTGATCACGGAGATGAAATCTGTG	420

SV2	GAGCTGTTGTGAATGTCAGAAAATAAGCAGGATAAAATTTCTATTTGGACTAAGAATGCTT	480
SV3	GAGCTGTTGTGAATGTCAGAAAATAAGCAGGATAAAATTTCTATTTGGACTAAGAATGCTT	480
RV2	GAGCTGTTGTGAATGTCAGAAAATAAGCAGGATAAAATTTCTATTTGGACTAAGAATGCTT	480
RV3	GAGCTGTTGTGAATGTCAGAAAATAAGCAGGATAAAATTTCTATTTGGACTAAGAATGCTT	480
RV5	GAGCTGTTGTGAATGTCAGAAAATAAGCAGGATAAAATTTCTATTTGGACTAAGAATGCTT	480

Figura 8. Alinhamento das sequências nucleotídicas do fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E), de cinco genótipos de *Vigna unguiculata*. Regiões em verde correspondem aos exons 1 e 3, enquanto as regiões em amarelo correspondem aos exons 2 e 4. Regiões em azul indicam diferença de bases entre as sequências. Asterisco (*) indica conservação das bases entre as sequências.

SV2	CAAATGAAGCTGCTCAGATGAGCATTGGAAAGCAGTGGAAAGGAGTTTCTTGATTACAATG	540
SV3	CAAATGAAGCTGCTCAGATGAGCATTGGAAAGCAGTGGAAAGGAGTTTCTTGATTACAATG	540
RV2	CAAATGAAGCTGCTCAGATGAGCATTGGAAAGCAGTGGAAAGGAGTTTCTTGATTACAATG	540
RV3	CAAATGAAGCTGCTCAGATGAGCATTGGAAAGCAGTGGAAAGGAGTTTCTTGATTACAATG	540
RV5	CAAATGAAGCTGCTCAGATGAGCATTGGAAAGCAGTGGAAAGGAGTTTCTTGATTACAATG	540

SV2	AGACAATA	548
SV3	AGACAATA	548
RV2	AGACAATA	548
RV3	AGACAATA	548
RV5	AGACAATA	548

Figura 8. Continuação.

SV2	EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHPLENSWTFWFDNPSAKSKQAPWGSSIRPIYTF	60
SV3	EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHPLENSWTFWFDNPSAKSKQAPWGSSIRPIYTF	60
RV2	EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHPLENSWTFWFDNPSAKSKQAPWGSSIRPIYTF	60
RV3	EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHPLENSWTFWFDNPSAKSKQAPWGSSIRPIYTF	60
RV5	EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHPLENSWTFWFDNPSAKSKQAPWGSSIRPIYTF	60

SV2	ATVEEFWSIYNNIHHPKSLGVGADFHCFKYKIEPKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSW	120
SV3	ATVEEFWSIYNNIHHPKSLGVGADFHCFKYKIEPKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSW	120
RV2	ATVEEFWSIYNNIHHPKSLGVGADFHCFKYKIEPKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSW	120
RV3	ATVEEFWSIYNNIHHPKSLGVGADFHCFKYKIEPKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSW	120
RV5	ATVEEFWSIYNNIHHPKSLGVGADFHCFKYKIEPKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSW	120

SV2	LYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNRNRQDKISIWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNE	180
SV3	LYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNRNRQDKISIWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNE	180
RV2	LYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNRNRQDKISIWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNE	180
RV3	LYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNRNRQDKISIWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNE	180
RV5	LYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVVNRNRQDKISIWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNE	180

SV2	TI	182
SV3	TI	182
RV2	TI	182
RV3	TI	182
RV5	TI	182
	**	

Figura 9. Alinhamento das seqüências de aminoácidos do fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E), deduzidos a partir de seqüências nucleotídicas obtidas de cinco genótipos de *Vigna unguiculata*. Regiões em rosa indicam diferença de bases entre as seqüências. Asterisco (*) indica conservação das bases entre as seqüências.

SV3	-----EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHLENS	60
Midnight	MVVEDTQKSTITDEQNPSRVDNDDDDLEGEILEDADDAASAASKPPSAFLRNPHLENS	60
RV2	-----EDGEILEDADDAASAASKPPSALLRNPHLENS	60
IVT 7214	MVVEDTQKSTITDEQNPSRVDNDDDDLEGEILEDADDAASAASKPPSAFLRKPHLENS	60
SV3	WTFWFDNPSAKSKQAEWGSSIRPIYTFATVEEFWSIYNNIHHPSKLGVGADFHCFKYKIE	120
Midnight	WTFWFDNPSAKSKQAAWGSSIRPIYTFSTVEEFWSIYNNIHHPSKLGVGADFHCFKHKIE	120
RV2	WTFWFDNPSAKSKQAEWGSSIRPIYTFATVEEFWSIYNNIHHPSKLGVGADFHCFKYKIE	120
IVT 7214	WTFWYDNPSAKSKQAEWGSSIRPIYTFSTVEEFWSIYNNIHHPSKLGVGAGFHCFKHKIE	120
SV3	PKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSWLYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVNVNRNRQDKIS	180
Midnight	PKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSWLYTLLAMIGEQFDYGDEICGAVNVNRNRQDKIS	180
RV2	PKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSWLYTLLAMIGEQFDHGDEICGAVNVNRNRQDKIS	180
IVT 7214	PKWEDPICANGGKWTMTFQRGKSDTSWLYTLLAMIGEQFDYGDEICGAVNVNRNRQDKIS	180
SV3	IWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNETI-----	230
Midnight	IWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNEPIGFIFHEDAKKHERSAKNKYV	230
RV2	IWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNETI-----	230
IVT 7214	IWTKNASNEAAQMSIGKQWKEFLDYNEPIGFIFHEDAKKHERSAKNKYV	230

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos do fator de iniciação da tradução 4E (eIF4E), de dois genótipos de *Vigna unguiculata* e de um genótipo suscetível, Midnight (AG_I41289.1) e um genótipo resistente, IVT 7214 (AG_I41304.1), de *Phaseolus vulgaris*. Regiões em rosa indicam as possíveis posições 76 e 145 para os genótipos de *V. unguiculata*.

6. Conclusões

- Devido a transcrição reversa de RNA em dsDNA, que resulta em depleção de leituras nas extremidades 5' e 3', foi obtida 96,2% da sequência nucleotídica do genoma do isolado CPMSV THE_18-01 por RNA-Seq.
- Os polimorfismos observados entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos do gene eIF4E de genótipos resistentes e suscetíveis ao CPMSV, sugerem que a resistência recessiva poderia estar associada com as mutações pontuais detectadas, expostas ou não na superfície da proteína, e conseqüentemente, podem modificar a interação entre a VPg viral e a proteína eIF4E.

7. Referências Bibliográficas

ABREU, E. F.; TINOCO, M. L.; ANDRADE, E. C.; ARAGAO, F. J. Diversity among isolates of *Cowpea severe mosaic virus* infecting cowpeas in northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 3, p. 3146-3153, 2012.

ANDRADE JR, A. S. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 108 p.

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.

BARROS, G. B.; NOGUEIRA, M. S. R.; OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; VEIGA, C. F. M.; BRIOSO, P. S. T.; EIRAS, M. Obtenção de plantas de feijão-caupi resistentes ao *Cowpea severe mosaic virus* e ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus*. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 130-136, 2013.

BASTET, A.; ROBAGLIA, C.; GALLOIS, J. L. eIF4E Resistance: Natural variation should guide gene editing. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 5, p. 411-419, 2017.

BASTET, A.; ZAFIROV, D.; GIOVINAZZO, N.; GUYON-DEBAST, A.; NOGUE, F.; ROBAGLIA, C.; GALLOIS, J. L. Mimicking natural polymorphism in eIF4E by CRISPR-Cas9 base editing is associated with resistance to potyviruses. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 9, p. 1736-1750, 2019.

BESERRA JR., J. E. A.; ANDRADE, E. C.; CAMARÇO, R. F. E. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA, J. A. A. Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, p. 121-124, 2011.

BEZERRA, A. K. P.; LACERDA, C. F.; HERNANDEZ, F. F. F.; SILVA, F. B.; GHEY, H. R. Rotação cultural feijão-caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Revista Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 175-182, 2010.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

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

BOUKAR, O.; BELKO, N.; CHAMARTHI, S.; TOGOLA, A.; BATIENO, J.; OWUSU, E.; HARUNA, M.; DIALLO, S.; UMAR, M. L.; OLUFAJO, O.; FATOKUN, C.; OJIEWO, C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, 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.

CAMARÇO, R. F. E. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; ANDRADE, E. C.; LIMA, J. A. A. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 239-244, 2009.

CARDOSO, M. J.; MELO, F. B.; RIBEIRO, V. Q.; MENEZES JR, J. A. N.; BASTOS, E. A.; SANTOS, J. F.; OLIBONE, D.; OLIBONE, A. P. E.; PIVETTA, L. G. **Experimentos de densidade de plantio com variedades comerciais de feijão-caupi em ambientes do Nordeste e do Centro-Oeste brasileiro : Rendimento de grãos e componentes de produção**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2018. 29 p.

CARETTE, J. E.; STUIVER, M.; LENT, J. V.; WELLINK, J.; KAMMEN, A. V. *Cowpea mosaic virus* infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6556-6563, 2000.

CHEN, X.; BRUENING, G. Cloned DNA copies of *Cowpea severe mosaic virus* genomic RNAs: Infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 607-618, 1992a.

CHEN, X.; BRUENING, G. Nucleotide sequence and genetic map of *Cowpea severe mosaic virus* RNA 2 and comparisons with RNA 2 of other Comoviruses. **Virology**, v. 692, p. 682-692, 1992b.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Levantamento. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento 2020.

CORNEY, D.; BASTUREA, G. RNA-seq Using Next Generation Sequencing. **Materials and Methods**, v. 3, p. 26, 2013.

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

D'ANDREA, A. C.; KAHLHEBER, S.; LOGAN, A. L.; WATSON, D. J. Early domesticated cowpea (*Vigna unguiculata*) from Central Ghana. **Antiquity**, v. 81, n. 313, p. 686-698, 2007.

DELMONDES, B. L.; MENEZES JR, J. Â. N.; SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; NEVES, A. C.; PEREIRA, C. S. Identifying lines of the black-eyed cowpea having high productivity and quality commercial grain. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 5, p. 848-855, 2017.

DUTRA, A. S.; TEÓFILO, E. M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 193-197, 2007.

FAJARDO, T. V. M.; NICKE, O. **Transmissão de vírus e controle de viroses em plantas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2019.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento genético. *In*: FREIRE FILHO, F. R. L., J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informações tecnológicas, 2005. p. 27-92.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

GONÇALVES, M. F. B.; LIMA, J. A. A. Danos ocasionados por estirpes do vírus do mosaico severo do caupi, em *Vigna unguiculata*, cultivar Pitiuba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 33-40, 1988.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELLI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, May 15 2011.

GUIMARÃES, D. G.; OLIVEIRA, L. M.; GUEDES, M. O.; FERREIRA, G. F. P.; PRADO, T. R.; AMARAL, C. L. F. Desempenho da cultivar de feijão-caupi BRS Novaera sob níveis de irrigação e adubação em ambiente protegido. **Cultura Agronômica: Revista de Ciências Agronômicas**, v. 29, n. 1, p. 61-75, 2020.

HAMPTON, R. O.; THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. Viral diseases of cowpea and their control by resistance-conferring genes. *In*: SINGH, B. B.; MOHAN, R. A. J.; DASHIELL, K. E. e JACKAI, L. E. N. (Ed.). **Advances in cowpea research**. IITA, Ibadan, Nigeria: Copublication of International Institute of Tropical Agriculture (IITA) and Japan International Research Center for Agricultural Science (JIRCAS). p. 159-1975, 1997.

HANSEN, K. D.; BRENNER, S. E.; DUDOIT, S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. 131, 2010.

HART, J. P.; GRIFFITHS, P. D. A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to *Clover yellow vein virus* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 11, p. 2849-2863, 2013.

HASHIMOTO, M.; NERIYA, Y.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Recessive resistance to plant viruses: Potential resistance genes beyond translation initiation factors. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1695, 2016.

JIANG, J.; LALIBERTÉ, J.-F. The genome-linked protein VPg of plant viruses: A protein with many partners. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 5, p. 347-354, 2011.

KANG, B. C.; YEAM, I.; FRANTZ, J. D.; MURPHY, J. F.; JAHN, M. M. The pvr1 locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. **The Plant Journal**, v. 42, n. 3, p. 392-405, 2005.

KAREEM, K. T.; TAIWO, M. A. Interactions of viruses in cowpea: Effects on growth and yield parameters. **Virology Journal**, v. 4, p. 15, 2007.

KHANDEKAR, S.; HE, J.; LEISNER, S. Complete nucleotide sequence of the Toledo isolate of *Turnip ringspot virus*. **Archives of Virology**, v. 154, n. 12, p. 1917-1922, 2009.

KOMATSU, K.; HASHIMOTO, M.; MAEJIMA, K.; OZEKI, J.; KAGIWADA, S.; TAKAHASHI, S.; YAMAJI, Y.; NAMBA, S. Genome sequence of a Japanese isolate of *Radish mosaic virus*: the first complete nucleotide sequence of a crucifer-infecting comovirus. **Archives of Virology**, v. 152, n. 8, p. 1501-1506, 2007.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LALIBERTE, J. F.; SANFACON, H. Cellular remodeling during plant virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 69-91, 2010.

LEBARON, C.; ROSADO, A.; SAUVAGE, C.; GAUFFIER, C.; GERMAN-RETANA, S.; MOURY, B.; GALLOIS, J. L. A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to *Potato virus Y* in tomato albeit with a low durability. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 11, p. 3063-3072, 2016.

LIMA, J. A. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; BARBOSA, G. S.; MAIA, L. M. S., F. R. Víruses em feijoeiro caupi. *In*: GUIMARÃES, A. C. L. (Ed.). **Virologia Essencial & Víruses em Culturas Tropicais**. Fortaleza: Editora da Universidade Federal do Ceará, 2015. v. 1, p. 418-429.

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

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

LIN, M. T.; ANJOS, R. N.; SANTOS, A. A.; RIOS, G. P. Serological grouping of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from Central Brazil. **Plant Disease**, v. 71, p. 435-438, 1981a.

LIN, M. T.; ANJOS, R. N.; SANTOS, A. A.; RIOS, G. P. Serological identification of several cowpea viruses in central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 73-85, 1981b.

LIN, M. T.; HILL, J. H.; KITAJIMA, E. W. Two novel serotypes of *Cowpea severe mosaic virus*. **Plant Disease**, v. 74, p. 581-585, 1984.

LOCATELLI, V. E. R.; MEDEIROS, R. D.; SMIDERLE, O. J.; ALBUQUERQUE, J. A. A. Eficiência da irrigação e produtividade de feijão-caupi no cerrado Roraimense. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 1716-1722, 2014.

MAGALHÃES, V. G. **Prospecção bioquímica e molecular de fatores possivelmente envolvidos na defesa de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] ao vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV)**. 129 p. Dissertação (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Ceará. 2011.

MAYO, M. A.; FRITSCH, C. A possible consensus sequence for VPg of viruses in the family *Comoviridae*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 354, n. 2, p. 129-130, 1994.

MENDES, F. C.; CAVALCANTE, R. R.; COSTA, P. F.; CARLINE, J. V. G.; FERREIRA, T. A.; NASCIMENTO, I. R. Genótipos de feijão-caupi em cultivo de várzea no sul do Tocantins. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 11, n. 3, p. 11-15, 2017.

MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. *In*: LOEBENSTEIN, G. e CARR, J. (Ed.). **Natural and engineered resistance to plant viruses, Part I**, 2009. p. 1-229. (Advances in Virus Research).

- NADERPOUR, M.; LUND, O. S.; LARSEN, R.; JOHANSEN, E. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 255-263, 2010.
- NAGY, P. D.; POGANY, J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 137-149, 2012.
- NICAISE, V. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 660, 2014.
- NOGUEIRA, C. C. P.; BASTOS, E. A.; CARDOSO, M. J.; ANDRADE JR, A. S.; RIBEIRO, V. Q. Viabilidade econômica do feijão-caupi verde irrigado na microrregião de Teresina, Piauí. **Embrapa Meio-Norte**, v. 1, p. 1-10, 2019.
- OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE FILHO, F. R.; NOGUEIRA, M. S. R.; BARROS, G. B.; EIRAS, M.; RIBEIRO, V. Q.; LOPES, Â. C. A. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. **Bragantia**, v. 71, p. 59-66, 2012.
- OLIVEIRA, M. A. Contribuição ao estudo dos vírus causadores de mosaico no feijão macassar (*Vigna* spp). Instituto Agrônomo do Sul (Pelotas). Boletim Técnico 1:1-36. 1947.
- OLIVEIRA, R. L. L.; MOREIRA, A. R.; COSTA, A. V. A.; SOUZA, L. C. S.; LIMA, L. G. S.; SILVA, T. L. Modelos de determinação não destrutiva de área foliar de feijão-caupi *Vigna unguiculata* (L.). **Global Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 17-27, 2015.
- PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y.-C.; BEUCHAT, L. R.; SEFA-DEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; ENWERE, J.; KOMEY, N. S.; LIU, K.; MENSA-WILMOT, Y.; NNANNA, I. A.; OKEKE, C.; PRINYAWIWATKUL, W.; SAALIA, F. K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v. 82, n. 2-3, p. 193-213, 2003.
- PIO-RIBEIRO, G.; FILHO, F. M. A. Doenças do Caupi. In: KIMATI, H. A., L.; FILHO, A. B.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed.). **Manual de Fitopatologia v.2**. São Paulo: Afronômica CERES Ltda., 1997. v. 2, cap. 21, p. 706.
- PIO-RIBEIRO, G.; PAZ, C. D.; ANDRADE, G. P.; MIGUEL, A.-F. F. Efeito de quatro isolados do vírus do mosaico severo, CPSMV, na produção de quatro cultivares de caupi, em condições de casa de vegetação. **Cardeno Ômega**, v. 12, p. 44-45, 2001.
- REVERS, F.; NICAISE, V. Plant resistance to infection by viruses. In: **eLS**, 2014.

ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 40-45, 2006.

RODRIGUES, J. E. L. F.; RODRIGUES, F. F. F.; BOTELHO, S. M.; AZEVEDO, R.; RUSNY, J. C.; RODRIGUES, M. C. S. F.; OLIVEIRA, R. P.; MIRANDA JR., J. P.; CALZAVARA, B. B. Avaliação da produtividade de cultivares de feijão-caupi para cultivo no estado do Pará. **Embrapa Amazônia Oriental**, v. 1, p. 24, 2020.

SAHA, S.; MAKINEN, K. Insights into the functions of eIF4E-binding motif of VPg in *Potato Virus A* infection. **Viruses**, v. 12, n. 197, p. 1-22, 2020.

SALVADOR, C. A. **Feijão - Análise da conjuntura agropecuária**. SEAB: Secretaria de Abastecimento de Estado da Agricultura e Abastecimento/DERAL: Departamento de Economia Rural, 2019.

SANFAÇON, H. Plant translation factors and virus resistance. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3392-3419, 2015.

SANFAÇON, H.; IWANAMI, T.; KARASEV, A.; VAN DER VLUGT, R.; WELLINK, J.; WETZEL, T.; YOSHIKAWA, N. Family *Secoviridae*. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSYENS, E. B. e LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). **Virus Taxonomy, ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier Academic Press, 2012. p. 881-899.

SCHMITT-KEICHINGER, C. Manipulating cellular factors to combat viruses: A case study from the plant eukaryotic translation initiation factors eIF4. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 17, 2019.

SHEN, W.; SHI, Y.; DAI, Z.; WANG, A. The RNA-Dependent RNA Polymerase N1b of Potyvirus Plays Multifunctional, Contrasting Roles during Viral Infection. **Viruses**, v. 12, n. 1, 2020.

SILVA, A. C.; SANTOS, D. C.; TEIXEIRA JR, D. L.; SILVA, P. B.; SANTOS, R. C.; SIVIERO, A. Cowpea: A strategic legume species for food security and health. In: JIMENEZ-LOPEZ, J. C. e CLEMENTE, A. (Ed.). **Legume seed nutraceutical research**: IntechOpen, 2019.

SILVA, L. C. **Linhagens avançadas e cultivares de feijão-caupi resistentes ao pulgão-preto**. 82 p. Dissertação - Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2017.

SOUTO, E. R.; ALMEIDA, A. M. R.; BIANCHINI, A.; SARTORI, F.; CALVO, E. S. Análise molecular de segmento do RNA2 de *Comovirus* isolados de soja no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 525-527, 2002.

TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. *In*: ARAÚJO, J. P. P. e WATT, E. E. (Ed.). **O caupi no Brasil**. Brasília: International Institute of Tropical Agriculture/Embrapa, 1988. p. 99-136.

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

TRUNIGER, V.; ARANDA, M. A. Recessive resistance to plant viruses. *In*: LOEBENSTEIN, G. e CARR, J. P. (Ed.). **Advances in Virus Research**: Academic Press, 2009. v. 75, p. 119-231.

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 7, p. 795-803, 2012.

WINGETT, S. W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. **F1000Research**, v. 7, p. 1338, 2018.