



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**MONALIZA GOMES DE LUCENA**

**IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE UM BEGOMOVIRUS  
OCORRENDO EM ALGODÃO NA PARAÍBA**

**Campina Grande - PB.  
2013**

MONALIZA GOMES DE LUCENA

**IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE UM BEGOMOVIRUS  
OCORRENDO EM ALGODÃO NA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Dra. Lúcia Vieira Hoffmann**

**Co-orientadora: M. Sc. Valeska Silva Lucena**

Campina Grande, PB.  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

L935i Lucena, Monaliza Gomes de.  
Identificação Parcial de um Begomovirus ocorrendo em algodão na Paraíba [manuscrito] / Monaliza Gomes de Lucena. – 2013.  
34 f. : il. color.

Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.  
“Orientação: Prof. Dra. Lucia Vieira Hoffmann, Embrapa Algodão.”

1. Algodoeiro. 2. Produção de algodão. 3. Praga agrícola.  
I. Título.

CDD 21. ed. 633.51

MONALIZA GOMES DE LUCENA

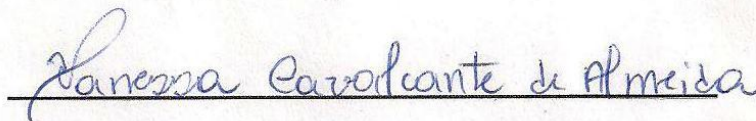
**IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE UM BEGOMOVIRUS  
OCORRENDO EM ALGODÃO NA PARAÍBA**

Aprovado em 06 de Novembro de 2013

BANCA EXAMINADORA



**Valeska Silva Lucena**  
Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO)  
Mestre em Genética e Biologia Molecular



**Vanessa Cavalcante de Almeida**  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)  
Mestre em Genética e Biologia Molecular



**Marleide Magalhaes de Andrade Lima**  
Embrapa Algodão  
Doutora em Agronomia

**Andei...**  
**Por caminhos difíceis, eu sei.**  
**Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida**  
**correr.**  
**E assim, a cada passo que der,**  
**Tentarei fazer o melhor que puder.**

**Fernando Sabino.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela presença em espírito, me dando força, coragem e saúde para enfrentar as diversidades da vida.

Aos meus queridos e amados pais, Margarida Maria e Luiz Carlos por toda confiança depositada em mim, pelo carinho, amor e pelos ensinamentos ao longo da minha vida, vocês são responsáveis por tudo que sou e eu amo vocês.

Ao meu amigo, cúmplice, namorado, noivo e marido Gustavo Reny, sempre presente em minha vida, com você tudo se torna mais fácil, amo você.

Aos meus irmãos Lindemberg Lucena, Micheline Lucena e meu sobrinho Kauê, por sempre se fazerem presentes em minha vida.

A Universidade Estadual da Paraíba e a todos os professores que me auxiliaram com seus ensinamentos.

A Embrapa pela oportunidade e suporte em infraestrutura que contribuíram para a realização deste trabalho.

A minha orientadora Dr. Lúcia Vieira Hoffmann, pela oportunidade, apoio, pelos conselhos e principalmente pela confiança em mim depositada. Sempre terei você como exemplo de profissional e ser humano.

A minha co-orientadora M. Sc. Valeska Silva Lucena por seu empenho e dedicação por fazer parte de momentos importantes da minha vida, obrigada pelas ajudas, pelas conversas e por me fazer crescer pessoalmente e profissionalmente.

A Dr. Sona Jain pelo companheirismo e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários da Embrapa e amigos que contribuíram com o desenvolvimento do trabalho e me incentivaram nas horas mais difíceis.

Aos colegas de turma pela paciência e disponibilidade, principalmente as minhas amigas Cláudia Nieves, Ana Márcia e Priscila Gouveia.

A Banca Examinadora, por aceitar o convite para as considerações na melhoria deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

E a todos que contribuíram de alguma forma para enriquecer este trabalho.

# **IDENTIFICAÇÃO PARCIAL DE UM BEGOMOVIRUS OCORRENDO EM ALGODÃO NA PARAÍBA**

**Monaliza Gomes de Lucena**

**Orientadora: Dra. Lúcia Vieira Hoffmann**

A incidência de doenças na cotonicultura tem contribuído para perdas consideráveis de produtividade. Além das perdas provocadas pela ação dos patógenos, a necessidade de implementar medidas preventivas ou curativas elevam o custo de produção. Com o advento das tecnologias moleculares, as viroses têm se tornado mais conhecidas. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de diagnose uma virose do algodoeiro, um begomovírus, por PCR. Foram analisados 24 genótipos, dos quais foi extraído DNA genômico pelos métodos CTAB e DArT. Os DNAs extraídos foram quantificados e utilizados para amplificação de sequências dos vírus através de reação de cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se oligonucleotídeos degenerados PAL1v1978 (sequência de nucleotídeos 5'GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT3') e PCRv19 (sequência de nucleotídeos 5'TGGCATWYTYGTAAATATG 3').. O DNA extraído pelo método DArT apresentou melhor integridade e pureza que os extraídos por CTAB, e entre os 24 genótipos avaliados por PCR 13 apresentaram tamanho de bandas esperado de 1500pb para begomovirose, o que sugere fortemente que os sintomas observados foram causados por begomovírus. O seqüenciamento posterior comprovou a presença deste patógeno.

Palavras-chave: Viroses; Algodoeiro; DArT.

# **PARTIAL IDENTIFICATION OF A BEGOMOVIRUS OCCURRING IN COTTON FROM PARAIBA**

**Monaliza Gomes de Lucena**

**Orientadora: Dra. Lúcia Vieira Hoffmann**

The incidence of diseases on cotton has contributed to considerable losses in productivity. In addition to the losses caused by the action of pathogens, the need to implement preventive or curative measures raise the production cost with the advent of molecular technologies, the viruses have become increasingly known. This aim of this study was to the develop of diagnosis of two cotton viruses, one begomovirus identified by PCR. For detection of begomoviruses 24 genotypes were analyzed, from which genomic DNA were extracted by the CTAB and DarT protocols. The extracted DNA was quantified and used to amplify virus sequences by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers PAL1v1978 (nucleotide sequence 5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3') and PCRv19 (nucleotide sequence 5' TGGCATWYTYGTAAATATG 3').. The DNA extracted by DarT protocol showed better integrity and purity , the diagnosis of 24 genotypes showed 13 standard DNA bands in the expected size in 1500 bp, which strongly suggests that the symptoms were caused by begomoviruses. The subsequent sequencing confirmed the presence of this pathogen.

Key words: Viruses; Cotton; DarT.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Planta de algodoeiro com sintomas da doença de begomovirus

**Figura 2:** Parte de gel de agarose (0,8%), apresentando banda de DNA em tamanho esperado em 1500 pb. DNA *ladder* 250 pb.

**Figura 3:** Parte de gel de agarose (0,8%), apresentando banda de DNA em tamanho esperado em 1500 pb. DNA *ladder* 250 pb.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BGMV: Begomovirus

CLCud : *Cotton leaf Curl disease*

CNPH: Embrapa Hortaliças

Conab: Companhia Nacional de Abastecimento

CTAB: *Cationic Hexadecyl Trimethyl ammonium bromide*

DArT: *Diversity Array Technology*

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

ICAC: *International Cotton Advisory Committee*

ng: nanograma

ORFs: presença ou ausência das regiões abertas de leitura

pb: Pares de base

PBST: tampão de lavagem

PBST: tampão conjugado

PCR: *Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase

PepGMV: *Pepper golden mosaic virus*

PepLCV: *Pepper leaf curl virus*

PHYVV: *Pepper huasteco yellow vein virus*

PIB (Produto Interno Bruto)

SiMMV: *Sida micrantha mosaic virus*

SiMoV: Sida mottle vírus

TBE: Tris Borato de EDTA

TE: Tris-EDTA

*Texas pepper virus* (TPV ou TPGV)

TYLCV: *Tomato yellow leaf curl virus*

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do SUL

VMNA: vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro

VPg: *genome-linked protein*

µL: Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Geral .....	15
2.2 Específico .....	15
<b>3. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1. A cotonicultura no Brasil .....	16
3.2. Taxonomia e etiologia do gênero begomovírus .....	17
3.3. Incidência de Begomovirus .....	18
3.4. O Begomovirus em malváceas .....	20
3.5. Característica e sintomatologia do Begomovirus .....	21
3.6. Técnicas moleculares .....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. Material Biológico .....	23
4.2. Obtenção de DNA genômico .....	23
4.2.1. Método CTAB para extração de DNA de begomovírus de folhas de algodão .....	23
4.2.2. Método Dart para extração de DNA de begomovírus de folhas de algodão .....	24
4.3. Quantificação de DNA .....	24
4.4. Reação de cadeia de polimerase (PCR) .....	25
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
5.1 Sintomas de begomovirus em plantas de algodão .....	25
5.2 Produtos de PCR em plantas com sintomas de begomovírus .....	26
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	28
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

O algodão dentre seus vários tipos de fibras, de origem natural, artificial ou sintética, destaca-se como a mais relevante matéria-prima aproveitada em toda a cadeia têxtil do Brasil, sendo um dos principais segmentos da economia do país. Segundo CONAB (2013) para o Brasil, estima-se uma área plantada de 976,6 mil hectares para a safra 2012/2013. No Nordeste houve aumento da produtividade de 3.016 para 3.801 Kg por hectares.

Apesar desse crescimento a incidência de doenças na cotonicultura tem contribuído para perdas consideráveis de produtividade, tendo aumentado de importância a cada ano no Brasil (MORELLO; FREIRE, 2012). O algodoeiro tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas para o desenvolvimento e a seleção de cultivares mais produtivas, resistentes ou tolerantes a pragas, doenças e a estresses abióticos (OLIVEIRA, 2009).

Sabe-se também que mais de cinquenta bactérias, fungos, vírus, e nematóides estão associados a doenças do algodoeiro. Tais patógenos enfraquecem a planta, reduz o seu tamanho e diminui o número de capulhos, a maturação das sementes e as fibras, o que torna essa situação um dos principais problemas para as regiões produtoras (WRIGHT et al., 2009).

As viroses como um todo, provocam alterações expressivas que fogem da normalidade no desenvolver das plantas. Registros da sintomatologia em plantas, atribuídos a vírus, datam do século XIX, no entanto, muito antes desse período, mesmo ignorando-se que o agente causal de tais anomalias se tratava de um fitopatógeno, definições, composições e estudos retratavam com lucidez os sinais induzidos por vírus (ASLAN, 2000).

Com relação ao Begomovirus, vírus do nosso estudo, este se apresenta com uma grande importância econômica em outras culturas no Brasil, como feijão, sendo uma das maiores ameaças a agricultura, transmitido por *Bemisia tabaci*, inseto hemíptero, conhecido como Mosca Branca. Outra doença de grande importância econômica para a cotonicultura brasileira e que também faz parte desse estudo é o mosaico-das-nervuras forma “Ribeirão bonito” ou Doença Azul, virose causada pelo *Cotton leafroll dwarf virus (Luteoviridae)*, transmitido pelo pulgão *Aphis gossypii*. As doenças causadas por esta são

severas em regiões tropicais da Ásia e América do Sul, sobretudo em países com disposição histórica ou com condições sazonais que aumentam o potencial de risco (ASLAM; GILANI, 2000).

Por não ter tratamento curativo, o principal método de controle é a resistência genética das plantas ao vírus (CORRÊA et al., 2005). Assim, o uso de variedades resistentes é uma das táticas de manejo (SUASSUNA et al., 2008). Os sintomas são caracterizados por nanismo severo, devido ao encurtamento dos entrenós, escurecimento foliar, rugosidade e curvatura dos bordos para baixo, resultando na diminuição de produtividade. Também ocorre a redução do número e tamanho dos capulhos produzidos e depreciação da qualidade da fibra (COSTA; CARVALHO, 1965; COSTA, 1966; ARAÚJO, 2001).

A resistência de genótipos a doença azul é avaliada através de ensaios *In Vivo* a partir da contaminação através do vetor virulífero com o material a ser testado, contudo, a grande quantidade de trabalho para realizar este tipo de inoculação torna impossível realizá-lo na escala necessária para atender à demanda do melhoramento (SUASSUNA et al., 2008).

Segundo Pupim Junior et al. (2008), esta doença possui herança simples, fenotipagens adequadas são difíceis de ser realizadas em campo e a presença de susceptibilidade em genótipos é um fator impeditivo para que estas cultivares sejam lançadas, sabe-se hoje que existe alternativas rápidas e eficientes para identificar a contaminação viral.

Uma técnica serológica muito utilizada para imunodeteção de patógenos de plantas devido à alta sensibilidade e facilidade de uso é o Elisa (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) capaz de detectar o vírus mesmo em quantidades inferiores de tecidos vegetais infectados (MILLER; MARTIN, 1988; REGENMORTEL, 1978).

Com os avanços na biologia molecular que vem disponibilizando instrumentos cada vez mais atualizados ao estudo de biologia vegetal, dar-se ênfase também nesse estudo aos métodos de amplificação de DNA baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), esta técnica é executada *in vitro* sem o uso de células, que permite a síntese de fragmentos de DNA, usando a enzima Taq DNA polimerase (BOER; BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2003).

Com o PCR verificou-se rápidos progressos nas técnicas de genética molecular que revolucionaram a prática da patologia, anatomia e análises clínicas (MALORNY et al., 2003) contribuindo também com o diagnóstico das doenças virais de plantas com maior precisão.

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a diagnose viral de um vírus do algodoeiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Realizar diagnose de virose em algodoeiro.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Descrever os sintomas de infecções virais apresentados nas plantas de algodoeiro;
- ✓ Realizar testes moleculares para diagnose de *Begomovirus* em plantas infectadas.

### 3.REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 A cotonicultura no Brasil

A cultura algodoeira (*Gossypium hirsutum* L.) se caracteriza no Brasil como uma das culturas mais tradicionais do Brasil. A cultura do algodão está presente em varias regiões do globo terrestre e são utilizadas para fins tradicionalmente conhecidos, para indústria têxtil e química.

A participação do consumo da fibra de algodão no contexto geral da produção de fios segundo dados do Conab 2013 (Companhia Nacional de Abastecimento) foi da ordem de 80%. No que faz referencia a tecelagem, 58% do fio utilizado na fabricação de tecidos são de algodão, por outro lado, no segmento de fabricação de malharia, 51,2% do fio utilizado é de algodão 48,7% de fibras artificiais e sintéticas e 0,01% de outras fibras naturais.

O destaque inicial de sua produção na região Nordeste ocorreu a partir do cultivo do algodoeiro arbóreo (*G. hirsutum* L. race marie galante Hutch). A sua consolidação nacional se deu no final do século XIX, destacando o Brasil como sendo um dos maiores produtores de fibras (FERREIRA et al., 2005).

Recentemente foi noticiado no Nordeste, um recorde na safra do algodão colorido orgânico, que começou a ser colhida no assentamento Margarida Maria Alves, em Juarez Távora, no Agreste paraibano. Em valores, a cada hectare colhido será arrecadado cerca de R\$ 5,6 mil. O processo de colheita se estende até janeiro de 2014 e os itens produzidos por meio do algodão colorido orgânico já estão sendo levados para as prateleiras de lojas de países como Alemanha, França, Estados Unidos, entre outros (PORTAL CORREIO, 2013).

Problemas relativos a pragas como bicudo e doenças acarretaram o aumento dos custos de produção que teve como consequência a expansão da área de cultivo das regiões tradicionais do Sudeste para as regiões de cerrado do Centro-Oeste, Oeste da Bahia (SANTOS et al., 2008). Os surgimentos de novas tecnologias, bem como, o desenvolvimento de novas cultivares, colaboraram para que a região Centro-Oeste liderasse na produção brasileira



de algodão, ocupando cerca de 65% de toda a área cultivada no país com destaques para os Estados do Mato Grosso e Goiás.

As perdas diretas são provocadas pela sucção de seiva da região do floema, secreção de substâncias açucaradas e amarelecimento irregular dos frutos, podendo estes ficar internamente com aspecto esponjoso ou “isoporizados”. Os danos indiretos são decorrentes da difusão de *geminivirus* às plantas, que geram amarelecimento, nanismo acentuado e enrugamento severo das folhas terminais, com diminuição marcante da produção (BROWN; BIRD 1992, BROWN 1994).

### **3.2 Taxonomia e etiologia do gênero Begomovirus**

Caracterizados pela morfologia de partículas icosaédricas geminadas e genoma composto por DNA de fita simples circular (HANLEY-BOWDOIN et al., 1999; STANLEY et al., 2005), os vírus pertencentes à família Geminiviridae abrangem os gêneros Mastrevirus, Curtovirus, Topocuvirus e Begomovirus, que recebem classificação embasada no número de elementos do genoma, tipo de inseto vetor, gama de hospedeiros e relacionamento filogenético. No que se refere ao gênero *Begomovirus* são compreendidas as espécies com dois componentes genômicos, denominados de DNA A e DNA B. São transmitidos pela mosca-branca e desde o seu conhecimento, mais de 100 espécies variadas foram relatadas (STANLEY et al., 2005).

O componente A possui genes necessários para a replicação viral e a sua encapsidação, já o componente B apresenta genes ligados à movimentação sistemática, aos hospedeiros e o desenvolvimento de sintomas (ALVES, 2008).

No que faz menção as espécies verificadas na América, estas se caracterizam por possuir genoma dividido em dois componentes de DNA, com tamanho variando entre 2,5 a 2,8 kb cada. Cada um dos elementos (DNA-A e DNA-B) é responsável por fases distintas do processo de infecção, sendo o DNA-A envolvido na replicação viral, transcrição e formação da capa protéica, e o DNA-B responsável pelo movimento (célula-a-célula e longa distância) do

vírus na planta (FARIA; ZERBINI, 2000; ROJAS et al., 2005; STANLEY et al., 2005).

De acordo com Farias et al., 2000 visivelmente, o acréscimo da incidência das viroses acarretadas por begomovirus está conexo ao aparecimento e à dispersão de um novo biótipo (biótipo B) que é transmitido através da “mosca-branca” . O biótipo B conduz os vírus mais eficientemente e oferece uma gama de hospedeiros, mais extensa que o biótipo A. Populações do biótipo B resistentes a inseticidas são mais ligeiramente seletas que no biótipo A. Esses casos impedem sobremaneira o controle das “moscas-brancas” e, conseqüentemente, das doenças causadas por Begomovirus.

Os Begomovirus têm a sua origem em países das Américas (ou Novo Mundo), bem como da Europa, Ásia e África (Hemisfério Oriental, ou Velho Mundo) (FARIA; ZERBINI, 2000). Os begomovírus do Novo Mundo são bastante diferentes dos begomovírus do Velho Mundo. Pequenos DNAs satélites de fita simples e circulares, denominados como DNA- $\beta$  com tamanho de aproximadamente 1,3 kb são relacionados a múltiplos Begomovirus monopartidos do Velho Mundo (STANLEY et al., 2005).

Esses dois componentes apresentados são fundamentais para a infecção sistêmica eficiente do vírus na planta. Os meios para estabelecimento de espécie no gênero Begomovirus abrangem alguns componentes como a presença ou ausência do componente  $\beta$ ; a organização do genoma (presença ou ausência das regiões abertas de leitura - ORFs) da planta; identidade da sequência de nucleotídeos completa do vírus; formação de pseudorecombinantes viáveis; características da proteína capsidial; hospedeiro naturais e sintomas observados (STANLEY et al., 2005).

Várias características da associação específica entre vírus e inseto vetor explicam a eficiência da transmissão do vírus ao gênero Begomovirus. Por exemplo, no caso do begomovírus Bean golden mosaic virus (BGMV) e a mosca branca demonstrou-se que a interação vírus vetor explicam características de transmissão do vírus pelo vetor, a exemplo do momento de aquisição, de inoculação, de latência, de retenção, passagem transovariana, entre outras características relacionadas à estirpe viral envolvida, à região geográfica e às condições locais (SANTOS et al., 2003).

### 3.3 Incidência de Begomovirus

No Brasil, a primeira constatação se deu no final da década de 50 (FLORES et al., 1960). Matys et al. (1975) identificaram o vírus em seu estudo, chamando-o de “mosaico dourado do tomateiro”. A partir dessas epidemias, ocorreram também mudanças significativas nos sistemas de exploração agrícola. Transmitido pela mosca branca que causa danos diretos na planta devido à sucção da seiva e pela ação toxicogênica, além da liberar secreções açucaradas que propiciam o desenvolvimento de fumagina (MORALES; ANDERSON, 2001)

A primeira observação do BGMV ocorreu na década de 1960, no estado de São Paulo-Brasil, infectando *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) e *Phaseolus lunatus* (feijão-de-lima) (MORALES; JONES, 2004). As espécies virais classificadas no gênero Begomovirus incluem alguns dos principais patógenos de plantas em regiões tropicais e subtropicais do globo (BROWN; BIRD, 1992; POLSTON; ANDERSON, 1997), ocorrendo atualmente em culturas alimentares básicas como mandioca (*Manihot esculenta*) (LEGG; THRESH, 2000), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (MORALES; ANDERSON, 2004), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (BRIDDON et al., 2001), pimentão (*Capsicum annum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) (FARIA et al., 2000).

A América Latina se destaca como a principal região afetada em termos de número total de espécies conhecidas de begomovirus. No ano 2001 foi constatado que cerca de 5 milhões de hectares de terra agricultável em 20 países latino-americanos estiveram sob ataque de mais de 30 *geminivírus* distintos (MORALES; ANDERSON, 2001).

Existe uma grande dificuldade na detecção dos Begomovirus, podemos destacar as dificuldades de transmissão de muitos desses vírus via extrato vegetal tamponado, a presença de sintomas idênticos em plantas infectadas por espécies de vírus distintos, a difícil purificação das partículas na sua forma estável, os vírions pouco imunogênicos e proteínas capsidiais antígenicamente indistintas (GILBERTSON et al., 1991).

No que faz referência a infecção por Begomovirus em pimentão foi constatada primeiramente nos Estados Unidos por Stenger et al. (1990). Tratava-se do *Texas pepper virus* (TPV ou TPGV) hoje considerado uma estirpe do *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) (FAUQUET; STANLEY, 2005). Da mesma forma, o *Serrano golden mosaic virus* (BROWN; POULOS, 1990), considerado atualmente como uma estirpe do PepGMV, foi identificado na Costa Rica em pimentas “Tabasco” e “Habanero”, por Lotrakul et al. (2000) e está largamente distribuído no sul dos Estados Unidos e México (BROWN; POULOS, 1990). No final da década de 1980, foi detectado infecção de pimentão, no norte do México, pelo *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) e pelo *Sinaloa tomato leaf curl virus* (GARZON-TIZNADO et al., 1993; IDRIS et al., 1993; STANLEY et al., 2005). O PHYVV, em 1996, foi detectado em todo território mexicano (TORRES-PACHECO et al., 1996). O *Pepper leaf curl virus* (PepLCV) também foi encontrado e caracterizado na Indonésia (TSAI et al., 2006).

No Brasil, o primeiro estudo de Begomovirus realizado na cultura de pimentão por Lima et al. (2001), que verificaram 43,8% de infecção do total de amostras da cultivar S-59 e no híbrido Tango coletados nos municípios de Curaçá (Bahia) e Petrolina (Pernambuco), no Submédio do Vale São Francisco, causando em média 20% de perda na produção.

### **3.4. O begomovírus em malváceas**

No que se refere à presença deste vírus na cultura do algodão esta doença foi registrada em 1984, no estado do Arizona, Estados Unidos provocando uma das maiores epidemias nesse local. Idris; Brown (2000) destacaram em seu estudo um isolado típico de DNA-A de Begomovirus a partir de uma planta de algodão com sintomas de deformação foliar no Sudão.

A ausência de estudos de *begomovírus* no Brasil refere-se a não procedência de perdas importantes em algodão e porque muitas vezes havia uma grande dificuldade de diagnóstico. O BGMV, só teve seus estudos intensificados nos últimos 15 anos, através da utilização de técnicas baseadas na detecção do DNA viral (MELLO, 2001).

Existe um begomovirus muito importante afetando algodão no Velho Mundo, que não existe no Brasil. Conhecida por *Cotton leaf curl disease* (CLCud), esta doença afeta inúmeras malváceas, a exemplo do algodão. Originada na Índia, foi descrita em 1985, havendo relatos desde a década de 1960 associando a um complexo de *begomovirus* com mais de um componente (BRIDDON et al., 2003).

No Brasil Costa (1954) destacou que o mosaico comum do algodão é causado pelo mesmo vírus de clorose infecciosa das malváceas. Concluiu seu estudo afirmando que a infecção de plantas de algodoeiros originava-se de insetos que se tornavam virulíferos por terem se alimentado em plantas infectadas.

Um extenso número de plantas daninhas hospedeiras de begomovirus está classificadas na família malváceas, a exemplo, do gênero *Sida*. Há ainda a propagação do Begomovirus em plantas ornamentais pertencentes à família Malvaceae, como por exemplo, o gênero *Abutilon* que apresentam sintomas característicos de clorose variegada na folhagem (PAPROTKA et al., 2010).

Torna-se evidente a presença de variadas espécies de begomovirus nos isolados do Brasil e da América Central. Diversas espécies virais, como *Sida micrantha mosaic virus* (SiMMV), *Sida mothe virus* (SiMoV), entre outras, foram associadas a doença causadora do mosaico em *Sida micrantha*, uma planta invasora, doença que era anteriormente relacionada a uma estirpe brasileira do AbMV (JOVEL et al., 2004; PAPROTKA et al., 2010).

### **3.5 Característica e sintomatologia do Begomovirus**

O gênero Begomovirus possui dois componentes genômicos, infectam dicotiledôneas e são transmitidos por mosca-branca (homóptera: Aleurodidae). Esses elementos têm cerca de 2,6 kb cada, sendo encapsidados em partículas geminadas distintas. Os sintomas de begomovirus são redução do crescimento da planta, deformação do limbo foliar, clareamento das nervuras (ARANHA et al., 2011).

São importantes exemplos de begomovirus o *Bean golden mosaic virus* (RYBICKI et al., 2000), que afeta feijão também no Brasil, sendo um importante

patógeno; e o TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) – denominação conferida ao complexo de begomovírus que infectam tomate. Considerando a transmissão de viroses por inseto em geral, existem insetos que ao adquirirem o vírus o transmitem por um período curto de tempo, ou que transmitem por longo período (conhecida como transmissão persistente), podendo o vírus replicar-se ou não no vetor. Esta relação se associa ao decréscimo na taxa de transmissão do vírus, longevidade e fecundidade do inseto. Ao receber o vírus, os insetos tornam-se capazes de inocular o vírus em plantas saudáveis, causando sintomas típicos da doença no algodão (GHANIM; CZOSNEK, 2000; KNELL; WEBBERLEY, 2004). Em viroses em geral é importante saber se existem hospedeiros alternativos, que armazenam o vírus na entressafra, e que muitas vezes os hospedeiros alternativos são plantas espontâneas ou invasoras, não cultivadas. Caso não existam hospedeiros intermediários o tempo em que o vetor armazena o vírus pode ter suma relevância, uma vez que o próprio vetor serve como um reservatório do vírus na ausência de um hospedeiro (CZOSNEK et al., 2002). No caso da transmissão do begomovírus por mosca branca, a transmissão é persistente.

### **3.6 Técnicas moleculares**

Torna-se perceptível nas últimas décadas a ocorrência de grandes avanços na biologia molecular que vem disponibilizando instrumentos cada vez mais atualizados ao estudo de biologia vegetal, colaborando, sobretudo em programas de melhoramento de plantas (BOER; BEUMER, 1999).

As técnicas de biologia molecular e a engenharia genética avançaram significativamente nos últimos anos, em especial a partir da década de 60, quando o DNA teve a sua estrutura descrita. No ano de 1985, Kary Mullis desenvolveu um modo para se amplificar um alvo genômico mediante a replicação do DNA in vitro técnica esta chamada de PCR que utiliza uma enzima termoestável e oligonucleotídeos iniciadores que são utilizados para amplificar um DNA até que se obtenham milhões de cópias da seqüência alvo (KONEMAM et al., 2001). E para diagnósticos de doenças virais constata-se

que uma das melhores técnicas é através de PCR, para um diagnóstico rápido, seguro e confiável.

No Brasil, já se concretizaram estudos tendo como meta caracterizar molecularmente isolados de geminivírus que infectam plantas cultivadas, principalmente o feijoeiro e o tomateiro (FARIA; MAXWELL, 1999; RIBEIRO et al., 1998; COTRIM et al., 2004). Os efeitos desses estudos mostram enorme variabilidade genética entre os isolados. Resultados precedentes sugerem que, a exemplo do que acontece com plantas cultivadas, a variabilidade é muito grande entre os Begomovirus que infectam plantas invasoras (AMBROZEVICIUS et al., 2002; CALLEGARIO et al., 2004).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material Biológico**

Os testes foram iniciados em 2009 na Embrapa Algodão no Laboratório de Biotecnologia. Foram coletados 24 genótipos de algodoeiro, apresentando sintomatologia patológica em mosaico das folhas associado à presença de mosca branca (*Bemisia tabaci*). Dezenove amostras foram coletadas em uma casa de Vegetação da Embrapa Algodão em Campina Grande – PB. Havia onze amostras de *Gossypium hirsutum* (TEX 2516, TX 732, TEX 1983, TEX 464, TX 267, TEX 1043, TEX 26, TEX 750, TEX 959, TEX 607 e A.R.MIRANDA 716), cinco de *G. barbadense* (MA 0429, PI 528301, AZB 837, Algodão del n° 3 e BROWN EGYPTIAN), um *G. mustelinum* (C<sub>24</sub>) e dois híbridos entre *G. mustelinum* e *G. hirsutum* (C<sub>29</sub> X ISO e MAC<sub>31</sub> X BT). Cinco amostras de *G. hirsutum* de plantas com sintomas foram coletadas em Goiás (genótipos não identificados).

### **4.2 Obtenção de DNA genômico**

Duas metodologias foram utilizadas para extração de DNA genômico de folhas de algodoeiro: um protocolo baseado pelo método CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl ammonium bromide*) segundo Menezes (2008) e o

protocolo DArT (*Diversity Array Technology*) de extração de DNA ( disponível em: <http://www.diversityarrays.com>, WENZL, 2004).

#### **4.2.1 Método CTAB para extração de DNA de begomovírus de folhas de algodão**

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens (30 a 60 mg de material fresco) foram coletadas, congeladas com nitrogênio líquido e maceradas. Adicionaram-se 600 µL de tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 M de EDTA, 0,1 M de Tris HCl pH 8, 2% de Polivinylpyrrolidone – PVP 40 e 0,2% de β-mercaptoetanol). A suspensão foi incubada, em banho-maria a 65°C por 30 minutos, emulsificada com 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1(v/v), as fases foram separadas por centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C. A fase aquosa foi transferida e adicionada uma parte de álcool isopropanol gelado (v/v). O conteúdo foi misturado por inversão para que ocorresse a precipitação do ácido nucléico, o DNA precipitado foi lavado com álcool 70% e álcool absoluto e ressuspensão em tampão TE (100 mM; 1 mM EDTA).

#### **4.2.2 Método Dart para extração de DNA de begomovírus de folhas de algodão**

Cerca de 60 mg de folhas frescas ou conservadas em sílica, foram maceradas com nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. O material macerado foi suspenso em tubos contendo 1 mL de solução tampão de trabalho, preparado por três soluções: tampão estoque de extração (0,35 M Sorbitol; 0,1 M Tris HCl pH 8,0 e 5 mM EDTA pH 8,0), tampão estoque CTAB ( 0,2 M Tris HCl pH 8,0; 0,05 M EDTA pH8,0; 2 M NaCl e 2% CTAB) a 65°C, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 60 minutos, sendo agitados periodicamente para completar a homogeneização. Após resfriamento, foi adicionado ao extrato o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v/v). Os tubos foram agitados e centrifugados a 10.000 g, por 20 minutos, para obtenção do



sobrenadante, que foi transferido e adicionado uma parte de álcool isopropanol gelado (v/v). Os tubos foram centrifugados a 10.000 g, por 30 minutos, O DNA precipitado foi lavado com álcool 70% e ressuspendido em 100 µL de TE ( 10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH8,0). A fase aquosa foi transferida e adicionada uma parte de álcool isopropanol gelado (v/v). O conteúdo foi misturado por inversão até a completa precipitação do ácido nucléico, o DNA precipitado foi lavado com álcool 70% e álcool absoluto e ressuspenso em tampão TE (100 mM Tris HCl; 1 mM EDTA).

### **4.3 Quantificação de DNA**

A quantificação do DNA extraído foi realizada em eletroforese de gel de agarose 0,8% (p/v) preparado em solução TBE 1X (0,89 M de Tris HCl; 0,86 M de ácido bórico; 0,02 M EDTA). Alíquotas do volume total de DNA genômico foram aplicadas nos poços o mesmo volume de *Syber green* e 5x tampão de carregamento de agarose, e ao lado uma quantidade conhecida como DNA fago λ (50, 100, 200 e 300ng). O gel foi imerso em uma solução de eletroforese TBE 1X, a estimativa da concentração de DNA ocorreu por comparação visual das bandas gerada pela intensidade de fluorescência das bandas de DNA fago λ. Posteriormente, o DNA foi diluído a 10 ng/ µL e armazenado a -20°C.

### **4.4 Reação de cadeia de polimerase (PCR)**

As reações PCR foram realizadas em um volume total de 15 µL, contendo 10 ng de DNA genômico, 1x de tampão PCR (10 mM Tris HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µM de cada primer universal degenerado (PAL1v1978 e PCRv19), para Begomovirus segundo Rojas et al., 1993 0,2 mM de dNTP, 0,25 mg/ml de BSA, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. Para amplificação, inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos compostos por uma desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento 55°C por 1 minuto e uma extensão de 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Após a amplificação adicionou-se solução contendo 25 mg de azul de bromofenol e 4 g

de sacarose. Visualizados em gel de agarose.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Sintomas de begomovirus em plantas de algodão

Em casa de vegetação na Embrapa Algodão (Campina Grande, Paraíba) 25 acessos apresentavam sintomas como encurvamento das bordas das folhas jovens, clareamento das nervuras, evoluindo para mosaico amarelo e verde. Tais sintomas caracterizavam uma suposta infecção por vírus do gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae* (Figura 1). Uma importância evidenciada adicional sugerindo que os sintomas pudessem ser causados por begomovírus foi o fato de os sintomas terem surgido em casa de vegetação e arredores após forte infestação da mosca branca *Bemisia tabaci*. Os begomovírus são transmitidos de maneira circulativa e não propagativa pela mosca branca (Stanley et al., 2005).

Segundo Silveira (1965) as plantas infectadas pelo vírus exibem irregular mosaico amarelo apresentando redução da área foliar, constatando que esta doença ocasiona perda de 50% na produção. Rojas et al (1993) faz menção que a família *Geminiviridae* é formada por um grande número de vírus que causam significativas perdas na produção. Os sintomas induzidos pelo vírus na planta hospedeira vêm a ser a expressão externa das modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas sofridas pelas células após a penetração da partícula viral (CHAVES, 2002). Assim o vírus induz na planta infectada, apenas sintomas que se caracterizam pela reação da planta a esse agente nocivo. Walkey, 1985 menciona que a identificação, caracterização e reconhecimento dos sintomas ainda é peça fundamental e indispensável, pois permitem realizar o pré-diagnóstico e a tomada de decisões no emprego das técnicas mais sofisticadas como as de biologia molecular.

Para confirmar a presença do vírus foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores degenerados para Begomovirus.



**Figura 1:** Planta de algodoeiro com sintomas da doença de begomovirus. (Foto: Monaliza Lucena).

## **5.2 Produtos de PCR em plantas com sintomas de begomovírus**

Os DNAs totais de algodoeiro foram submetidos à amplificação por PCR utilizando primers universais PAL 1v1978/ PCRv19 para confirmar a infecção (ROJAS et al., 1993). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e visualizados em espectrofotômetro após coloração com Sybr green, com isto foram observados fragmentos com tamanhos aproximadamente de 1500 pb, dos 24 genótipos utilizados para as análises 13 apresentaram bandas de DNA em tamanho esperado confirmando a presença do Begomovirus nas amostras (Figura 2 e 3).

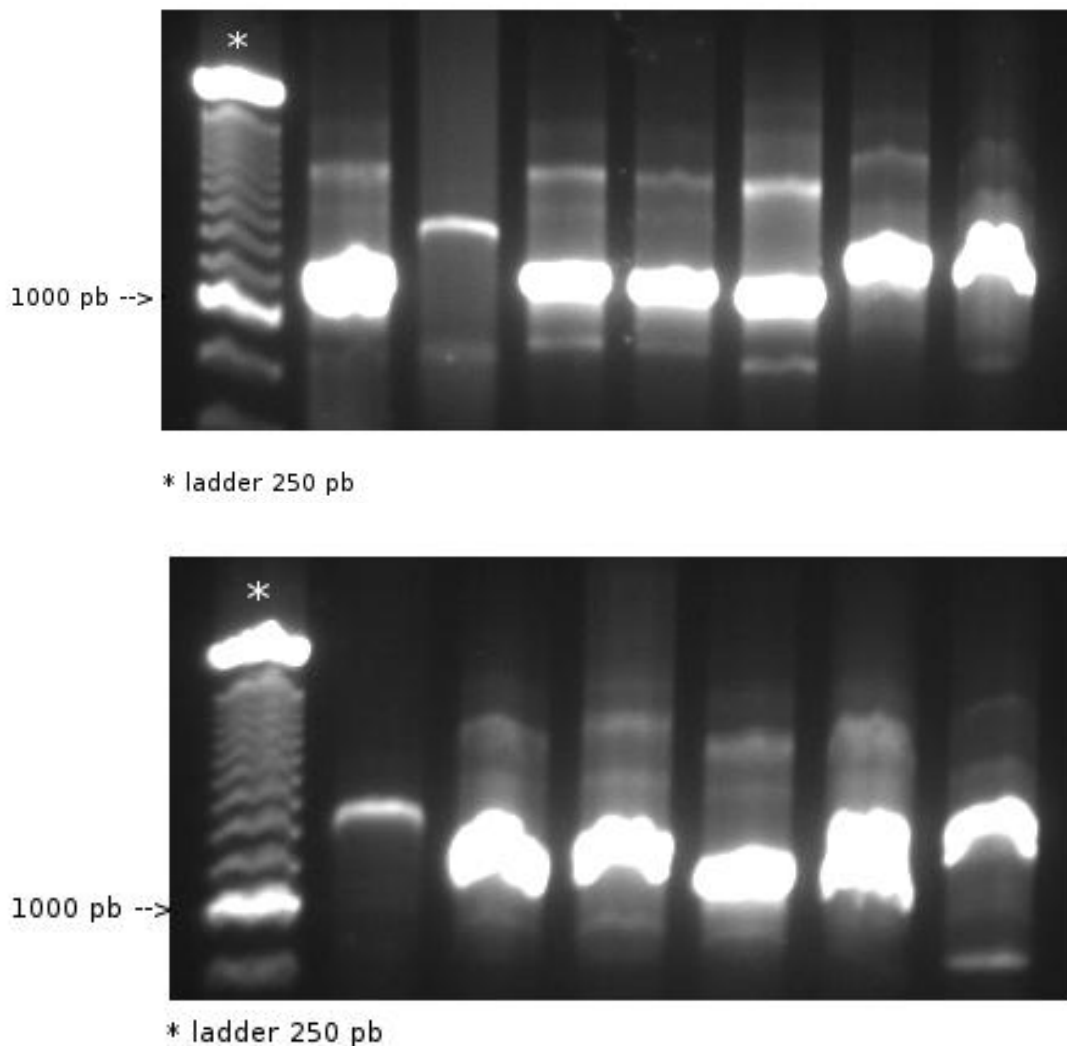
Segundo Jovel et al (2004) no Brasil encontra-se uma grande diversidade de begomovírus infectando plantas cultivadas, desde da incidência de begomovírus em tomates no ano de 1990.

Dos 25 genótipos utilizados para análise 13 apresentaram bandas de DNA em tamanho esperado 1500 pb. No Brasil já se realizou estudos com o objetivo de caracterizar molecularmente isolados de geminivírus que infectam plantas cultivadas (CALGARIO et al., 2007).

Com isto, Quintela et al. (2008) faz alusão que a caracterização de Begomovirus que infectam plantas é a etapa inicial para se chegar a importantes informações sobre o aspecto ecológico e evolutivo a respeito

desse vírus.

Após análise conclui-se que os 13 genótipos apresentavam banda esperada confirmando a presença dos begomovírus.



**Figura 2 e 3** : Parte de gel de agarose (0,8%), apresentando banda de DNA em tamanho esperado em 1500 pb. DNA *ladder* 250 pb.

Os produtos de amplificação da PCR, purificados, foram enviados para a equipe da Doutora Alice Kazuko Inoue-Nagata na Embrapa Hortaliças (CNPH) Brasília – DF para clonagem e análise da sequência genômica, tendo a confirmação que se trata de um begomovírus. Como a similaridade com vírus já sequenciados foi menor que 89%, foi considerado como novo vírus *Cotton chlorotic spot vírus*.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ O protocolo de DArT para extração de DNA (*Diversity Array Technology*, disponível em: <http://www.diversityarrays.com>) se mostrou mais eficaz quando comparado com o método CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl ammonium bromide*).
- ✓ Por meio da técnica de PCR com oligonucleotídeos degenerados foi eficiente na detecção de infecção viral do Begomovirus.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. P. Effect of the population levels of *Aphis gossypii* on cotton agronomic trait and fibre quality. **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society**. Amsterdam, v. 12, p. 97-100, 2001.

AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. **Genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil**. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.27, p.372-377, 2002.

ARAÚJO, A. E. **Quando a doença é azul**. *Cultivar*, Pelotas, n. 25, p. 46-47. fev. 2001. Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=571>> Acesso em: 05 de Nov. 2009.

ASLAM, M.; GILANI, A. A. **Resistance of different cotton varieties to Cotton Leaf Curl Virus under Field conditions**. *Journal of Research (Science)*, Multan, v. 11, n. 1, p.42-45, 2000.

BELL, A. A. Diseases of cotton. In: SMITH, C. W.; COTHREN, J. T. **Cotton: origin, history, technology and production**. New York: John Wiley and Sons, 1999. p. 533-594.

BOER, E.; BEUMER, R. R. **Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms**. *Int. J. Food Microbiol.*, v.50, p.119-130. 1999

BRIDDON, R. W., MANSOOR, S., BEDFORD, I. D., PINNER, M. S., SAUNDERS, K., STANLEY, J., ZAFAR, Y., MALIK, K. A. & MARKHAM, P. G. (2001). **Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease**. *Virology* 285, 234–243

BROWN, J.K.; BIRD, J. (1992) **Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin**. *Plant Disease* 76, 220-225

BROWN, J.K.; COATS, S.A.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; BIRD, J.; Frohlich, D.R. (1994a) **Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, Bemisia tabaci (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae)**. *Biochemical Genetics* 33, 205-214.

CALLEGARI, O.; SANTOS, H. S.; SCAPIM, C. A. **Variações do ambiente e de práticas culturais na formação de mudas e na produtividade da alface (Lactuca sativa L. cv. Elisa)**. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 23, n. 5, p. 1117-1122, 2001

CAUQUIL, J.; FOLLIN, J.-C. Les maladies du cotonnier attribuées à des virus ou à des mycoplasmes en Afrique au sud du Sahara et dans le reste du monde. **Coton et Fibres Tropicales**, Paris, v. 38, n. 4, p. 293-317, 1983.

CAUQUIL, J.; VAISSAYRE, M. La “Maladie Bleue” du cotonnier en Afrique: transmission de cotonnier à cotonnier par *Aphis gossypii* Glover. **Coton et fibres tropicales**, Paris, v. 26, n. 4, p. 463-466, 1971.

CELINI, C. L. **Le puceron du cotonnier**, 2001. Disponível em: <<http://www.inra.fr/opieinsectes/pdf/i122celini.pdf>> Acesso em: 01 de Nov. 2009.

COSTA, A. S. **Moléstias de vírus do algodoeiro**. In: *Divulgação Agronômica*, Rio de Janeiro, n. 21, p. 27-29, 1966.

COSTA, A.S., CARVALHO, A.M. **Comparative studies between Abutonium and Euphorbia mosaic viruses**. *Phytopathol. Zeitsch.*, v. 38, n. 2, p. 129-152, 1960.

COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B. **Moléstias de vírus do algodoeiro**. *Bragantia*, Campinas, v. 21, n. 2, p. 50-51, 1962.

COSTA, A. S.; FORSTER, R. **Nota preliminar sobre uma nova moléstia de vírus do algodoeiro – mosaico das nervuras**. *Revista de Agricultura*, Piracicaba, v. 13, n. 3-4, p. 187-191, 1938.

COTRIM, M. A. A. et al. **Análise da diversidade genética de Begomovirus em tomateiro no Centro-Oeste Paulista.** Fitopatol. Bras., v. 29, p. S109, 2004.

FARIA, J. C.; MAXWELL, D. P. **Variability in geminivirus isolates associated with Phaseolus spp. In Brazil.** Phytopathology, v. 89, n. 3, p. 262-268, 1999.

FAUQUET CM, BRIDDON R, BROWN JK, MORIONES E, STANLEY J, ZERBINI M, ZHOU X, 2008. **Geminivirus strain demarcation and nomenclature.** Archives of Virology 153, 783-821.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ª Ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p

GILBERTSON, R.L.; HIDAYAT, S.H.; PAPLOMATAS, E.J.; ROJAS, M.R.; HOU, Y.M.; MAXWELL, D.P. (1993) **Pseudorecombination between infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses.** Journal of General Virology 74, 23-31.

HANLEY-BOWDOIN et al. 1999). **Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation.** Crit Rev Biochem Mol Biol 35, 105–140.

HOFFMANN, L. V.; FARIAS, F. J. C.; MOREIRA, J. A. N.; NÓBREGA, M. B. M.; BARROSO, P. A. **Marcadores moleculares no melhoramento genético do algodão.** In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. (Ed.) O Agronegócio do Algodão no Brasil. 2ª Ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 431-452.

HURLEY, I. P., COLEMAN, R. C., IRELAND, H. E., & WILLIAMS, J. H. H. (2006). **Use of sandwich IgG ELISA for the detection and quantification of adulteration of milk and soft cheese.** International Dairy Journal, 16, 805-812.

JOVEL J, RESKI G, ROTHENSTEIN D, RINGEL M, FRISCHMUTH T, JESKEH (2004) **Sida micrantha mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from Abutilon mosaic virus.** Archives of Virology 149:829-841.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico Microbiológico.** Medsi Editora Médica e Científica Ltda., 2001. 1466p.



LAZAROWITZ, S. G. **Geminiviruses: genome structure and gene function.** Crit. Rev. Plant Sci., v. 11, p. 327-349, 1992.

LU, P.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A.; MILLS, J. T. **Detection of *Penicillium aurantiogriseum* by ELISA utilizing antibodies produced against its exoantigens.** Microbiology, New York, v.140, p.3267-3276, 1994.

MALORNY, B et al. **Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method.** International Journal of Food Microbiology 89: 241-249. 2003.

MAHAMA, A.; CAUQUIL, J. **La sélection de variétés résistantes à la Maladie Bleue du cotonnier dans l'Empire Centrafricain.** Coton et Fibres Tropicales, Paris, v. 31, n. 4, p. 440-446, 1976.

MEIRELLES, et al. **Imunoensaios: uma alternativa para a detecção de fungos toxigênicos em alimentos** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 4, p. 617-628, out./dez. 2006

MICHELOTTO, M. D.; BUSOLI, A. C. **Eficiência de ninfas e adultos de *Aphis gossypii* Glov. na transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro.** Bragantia, Campinas, v. 62, n. 2, p. 255-259, 2003.

MILLER, S.A., MARTIN, R.R. **Molecular diagnosis of plant disease.** Ann. Rev. Phytopathol. 1988. 26:409-32.

MIRANDA, J. E.; SUASSUNA, N. D.; MORELLO, C. L.; SILVA, M. V. F.; FREIRE, E. C. **Doença Azul do Algodoeiro: novos aspectos a serem considerados no manejo.** Campina Grande: Embrapa-CNPA, jul. 2008. 12 p. (Embrapa-CNPA. Circular Técnica, 121).

MORELLO, C. L.; FREIRE, E. C. **Estratégias para o melhoramento genético do algodoeiro no Brasil.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005. Salvador. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão/Fundeagro, 2005. Disponível em: <  
[http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos\\_cba5/317.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba5/317.pdf) >. Acesso em: 04 jul 2012.

MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. **The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America.** Arch. Virol., v. 146, n. 3, p. 415-441, 2004.

OLIVEIRA, C.L.(2009) **Caracterização de um novo begomovírus Euphorbia Yellow Mosaic Virus, no Brasil.** Dissertação (mestrado) – Universidade de Brasília.

PRABHAKER, N.; TOSCANO,N.C.; COUDRIET,D.L. **Susceptibility of the immature and adult stages of the sweetpotato whitefly (Homoptera:Aleyrodidae) to selected insecticides.** Journal of Economic Entomology, CollegePark, v.82, n.4, p.983-988, 1985

PAPROTKA, T.; BOITEUX, L. S.; FONSECA, M. E. N.; RESENDE, R. O.; JESKE, H.; FARIA, J. C., et al. **Genomic diversity of sweet potato geminiviruses in a Brazilian germplasm bank.** Virus Research, Amsterdam, v. 149, p. 224-233, 2010.

POLSTON, J.E.; MCGOVERN, R.J.; BROWN,L.G. **Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato.** Plant Disease,v.83, p.984-988, 1997

PUDIM JUNIOR O., SCHUSTER,I., PINTO,R.B. , PIRES,E., BELOT J-L., SILVIE,P., CHITARRA, L.G., HOFFMANN, L.V., BARROSO, P.A.V. **Inheritance of resistance to cotton blue disease.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.43, n.5, p.661-665, maio 2008.

QUYÊN, L. Q.; HAI, N. T.; HÀO, T. A.; HÀO, M. V.; BÌNH, N. T. T.; BỬ'U, D. N.; DIÊU, D. X.; UNDERWOOD, E. Cotton production in Vietnam. In: ANDOW, D. A.; HILBECK, A.; TUAT, N. V. (Ed.) **Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Organisms Series: Challenges and Opportunities with Bt Cotton in Vietnam.** [S. I.], CAB International, 2008. p. 24-63.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; LIMA, M.F.; MELLO, R.N.; ROCHA, H.; ZERBINI, F.M. **Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil.** Arch. Virol., v.148,p.281-295, 1998.

ROJAS MR, GILBERTSON RJ, RUSSELL DR, MAXWELL DP (1993) **Use of degenerate primers in the polymerase chain-reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses.** Plant Disease 77:340-347.

SANTOS, C. D.G., D'ÁVILA. A.C., INOUE-NAGATA, A.K., RESENDES, R.O. **Espécies vegetais hospedeiras de begomovírus isolados em Goiás e no Distrito Federal.** Fitopatologia Brasileira 29: 450-455. 2004.

SANTOS, C.D.G., D'ÁVILA, A.C., RESENDE, R.O. **Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca.** Fitopatologia brasileira. v. 28, n. 6, Brasília, Nov/Dec.2003.

SANTOS, K. B.; NEVES, P. M. J.; SANTOS, W. J. **Resistência de cultivares de algodoeiro ao Vírus do Mosaico da Nervuras transmitido pelo pulgão *Aphis gossypii* (Glover) (Hemíptera: Aphididae)**. Neotropical Entomology, Londrina, v. 33, n. 4, p. 481-486, Jul./Ago. 2004.

STANLEY, J. (2005). **Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes**. Vet Microbiol 98, 121–129.

STENGER, D.C.; DUFFUS, J.E.; VILLALON, B. (1990) **Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper**. Phytopathology 80, 704-709.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M.; MORELLO, C. L. **Resistência genética do algodoeiro a doenças**. In: BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D. M. P. (Ed.) O Agronegócio do Algodão no Brasil. 2ª Ed. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p. 325-354.

TSAI, J.H.; WANG, K. **Development and reproduction of *Bemisia argentifolii*** (Homoptera: Aleyrodidae) on five 178 A.P. SOUZA e J.D. VENDRAMIM Bragantia, Campinas, 59(2), 173-179, 2000 ost plants. Environmental Entomology, College Park, v.25, n.4, p.810-816, 1996.

WRIGHT, R. J.; NIU, C.; NGUYEN, B. **Bridging classical and molecular genetics of cotton**. In: PATERSON, A. H. (Ed.). Plant genetics and genomics: crops and models: genetics and genomics of cotton. New York: Springer, 2009. p. 313-336.