Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por Tomato
yellow vein streak virus em tomateiro na região de Campinas - SP**

Marilia Gabriela Salveti Della Vecchia

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2006

Marilia Gabriela Salveti Della Vecchia
Engenheiro Agrônomo

**Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por Tomato yellow vein
streak virus em tomateiro na região de Campinas - SP**

Orientador:

Prof. Dr. **JORGE ALBERTO MARQUES REZENDE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Della Vecchia, Marília Gabriela Salveti

Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por Tomato yellow vein streak virus em tomateiro na região de Campinas – SP / Marília Gabriela Salveti Della Vecchia. - - Piracicaba, 2006.

91 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Análise espacial 2. Dinâmica temporal 3. Doenças de plantas 4. Luteovirus
5. Tomate 6. Virus de plantas I. Título

CDD 635.642

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

“Nós existimos, em primeiro lugar, para as pessoas queridas de cujo bem-estar e sorrisos dependem a sua e a nossa felicidade, depois, para todos os seres, nossos semelhantes, que não conhecemos pessoalmente, mas aos quais estamos ligados pelos laços de simpatia e fraternidade humana”.

Albert Einstein

À minha família
DEDICO

Aos amigos
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me ensinado a valorizar a vida, à minha família, aos amigos que vêm e vão e à oportunidade de crescimento e evolução;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela formação profissional;
Ao Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola por toda a estrutura e assistência necessárias à realização deste trabalho;

Ao Professor Jorge Alberto Marques Rezende pela amizade, compreensão nos momentos difíceis e pelo carinho e confiança nesses anos todos;

À CAPES pelo apoio financeiro;

A todos os professores e aos funcionários do Setor de Fitopatologia; em especial ao professor Armando Bergamin Filho e à professora Lilian Amorim pela atenção dispensada no planejamento, avaliação dos ensaios e redação do texto;

Ao Daniel Dias Rosa, ao Osmar e ao professor Luis Eduardo Aranha Camargo por toda a cooperação na realização dos seqüenciamentos;

Ao Sr. Luis Carlos Lúcio e sua esposa pela amizade e carinho durante todo o experimento conduzido em Elias Fausto, aos irmãos Andrade por facilitarem a execução do experimento em Sumaré;

À Nunhens, na pessoa do Eng. Agr. Aílton Ribeiro, pela amizade, presença constante e auxílio financeiro para que tudo ocorresse conforme o necessário;

À Clause, na pessoa do Sr. Celso, pelo fornecimento de sementes da variedade Alambra;

Aos companheiros do laboratório de Virologia Vegetal: Edivaldo, Ricardo, Quelmo, José Segundo, Scheila, Estela, Débora, Ana Carolina, Daniel e Adriana pelos bons momentos compartilhados;

Aos colegas do curso e a todos que ajudaram de alguma forma;

Aos queridos amigos que tornaram vários momentos tão mais fáceis de serem transpostos: Marissonia, Jaqueline, Adriana, Ana Paula, Luiz Fernando, Elaine, Maurício, Beto, Keila, Juliana, Cleci, Alexandre, Cândido, Daniel, Paulão, Paulinho; Nicole, Angelita, Dr. Guaraci, aos pequeninos Tiago, Alicia, Júlia, Clara e Gabriel que puderam me fazer sorrir tantas vezes e redescobrir muitos valores;

Aos companheiros de muitos aperreios: Carla, Lyssandro e Sivaldir;

À Syngenta por facilitar a conclusão da redação deste trabalho nas pessoas dos Eng.

Agr. Maurício Rangel e Alexandre Develey;

Ao Frederico pela auxílio em todas as coletas de dados durante a condução dos experimentos, pela paciência e dedicação;

Aos meus pais e ao João Vinicius pelo incentivo e apoio nos momentos delicados.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 DESENVOLVIMENTO	13
2.1 Viroses que incidem sobre o tomateiro	13
2.2 Geminiviroses e características de membros da família <i>Geminiviridae</i> que incidem sobre o tomateiro	15
2.3 Epidemiologia	20
2.3.1 Dinâmica temporal	22
2.3.2 Dinâmica espacial	29
2.4 Materiais e métodos	32
2.4.1 Caracterização dos locais de plantio e instalação das armadilhas adesivas	32
2.4.1.1 Sumaré	32
2.4.1.2 Elias Fausto	33
2.4.2 Avaliação da incidência de viroses	34
2.4.3 Monitoramento da população de aleirodídeos.....	36
2.4.4 PCR e sequenciamento para o begomovirus	37
2.4.4.1 Extração e amplificação do DNA total por PCR	37
2.4.4.2 Seqüenciamento parcial do DNA A	38
2.4.5 DAS-ELISA para o polerovirus	40
2.4.6 Análise epidemiológica	41

	7
2.4.6.1 Análise temporal	41
2.4.6.2 Análise espacial	41
2.4.7 Avaliação de danos à produção e à qualidade dos frutos	43
2.4.7.1 Danos à produção	43
2.4.7.2 Danos à qualidade	43
2.5 Resultados e discussão	44
2.5.1 Identificação dos vírus predominantes nos tomates	44
2.5.2 Amostragem de aleirodódeos	46
2.5.3 Avaliação da incidência de viroses em Sumaré e Elias Fausto	51
2.5.4 Dinâmica temporal e espacial	57
2.5.4.1 Análise temporal	57
2.5.4.2 Análise espacial	58
2.5.5 Avaliação de danos à produção e à qualidade causados pelos vírus	75
3 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81

RESUMO

Dinâmica temporal e espacial da begomovirose causada por Tomato yellow vein streak virus em tomateiro na região de Campinas - SP

O principal objetivo do presente trabalho, considerando a tomaticultura praticada na região de Sumaré e Elias Fausto, no Estado de São Paulo, foi caracterizar os padrões temporal e espacial do Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) em condições de campo e de casa-de-vegetação (estufas plásticas). Também foram avaliados os danos causados por este vírus e pelo vírus do amarelo baixeiro do tomateiro na produção quantitativa e qualitativa das plantas de tomate em campo. No ensaio de campo, em Sumaré, plantado com o cultivar Alambra, foram avaliadas 4.032 plantas, distribuídas em oito blocos. Em oito casas-de-vegetação, em Elias Fausto, com plantios escalonados do cultivar Ikram, foram avaliadas 6.016 plantas. As avaliações foram feitas com base nos sintomas característicos induzidos por esses vírus. A confirmação da identidade do ToYVSV foi feita por meio da análise da sequência de nucleotídeos de parte do DNA-A viral, que incluiu os genes AV1 e AC3. A presença do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro foi detectada por DAS-ELISA, com antissoro específico contra o *Potato leafroll virus*. Também foi monitorada a população de alelodídeos nas áreas dos dois ensaios. No ensaio em condições de campo, a incidência da doença causada pelo ToYVSV evoluiu lentamente, desde um mínimo de 0,2% até um máximo de 4,97%. Mesmo assim, foi possível constatar um efeito de borda, pois a incidência média de plantas doentes nos blocos situados nos bordos da área foi 2,1 vezes maior do que naqueles internos. Além disso, nesses blocos, as plantas sintomáticas apresentaram padrão espacial levemente agregado, ao contrário dos blocos internos, que apresentaram padrão ao acaso. O progresso da incidência da doença foi linear, o que indica que novas infecções foram devidas principalmente a um influxo constante de vetores virulíferos de fora para dentro da área avaliada. Nos plantios em casas-de-vegetação, os níveis finais de doença causada pelo ToYVSV foram fortemente dependentes da época de plantio, com médias variando de 4,8% a 69,3%. A distribuição espacial de plantas sintomáticas nesses plantios foi fortemente agregada. Essa agregação provavelmente não se deve a infecções secundárias dentro das casas-de-vegetação, mas sim à concentração de plantas sintomáticas nos bordos das mesmas, consequência da migração de vetores virulíferos a partir de áreas externas. A avaliação de danos revelou que as médias de produção das plantas infectadas pelo ToYVSV e pelo vírus do amarelo baixeiro foram 37,6% e 14,8% inferiores às das plantas sadias, respectivamente. Entretanto, esses vírus não provocaram nenhum decréscimo para os caracteres de qualidade analisados em comparação com os valores encontrados para as plantas sadias.

Palavras-chave: Epidemiologia, *Lycopersicon esculentum*, Virologia, Begomovirus, Luteoviridae

ABSTRACT

Spatio-temporal pattern of a begomovirus disease caused by Tomato yellow vein streak virus in tomato in Campinas region, São Paulo State, Brazil

The purpose of the present work was the characterization of the temporal and spatial pattern of Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV), transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, in tomato crops under field and greenhouse conditions, in Sumaré and Elias Fausto counties, respectively, State of São Paulo, Brazil. Evaluation of quantitative and qualitative yield loss caused by the infection with ToYVSV and Tomato yellow bottom leaf virus (TYBLV), a putative member of the genus *Polerovirus*, family *Luteoviridae*, was also carried out in the field experiment. A total of 4,032 plants of cultivar Alambra, distributed in eight randomized blocks, were evaluated under field conditions. Evaluations under greenhouses were carried out with cultivar Ikram, for which 6,016 plants were analyzed. Plants were transplanted into eight greenhouses, in a staggered manner. Evaluations were based on typical symptoms induced by these viruses. The identification of ToYVSV was based on the analysis of the nucleotide sequence of part of the DNA-A, which included the AV1 and AC3 genes. The presence of TYBLV was detected by DAS-ELISA with antiserum against *Potato leafroll virus*. The population of aleyrodidae was monitored under both conditions. The incidence of the disease progressed very slowly under field conditions, coming from a minimum of 0.2% to a maximum of 4.97%. In spite of this, border effect was observed, since the average of diseased plants in the peripheric blocks was 2.1 times higher than in the inner blocks. Furthermore, the pattern of symptomatic plants in the peripheric blocks was slightly aggregated, whereas in the inner blocks it was randomized. The disease progress curve was linear, indicating that newer infections were mainly due to the constant influx of viruliferous whiteflies coming from outside sources of inoculum. The percentage of diseased plants in tomatoes grown under greenhouse conditions was enormously influenced by the time of planting, varying from 4.8% to 69.3%. The spatial distribution of symptomatic tomato plants in these crops was aggregated. Apparently, this pattern was not due to secondary infections, but a result of aggregation of diseased plants near by the periphery of the greenhouses, as a consequence of the migration of viruliferous vectors from outside sources of inoculum. Damage evaluation showed that the average yield of tomato plants infected with ToYVSV and TYBLV were 37.6% and 14.8%, respectively, lower than the yield of healthy plants. Infection with these viruses did not affect the quality of the fruits, based on the parameters analyzed.

Keywords: Epidemiology, *Lycopersicon esculentum*, Virology, Begomovirus, Luteoviridae

1 INTRODUÇÃO

A característica mais marcante da olericultura (termo derivado do substantivo latino *oleris*, que significa hortalica, e do verbo latino *colere*, que significa cultivar) é o seu caráter intensivo no que se refere à utilização do solo, aos tratos culturais, à mão de obra e à necessidade de insumos agrícolas modernos.

A vastidão e a complexidade do universo da olericultura não se prendem apenas à multiplicidade das espécies vegetais envolvidas, mas também às particularidades de cada cultura. A exploração dessas culturas, em relação aos demais agricultores ou criadores, possibilita ao olericultor a obtenção de alta renda líquida por unidade de área explorada. Entretanto, acabam permanecendo no negócio somente aqueles que mais agilmente se ajustam às constantes e freqüentemente imprevisíveis mudanças tecnológicas e mercadológicas características dessa especialidade (FILGUEIRA, 1981).

Dentre as diversas olerícolas cultivadas, merece destaque o tomateiro, (*Lycopersicon esculentum* Mill, ordem Tubiflorae, família Solanaceae), já que é cultivado em regiões tropicais e subtropicais durante todo o ano e em todos os continentes, tanto para consumo *in natura* como para a indústria de processamento. Sua origem está na costa oeste da América do Sul (Equador, Peru e Chile). Nessa região, especialmente em altitudes elevadas, encontram-se variedades silvestres, os mini-tomates, precursores de todas as variedades modernas. O primeiro cultivo de tomate provavelmente se deu no México. No século XVI os espanhóis levaram essa olerícola para a Europa, onde rapidamente se espalhou por toda a região do Mediterrâneo (RODRIGUEZ; RODRIGUEZ; SAN JUAN, 1997).

Os maiores produtores de tomate são a China, os Estados Unidos e a Itália; o Brasil ocupa o oitavo lugar. Atualmente, seu cultivo se dá numa área de 4.310.669 ha (FNP, 2005). Ocupa, segundo estatísticas da FAO, o terceiro lugar entre as hortaliças quanto ao valor comercial e ao volume de produção mundial, só sendo superado pela batata e batata-doce (ESPINOZA, 1991).

A cultura do tomateiro é de introdução recente no Brasil e seu crescimento, tanto em área cultivada como em produtividade, foi regular nas décadas de 50 e 60, e

acentuado a partir de 1972, principalmente no Estado de São Paulo (MINAMI; HAAG, 1989). No mercado nacional merecem destaque como grandes regiões produtoras o Sudeste (50,3% da produção nacional) e o Centro-Oeste (26,8%). O País produziu cerca de 3.347.000 toneladas em quase 57.000 hectares no ano agrícola de 2004 (FNP, 2005).

As doenças representam um dos fatores mais importantes que limitam a produção do tomateiro (KUROSAWA; PAVAN, 2005; FAJARDO; ÁVILA; RESENDE, 2000). Dentre elas, destacam-se as viroses. A literatura internacional registra pelo menos 37 diferentes espécies de vírus de importância econômica nessa cultura (POLSTON; ANDERSON, 1997). Desses, pelo menos 17 pertencem ao gênero *Begomovirus*, da família *Geminiviridae*, e têm a mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) como vetora. A importância desse grupo de vírus aumentou consideravelmente desde o final da década de 80 (POLSTON; ANDERSON, 1997).

No Brasil, os primeiros relatos de doenças do tomateiro associadas a vírus, provavelmente begomovirus, transmitidos pela mosca branca *B. tabaci*, foram feitos por Flores; Silberschmidt e Kramer (1960), Costa (1974) e Costa; Oliveira e Silva (1977). Naquela ocasião, todavia, as fitoviroses do tomateiro associadas com a transmissão por *B. tabaci* não eram economicamente importantes, aparentemente pelo fato de que o biótipo A desse Aleyrodidae, predominante no País, não colonizar o tomateiro (RIBEIRO et al., 2003). No entanto, com a aparente posterior substituição deste pelo biótipo B, que coloniza o tomateiro e que foi primeiramente relatado no País em 1994 (LOURENÇÃO; NAGAI, 1994; FRANÇA; VILLAS-BOAS; CASTELO-BRANCO, 1996), os problemas de incidência de viroses em tomateiro transmitidas por esse inseto se intensificaram (RIBEIRO et al., 1998). A partir dessa época, até os dias atuais, passou-se a relatar surtos de doenças do tomateiro relacionadas com begomovirus, com porcentagens elevadas de plantas infectadas e danos significativos na produção (SOUZA-DIAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1996; FARIA et al., 1997; SANTOS et al., 1998; CALEGARIO et al., 2000; CALEGARIO; FERNANDES; ZERBINI, 2001; COLARICCIO et al., 2001; EIRAS et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2004). Também passaram a ser feitos estudos para a identificação e caracterização das diferentes espécies de begomovirus associados com a cultura do tomateiro nas diversas regiões

produtoras dessa olerícola no País (SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997; COLARICCIO et al., 2001; AMBROZEVICIUS et al., 2002; EIRAS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

Apesar disso, ainda há carência de estudos sobre as espécies de maior predominância em cada região, sobre os danos ocasionados à cultura e sobre sua epidemiologia, pois um conhecimento mais amplo das características espaciais e temporais das doenças causadas por begomovirus permite uma visão mais íntima da estrutura do patossistema e de seu funcionamento (JEGER, 1989). Esse conhecimento pode ser útil na elaboração de estratégias de manejo das doenças em campo.

Desse modo, o principal objetivo do presente trabalho, considerando a tomaticultura praticada na região de Sumaré e Elias Fausto, no Estado de São Paulo, foi caracterizar os padrões temporal e espacial do ToYVSV em condições de campo e avaliar o efeito desse patógeno na produção e qualidade dos frutos. Em face da constatação de plantas exibindo sintomas de amarelo baixeiro do tomateiro, causado aparentemente por uma espécie ainda não caracterizada da Família *Luteoviridae*, Gênero *Polerovirus* (KUROZAWA; PAVAN, 2005), também foram avaliados os danos causados por este vírus na produção quantitativa e qualitativa das plantas de tomate.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Viroses que incidem sobre o tomateiro

A cultura do tomateiro hospeda inúmeros patógenos que reduzem sua produtividade. Dentre eles, há vários vírus que podem inviabilizar o seu cultivo. Excetuando-se os Begomovirus, que serão mencionados posteriormente, há descritos na literatura internacional pelo menos vinte e duas diferentes espécies de vírus que podem infectar naturalmente o tomateiro (POLSTON; ANDERSON, 1997).

A literatura nacional (FAJARDO; ÀVILA; RESENDE, 2000; KUROSAWA; PAVAN, 2005) registra a ocorrência: (i) de espécies da família *Bunyaviridae*, gênero *Tospovirus*, como o *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV); pode alcançar altas incidências (entre 50 e 90%), especialmente entre novembro e abril, período mais favorável à proliferação dos trips vetores (Thysanoptera – Thripidae); (ii) do *Tomato mosaic virus* (ToMV), do gênero *Tobamovirus*; pode causar danos de até 70% caso a infecção ocorra no início da cultura; a transmissão pode se dar via sementes infectadas e mecanicamente, durante os tratos culturais; um valor de incidência de 100% já foi relatada no Rio Grande do Sul (DANIELS; CARVALHO; COUTO, 1994); (iii) do *Potato virus Y* (PVY), da família *Potyviridae*, do gênero *Potyvirus*, transmitido por diversas espécies de afídeos; pode causar danos entre 20 e 70%; (iv) do *Tomato yellow top virus* (ToYTV), considerada uma estirpe do *Potato leafroll virus* (PLRV), da família *Luteoviridae*, do gênero *Polerovirus*, transmitido por afídeos de maneira circulativa, não-propagativa. Há também no país o relato de uma doença do tomateiro denominada de amarelo baixeiro, atribuída a um vírus denominado *Tomato yellow bottom leaf virus* (TYBLV), cuja posição taxonômica ainda não está definida, mas que se acredita ser da mesma família do ToYTV (KUROSAWA; PAVAN, 2005).

Esses e outros vírus têm sido identificados na cultura do tomateiro e infecções com diferentes espécies são freqüentes. No Estado do Alabama, E.U.A., por exemplo, levantamentos realizados a partir de 1992 mostraram a presença de pelo menos cinco vírus, entre eles: *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco etch virus* (TEV) e *Tobacco mosaic virus* (TMV). Esses vírus, isoladamente ou em conjunto, têm causado

recorrentes epidemias, algumas delas devastadoras (SIKORA et al., 1998). Entre 1992 e 1995, o CMV foi o vírus predominante em 90% dos campos amostrados, detectado isoladamente em 44% das plantas, provavelmente devido ao seu extenso círculo de hospedeiros. O PVY e o TEV foram identificados isoladamente em 5 e 3% das plantas amostradas, respectivamente. Infecções mistas com CMV, PVY e TEV foram detectadas em 14% das amostras. Infecções mistas de PVY e TEV foram encontradas em 4% das amostras (SIKORA et al., 1998).

A lista de novos vírus que afetam a cultura do tomateiro cresce continuamente. Na Holanda, em 1999, em cultivo protegido de tomateiro, foi identificado, por meio de inoculação de plantas indicadoras, testes sorológicos e análise de fragmentos de cDNA da região não traduzida e da parte do terminal 3' do gene da proteína capsidial, o *Pepino mosaic virus* (PepMV), da família *Flexiviridae*, do gênero *Potexvirus* (VLUGT et al., 2000). Em 2000, na Guatemala, o *Pepper mottle virus* (PepMoV) da família *Potyviridae*, do gênero *Potyvirus*, foi relatado pela primeira vez em tomateiro. As homologias de nucleotídeos desse vírus com isolados típicos do PepMoV, no entanto, não são altas (93-94% para a região não-traduzida e 90-93% para a região do gene da proteína capsidial), sugerindo que este vírus tenha encontrado, no tomateiro, um hospedeiro alternativo para o seu desenvolvimento (VERHOEVEN; WILLEMEN; ROENHORST, 2002). No Brasil, o vírus do mosaico amarelo do pimentão (*Pepper yellow mosaic virus*-PepYMV) da família *Potyviridae*, do gênero *Potyvirus*, foi relatado na cultura do tomateiro pela primeira vez no Estado do Espírito Santo (MACIEL-ZAMBOLIM et al., 2004) e um estudo posterior mostrou ser esse o vírus de maior prevalência na região (ÁVILA et al., 2004).

No inverno de 2000-2001, na Itália, Accotto et al. (2001) observaram, em cultivo protegido de tomateiro, plantas com sintomas típicos de virose. A análise por RT-PCR a partir de RNA viral mostrou 99% de identidade de nucleotídeos para o gene da proteína de choque ao calor (heat shock protein) com o *Tomato chlorosis virus* (ToCV), da família *Closteroviridae*, gênero *Crinivirus*, transmitido por mosca branca, e até então desconhecido na Europa. Accotto et al. (2001) frisam que esse vírus já foi constatado em outras três regiões do país e que pode estar amplamente distribuído, uma vez que os sintomas podem ser confundidos com aqueles causados por

desordens fisiológicas ou pelo *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), outro crinivirus que infecta o tomateiro.

2.2 Geminiviroses e características de membros da família *Geminiviridae* que incidem sobre o tomateiro

A família *Geminiviridae* é constituída por vírus que possuem partículas geminadas, morfologicamente semelhantes a um icosaedro incompleto e tamanho aproximado de 22 x 38 nm. O ácido nucléico é do tipo DNA de fita simples circular, com tamanho variando de 2,5 - 3,0 kb. A proteína capsidial tem peso molecular de 28 - 34 kDa (FAUQUET et al., 2005).

Há quatro gêneros dentro dessa família: *Mastrevirus*; *Curtovirus*; *Topocuvirus*; *Begomovirus*. Os vírus dos três primeiros gêneros possuem genoma constituído por apenas uma molécula de DNA (monopartido). No gênero *Begomovirus*, por outro lado, a maioria das espécies possui dois componentes genômicos (bipartido), referidos por DNA A e DNA B. O DNA A replica-se independente do outro componente, forma partículas inteiras, mas necessita do DNA B para invasão sistêmica. Alguns begomovirus que ocorrem na Europa possuem apenas um componente genômico, que se assemelha ao DNA A. Entre estes estão o *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) e o *Tomato leaf curl virus* (TLCV) (FAUQUET et al., 2005).

Quanto à transmissão, os vírus dos gêneros *Mastrevirus* e *Curtovirus* são transmitidos por cigarrinhas (Homóptera: Cicadelidae). A única espécie do gênero *Topocuvirus* é transmitida por cigarrinhas (Homóptera: Membracidae). Finalmente, os vírus do gênero *Begomovirus* são transmitidos pela mosca branca (*B. tabaci*). Alguns também são transmitidos mecanicamente. A relação vírus-vetores em todos os casos é do tipo persistente (circulativa, não propagativa) (FAUQUET et al., 2005). A eficiência da mosca branca na transmissão dos diferentes begomovirus está relacionada com a concentração do vírus na planta e com a duração do período de aquisição (TIMMERMAN; DAS; MESSING, 1994).

A mosca branca (*B. tabaci*) é um inseto polífago que se alimenta do floema das plantas. Possui mais de 500 espécies vegetais descritas como hospedeiras, em 74 diferentes famílias (BROWN; BIRD, 1992; BROWN; FROHLICH; ROSSELL, 1995;

PERRING, 2001; JONES, 2003). A interação do biótipo B de *B. tabaci* com os begomovirus está muito bem caracterizada para o TYLCV. Cohen & Nitzany (1966) relataram que as fêmeas das moscas brancas são mais eficientes do que os machos na transmissão desse vírus. Tanto as ninfas como os adultos podem adquirir o vírus das plantas infectadas (COHEN; NITZANY, 1966; MEHTA et al., 1994). Os períodos de aquisição e de inoculação variam de 15 a 30 minutos, porém a taxa de transmissão aumenta com o aumento do período de aquisição. O período latente é de 21 a 24 horas. Adultos virulíferos retêm o TYLCV por um período de 10 a 20 dias após o término da aquisição. O vírus é retido após as ecdises e a transmissão transovariana origina adultos, oriundos de fêmeas virulíferas, capazes de transmitir o vírus (COHEN; NITZANY, 1966; ZEIDAN; CZOSNEK, 1991; MANSOUR; AL-MUSA, 1992; MEHTA et al., 1994; GHANIM et al., 1998).

No Brasil, Santos; Ávila e Resende (2003) estudaram a interação de um begomovirus isolado de tomateiro em Anápolis, GO, taxonomicamente relacionado com o *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), com o vetor *B. tabaci* biótipo B e constataram as seguintes características: (i) período mínimo de aquisição de 15 minutos; (ii) período mínimo de inoculação de 30 minutos; a eficiência de transmissão aumentou significativamente quando ambos os períodos foram aumentados para 24 horas; (iii) período de latência de 16 horas e (iv) passagem transestadial do vírus nos insetos. Evidenciou-se também a transmissão à progênie pela detecção do vírus em ovos, ninfas e adultos provenientes de fêmeas virulíferas. A transmissão do vírus pelos adultos provenientes de fêmeas virulíferas, no entanto, não foi observada.

Entre os Curtovirus, há tentativamente listada uma espécie que infecta o tomateiro, o Tomato leafroll virus (TLRV) (BOS, 1999). A única espécie até o momento classificada no gênero *Topocuvirus*, denominada *Tomato pseudo-curly top virus* (TPCTV), também infecta o tomateiro (BRIDDON et al., 1996).

Dentro do gênero *Begomovirus* existem diversas espécies citadas na literatura (POUR et al., 1991; ABOUZID; POLSTON; HIEBERT, 1992; PAPLOMATAS et al., 1994; POLSTON; ANDERSON, 1997), e outras tentativamente inseridas e reconhecidas pelo ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses (FAUQUET

et al., 2005) que infectam o tomateiro. Entre elas estão: (i) *Chino del tomate* (CdTV); (ii) *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHV); (iii) *Potato yellow mosaic Panama virus* (PYMPV); (iv) *Tomato chino La Paz virus* (ToChLPV); (v) *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV); (vi) *Tomato curly stunt virus* (ToCSV); (vii) *Tomato golden mosaic virus* (TGMV); (viii) *Tomato golden mottle virus* (TGMoV); (ix) *Tomato leaf curl virus* (TLCV); (x) *Tomato mosaic Havana virus* (ToMHV); (xi) *Tomato mottle virus* (ToMoV); (xii) *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV); (xiii) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV); (xiv) *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV); (xv) *Tomato yellow vein streak virus* (ToYVSV); (xvi) *Tomato crinkle virus* (ToCrV) e (xvii) *Tomato Uberlândia virus* (ToUV).

A observação da seqüência completa de nucleotídeos de mais de cem espécies distintas de begomovirus revelou altas taxas de recombinação entre as espécies (FAUQUET et al., 2003). Em razão disso, o oitavo relatório do ICTV (FAUQUET et al., 2005) utiliza como critério de demarcação taxonômica das espécies dentro do gênero *Begomovirus* as seguintes características: (i) número de componentes genômicos, i.e., presença ou ausência do DNA B; (ii) organização do genoma; (iii) identidade na seqüência completa de nucleotídeos; valores de identidade menores que 89% geralmente indicam espécies distintas; no entanto, comparações baseadas nessa característica, especialmente quando muito próximos daquele valor, também devem levar em consideração as características biológicas do vírus; (iv) replicação *trans* dos componentes genômicos; (v) produção de pseudo-recombinantes viáveis; (vi) características da proteína capsidial; valor de identidade da seqüência de aminoácidos menor que 90% em conjunto com diferenças sorológicas substanciais são indicativos de espécie distinta e (vii) gama de hospedeiros e sintomas.

Os testes sorológicos mostraram que os begomovirus estão proximamente relacionados. O círculo de hospedeiros das espécies desse gênero abrange uma ampla gama de plantas dicotiledôneas. Entretanto, considerando as espécies individualmente, a gama de hospedeiros é limitada.

A identificação das espécies de begomovirus que infectam o tomateiro no Brasil, bem como a sua distribuição geográfica e os danos que causam à cultura, têm sido motivo de intensa investigação nos últimos anos. Quando as primeiras doenças

aparentemente causadas por esses vírus foram observadas no País, elas foram descritas principalmente com base na manifestação dos sintomas e genericamente identificadas com sendo causadas por geminivirus transmitidos por mosca branca. Flores; Silberschmidt e Kramer (1960) parecem ter sido os primeiros a relatar a infecção de tomateiros em campo pelo vírus da clorose infecciosa das malváceas, que hoje se sabe ser um begomovirus. Anos mais tarde, Costa (1974) distinguiu seis viroses do tomateiro transmitidas por mosca branca com base nos sintomas exibidos pelas plantas. Foram elas: o mosaico dourado ou chita do tomateiro; o encarquilhamento da folha; o engrujo; o mosaico das nervuras, causado pelo vírus do mosaico da *Euphorbia*; a clorose internerval induzida pelo agente do mosaico do *Abutilon* e as nervuras amarelas ("yellow net"). Posteriormente, Costa; Oliveira e Silva (1977) verificaram que o vírus do mosaico dourado do tomateiro, de difícil transmissão mecânica entre plantas de tomateiro, era facilmente transmitido mecanicamente para as espécies *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* e *Physalis* sp. Essa característica já havia permitido a purificação do vírus do mosaico dourado do tomateiro para estudos morfológicos das partículas e a confirmação de tratar-se de um vírus com partículas geminadas (MATYIS et al., 1975).

A intensificação da incidência de begomoviroses em tomates no Brasil a partir da década de 90, associada com a prevalência do biótipo B de *B. tabaci*, e os avanços nas técnicas moleculares para a caracterização dos vírus, considerando-se também as características do seu genoma, permitiram avanços significativos na identificação e caracterização das espécies e/ou espécies putativas de begomovirus presentes em tomates no país. Ambrozevicius et al. (2002), estudando a diversidade genética de begomovirus encontrados em tomateiros nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, constataram uma grande diversidade genética, possivelmente indicando espécies diferentes, com predominância do *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Logo depois, Ribeiro et al. (2003), em estudo mais elaborado e incluindo isolados coletados de tomateiros em outros estados do nordeste brasileiro, apontaram a ocorrência de sete possíveis novas espécies, inclusive o ToCMoV. Acrescentem-se a estas o TGMV e o ToYVSV, identificados anteriormente por Matyis et al. (1975) e Faria et al. (1997), respectivamente. Essa última espécie parece ser a prevalecente nos

tomatais no cinturão verde de Campinas, Estado de São Paulo, desde meados da década de 90 (SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997; COLARICCIO et al., 2001; EIRAS et al., 2002). Apesar dos avanços na caracterização dos begomovirus que infectam o tomateiro no Brasil e a constante preocupação com esse patógeno nos plantios dessa olerícola, uma vez que relatos de incidência variando de 20 a 100% de tomateiros infectados em campo têm sido freqüentes (SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997; COLARICCIO et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2004), estudos sobre os danos quantitativos e qualitativos provocados por esses vírus são praticamente inexistentes no país. Gonçalves et al. (1997) estudaram o efeito da época de inoculação de um geminivirus em duas cultivares de tomateiro em condições de casa de vegetação e constataram um efeito progressivo para os danos em relação às inoculações nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas. Giordano et al. (2005) avaliaram o efeito da infecção precoce de tomateiro industrial (cv. Viradoro) com um isolado distinto de begomovirus, geneticamente relacionado com o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), sobre a produtividade e teor de sólidos solúveis (°Brix). Constataram que a infecção das plantas aos 18 dias após a semeadura reduziu a produtividade das plantas em aproximadamente 60%, sendo a diferença mais acentuada em relação ao número de frutos por planta. O peso médio e o teor de sólidos solúveis dos frutos não foram significativamente afetados pela infecção precoce com esse begomovirus.

O controle das viroses causadas por begomovirus não tem sido tarefa fácil. Nenhuma estratégia de controle, quando usada isoladamente, tem se mostrado eficaz para o combate dessas viroses. O controle químico do vetor, amplamente empregado pelos produtores, isoladamente não tem sido eficaz pelos seguintes aspectos: (i) a gama de hospedeiros da mosca branca envolve mais de 500 espécies vegetais; (ii) freqüente presença de ninfas do inseto na face inferior das folhas das plantas; (iii) extrema mobilidade dos insetos adultos e (iv) rapidez com que a mosca branca desenvolve resistência à maioria das classes de inseticidas disponíveis no mercado (NAKHALA; MAXWELL, 1998). Estudos feitos para o desenvolvimento de estratégias de controle da begomovirose denominada “tomato yellow leaf curl”, causada pelo TYLCV, predominante e destrutiva em diversos países do hemisfério norte, mas que até o momento não foi constatada no Brasil, apontam que somente o manejo integrado

pode ser capaz de minimizar os danos causados por essa fitovirose. Tal prática inclui o uso integrado das seguintes medidas de controle: (i) produção de mudas sadias em local protegido; (ii) eliminação ou redução das fontes de inóculo do vírus antes do transplante das mudas no campo; isso inclui as plantas de tomate infectadas remanescentes ou voluntárias e as plantas da vegetação espontânea hospedeiras do vírus; (iii) alterações nas datas de transplante para evitar que as plantas jovens sejam expostas a altas populações de moscas brancas; isso exige um conhecimento da flutuação populacional do inseto na região de plantio; (iv) controle químico do inseto vetor e (v) uso de variedades resistentes ou tolerantes à doença (NAKHALA; MAXWELL, 1998).

Estudos recentes realizados em São Paulo evidenciaram que existe variabilidade genética dentro de *Lycopersicon* para resistência ao ToYVSV, havendo cultivares comerciais, como 'Franco' e 'Densus', que se mostraram resistentes ao isolado viral testado. Linhagens selvagens, como LA 444-1 (*L. peruvianum* (L.) Mill.), PI 134417 (*L. hirsutum* Humb. & Bonpl.) e populações de origem interespecíficas (série IAC 14-2) apresentam níveis variáveis de resistência, constituindo-se em germoplasma de valor para o melhoramento genético (MATOS et al., 2003).

2.3 Epidemiologia

Dentre as muitas definições de epidemiologia, nenhuma é tão simples quanto a de Vanderplank (1963), para quem epidemiologia é apenas *"a ciência da doença em populações"*, e nenhuma é tão completa quanto a de Kranz (1974), para quem a epidemiologia é *"o estudo de populações de patógenos em populações de hospedeiros e das doenças resultantes dessas interações, sob a influência do ambiente e a interferência humana"*. As populações importantes para a epidemiologia, portanto, são aquelas do hospedeiro e do patógeno, conceito que está na origem do tetraedro da doença, versão mais moderna do clássico triângulo da doença.

As definições de epidemiologia propostas por diferentes autores, no entanto, nunca levaram em conta as fitovirose transmitidas por vetores. Para esses casos específicos, a definição original de Kranz (1974) pode ser expandida para *"o estudo de populações de patógenos e de seus vetores em populações de hospedeiros primários e*

secundários e das doenças resultantes dessas interações, sob a influência do ambiente e a interferência humana”. Entende-se por hospedeiro primário a espécie de interesse econômico e por hospedeiro secundário a espécie (ou espécies) que serve de reservatório (ou de refúgio) para os vírus.

Assim, as populações importantes para a epidemiologia de fitoviroses são aquelas dos hospedeiros primário e secundário, do patógeno e do vetor. O contato dessas populações leva a uma quinta, a população de lesões (para aquelas poucas fitoviroses que causam sintomas locais), ou a população de plantas doentes (para aquelas fitoviroses que causam sintomas sistêmicos). O ambiente interfere no desenvolvimento das cinco populações (hospedeiros primário e secundário, patógeno, vetor, lesões/plantas doentes), muitas vezes diferencialmente e, em contrapartida, as cinco populações também podem influenciar o ambiente, especialmente o microclima. O homem, cada vez mais, interage com todos os fatores envolvidos e, não raro, sofre os efeitos do rápido crescimento da população de lesões ou da população de plantas doentes. Estas, ao contrário das outras quatro populações, do ambiente e do homem, não têm existência autônoma. Patossistemas viróticos podem ser mais simples que o descrito anteriormente: há os que não possuem hospedeiro secundário, assim como há os que não possuem, além de hospedeiro secundário, vetor.

O princípio básico da epidemiologia é que a quantidade de doença no campo (tanto no hospedeiro primário quanto no hospedeiro secundário) é determinada pelo balanço entre dois processos opostos: infecção e remoção (VANDERPLANK, 1960). De um lado, novas infecções ocorrem, lesões (ou plantas doentes) aparecem e possibilitam o aparecimento de novas lesões (ou de novas plantas doentes). Do outro lado, tecido infeccioso é removido quando as lesões (ou as plantas doentes) envelhecem e não mais sustentam a formação de propágulos. Quando a infecção for mais intensa que a remoção, a intensidade da doença crescerá. Quando a remoção for mais intensa que a infecção, a intensidade da doença deixará de aumentar e poderá, inclusive, diminuir, caso o hospedeiro, por exemplo, lance novas folhas. O ponto importante é que, independentemente da doença estar aumentando ou diminuindo, os dois processos opostos – infecção e remoção – ocorrem ao mesmo tempo. A epidemiologia estuda esses dois processos, sendo apenas um detalhe o fato da quantidade de doença

aumentar, diminuir ou permanecer inalterada em função do tempo (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996).

A epidemiologia, como a maioria das ciências, apresenta duas faces distintas: a face acadêmica e a face aplicada (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). A primeira tem por objetivo uma melhor compreensão da estrutura e do comportamento das doenças no campo e a segunda, baseando-se na primeira, tem por principal objetivo a otimização do controle de doenças. Uma melhor compreensão da estrutura e do comportamento das doenças é importante por si só, mas o desenvolvimento da epidemiologia nos últimos anos deve-se, sem dúvida, às possibilidades de seu uso na otimização do controle de doenças.

A epidemiologia, no entanto, não tem tido sua importância devidamente reconhecida dentro da virologia vegetal, ao contrário da biologia molecular, que domina as pesquisas nessa área em diversos países do mundo. À exceção de dois livros (PLUMB; THRESH, 1983; MCLEAN; GARRET; RUESINK, 1986) e dos pioneiros trabalhos de J.M. Thresh (THRESH, 1974; 1976; 1980; 1983; 1988; 1991) sobre ecologia, curvas de progresso (em função do tempo) e gradientes (em função da distância da fonte de inóculo), pouco há na literatura sobre os vários aspectos da epidemiologia de fitoviroses. Somente os mais recentes textos de virologia vegetal incluem uma breve seção sobre epidemiologia (por exemplo, BOS, 1999). Não é de causar surpresa, portanto, que os vírus de plantas continuem a causar sérios danos a diversas culturas de importância econômica e que a dificuldade e o custo de seu controle só tenha aumentado nas últimas décadas (THRESH, 1986).

2.3.1 Dinâmica temporal

A curva de progresso da doença, usualmente expressa pela plotagem da proporção de doença *versus* tempo, é a melhor representação de uma epidemia. Por meio dela, interações entre patógeno, hospedeiro (primário e secundário), vetor e ambiente podem ser caracterizadas, estratégias de controle avaliadas, níveis futuros de doença previstos e simuladores verificados. Thresh (1983), Madden e Campbell (1986) e Nutter (1997) apresentam detalhada discussão sobre a análise temporal de doenças causadas por vírus.

Curvas de progresso da doença podem ser construídas para qualquer patossistema: o hospedeiro, por exemplo, pode ser anual, perene ou semi-perene, de origem tropical ou temperada; o patógeno, por sua vez, pode ser um fungo, um vírus, uma bactéria ou qualquer outro agente causal; a epidemia pode ser de curta, média ou longa duração; a área na qual a doença está ocorrendo pode ser desde uma pequena parcela experimental até um continente inteiro. Independentemente da situação considerada, os componentes importantes da curva de progresso da doença – como a época de início da epidemia, a quantidade de inóculo inicial (x_0), a taxa de aumento da doença (r), a forma da curva de progresso da doença, a área sob esta curva (AUDPC), as quantidades máxima (x_{max}) e final (x_f) de doença e a duração da epidemia – podem ser caracterizados (KRANZ, 1974).

Vanderplank (1963) definiu, do ponto de vista epidemiológico, dois grupos de doenças: as doenças de juros compostos e as doenças de juros simples. No primeiro grupo (as definições referem-se ao hospedeiro primário ou econômico do vírus), *plantas infectadas durante o ciclo da cultura servem de fonte de inóculo para novas infecções durante o mesmo ciclo*. É o caso típico de muitos vírus transmitidos de forma não-persistente e que se movimentam intensamente entre plantas hospedeiras (e também das ferrugens, oídios e míldios, por exemplo). Essa situação é análoga ao crescimento de capital a juros compostos, onde os juros ganhos rendem novos juros; no caso de doenças de juros compostos, plantas doentes rendem novas plantas doentes durante o ciclo da cultura. Para que isto ocorra, está implícita uma movimentação do patógeno a partir de plantas doentes para plantas saudáveis. No segundo grupo, *plantas infectadas durante o ciclo da cultura não servem de fonte de inóculo para novas infecções durante o mesmo ciclo*. É o caso típico dos vírus veiculados por vetores que não colonizam o hospedeiro primário ou econômico do vírus e, sim, outras plantas, muitas vezes silvestres (e também das murchas de *Fusarium*, *Verticillium* e *Ralstonia*, por exemplo). Esta situação é análoga ao crescimento de capital a juros simples, onde os juros ganhos não rendem novos juros; no caso de doenças de juros simples, o aumento gradativo do número de plantas doentes durante o ciclo da cultura não é devido, primariamente, à movimentação do patógeno a partir de plantas doentes em direção a

plantas sadias e, sim, ao inóculo original, neste caso plantas silvestres que abrigam o vírus.

Como seria a curva de progresso típica de cada um desses grupos? Para o caso das doenças de juro compostos, considerando que plantas doentes (ou lesões) dão origem a novas plantas doentes (ou novas lesões) no mesmo ciclo da cultura, a velocidade de aumento da doença é proporcional à própria quantidade de doença em cada instante (supondo constante a população do vetor). Assim, se uma lesão (ou planta doente) der origem a 10 lesões (ou plantas doentes), 10 lesões darão origem a 100, 100 a 1000, 1000 a 10.000 e assim por diante. Esta cinética de crescimento é expressa matematicamente por meio da equação diferencial

$$dx / dt = rx$$

onde dx/dt é a velocidade de aumento da doença, x , a quantidade de doença, e r , a taxa de infecção. A integração dessa diferencial leva a

$$x = x_0 \exp(rt)$$

onde x_0 é a quantidade de doença no tempo t_0 . A curva descrita por essa equação tem a forma típica de um 'J' e é conhecida como curva exponencial.

Para o caso das doenças de juro simples, considerando que plantas doentes (ou lesões) não dão origem a novas plantas doentes (ou novas lesões) no mesmo ciclo da cultura, a velocidade de aumento da doença não tem qualquer relação com a quantidade de doença em cada instante. Como já discutido, o aumento gradativo do número de plantas doentes durante o ciclo da cultura é função do inóculo original previamente existente (em plantas silvestres, por exemplo). A quantidade de inóculo existente é, na maioria dos casos, desconhecida, mas por conveniência, considerada constante durante cada período de vegetação (essa premissa, válida para fungos e bactérias veiculadas pelo solo, não se aplica a muitas viroses). A fração de plantas que torna-se doente (x) depende da frequência de contatos efetivos entre hospedeiro e vetor/patógeno (inóculo original). Contato efetivo é definido como aquele contato que leva à doença. Assim,

$$dx / dt = QR$$

onde Q é a quantidade de inóculo previamente existente e R , a taxa de infecção. O produto QR representa o número de contatos efetivos. Tanto Q quanto R são considerados constantes. A integração dessa diferencial resulta em

$$x = x_0 + QRt$$

onde x_0 é a quantidade de doença no tempo t_0 . A curva descrita por essa equação é uma linha reta.

Seriam os modelos exponencial e linear espelhos fiéis da realidade? Simulariam eles com razoável precisão o crescimento da doença em condições naturais? As epidemias reais de vários patossistemas viróticos mostram um acordo parcial entre esses modelos e a realidade (THRESH, 1983): com quantidades pequenas de doença, os modelos ficam próximos da realidade; à medida que a quantidade de doença aumenta, aumenta também o divórcio entre realidade e modelo. Esse resultado nada tem de surpreendente: tanto o modelo exponencial quanto o linear permitem à quantidade de doença crescer até o infinito e nenhum processo biológico comporta-se dessa maneira. Nesse caso, a quantidade de plantas doentes não pode tender ao infinito, pois seu crescimento é limitado pela crescente indisponibilidade de plantas sadias. Um fator de correção obviamente faz-se necessário, fator que reduza a velocidade de crescimento da doença proporcionalmente à diminuição da oferta de plantas sadias. A equação de juros compostos pode, assim, ser alterada para

$$dx / dt = rx(1 - x)$$

onde $(1 - x)$ representa a quantidade de tecido sadio (x , neste contexto, é sempre expresso em proporção de doença). A integração dessa diferencial produz

$$\ln(x / (1 - x)) = \ln(x_0 / (1 - x_0)) + rt$$

Em consequência, o valor da taxa r (chamada de taxa aparente de infecção por VANDERPLANK, 1963) é calculado por

$$r = (1 / t)(\ln(x / (1 - x)) - \ln(x_0 / (1 - x_0)))$$

A curva descrita por essa equação tem a forma de 'S', é conhecida pelo nome de curva logística e pode ser linearizada plotando-se na ordenada $\ln(x / (1 - x))$ ao invés

de x . O valor de $\ln(x / (1-x))$ é conhecido pelo nome de logito de x . É digno de nota que o modelo logístico confunde-se com o modelo exponencial para baixas quantidades de doença (aproximadamente 5% ou 0,05 de proporção de doença). As diferenças são crescentes à medida que x aproxima-se de 1.

Pelo mesmo raciocínio, a equação de juros simples pode ser alterada para

$$dx / dt = QR(1-x)$$

onde $(1 - x)$ representa a quantidade de tecido sadio. A integração dessa diferencial produz

$$\ln(1 / (1 - x)) = \ln(1 / (1 - x_0)) + QRt$$

O produto QR (quantidade de inóculo inicial e taxa de infecção) é calculado por

$$QR = (1 / t)(\ln(1 / (1 - x)) - \ln(1 / (1 - x_0)))$$

A curva descrita por essa equação é conhecida pelo nome de curva monomolecular (inicialmente usada para descrever reações químicas monomoleculares de primeira ordem) e pode ser linearizada plotando-se na ordenada $\ln(1/(1-x))$ ao invés de x . O valor $\ln(1/(1-x))$ é conhecido pelo nome de monito de x . A exemplo dos modelos exponencial e logístico, aqui também, para baixos valores de x (até aproximadamente 5% ou 0,05), os modelos linear e monomolecular confundem-se. As diferenças, porém, acentuam-se à medida que x aproxima-se de 1.

Curvas em forma de 'S' (curva logística, por exemplo) costumam indicar que, pelo menos na epidemiologia de doenças fúngicas, *“plantas infectadas durante o ciclo da cultura servem de fonte de inóculo para novas infecções durante o mesmo ciclo”*, o que caracteriza uma doença de juros compostos ou policíclica. Nunca é demais lembrar o perigo de inferir o processo biológico a partir apenas de um simples ajuste de curva (PFENDER, 1982; CAMPBELL; MADDEN, 1990). Essa prática, no entanto, desde que feita com o devido cuidado, pode contribuir para um melhor entendimento do processo epidêmico.

Para o caso da maioria das fitoviroses (e para doenças causadas por outros patógenos transmitidos por vetores, como *Xylella fastidiosa* em diversos hospedeiros)

deve-se considerar um complicador adicional nesse tipo de análise: o aspecto de 'S' da curva de progresso pode não indicar transmissão de planta para planta (do hospedeiro primário ou econômico) dentro de um ciclo da cultura e, sim, crescimentos logísticos da população virulífera do vetor ou da população de plantas silvestres (hospedeiro secundário) portadoras do vírus, ou de ambas. O progresso do vírus do 'rayado fino' em milho (*Mayze rayado fino virus* - MRFV), assim, é explicado melhor pelo aumento logístico da população de *Dalbulus maidis* que pela transmissão do vírus de planta para planta. Esse patossistema caracteriza-se por longa latência do patógeno tanto na planta quanto no vetor (GÁMEZ; SAAVEDRA, 1986), de tal modo que não mais que dois ciclos da doença, em condições ideais de ambiente, poderiam ser completados durante o ciclo do hospedeiro.

Situação análoga ao patossistema 'rayado fino' /milho/ *D. maidis* pode acontecer por diversas outras razões: o vírus do amarelo-necrótico da alface (*Lettuce necrotic yellows virus* – LNYV), por exemplo, é transmitido de forma persistente pelo afídeo *Hyperomyzus lactucae* a partir da planta daninha *Sonchus oleraceus*; esse afídeo, no entanto, é incapaz de transmitir o vírus a partir de alface (GARRETT; RUESINK; McLEAN, 1986). Claramente, portanto, o amarelo-necrótico em alface é monocíclico (no hospedeiro primário), a despeito de sua curva de progresso ser, muitas vezes, em forma de 'S', fato que pode ser explicado pelo crescimento da população do vetor, ou pelo crescimento da doença em *S. oleraceus*, ou por ambos os motivos.

Uma curva monomolecular de progresso da doença, ao contrário dos dois casos precedentes, já fornece informação mais confiável a respeito do processo biológico envolvido: desde que o fato repita-se de forma consistente, é plausível a suposição de ausência de movimentação do vírus de planta para planta durante o ciclo do hospedeiro, o que caracteriza uma doença de juro simples ou monocíclica; além disso, nesse caso, infere-se que a população de vetores virulíferos e a população de hospedeiros secundários infecciosos devem se manter constantes durante o ciclo da cultura.

Doenças causadas por fungos e bactérias, com algumas exceções (as murchas vasculares, entre outras), são essencialmente policíclicas. As palavras de

Gäumann (1950), transcritas a seguir, não deixam dúvida quanto a esse fato e formam a base do raciocínio epidemiológico em vigor: *“Uma doença infecciosa pode se manter unicamente por meio de contínuas reinfecções baseadas na cadeia de infecção. Caso estas infecções sejam interrompidas, a doença desaparece. Por cadeia de infecção entende-se a transmissão contínua, seriada, de material infectivo de uma planta para outra”*.

E as viroses, como se comportam a esse respeito? Os clássicos textos de epidemiologia de doenças de plantas (VANDERPLANK, 1963; ZADOKS; SCHEIN, 1979; CAMPBELL; MADDEN, 1990; KRANZ, 1996) raramente cuidam do assunto e mesmo os livros mais recentes o ignoram (JONES, 1998). Entre os virologistas, é comum as viroses com vetor serem consideradas policíclicas (a grande maioria) e aquelas desprovidas de vetor, monocíclicas (umas poucas). A favor dessa idéia estão as inúmeras curvas de progresso em forma de ‘J’ ou ‘S’ publicadas na literatura (por exemplo, THRESH, 1983; NUTTER, 1997).

Um exame atento da realidade, porém, aponta para outra direção. Assim, somente aquelas viroses de curta latência (em relação à duração do ciclo da planta) – cujos vetores mantêm relação não-persistente com os respectivos vírus e que rapidamente podem transmitir o patógeno após a aquisição (curta latência no vetor) – são policíclicas ou de juro composto (ZADOKS, 1999). As demais – seja por apresentarem longa latência no hospedeiro, seja por apresentarem longa latência no inseto, seja por seus vetores serem incapazes de adquirir o vírus em seus hospedeiros econômicos – são monocíclicas ou de juro simples.

É importante registrar a existência de um grupo de transição entre as fitoviroses monocíclicas e as fitoviroses policíclicas. Esse grupo – a depender de condições do inóculo e do ambiente – pode completar dois ou três ciclos de infecção durante o ciclo de crescimento do hospedeiro, o que tecnicamente configura doença policíclica, mas que na prática (inclusive para o controle da doença) está mais próxima de patossistemas monocíclicos.

Doenças monocíclicas típicas – como as murchas causadas por *Verticillium*, *Fusarium* e *Ralstonia* – são exemplos de doenças poliéticas (ZADOKS, 1974). Uma das

características epidemiológicas mais marcantes desses patógenos é a incapacidade de causar epidemia numa determinada estação de cultivo caso o inóculo inicial seja baixo. Epidemias só ocorrerão caso repita-se o plantio do mesmo hospedeiro nas estações subseqüentes, dando, assim, oportunidade para o paulatino aumento do inóculo inicial de um plantio para outro (ZADOKS & SCHEIN, 1979; BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1996).

Fitoviroses monocíclicas transmitidas por vetores não-persistentes (como, por exemplo, a doença causada em alface pelo vírus do amarelo-necrótico), constituem a exceção que confirma a regra. Epidemias severas podem ocorrer na primeira estação de cultivo caso o vetor multiplique-se rapidamente e haja um mínimo de hospedeiros secundários infectados na área. A diminuição do inóculo inicial – medida de controle sempre eficiente para *Verticillium*, *Fusarium* e *Ralstonia* – terá pouca eficiência nesse caso. Diversos patossistemas viróticos comportam-se dessa maneira (THRESH, 1983).

2.3.2 Dinâmica espacial

Considerável progresso na análise dos padrões espaciais de epidemias tem ocorrido nas últimas duas décadas (JEGER, 1989; MADDEN, 1989; MADDEN; HUGHES, 1995; HUGHES et al., 1997). Padrão espacial em fitopatologia pode ser definido como a distribuição de plantas doentes, umas em relação às outras (GILLIGAN, 1982). Esses padrões, no agroecossistema, têm origem nas interações diretas ou indiretas entre agente causal, hospedeiro (primário e secundário), ambiente, vetor e homem. A análise desses padrões pode levar a inferências sobre o comportamento de vetores (MADDEN et al., 1995; GOTTWALD et al., 1997), a resistência de variedades (LARANJEIRA, 1997), a eficiência de fungicidas (GOTTWALD, 1995) ou, ainda, a influência do vento (GOTTWALD et al., 1993) ou da chuva (AGOSTINI; GOTTWALD; TIMMER, 1993) na disseminação de patógenos e de seus vetores.

Não há mais que três possibilidades para a distribuição (ou padrão) espacial de plantas doentes numa determinada área: ao acaso, agregada ou regular. A distribuição regular é incomum na área fitopatológica. Um método bastante utilizado em fitopatologia para a análise espacial de epidemias é baseado no conceito de *quadrats*,

que pode ser visualizado como uma grelha quadriculada sobreposta ao mapa do campo experimental; nesse mapa, cada planta é identificada como sadia ou doente; o *quadrat*, que pode ser quadrado ou retangular, é a unidade da grelha. Dois métodos de análise utilizando *quadrats* são utilizados neste trabalho: o primeiro fornece uma visão fotográfica, pontual, do padrão de distribuição de plantas doentes numa determinada área (índice de dispersão); o segundo possibilita uma visão dinâmica da evolução dos padrões de agregação (lei de Taylor modificada) em função do tempo (e da incidência).

O grande número de vetores (insetos de várias ordens, ácaros, nematóides, fungos) e a complexidade das relações vetor-patógeno-hospedeiro-ambiente fazem dos vírus o grupo de patógenos com maior diversidade de padrões espaciais. Assim, padrões altamente agregados são encontrados, por exemplo, no patossistema cacau/vírus do intumescimento da haste (*Cocoa swollen shoot virus* - CSSV)/*Planococcoides njalensis* (THRESH, 1988) e, ao contrário, padrões ao acaso, no patossistema citros-vírus da tristeza (*Citrus tristeza virus* - CTV)-*Aphis gossypii* (nos E.U.A., Espanha e Israel – GOTTWALD et al., 1996a). Entre esses extremos, há exemplos de vários padrões intermediários de agregação (MADDEN; PIRONE; RACCAH, 1987; HUGHES; MADDEN, 1992; 1993), inclusive para o mesmo vírus da tristeza dos citros, mas em regiões onde *Toxoptera citricida* é o vetor predominante (GOTTWALD et al., 1996b; 1997; GOTTWALD; GARNSEY; BORBÓN, 1998; GOTTWALD et al., 1999).

Para a grande maioria das doenças causadas por fungos e bactérias, o padrão espacial de plantas doentes é governado pelas características intrínsecas ao patógeno e por suas relações com o meio ambiente. Assim, a título de exemplo, as ferrugens exibem padrão espacial moderadamente agregado em virtude do balanço entre disseminação pelo vento (longa, média e curta distâncias) e disseminação pela chuva (curta e média distâncias); neste caso, os uredósporos formados na superfície foliar podem ser dispersos pelos dois agentes de disseminação. Já muitas bactérias, como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, agente causal do cancro cítrico, exibem padrão espacial altamente agregado (no caso do cancro cítrico, especialmente na ausência da larva minadora, *Phyllocnistis citrella*), em virtude do papel indispensável

desempenhado pela chuva na dissolução da mucilagem que envolve as células bacterianas na superfície da lesão e, conseqüentemente, na disseminação da bactéria.

O caso dos vírus é diferente. Aqui, os padrões espaciais de plantas doentes variam desde altamente agregados, passando por inúmeros padrões levemente agregados, até casos de distribuição ao acaso: tudo depende das características intrínsecas ao vetor (ou aos vetores) e de suas relações com o meio ambiente (que inclui o próprio vírus).

Assim, patógenos diferentes (bactérias, fitoplasmas/espiroplasmas ou vírus), mas com vetores do mesmo grupo, devem exibir padrões espaciais semelhantes. Quase nada há na literatura sobre o assunto, mas o pouco que há indica que o conceito pode ser útil, como exemplificado pelos patossistemas

- citros/*Xylella fastidiosa*/diversos vetores (Cicadellidae),
- milho/complexo do enfezamento (fitoplasma – ‘maize bushy stunt phytoplasma’ – e espiroplasma – *Spiroplasma kunkelii*)/*Dalbulus maidis* (Cicadellidae) e
- milho/vírus do ‘rayado fino’ (MRFV)/*Dalbulus maidis* (Cicadellidae).

Apesar de envolverem, respectivamente, bactéria, fitoplasma/espiroplasma e vírus, todos eles exibem padrões espaciais semelhantes. O parâmetro *b* da lei de Taylor modificada, um atributo importante na caracterização espacial de espécies (TAYLOR, 1961; TAYLOR et al., 1988), assume valores de 1,13 ($P < 0,05$), para *Xylella fastidiosa* (LARANJEIRA, 1997), 1,10 ($P < 0,05$), para o complexo do enfezamento do milho (FOLEGATTI; AMORIM; LOPES; BERGAMIN FILHO, dados não-publicados) e 1,19 ($P > 0,05$), para o vírus do ‘rayado fino’ (MRFV) (dados de GÁMEZ; SAAVEDRA, 1986), o que indica padrão ao acaso ou de baixa agregação, provavelmente devido ao hábito dos vetores (Homoptera: Cicadellidae), que se instalam ao acaso na cultura e que, posteriormente, não costumam voar para plantas imediatamente vizinhas às aquelas em que se encontravam. Mais estudos sobre o assunto, nessa e em outras combinações hospedeiro/patógeno/vetor, são necessários antes que a generalização aqui proposta seja validada.

Pelo mesmo raciocínio, um mesmo patógeno, quando disseminado por diferentes vetores (com diferentes comportamentos), deve apresentar padrões espaciais distintos em cada situação. O vírus da tristeza do citros é um bom exemplo desse princípio. Nos países onde o afídeo *T. citricida* não ocorre e *A. gossypii* é o principal vetor (Oeste dos E.U.A., Espanha e Israel), a doença exibe padrão espacial ao acaso (MARCUS et al., 1984; GOTTWALD et al., 1996a); nas regiões ou pomares onde *T. citricida* predomina, o padrão é agregado; nas regiões ou pomares onde ambos os vetores são abundantes, o padrão espacial caracteriza-se pelo aparecimento de focos satélites (formados principalmente por *A. gossypii*) e posterior crescimento desse foco (por ação de *T. citricida*), o que produz um padrão de agregação intermediária, de crescimento temporal mais rápido e de mais difícil controle (GOTTWALD et al., 1996b; 1997; GOTTWALD; GARNSEY; BORBÓN, 1998; GOTTWALD et al., 1999).

2.4 Materiais e métodos

2.4.1 Caracterização dos locais de plantio e instalação das armadilhas adesivas

2.4.1.1 Sumaré

Dois ensaios de campo foram realizados numa propriedade localizada no município de Sumaré, Estado de São Paulo, para avaliar a dinâmica espacial e temporal do ToYVSV.

A área comercial escolhida para o primeiro ensaio tinha uma população de aproximadamente 500 mil pés de tomate da variedade Alambra (Figura 1A). As mudas, produzidas em bandejas em local protegido, foram transplantadas no campo entre os dias 20 e 23 de agosto de 2004. Uma semana após o transplante foi efetuada a demarcação das áreas experimentais e iniciadas as avaliações, que prosseguiram durante todo o segundo semestre do ano. Foram demarcadas oito parcelas (blocos). As parcelas numeradas de 1 a 4 estavam dispostas aleatoriamente em locais periféricos à totalidade da área plantada, enquanto as parcelas numeradas de 5 a 8 se localizaram aleatoriamente no interior da mesma área. Cada parcela constou de catorze linhas com

trinta e seis plantas cada uma, totalizando 504 plantas por parcela, num total de 4.032 plantas avaliadas durante todo o período.

O segundo ensaio foi realizado na mesma propriedade, mas em área distinta da do primeiro ensaio. As mudas de tomateiro da variedade Alambra também foram produzidas em bandejas em local protegido. O transplante em campo foi feito entre 10 e 12 de março de 2005, totalizando aproximadamente de 250 mil plantas. Uma semana após o transplante, procedeu-se da mesma forma que no primeiro ensaio. Demarcaram-se as parcelas, em numero de quatro, e as avaliações prosseguiram durante o primeiro semestre de 2005. As parcelas 1 e 2 estavam dispostas perifericamente à área plantada e as parcelas 3 e 4 no interior da plantação. Cada parcela constou de catorze linhas com trinta e seis plantas cada uma, totalizando 504 plantas por parcela, num total de 2.056 plantas avaliadas durante todo o período.

Os tratos fitossanitários foram efetuados conforme hábito do produtor, com pelo menos duas aplicações semanais de agroquímicos e a adubação foi realizada por fertirrigação através de gotejo.

2.4.1.2 Elias Fausto

Os ensaios para a avaliação da dinâmica espacial e temporal do ToYVSV em plantios localizados no município de Elias Fausto, Estado de São Paulo, foram conduzidos em tomates da variedade Ikram cultivados em casas-de-vegetação (estufas plásticas) (Figura 1B).

Na primeira fase de observações foram avaliadas plantas cultivadas nas casas-de-vegetação 1, 2 e 3 (Figura 1B). As mudas de tomate foram transplantadas entre os dias 28 e 29 de dezembro de 2004 e as avaliações iniciadas na segunda semana de janeiro de 2005. Cada casa-de-vegetação foi considerada uma parcela e cada uma continha oito linhas com noventa e oito plantas por linha (mais ou menos uma), totalizando aproximadamente 2.352 plantas. Foram feitas oito avaliações, sendo a última no dia 02/03/2005.

Na segunda fase de observações foram avaliadas plantas cultivadas nas casas-de-vegetação 4 e 5 (Figura 1B), cujas mudas foram transplantadas entre os dias 15 e 16 de março de 2005. As avaliações tiveram início na última semana de março. Cada parcela apresentava oito linhas com oitenta e duas plantas por linha (mais ou menos duas), totalizando aproximadamente 1.312 plantas. Foram feitas nove avaliações, sendo a última no dia 25/05/2005.

Na terceira fase de observações foram avaliadas as plantas das casas-de-vegetação 6, 7 e 8 (Figura 1B). As mudas de tomate foram transplantadas entre os dias 12 e 13 de abril de 2005 e as avaliações iniciadas na semana seguinte. Cada casa-de-vegetação continha oito linhas com noventa e oito plantas por linha (mais ou menos duas plantas), totalizando aproximadamente 2.352 plantas. Foram feitas oito avaliações, sendo a última no dia 14/06/2005.

A vegetação predominante ao redor da área das casas-de-vegetação era a cana-de-açúcar, exceto na área ao redor da sede da propriedade, que continha um gramado, diversas plantas ornamentais e algumas frutíferas.

Os tratos fitossanitários foram efetuados conforme hábito do produtor, com pelo menos duas aplicações semanais de agroquímicos e a adubação foi realizada por fertirrigação através de gotejo.

2.4.2 Avaliação da incidência de viroses

As avaliações de plantas de tomateiro infectadas com o ToYVSV foi feita com base nos sintomas foliares dessa virose. Esses se caracterizam inicialmente pelo aparecimento de riscas amarelas nas nervuras (Figura 2A), que progridem para manchas de mosaico amarelo e limbo foliar ondulado. Há também redução no tamanho das folhas.

Em face da constatação de plantas com sintomas típicos do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro, nos ensaios em campo, também foram feitas avaliações sobre a sua incidência. Os principais sintomas dessa moléstia são o amarelecimento e

Figura 1 - Vista parcial da área comercial de tomateiro cv. Alambra no município de Sumaré (A) e vista aérea das casas de vegetação (estufas) para o cultivo protegido de tomateiro cv. Ikram, localizadas no município de Elias Fausto (B)

enrolamento das folhas das porções medianas e inferiores das plantas de tomate (Figura 2B).

As avaliações foram realizadas semanalmente a partir da data do transplante das mudas até o final do ciclo de cultivo, em cada uma das parcelas.

A identificação do ToYVSV foi feita por meio de PCR e análise da sequência de nucleotídeos de parte do DNA-A, enquanto a indexação para o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro foi feita por DAS-ELISA com antissoro contra o *Potato leafroll virus* (PLRV), cujos procedimentos estão descritos em 2.4.4 e 2.4.5.

Figura 2 - Sintoma de mosaico amarelo nas nervuras associado com a infecção com o Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) (A) e sintomas de amarelo e enrolamento da folha baixa do tomateiro associados com a infecção com o vírus do amarelo baixo do tomateiro (B)

2.4.3 Monitoramento da população de aleirodídeos

O monitoramento de insetos da família Aleyrodidae, à qual pertence a mosca branca *B. tabaci*, vetora de begomovirus, foi realizado nas parcelas demarcadas nos plantios de tomateiro em campo e no interior das casas-de-vegetação. Este foi feito através de contagens dos aleirodídeos coletados por armadilhas adesivas amarelas colocadas em cada parcela. Cada armadilha de dimensões 09 x 14 cm possuía as duas faces amarelas, recobertas por uma cola, onde os insetos ficavam aderidos.

No ensaio em campo, as armadilhas foram colocadas a uma altura de 50 cm do solo, presas a uma estaca de madeira. Foi colocada uma armadilha em cada

parcela, localizada no meio da décima linha da parcela. Nos plantios em casa-de-vegetação, as armadilhas se encontravam a uma altura de 1,70 m do solo, presas ao arame de sustentação da linha, ao qual se prendiam os fitilhos de condução das plantas. Em cada casa-de-vegetação foi colocada uma armadilha, localizada no meio da casa entre a quarta e quinta linha.

A cada catorze dias, no ensaio em campo, e sete dias, no ensaio em casa-de-vegetação, as armadilhas foram recolhidas e substituídas por outras novas. As armadilhas recolhidas foram trazidas para o Laboratório de Virologia Vegetal, ESALQ/USP para a contagem dos aleirodídeos. Esta foi feita em ambas as faces das armadilhas, com o auxílio de um estéreomicroscópio, baseando-se nas características dos adultos.

2.4.4 PCR e seqüenciamento para o begomovirus

2.4.4.1 Extração e amplificação do DNA total por PCR

Cerca de cem plantas sintomáticas foram coletadas em cada ensaio (Sumaré e Elias Fausto).

A extração do DNA genômico (total) das plantas supostamente infectadas com o ToYVSV foi realizada conforme protocolo descrito por Edwards; Johnstone e Thompson (1991), a partir de tecido foliar que foi macerado em tubo de 1.000 µL, na temperatura ambiente, sem adição de tampão, por cerca de 15 segundos. Posteriormente, 400 µL de tampão de extração (200 mM de Tris HCl pH 7,5; 250 mM de NaCl; 25 mM de EDTa e 0,5% de SDS) foram adicionados ao tubo e vigorosamente misturados por 5 segundos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.000 g por um minuto e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, onde se misturou um volume igual de isopropanol. Essa mistura permaneceu em temperatura ambiente por 2 minutos, sendo em seguida centrifugada por 5 minutos a 13.000 g. O precipitado foi seco ao ar e ressuspendido em 100 µL de água estéril.

A amplificação do DNA viral por PCR foi realizada com 2,5 μ L do DNA extraído, misturados com 5 μ L do tampão 10 X de PCR, 2 μ L de 25 mM de MgCl, 0,6 μ L de uma mistura de dNTP'S a 10mM, 2,5 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega), 20 pmoles dos pares de oligonucleotídeo iniciadores, completando o volume para 25 μ L com água destilada estéril. O controle negativo foi representado por DNA total extraído de plantas de tomate sadias.

Utilizou-se o par de oligonucleotídeos degenerados AV494 (5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3') e AC1048 (5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 576 pb do DNA A, referente ao gene da proteína capsidial dos begomovirus (WYATT; BROWN, 1996) e o par de oligonucleotídeos degenerados PBL1v2040 (5'-GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA-3') e PCRC1 (5'-CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA-3'), que amplifica um fragmento de aproximadamente 500 a 650 pb do DNA B (ROJAS et al., 1993).

O regime utilizado junto ao termociclador foi de 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 33 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos, finalizando-se o processo com 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 μ g.mL⁻¹ de brometo de etídeo.

2.4.4.2 Seqüenciamento parcial do DNA A

Oito isolados do ToYVSV coletados em plantas de tomate em Elias Fausto e amplificados conforme descrito no item anterior tiveram o DNA A seqüenciado.

O kit Templiphi DNA amplification (Amersham Biosciences), utilizado segundo recomendações do fabricante, amplificou os componentes virais. De posse do DNA A amplificado e dos iniciadores já mencionados foi utilizado o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems) para a reação de PCR e posterior seqüenciamento direto do produto obtido. Essa etapa foi realizada no laboratório de Genética Molecular, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ.

A reação de amplificação foi realizada com 400-500 ng de DNA A amplificado pelo kit Templiphi DNA amplification, 3,2 pmol de primer, 2,0 µL de tampão 2,5X, 2,0 µL de Big Dye num total de 10 µL em água estéril. O regime do termociclador para esse kit foi de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, finalizando com 2 minutos a 4°C. Ao conteúdo desses tubos foram adicionados 10 µL de água estéril e 30 µL de isopropanol 100%. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos, sendo posteriormente centrifugada a 13.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O precipitado foi dissolvido em 250 µL de etanol 70 %. O tubo foi agitado e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco por 1 minuto a 90°C, sendo em seguida dissolvido em 3 µL de tampão de carregamento. Antes das amostras serem aplicadas no gel de poliacrilamida para o seqüenciamento, estas foram desnaturadas por 3 minutos a 90°C. O seqüenciamento foi realizado em aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer™ de acordo com o protocolo descrito nos kits utilizados.

As seqüências de nucleotídeos obtidas apenas para o componente A do genoma viral, oriunda dos eletroferogramas, foram alinhadas pelo programa CAP 3 de onde foi extraída a seqüência consenso final (contig) para as regiões do DNA A correspondentes as proteínas de transativação (AC3) e capsidial (AV1). A procura no “GenBank” de outros isolados de begomovirus para comparação de identidade com o isolado estudado foi realizada pelo programa Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

O alinhamento da seqüência consenso foi realizado pelo programa Multalin (INRA) no endereço <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

A tradução da seqüência de nucleotídeos obtida em aminoácidos deduzidos foi realizada pelo programa Translate, disponível no endereço <http://ca.expasy.org/tools/dna.html>. A comparação desta com aquelas disponíveis no “GenBank” foi realizada pelo programa Blast, disponibilizado no endereço do NCBI.

2.4.5 DAS-ELISA para o polerovirus

A confirmação da infecção dos tomateiros com o vírus do amarelo baixeiro foi feita através do teste serológico de ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”) do tipo DAS (“Double Antibody Sandwich”) (VAN REGENMORTEL; DUBS, 1993), com algumas modificações, utilizando antissoro policlonal contra o vírus do enrolamento da folha da batata (*Potato leafroll virus* - PLRV). A imunoglobulina G (IgG) contra o PLRV e a mesma IgG conjugada com a enzima fosfatase alcalina foram fornecidas pelo Dr. André N. Dusi, da EMBRAPA Hortaliças. Esse teste foi realizado no laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Foram amostradas cem folhas de plantas de tomate sintomáticas do primeiro ensaio de campo em Sumaré e os respectivos extratos foram indexados para a presença do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro. Como controle negativo foram usados extratos de plantas sadias de tomate e como controle positivo os extratos de plantas de batata sabidamente infectadas com o PLRV, cedidas pelo Dr. José Alberto Caram de Souza Dias, do IAC/APTA de Campinas.

Uma placa de ELISA foi incubada com 100 µL/pocinho da IgG contra o PLRV, diluída 1:1.000 em tampão carbonato (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M Na₃HCO₃, pH 9,6), por doze horas a 10°C, seguida de cinco lavagens consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂HPO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4, adicionado de 0,5 mL de Tween 20 por litro). Amostras individuais de tecido vegetal foram maceradas em almofariz, na diluição 1:10, na presença de tampão PBS + poli vinil pirolidona (PVP) a 2% + albumina de soro bovina a 0,2%. Cada amostra foi distribuída em dois pocinhos de uma placa de ELISA, colocando-se 100 µL do extrato em cada um. A placa foi incubada por doze horas a 10°C, seguida de cinco lavagens consecutivas com PBS-Tween. Posteriormente, 100 µL da IgG contra o PLRV conjugada com a fosfatase alcalina, diluída 1:1.000 em tampão PBS + PVP + albumina, foram adicionados em cada pocinho. A placa foi mais uma vez incubada por doze horas a 10°C e posteriormente submetida a cinco lavagens consecutivas com PBS-Tween. Finalmente, 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA S-0942), diluído em

tampão de dietanolamina ($0,6 \text{ mg.mL}^{-1}$), foram adicionados por pocinho. A placa foi mantida a temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A reação foi avaliada com base nos valores de absorbância mensurados pelo leitor de ELISA da marca Metertech Σ 960, no comprimento de onda de 405 nm. Uma amostra foi considerada positiva quando o valor de absorbância foi igual ou superior a três vezes o valor de absorbância de extratos de plantas sadias.

2.4.6 Análise epidemiológica

Os progressos temporal e espacial de plantas sintomáticas infectadas com o ToYVSV e/ou vírus do amarelo baixeiro do tomateiro foram estudados em todas as parcelas dos ensaios em campo. Nas casas-de-vegetação foram analisados os progressos temporal e espacial das plantas sintomáticas infectadas apenas com o begomovirus.

2.4.6.1 Análise temporal

A análise temporal constou da plotagem cumulativa e não-cumulativa da incidência de plantas sintomáticas em função do tempo para todas as parcelas, conforme metodologia descrita por Bergamin Filho et al. (1998). Outros modelos epidemiológicos comumente utilizados em epidemiologia – como o exponencial ($dx/dt=rx$), o logístico [$dx/dt=rx(1-x)$], e o de Gompertz [$dx/dt=rx(-\ln x)$] – onde x é a incidência de plantas sintomáticas (em proporção), r , a taxa de progresso dos sintomas, e t , o tempo, não foram ajustados aos dados de progresso dos sintomas em virtude da forma típica de todas as curvas, ou seja, todas seguiram a família de curvas linear/monomolecular, descritas pelas diferenciais $dx/dt=QR$ e $dx/dt=QR(1-x)$, respectivamente.

2.4.6.2 Análise espacial

A análise espacial dos dados se deu pelo mapeamento da área a partir de dados binários (presença ou ausência de sintomas) provenientes dos mapas originais. A cada levantamento, as novas plantas sintomáticas eram incorporadas aos mapas anteriores, obtendo-se, assim, o número acumulado de plantas afetadas e suas

respectivas posições para cada data de avaliação. Os mapas básicos de cada área foram confeccionados em planilha do Microsoft Excel.

Após análise preliminar dos dados (UPTON; FINGLETON, 1985), *quadrats* de 2x2 e 5x2 foram definidos de modo a conter um número fixo de plantas quando sobrepostos aos mapas. Para cada *quadrat* foi determinada a proporção de plantas afetadas em cada avaliação e calculada a incidência (p) na parcela. Essa variável pode ser definida como a estimativa da probabilidade de uma planta estar sintomática numa determinada área (MADDEN; HUGHES, 1995) e é calculada por $p = \Sigma X_i / nN$, onde ΣX_i é o somatório do número de plantas sintomáticas em cada *quadrat* i , n é o número de plantas em cada *quadrat* e N é o número total de *quadrats* em cada área. Incidência (p), assim calculada, é a base para o cálculo do índice de dispersão (MADDEN; HUGHES, 1995) e para a aplicação da lei de Taylor modificada (MADDEN; HUGHES, 1995).

- **Cálculo do índice de dispersão:** o índice de dispersão (D) é função da variância observada (V_{obs}) e da variância binomial (V_{bin}). O valor de D foi estimado para cada parcela e cada avaliação por meio da equação (Gottwald et al., 1996a): $D = V_{obs}/V_{bin}$, onde, de acordo com Hughes et al. (1997), $V_{obs} = \Sigma (X_i - np)^2 / n^2(N-1)$ e $V_{bin} = p(1-p)/n$.
- **Lei de Taylor modificada:** a lei de Taylor modificada (MADDEN; HUGHES, 1995) relaciona, por meio de polinômio de primeiro grau, a variância observada (V_{obs}) e a variância esperada para uma distribuição aleatória ou ao acaso (V_{bin}). Quando os dados são expressos em incidência, a distribuição binomial é a que propicia o melhor ajuste para condições de aleatoriedade (MADDEN; HUGHES, 1995). Nesse caso, $\log(V_{obs}) = \log(A) + b\log(V_{bin})$, onde A e b são parâmetros. As regressões foram calculadas por meio do método dos quadrados mínimos. Considerou-se como variável independente o logaritmo das variâncias binomiais estimadas para cada avaliação e como variável dependente, o logaritmo das variâncias observadas.
- **Áreas isópatas:** o estabelecimento das áreas isópatas para cada local de avaliação foi feito no utilitário Statistica, através do procedimento de uniformização dos quadrados mínimos ponderados pela distância. Nessa determinação, foi utilizada a

matriz dos valores não-transformados de proporção de plantas afetadas de cada *quadrat*. Para cada local, o número de áreas isópatas previamente escolhidas foi igual. Entretanto, os níveis de cada área isópata, para cada local, foram arbitrariamente escolhidos, com o objetivo de realçar possíveis diferenças.

2.4.7 Avaliação de danos à produção e à qualidade dos frutos

2.4.7.1 Danos à produção

Do total de 4.032 plantas dos oito blocos avaliados no primeiro ensaio em condições de campo em Sumaré, vinte e seis plantas sadias, vinte e uma plantas com sintomas do ToYVSV, catorze plantas com sintomas do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro e duas plantas com infecção mista, marcadas ao acaso, tiveram individualmente seus frutos colhidos e pesados (quilos acumulados por planta) durante todo o ciclo de cultivo. As médias foram contrastadas pelo teste T, a 5% de probabilidade, através do aplicativo SAS, excetuando os dados das plantas com infecção mista.

2.4.7.2 Danos à qualidade

Frutos de uma data de colheita, portanto com idade e fenologia muito similares, foram escolhidos para a análise qualitativa. Esses frutos foram selecionados e agrupados em quatro categorias (tratamentos) conforme as condições das plantas: sadias, infectadas pelo ToYVSV, infectadas pelo vírus do amarelo baixeiro e com infecção mista. Cada tratamento teve quatro repetições com cinco frutos cada uma. Extratos homogêneos das polpas dos frutos foram obtidos com um aparelho do tipo “mixer” de bancada. Foram avaliados os seguintes caracteres: teor de sólidos solúveis (SS, °Brix); pH; acidez total titulável (ATT) e ratio ($SS.ATT^{-1}$) (MANTOVANI et al., 1990).

O teor de sólidos solúveis (°Brix) foi determinado pela média de duas leituras obtidas de uma gota de polpa num refratômetro. O pH foi obtido pela média de duas leituras em medidor de pH. A determinação da ATT se deu pela diluição de 10 g da polpa em 90 mL de água destilada, sendo titulada com uma solução de hidróxido de sódio a 0,1 N, até que a solução alcançasse pH 8,1 (ponto de viragem da fenolftaleína).

Os valores obtidos para cada um dos caracteres avaliados foram submetidos a análise de variância, sendo as médias contrastadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do aplicativo SAS.

2.5 Resultados e discussão

2.5.1 Identificação dos vírus predominantes nos tomates

Cerca de cem amostras de tomateiro com sintomas de riscas amarelas nas nervuras e manchas de mosaico amarelo (Figura 2A) foram coletadas no primeiro ensaio em campo no município de Sumaré. Em cada fase de observação, no município de Elias Fausto, foram amostradas cerca de oitenta plantas com o sintoma de manchas de mosaico amarelo. O DNA total extraído das amostras com o sintoma associado ao begomovirus foi analisado por PCR. Em cinquenta amostras coletadas em Sumaré e sessenta e cinco em Elias Fausto foi possível amplificar fragmentos do DNA A e DNA B com os respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores universais para begomovirus.

A Figura 3 ilustra os tamanhos dos fragmentos correspondentes ao DNA A e DNA B, respectivamente, amplificados a partir de ácidos nucléicos extraídos de tomateiros sintomáticos coletados no município de Elias Fausto, durante a terceira fase de observações. Os extratos de DNA total de amostras coletadas de plantas sintomáticas que deram reação negativa em PCR foram submetidos a uma nova análise, após re-amostragem das plantas no campo. Nessa nova amostragem, todavia, as folhas foram colhidas dos ponteiros das plantas. Os resultados de PCR foram positivos para todas as amostras. Nesse caso, pode-se observar a importância da idade do tecido vegetal na coleta de amostras foliares. Observação semelhante a essa também foi realizada pelo Dr. Renato de O. Resende (informação verbal) num ensaio realizado na Espanha.

Os produtos do PCR do DNA A, de oito amostras coletadas em Elias Fausto, foram seqüenciados e a seqüência consenso de nucleotídeos foi usada para a identificação da espécie de begomovirus presente nos tomates. A seqüência obtida

engloba parte do gene AV1 (proteína capsidial) e AC3 (REn), com um total de 810 nucleotídeos (Figura 4). Uma primeira análise de identidade com outros begomovirus, cujas seqüências de nucleotídeos da mesma região genômica estão depositadas no GenBank, revelou que o vírus em estudo seria uma estirpe da espécie putativa Tomato golden vein vírus – ToGVV (gi/53850887), uma vez que os valores de identidade para as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos foram de 95% e 96,7%, respectivamente (Tabela 1 e Figura 5). Essa possível nova espécie foi proposta por Albuquerque et al. (2004) após análise de amostras de tomateiro infectadas por begomovirus no Distrito Federal.

Quando Albuquerque et al. (2004) apresentaram essa possível nova espécie, basearam-se no fato de que a maior identidade encontrada (89%), entre a seqüência de nucleotídeos obtida de uma região do genoma do DNA A, de aproximadamente 1,3 kb, envolvendo parte do gene AC1 (Rep), a região intergenérica (CRA), parte dos genes AV1 (proteína capsidial) e AC3 (REn) (Figura 4), e outras depositadas no GenBank, foi com a espécie putativa Tomato yellow vein streak virus ToYVSV (gi/56385116 e gi/1773322), isolados IAC e Brazil, respectivamente, relatada por Souza-Dias et al. (1996) e Faria et al. (1997). Naquela ocasião, essa proposta pareceu pertinente, uma vez que o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) estabelecia que identidades menores do que 90% na seqüência de nucleotídeos do genoma completo (DNA A) eram indicativas de espécies distintas (VAN REGENMORTEL et al., 2002).

Mais recentemente, todavia, a nova versão do ICVT (FAUQUET et al., 2005) estabelece que identidades menores do que 89% na seqüência de nucleotídeos do genoma completo (DNA A) e menores do que 90% na seqüência de aminoácidos da proteína capsidial são indicativas de espécies distintas dentro do gênero *Begomovirus*. Diante desses novos critérios, uma nova análise de identidade das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos das espécies putativas ToGVV, ToYVSV – IAC, ToYVSV - Brazil e do isolado de begomovirus do presente trabalho (ToYVSV – Elias Fausto), sugere tratar-se do mesmo vírus (Figura 4, Tabela 2). Em face desse fato e considerando-se os demais critérios estabelecidos para caracterização de espécies (FAUQUET et al., 2005), especialmente a similaridade dos sintomas descritos para

essas espécies putativas (ALBUQUERQUE et al., 2004; SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997), adotou-se neste trabalho o nome ToYVSV, por ser este o mais antigo (SOUZA-DIAS et al., 1996; FARIA et al., 1997). A sequência completa de nucleotídeos do DNA A desses isolados é necessária para a identificação definitiva dessa espécie putativa.

Cem amostras de folhas de tomateiro com sintomas de amarelo baixeiro coletadas em plantas no primeiro ensaio em campo em Sumaré tiveram seus extratos testados em DAS-ELISA. Sessenta amostras deram reação positiva com o antissoro contra o PLRV. Esse resultado, aliado aos sintomas de folhas basais amarelecidas e enroladas, encontrados nas plantas infectadas, sugere que o vírus associado a essas plantas seja o do amarelo baixeiro do tomateiro (Tomato yellow bottom leaf virus - TYBLV). Há necessidade de estudos complementares para a perfeita caracterização taxonômica desse vírus. Não foi constatada a presença de plantas com sintomas característicos dessa virose nos plantios de tomate em casas-de-vegetação.

2.5.2 Amostragem de aleirodídeos

Os valores correspondentes às contagens do número de aleirodídeos capturados nas armadilhas amarelas, durante as diferentes avaliações, em cada um dos ensaios, encontram-se nas Tabelas 3 e 4. De uma maneira geral, no ensaio em campo, durante todo o período de avaliação, foram capturados 1.364 aleirodídeos nas oito parcelas. Nas oito casas-de-vegetação foram capturados 1.355 aleirodídeos.

Deve-se esclarecer que não foram feitas análises para a identificação da *B. tabaci* entre os insetos capturados, nem a certificação de que havia insetos virulíferos. Por isso, o número de insetos capturados não pode ser relacionado diretamente com a incidência do ToYVSV. No entanto, é interessante relatar que durante todo o período de avaliações nos plantios de tomate em campo e nas casas-de-vegetação, nunca foram observadas colônias de aleirodídeos em qualquer planta. Isso se deve ao grande número de aplicações de inseticidas (2 a 3 vezes por semana) para o controle desse inseto.

Figura 3 – Amplificação por PCR dos fragmentos dos DNA A e B dos isolados de TYVSV amostrados em Elias Fausto

M - marcador de peso molecular 1 Kb, Promega

A - fragmento de aproximadamente 580pb,

B – fragmento de aproximadamente 500 pb.

1 e 2 - isolado proveniente da casa 6

3 e 4 - isolado proveniente da casa 6

5 e 6 - isolado proveniente da casa 7

7 e 8 - isolado proveniente da casa 8

Figura 4 – Diagrama representativo do DNA A linearizado dos begomovirus, indicando a região intergenérica (CRA), os genes AC1 (Rep; replication-associated protein), AV2 (MP; movement protein), AV1 (CP; capsid protein) e AC3 (REN; replication enhancer) (A); regiões seqüenciadas do DNA A do Tomato golden vein virus – PA-05, Tomato yellow vein streak virus – IAC, Brazil e Elias Fausto (B) e regiões de seqüências de nucleotídeos comuns entre esses begomovirus (C)

Tabela 1 - Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos (nt) e aminoácidos deduzidos (aa) das regiões AV1 (CP) e AC3 (REn) dos isolados do ToYVSV de tomateiros do município de Elias Fausto e outros begomovirus e uma espécie do gênero *Topocuvirus* depositados no GenBank

Vírus	Acesso	nt	aa
Tomato golden vein virus	gi 53850887	95,0	96,7
<i>Dicliptera yellow mottle virus</i>	gi 28974536	84,8	83,8
<i>Tomato sereve rugose virus</i>	gi 14009278	84,3	82,1
<i>Tomato rugose mosaic virus</i>	gi 10281644	83,8	84,2
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	gi 20149014	83,3	86,1
<i>Potato yellow mosaic Panama virus</i>	gi 2558627	83,1	83,2
<i>Tomato golden mosaic virus</i> -Yellow vein	gi 332213	83,0	87,7
Tomato yellow margin leaf curl virus	gi 40850598	82,7	84,3
Sinaloa tomato leaf curl vírus	gi 55956212	82,5	82,1
<i>Sida mottle vírus</i>	gi 20177128	81,6	79,1
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	gi 15667202	80,7	74,3
<i>Tomato pseudo-curly top virus</i> - topocuvirus	gi 20564194	43,1	47,2

Tabela 2 - Porcentagem de identidade entre as seqüências de nucleotídeos comuns (Figura 4, X, Y e Z) do Tomato golden vein virus - PA-05 (ToGVV-PA-05), Tomato yellow vein streak virus – IAC (ToYVSV-IAC), ToYVSV-Brazil e ToYVSV-Elias Fausto

Vírus	NCBI	X		Y			Z
		2	3	2	3	4	4
1 ToGVV-PA-05	gi 53850887	95,1	89	100	97,6	93,2	95
2 ToYVSV-IAC	gi 56385116		90,3		97,6	93,2	
3 ToYVSV-Brazil 1	gi 1773322					92,7	
4 ToYVSV-Elias Fausto	DQ 355977

Figura 5 – Dendrograma filogenético, baseado em 810 pares de bases do *Tomato yellow vein streak virus* (Elias Fausto - SP), juntamente com os begomovirus *Tomato golden vein virus* (gi|53850887|), *Dicliptera yellow mottle virus* (gi|28974536|), *Tomato severe rugose virus* (gi|14009278|), *Tomato rugose mosaic virus* (gi|10281644|), *Tomato chlorotic mottle virus* (gi|20149014|), *Potato yellow mosaic virus* (gi|2558627|), *Tomato golden mosaic virus – yellow vein* (gi|332213|), *Tomato yellow margin leaf curl virus* (gi|40850598|), *Sinaloa tomato leaf curl virus* (gi|55956212|), *Sida mottle virus* (gi|20177128|), *Pepper huasteco yellow vein virus* (gi|15667202|), e o topocovirus *Tomato pseudo-curly top virus* (gi|20564194|), construído com o método UPGMA, com 10000 bootstrap, utilizando modelos de substituição Jukes-Cantor, através do programa MEGA v.3.1

Portanto, é muito provável que a grande maioria, senão a totalidade, dos aleirodídeos capturados nas armadilhas adesivas veio de fora da cultura. Outro dado que chama a atenção é o número de insetos capturados no interior das casas-de-vegetação. Nestas, além das pulverizações, a proteção com tela deveria reduzir de maneira significativa a entrada desses insetos.

Polston et al. (1996) concluíram que, apesar das armadilhas adesivas serem amplamente utilizadas para estimar a população de adultos de mosca branca, elas não são úteis para estimar a população de insetos para estudos epidemiológicos por causa da pouca correlação positiva significativa encontrada entre o número de adultos capturados e a incidência de plantas doentes infectadas com o Tomato mottle virus (TMoV), mesmo que se leve em conta o período de latência.

Entretanto, é importante observar que uma pequena população de insetos na área de cultivo pode ser catastrófica, caso eles se encontrem virulíferos. Dessa forma o manejo da população de insetos vetores é de suma importância para prevenir a epidemia.

2.5.3 Avaliação da incidência de viroses em Sumaré e Elias Fausto

Na Tabela 5 são apresentadas as porcentagens de incidência do ToYVSV, avaliada com base nos sintomas, nas plantas de tomate dos oito blocos no ensaio em campo no município de Sumaré em 2004. Foram feitas dez avaliações durante um período de 63 dias. Nota-se que a incidência desse vírus no final do ciclo da cultura foi relativamente baixa, com uma média de 2,3% de plantas infectadas, ou seja, aproximadamente 93 plantas infectadas em 4.032 plantas avaliadas.

Em cultivos anteriores, no mesmo local, levantamentos não-sistemáticos indicaram incidências consideravelmente maiores. Durante o segundo semestre de 2003, por exemplo, foram encontradas incidências de plantas da variedade Alambra infectadas por esse begomovirus entre 58% e 100%. Em plantios cultivados durante o primeiro semestre de 2004 foram constatadas incidências entre 14% e 27% de plantas infectadas por esse vírus (Rezende, J. A. M.: dados não publicados).

Tabela 3 - Número de adultos de aleirodídeos capturados em armadilha adesiva nos blocos de tomateiro em campo no município de Sumaré

Datas	Blocos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
21/08/04	10	19	12	13	06	10	10	12
02/09/04	08	19	19	10	14	08	06	12
17/09/04	22	40	25	26	11	06	12	14
01/10/04	36	21	26	24	08	15	10	25
15/10/04	43	26	28	52	42	26	51	31
29/10/04	92	61	40	116	79	45	75	48
Total	211	186	150	241	160	110	164	142

Tabela 4 - Número de adultos de aleirodídeos capturados em armadilha adesiva nas casas-de-vegetação no município de Elias Fausto

Datas	Casas-de-vegetação							
	1	2	3	4	5	6	7	8
12/01/05	95	115	174	..	..	..	..	..
02/02/05	23	21	21	..	..	..	..	..
23/02/05	23	15	16	..	..	..	..	..
30/03/05	..	..	..	20	22	..	..	..
06/04/05	..	..	..	24	18	..	..	..
13/04/05	..	..	..	22	22	..	..	..
20/04/05	..	..	..	19	15	27	..	..
28/04/05	..	..	..	36	24	08	09	05
04/05/05	..	..	..	30	18	27	50	43
11/05/05	..	..	..	48	22	58	81	67
18/05/05	..	..	..	10	06	35	47	39
Total	141	151	211	209	147	155	187	154

Tabela 5 - Valores de incidência (%) do ToYSV e do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro em plantios de tomate cv. Alambra, em campo, no município de Sumaré, em 2004

Datas		Blocos							
de	1*	2	3	4	5	6	7	8	
Avaliações									
24/09/04	1,19	1,19	1,79	..	0,40	..	0,20	..	..
01/10/04	1,59	1,98	1,99	0,80	1,79	1,39	0,60	0,40	0,80
08/10/04	1,98	2,98	3,18	1,99	1,98	1,59	0,99	0,40	0,80
15/10/04	3,38	3,38	4,37	2,58	2,38	2,19	1,39	0,60	0,80
22/10/04	3,38	3,38	4,57	2,98	2,38	2,19	1,59	0,60	0,80
29/10/04	3,58	3,58	4,77	4,57	2,38	2,19	1,59	2,19	0,99
05/11/04	3,78	3,58	4,97	5,17	2,58	2,19	1,59	2,98	0,99
12/11/04	3,78	3,58	4,97	5,37	2,58	2,39	1,59	3,38	0,99
19/11/04	3,78	3,78	4,97	5,37	2,39	2,39	1,59	3,78	0,99
26/11/04	3,78	3,79	4,97	5,57	2,39	2,39	1,59	4,57	0,99

Notas: (*) a primeira coluna refere-se ao ToVSV e a segunda ao amarelo baixeiro .. não se aplica dado numérico devido à ausência de doença

Os dados da Tabela 5 indicam também que, de uma maneira geral, as parcelas localizadas na periferia da plantação tiveram em média mais plantas infectadas (2,65%) do que as parcelas internas (1,26%), ou seja, 2,1 vezes mais, embora o número de aleirodídeos capturados nas armadilhas das quatro parcelas externas (788 insetos) tenha sido apenas 1,37 vezes superior ao capturado nas quatro parcelas internas (576 insetos) (Tabela 3).

Resultado praticamente idêntico quanto à incidência da doença foi obtido para o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro: média de 2,58% para as parcelas externas comparada com a média de 1,21% para as parcelas internas (Tabela 5).

No segundo ensaio para a avaliação da incidência do ToYVSV e do vírus do amarelo baixeiro em tomateiros em campo, no município de Sumaré, as avaliações iniciaram-se em março e prosseguiram até final de maio de 2005. Não foi encontrada uma única planta com sintomas induzidos por esses vírus durante esse período, o que evidencia a alta sazonalidade destas doenças.

Na Tabela 6 são apresentadas as porcentagens de incidência do ToYVSV, avaliada com base nos sintomas, nas plantas de tomate das oito casas-de-vegetação localizadas no município de Elias Fausto. As primeiras avaliações foram feitas nas casas-de-vegetação 1, 2 e 3 (Figura 1 B), durante os meses de janeiro e fevereiro de 2005. As porcentagens de plantas infectadas pelo ToYVSV variaram de 30,0% a 69,3% no final do ciclo da cultura. Deve-se mencionar que, por ocasião desses plantios, o produtor ainda dispunha de três casas-de-vegetação com plantas de tomate em final de ciclo, com sintomas do ToYVSV, e que continham uma alta população de aleirodídeos, uma vez que não estavam mais sendo pulverizadas. Também dispunha de uma casa-de-vegetação situada nas bordas próximas à entrada da propriedade com plantas de pepino que, embora não sendo hospedeiras do vírus, são bastante propícias para a criação de aleirodídeos, entre os quais a *B. tabaci*, biótipo B. Assim, pode-se supor que o alto valor de incidência para essa doença nessa época tenha sido em razão da existência de fontes de inóculo e vetores próximos.

As porcentagens de plantas infectadas nas casas-de-vegetação 4 e 5, cujas avaliações foram feitas durante o período de março a maio de 2005, e nas casas-de-vegetação 6, 7 e 8, cujas plantas foram inspecionadas no período de abril a maio de 2005, foram bem menores do que aquelas encontradas anteriormente nas casas-de-vegetação 1, 2 e 3 (Tabela 6). O total de plantas infectadas no final do ciclo da cultura nessas casas-de-vegetação variou de 4,8% a 8,6%. Isso provavelmente se deve ao fato de o produtor já ter eliminado todos os plantios mais velhos de tomate, bem como o pepino cultivado nas outras casas-de-vegetação, reduzindo significativamente a fonte de inóculo do ToYVSV, embora o número de aleirodídeos capturados tenha se mantido constante (Tabela 4). O número médio de insetos capturados nas casas-de-vegetação 4, 5, 6, 7 e 8 (média de 170 insetos) foi semelhante ao obtido nas casas-de-vegetação 1, 2 e 3 (média de 167 insetos), embora os períodos de amostragens não tenham sido iguais. De acordo com a vivência e as observações do produtor, que cultiva tomate a mais de quinze anos na mesma propriedade, os plantios semeados em janeiro são historicamente os que apresentam as maiores incidências de plantas viróticas. A partir de março há uma tendência de esse valor ser bem menor até meados de novembro, quando há uma nova alta.

Creamer; Luque-Willians e Howo (1996) estudaram a incidência do *Beet curly top virus* (BCTV), transmitido por cigarrinhas, em plantas daninhas naturalmente infectadas e verificaram que a infecção era bastante variável no decorrer do ano (estações). A maioria das cigarrinhas coletadas na primavera não eram virulíferas, já as coletadas no verão estavam 100% virulíferas, pois a temperatura afeta a capacidade do inseto de carregar o vírus. Entre anos, há relatos de infectividade em beterraba açucareira de 4% em um ano e 67% no ano seguinte, já que há uma variação no tamanho da população de insetos e daqueles que se encontram infectivos (WALLACE; MURPHY, 1938¹ apud CREAMER; LUQUE-WILLIANS; HOWO, 1996).

¹ WALLACE, J. M.; MURPHY, A. M. Studies on the epidemiology of curly top in southern Idaho, with special reference to sugar beets and weed hosts of the vector *Eutettix tenellus*. USDA Tech Bull, 624p., 1938.

Tabela 6 - Valores de incidência (%) do ToYVSV em plantios de tomate cv. Ikram, cultivados em casas-de-vegetação, no município de Elias Fausto, em 2005

Datas de Avaliações	Casas-de-vegetação							
	1	2	3	4	5	6	7	8
12/01/05	0,13	0,26	2,17	..	..	..	..	..
19/01/05	4,50	5,80	9,32	..	..	..	..	..
26/01/05	11,45	21,91	20,20	..	..	..	..	..
02/02/05	12,89	24,55	30,73	..	..	..	..	..
09/02/05	18,94	34,54	53,46	..	..	..	..	..
17/02/05	23,45	38,42	60,77	..	..	..	..	..
23/02/05	27,71	43,98	69,36	..	..	..	..	..
02/03/05	30,03	46,89	69,36	..	..	..	..	..
30/03/05	..	..	..	0,31	..	..	..	..
06/04/05	..	..	..	1,08	1,68	..	..	..
13/04/05	..	..	..	2,32	2,61	..	..	..
20/04/05	..	..	..	3,09	3,68	..	..	..
28/04/05	..	..	..	3,55	3,83	1,78	1,02	0,64
04/05/05	..	..	..	4,33	4,14	2,67	1,52	1,15
11/05/05	..	..	..	4,95	4,60	3,18	1,91	1,91
18/05/05	..	..	..	6,52	5,85	4,07	3,05	3,05
25/05/05	..	..	..	7,76	8,62	4,70	3,43	3,44
31/05/05	..	..	..	..	..	5,59	3,68	4,20
07/06/05	..	..	..	..	..	6,10	4,32	4,58
14/06/05	..	..	..	..	..	6,99	4,83	4,83

Nota: .. não se aplica dado numérico devido ao término, ausência de plantio ou de doença

2.5.4 Dinâmica temporal e espacial

2.5.4.1 Análise temporal

Os dados obtidos referentes à incidência de begomovirus durante todo o período avaliado para cada ensaio encontram-se nas Tabelas 5 e 6 e nas Figuras 6 e 7.

No ensaio de campo de Sumaré em 2004, o crescimento da incidência de plantas sintomáticas foi linear nas quatro primeiras datas de avaliação (Figura 6), o que indica que novas infecções foram devidas principalmente a um influxo constante de vetores virulíferos de fora para dentro da plantação nesse período. A estabilização da curva a partir da quinta avaliação indica que esse fluxo interrompeu-se a partir dessa data, provavelmente devido a condições climáticas, e que houve pouca transmissão de planta para planta durante o ciclo da cultura, provavelmente como consequência de um controle eficiente do vetor, pois durante as avaliações nunca foi constatada a formação de colônias de aleirodídeos nas plantas de tomate.

Em Elias Fausto, em condições de casa-de-vegetação, os plantios de tomate foram escalonados, permitindo a sobrevivência de aleirodídeos virulíferos por um longo período na área. Os vetores, assim, podiam migrar das casas-de-vegetação com plantio em final de ciclo para as casas-de-vegetação recém transplantadas, dando continuidade à transmissão do vírus.

As formas das curvas de crescimento da doença em casa-de-vegetação também foram claramente lineares para as três épocas de plantio analisadas (Figura 7). Isso também indica um influxo constante de vetores virulíferos. Esse influxo, ao contrário do ensaio de campo de Sumaré-2004, manteve-se durante todo o ciclo da cultura, o que pode ser explicado pelas condições ambientes mais estáveis desse tipo de cultura. Além disso, a forma da curva também indica a pouca transmissão de planta para planta dentro das casas-de-vegetação.

Os níveis finais de doença alcançados nas casas-de-vegetação foram fortemente dependentes da época de plantio: médias de 48,7% para o primeiro plantio, 8,2% para o segundo e 5,5% para o terceiro (Tabela 6 e Figura 7). Esse fato ocorreu a

despeito das populações dos aleirodódeos não variarem significativamente entre plantios: 167,6, 178,0 e 165,3 (Tabela 4), respectivamente, o que evidencia uma vez mais a importância de se ter uma medida de vetores virulíferos, e não simplesmente de vetores, em estudos epidemiológicos de doenças causadas por vírus.

2.5.4.2 Análise espacial

As análises espaciais realizadas tiveram por base mapas de distribuição de plantas doentes como os apresentados nas Figuras 8, 9 e 10. A essas figuras foram justapostos *quadrats* de 2x2 e 5x2 para se determinar os diversos parâmetros que caracterizam a distribuição espacial da doença. Nas tabelas 7 e 8 são mostrados os valores do índice de dispersão (D) para cada unidade experimental e data de avaliação, bem como os valores de b e A da lei de Taylor modificada. As Figuras 11 e 12 mostram a relação das variâncias observada e binomial.

Como pode ser observado na Tabela 7 e na Figura 11, a dinâmica espacial do begomovirus, no município de Sumaré, foi predominantemente do tipo aleatória. Analisando a influência da localização das parcelas na área, porém, pode-se inferir que parcelas localizadas nas bordas da área (blocos 01 a 04) apresentaram agregação significativa de plantas sintomáticas, fato este não observado nas parcelas localizadas mais internamente (blocos 05 a 08).

O número de aleirodódeos foi também ligeiramente maior nas parcelas externas (Tabela 3). A análise desses dados sugere que a entrada da doença por meio do vetor se dá de fora para dentro, através de hospedeiros (plantas daninhas, plantas voluntárias de tomate) fontes que se encontram nas áreas adjacentes ao plantio. Groves et al. (2002) ressaltam que o conhecimento advindo da relação entre a distância da fonte de vírus e a incidência numa cultura suscetível é de suma importância para o sucesso de qualquer esforço com a finalidade de reduzir a incidência viral através da redução de plantas fontes de viroses.

Figura 6 – Curva de progresso da incidência de plantas de tomateiro cv. Alambra infectadas com o ToYVSV no ensaio em campo, em Sumaré, 2004. Dados médios avaliados conjuntamente para todas as parcelas

Figura 7 – Curvas de progresso da incidência de plantas de tomateiro cv. Ikram infectadas com ToYVSV no ensaio em casa-de-vegetação, em Elias Fausto, 2004. Dados médios avaliados conjuntamente. A – casas 1 - 3, B – casas 4 -5 e C – casas 6 - 8

Figura 8 – Padrão espacial de plantas de tomateiro cv. Alambra infectadas com o ToYVSV e o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro na última avaliação em campo em Sumaré, 2004. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas

Figura 9 – Padrão espacial de plantas de tomateiro cv. Ikram infectadas com ToYVSV em função do tempo em casas-de-vegetação em Elias Fausto, 2004. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas

Figura 10 – Padrão espacial de plantas de tomateiro cv. Ikram infectadas com o IoYVSV na última avaliação em casas-de-vegetação em Elias Fausto, 2004. Quadrados pretos indicam plantas sintomáticas e quadrados brancos, plantas assintomáticas

Tabela 7 - ToYVSV em tomateiros cv. Alambra em campo, no município de Sumaré, 2004: incidência, índice de dispersão binomial (D) e parâmetros b e A da lei de Taylor

Local	Data	Incidência	D ^(a)		b ^(b)		A ^(b)	
			2x2	5x2	2x2	5x2	2x2	5x2
Bloco 01	24/set	0,0119	0,97	0,91				
	01/out	0,0159	0,96	0,87				
	08/out	0,0198	0,95	0,83				
	15/out	0,0338	0,90	0,82				
	22/out	0,0338	0,90	0,82				
	29/out	0,0358	0,90	0,82	0,917816	0,918723	0,217384	0,287577
	05/nov	0,0378	0,89	0,79				
	12/nov	0,0378	0,89	0,79				
	19/nov	0,0378	0,90	0,82				
	26/nov	0,0378	0,89	0,91				
Bloco 02	24/set	0,0179	1,18	1,08				
	01/out	0,0199	1,15	1,04				
	08/out	0,0318	1,17	1,37*				
	15/out	0,0437	1,25*	1,66*				
	22/out	0,0457	1,23*	1,69*				
	29/out	0,0477	1,21*	1,62*	1,086861*	1,557038*	0,266497*	1,539026*
	05/nov	0,0497	1,27*	1,82*				
	12/nov	0,0497	1,27*	1,82*				
	19/nov	0,0497	1,27*	1,82*				
	26/nov	0,0497	1,27*	1,82*				
Bloco 03	24/set	0,0179	1,18	1,31				
	01/out	0,0179	1,18	1,31				
	08/out	0,0198	1,15	1,25				
	15/out	0,0238	1,07	1,35				
	22/out	0,0238	1,11	1,14				
	29/out	0,0238	1,11	1,14				
	05/nov	0,0258	1,09	1,09	0,742251	0,686155	0,535187	0,753711
	12/nov	0,0258	1,09	1,09				
	19/nov	0,0258	1,02	1,09				
	26/nov	0,0258	1,09	1,09				
Bloco 04	24/set	0,0040	1,00	0,98				
	01/out	0,0060	0,99	0,98				
	08/out	0,0099	0,98	0,95				
	15/out	0,0139	0,97	1,25				
	22/out	0,0159	0,96	1,25				
	29/out	0,0159	0,96	1,25	0,970857	1,23592*	0,087881	0,778994*
	05/nov	0,0159	0,96	1,25				
	12/nov	0,0159	0,96	1,25				
	19/nov	0,0159	0,96	1,25				
	26/nov	0,0159	0,96	1,25				

Tabela 7 - ToYVSV em tomateiros cv. Alambra em campo, no município de Sumaré, 2004: incidência, índice de dispersão binomial (D) e parâmetros b e A da lei de Taylor

Local	Data	Incidência	D		b		A	
			2x2	5x2	2x2	5x2	2x2	5x2
Bloco 05	24/set	0,0040	1,00	0,98				
	01/out	0,0080	0,98	0,95				
	08/out	0,0080	0,98	0,95				
	15/out	0,0080	0,98	0,95				
	22/out	0,0080	0,98	0,95				
	29/out	0,0099	0,98	0,93	0,979269	0,932901	0,063631	-0,23343
	05/nov	0,0099	0,98	0,93				
	12/nov	0,0099	0,98	0,93				
	19/nov	0,0099	0,98	0,93				
	26/nov	0,0099	0,98	0,93				
Bloco 06	24/set	0,0020	1,00	1,00				
	01/out	0,0020	1,00	1,00				
	08/out	0,0040	1,00	0,98				
	15/out	0,0079	0,98	0,95				
	22/out	0,0080	0,98	0,95				
	29/out	0,0080	0,98	0,95	0,985033	0,952008	0,048089	0,174532
	05/nov	0,0080	0,98	0,95				
	12/nov	0,0099	0,98	0,93				
	19/nov	0,0099	0,98	0,93				
	26/nov	0,0100	0,98	0,93				
Bloco 07	24/set	0,0179	0,95	1,08				
	01/out	0,0218	0,94	1,00				
	08/out	0,0218	0,94	1,00				
	15/out	0,0238	0,93	0,96				
	22/out	0,0258	0,93	0,93				
	29/out	0,0258	0,93	0,93	0,923975	0,584497	0,199779	1,105723
	05/nov	0,0258	0,93	0,93				
	12/nov	0,0258	0,93	0,93				
	19/nov	0,0258	0,93	0,93				
	26/nov	0,0258	0,93	0,93				
Bloco 08	24/set	0,0060	0,99	0,96				
	01/out	0,0100	0,98	0,93				
	08/out	0,0120	0,97	1,25				
	15/out	0,0120	0,97	1,18				
	22/out	0,0120	0,97	1,18				
	29/out	0,0120	0,97	1,25	0,970689	1,34395	0,086915	1,080017*
	05/nov	0,0120	0,97	1,25				
	12/nov	0,0120	0,97	1,25				
	19/nov	0,0120	0,97	1,25				
	26/nov	0,0120	0,97	1,25				
Bloco 01-04	..	..	..	..	1,073213*	1,118154*	0,184698*	0,376308*
Bloco 05-08	..	..	..	..	0,965481	1,006921	-0,102821	0,021493

^a Índice de dispersão binomial (D= variância observada/variância binomial), valores indicados para os tamanhos do quadrats e data de avaliação. Significâncias (*) foram calculadas pela distribuição de chi-quadrado. Valores significativos indicam agregação de plantas sintomáticas (P<0,05)

^b valores significativamente diferentes de 1 (*) para b e de zero (*) para A, pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 8 - ToYVSV em tomateiros cv. Ikram em casa-de-vegetação, no município de Elias Fausto, 2005: incidência, índice de dispersão binomial (D) e parâmetros b e A da lei de Taylor

(continua)								
Local	Data	Incidência	D ^(a)		b ^(b)		A ^(b)	
			2x2	5x2	2x2	5x2	2x2	5x2
Casa 01	12/jan	0,001285	1,00	1,00				
	19/jan	0,045045	1,31*	1,20				
	26/jan	0,114543	1,43*	1,76*				
	02/fev	0,128866	1,46*	1,63*				
	09/fev	0,189433	1,40*	1,47*				
	17/fev	0,234536	1,38*	1,43*	1,066119*	1,102166*	0,239645	0,387229*
	23/fev	0,277062	1,38*	1,63*				
	02/mar	0,300258	1,36*	1,80*				
Casa 02	12/jan	0,002571	1,00	0,99				
	19/jan	0,05799	1,21*	1,40*				
	26/jan	0,219072	1,34*	1,63*				
	02/fev	0,245478	1,35*	1,85*				
	09/fev	0,345408	1,36*	1,85*				
	17/fev	0,384217	1,51*	2,08*	1,088082*	1,165299*	0,269356	0,566141*
	23/fev	0,439845	1,56*	2,20*				
	02/mar	0,468912	1,57*	2,27*				
Casa 03	12/jan	0,021711	1,06	0,97				
	19/jan	0,093231	1,12	1,33*				
	26/jan	0,202046	1,19*	1,60*				
	02/fev	0,307298	1,24*	1,87*				
	09/fev	0,534615	1,48*	2,22*				
	17/fev	0,607692	1,47*	2,13*	1,128671*	1,321145*	0,296861	0,832362*
	23/fev	0,69359	1,47*	2,19*				
Casa 04	30/mar	0,003091	1,00	0,99				
	06/abr	0,010819	1,22*	1,16				
	13/abr	0,023184	1,06	1,04				
	20/abr	0,030912	1,20*	1,21				
	28/abr	0,035549	1,24*	1,28				
	04/mai	0,043277	1,23*	1,24	1,081073*	1,086472*	0,2554	0,294492*
	11/mai	0,049459	1,30*	1,17				
	18/mai	0,065217	1,28*	1,28				
Casa 05	25/mai	0,07764	1,33*	1,36*				
	06/abr	0,01682	1,14	1,04				
	13/abr	0,026074	1,17	1,01				
	20/abr	0,03681	1,16	1,36*				
	28/abr	0,038344	1,14	1,41*				
	04/mai	0,041411	1,19*	1,56*				
	11/mai	0,046012	1,15	1,49*	1,224473*	1,62971*	0,548445	1,693027*
	18/mai	0,058462	1,27*	1,92*				
Casa 06	25/mai	0,086154	1,75*	2,62*				
	28/abr	0,017789	1,10	1,14				
	04/mai	0,026684	1,12	1,35*				
	11/mai	0,031766	1,07	1,37*				
	18/mai	0,040661	1,40*	2,00*				
	25/mai	0,047014	1,43*	1,99*				
	31/mai	0,055909	1,60*	2,12*	1,422513*	1,663561*	0,988461	1,848618*
	07/jun	0,060991	1,61*	2,34*				
Casa 06	14/jun	0,069886	1,84*	2,69*				

Tabela 8 - ToYVSV em tomateiros cv. Ikram em casa-de-vegetação, no município de Elias Fausto, 2005: incidência, índice de dispersão binomial (D) e parâmetros b e A da lei de Taylor

Local	Data	Incidência	D		b		a	
			2x2	5x2	2x2	5x2	2x2	5x2
Casa 07	28/abr	0,010165	0,97	0,92				
	04/mai	0,015248	0,96	1,04				
	11/mai	0,01906	0,95	1,11				
	18/mai	0,030496	0,91	1,06				
	25/mai	0,034308	0,90	0,99				
	31/mai	0,036849	0,89	1,16	0,996166	1,204553*	-0,03195	0,574363
	07/jun	0,043202	0,99	1,31*				
	14/jun	0,048285	1,02	1,41*				
Casa 08	28/abr	0,006361	0,99	0,95				
	04/mai	0,01145	0,97	1,13				
	11/mai	0,019084	0,95	0,97				
	18/mai	0,030534	0,91	0,89				
	25/mai	0,034351	1,13	1,30*				
	31/mai	0,041985	1,25*	1,63*	1,116406*	1,260558*	0,28668	0,771707*
	07/jun	0,045802	1,21*	1,68*				
	14/jun	0,048346	1,19*	1,66*				
Casa 01-03	..	..	..	..	1,07774*	1,157926*	0,245878*	0,528429*
Casa 04-05	..	..	..	..	1,104271*	1,19861*	0,304624*	0,613944*
Casa 06-08	..	..	..	..	1,209822*	1,404939*	0,496804*	1,15574*

^a Índice de dispersão binomial (D= variância observada/variância binomial), valores indicados para os tamanhos do quadrats e data de avaliação. Significâncias (*) foram calculadas pela distribuição de chi-quadrado. Valores significativos indicam agregação de plantas sintomáticas (P<0,05)

^b valores significativamente diferentes de 1 (*) para b e de zero (*) para A, pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade

Figura 11 – Relação entre variância da incidência observada e variância binomial para o ToYVSV em tomateiro cv. Alambra em campo, em Sumaré, 2004 (*quadrat* de 5x2). A - Blocos de 01-04 com os dados analisados em conjunto. B - Blocos 05-08 com os dados analisados em conjunto. A linha cheia representa a relação $\log(\text{vobs}) = \log(A) + b \log(\text{vbin})$ ajustado aos dados de regressão. A linha pontilhada representa a linha binomial (variância observada = variância binomial). As equações da reta para as figuras A e B são respectivamente: $y=0,376+1,118x$ e $y=0,0215+1,007x$

Figura 12 – Relação entre variância da incidência observada e variância binomial para o ToYVSV em tomateiro cv. Ikram em casa-de-vegetação, em Elias Fausto, 2005 (*quadrat* de 5x2). A - Casas de 01-03 com os dados analisados em conjunto. B - Casas 04-05 com os dados analisados em conjunto. C - Casas 06-08 com os dados analisados em conjunto. A linha cheia representa a relação $\log(\text{vobs}) = \log(A) + b \log(\text{vbin})$ ajustado aos dados de regressão. A linha pontilhada representa a linha binomial (variância observada = variância binomial). As equações da reta para as figuras A, B e C são respectivamente: $y=0,528+1,158x$; $y=0,614+1,199x$ e $y=1,156+1,405x$

Nos dados coletados em Elias Fausto, o cenário da dinâmica espacial é bem diferente, já que os valores de incidência são bem mais elevados e o padrão encontrado é do tipo agregado para a análise feita em conjunto para as casas de 01 a 03, de 04 a 05 e de 06 a 08 (Tabela 8 e Figura 12). Nesse caso pôde-se observar o papel da distância da fonte de inóculo no progresso dos valores de incidência. O produtor possuía áreas mais velhas com plantio de tomate juntamente com áreas recém-transplantadas, e a migração do inseto infectivo da primeira área para a segunda é bem evidente, especialmente na primeira época de avaliação. É importante ressaltar que a agregação detectada nessas condições provavelmente não se deve a infecções secundárias dentro das estufas plásticas, mas sim à concentração de plantas sintomáticas nos bordos das estufas, devida à migração de vetores a partir de áreas externas à estufa. Essa explicação é corroborada pela dinâmica temporal da doença (Figura 7) e pelos dados de Polston et al. (1996), que estudaram a dinâmica espacial do *Tomato mottle geminivirus* na Flórida durante dois anos, em 10 campos comerciais, totalizando 90 parcelas de 144 plantas. Esses autores determinaram o padrão espacial pela análise de seqüências ordinárias e não foi encontrada nenhuma relação entre valores de incidência nas parcelas e o grau de agregação dentro das linhas. Nesse estudo foi observado também que a disseminação primária tem papel mais predominante do que a secundária no aumento do número de plantas doentes e que a eliminação dos campos colhidos, que podem servir como reservatório de vírus, deve ser uma recomendação de manejo a ser enfatizada. Além desta, recomenda-se também a eliminação de plantas hospedeiras do vírus e do inseto vetor nas proximidades da área do plantio e o controle da mosca branca com inseticidas apropriados e aplicados conforme a necessidade, que deve ser determinada por meio do monitoramento da população desse inseto. Variedades resistentes devem ser usadas, desde que estejam disponíveis no mercado.

Para várias pragas, incluindo a mosca branca, tem sido mostrado que aplicações de inseticidas alteram o padrão de dispersão dos insetos, na maioria dos casos diminuindo a agregação da doença por eles transmitida (LIU; OETTING; BUNTIN, 1993; TONHASCA; PALUMBO; BYRNE, 1994; TRUMBLE, 1985).

Colvin et al. (2004) avaliaram uma infecção mista dos begomovirus *African cassava mosaic virus* (ACMV) e *East African cassava mosaic virus* (EACMV) e um recombinante oriundo dessas duas espécies, o EACMV-UG, um variante da Uganda, em mandioca. A capacidade de disseminação pandêmica da virose e seu vetor em áreas não endêmicas foi avaliada por dois anos consecutivos. Em um dos anos avaliados, uma área registrou após seis meses do plantio valores de incidência da ordem de zero a mais que 50%. Numa outra área, no ano seguinte após o mesmo período, esses valores ultrapassaram os 60% e em outras, os valores de incidência foram maiores que 90%. Para o mesmo período foi verificado um aumento de 10-15 vezes na população da mosca branca. A infecção de mandioca suscetível ao EACMV-UG parece alterar o conteúdo da seiva do floema pelo aumento da concentração de pelo menos um aminoácido essencial e isto está associado com o aumento da taxa de crescimento de *B. tabaci*.

A análise de áreas isópatas foi feita a partir de mapas espaciais, como aqueles das Figuras 8, 9 e 10, para algumas parcelas dos ensaios de Sumaré e Elias Fausto, incluindo-se aí a distribuição espacial do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro que ocorreu em Sumaré (Figura 8, à direita). As áreas isópatas (Figuras 13, 14 e 15) claramente indicam que a doença é introduzida na área de plantio a partir de fora, seja de outros plantios de tomate, seja da vegetação espontânea. Nesse aspecto, tanto o ToYVSV como o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro têm o mesmo comportamento.

O *Iris Yellow spot virus* (IYSV) é um novo tospovirus que tem se revelado devastador para o cultivo de cebola. Em um ensaio com cultivares resistente e suscetível, instalado em noventa e oito campos de produção, em três anos consecutivos, constataram-se valores de incidência do IYSV crescentes de 5,6%, 16,7% e 73,2% para cada ano. O mapeamento espacial da incidência da doença nos campos revelou um efeito bem distinto de borda para os padrões de gradientes da doença. Observou-se que o aumento na incidência do IYSV afetou o tamanho do bulbo, mas não o rendimento total (GENT; SCHWARTZ, 2004).

Figura 13 - Áreas isopatas referentes a última avaliação para o vírus do amarelo baixeiro em tomateiro cv. Alambra, em campo, em Sumaré. As cores indicam variação dos valores de incidência, verde (menor incidência), vermelho escuro (maior incidência)

Figura 14 - Áreas isopatas referentes a última avaliação para o ToYVSV tomateiro cv. Alambra em campo, em Sumaré. As cores indicam variação dos valores de incidência, verde (menor incidência), vermelho escuro (maior incidência)

Figura 15 - Áreas isopatas referentes a última avaliação para o ToYVSV tomateiros cv. Ikram em casa-de-vegetação, em Elias Fausto. As cores indicam variação dos valores de incidência, verde (menor incidência), vermelho escuro (maior incidência)

Holt; Colvin e Muniyappa (1999) identificaram estratégias para o manejo do *Tomato leaf curl virus* através de modelos epidemiológicos que levam em consideração características gerais do patossistema. Entre essas características, foi observado que a taxa de aquisição pode ser considerada importante apenas quando a maior proporção de transmissão do patógeno for feita por vetores que adquirem o vírus dentro da cultura. O modelo proposto por esses autores permite inferir que o isolamento dos campos de produção é uma medida de substancial efeito se for também possível isolar a cultura de hospedeiros alternativos do vírus e do vetor. Os resultados do uso desse modelo predizem que a “saturação” da doença pode ocorrer a taxas relativamente baixas de imigração e que a adição de mais vetores pode fazer pouca diferença na incidência graças à saturação.

Práticas de manejo que podem ser eficientes no controle de viroses devem incluir o uso de culturas armadilhas usadas em bordadura, repelentes, como o óleo de neem, inseticidas convencionais com qualquer efeito repelente/irritante e a aplicação de cinza de madeira à folhagem do tomateiro. Uma nova abordagem seria o uso de telas de nylon tratadas com um inseticida persistente e com um dos lados voltados ao plantio do tomate colorido de amarelo. Todas essas estratégias devem estar sempre que possível sendo usadas com variedades resistentes ao vírus cuja taxa de infecção já é por si mesma reduzida.

2.5.5 Avaliação de danos à produção e à qualidade causados pelos vírus

A avaliação de danos é uma tarefa difícil mas necessária para a determinação da importância de uma doença. As principais dificuldades residem nas influências quantitativas e qualitativas que devem ser determinadas na ausência de outros fatores causadores de danos. Em condições de campo o processo de infecção é gradual, com plantas infectadas no início do ciclo, no meio e no fim, causando dessa forma, danos variáveis e podendo ainda haver algum efeito de compensação das plantas afetadas com o aumento na produção por plantas vizinhas (COSTA, 1975).

Na lavoura, a determinação de danos pode dar uma idéia bastante aproximada do prejuízo real. No ensaio de avaliação da incidência do ToYVSV e do vírus do amarelo baixeiro do tomateiro em condições de campo, em Sumaré, no ano de

2004, as incidências desses dois vírus variaram de 0,2% a 4,97% e de 0,2% a 5,57%, respectivamente (Tabela 5). Apenas duas plantas com infecção mista foram detectadas. Na Tabela 9 são apresentados os dados médios de produção de frutos por plantas sadias, infectadas com o ToYVSV e com o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro. Esses valores são resultantes das colheitas efetuadas desde o aparecimento dos primeiros frutos em ponto de colheita até o momento da eliminação das plantas no final do ciclo. Avaliando as médias de produção das plantas infectadas pelo ToYVSV e pelo vírus do amarelo baixeiro, os valores foram 37,6% e 14,8% inferiores ao das plantas sadias, respectivamente. A redução na produção causada pelo ToYVSV foi inferior à relatada por Giordano et al. (2005) sobre o efeito da infecção precoce de tomateiro industrial (cv. Viradoro) com um begomovirus geneticamente relacionado com o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Neste trabalho os autores relataram danos da ordem de 60%.

Tabela 9 - Médias de produção de frutos (kg) por planta de tomate cv. Alambra sadia, infectada pelo Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e pelo vírus do amarelo baixeiro do tomateiro, em condições de campo no município de Sumaré

Tratamentos	Produção (kg/planta)*
Plantas sadias	5,64 ^a
Infectadas com o ToYVSV	3,52 ^b
Infectadas com o vírus do amarelo baixeiro	4,80 ^a

Nota: *Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste T, ao nível de 5% de probabilidade

Avaliações de danos em outros patossistemas envolvendo espécies do gênero *Begomovirus*, bem como de outros gêneros, também mostram o efeito deletério das moléstias por eles induzidas. Costa e Cupertino (1976) avaliaram os danos na produção de feijão causados pelo *Bean gold mosaic virus* (BGMV) e verificaram que plantas infectadas aos 15 dias após a semeadura tiveram reduções de 85% em peso, enquanto que, naquelas infectadas aos 30 dias após a semeadura esse valor foi de

72%. Num estudo posterior, Almeida et al. (1984), trabalhando com 12 cultivares no mesmo patossistema, notaram reduções, em termos médios, mais intensas nos parâmetros avaliados quando as plantas foram infectadas mais precocemente do que quando infectadas mais tardiamente. Dentre os parâmetros por eles mensurados, a produção de grãos por planta apresentou reduções de até 80%, com média de 73% em infecções precoces e 43% em infecções tardias. O número de vagens por planta apresentou reduções de 52% em infecção precoce e 22% em infecção tardia. O peso de sementes também foi afetado em 39% para infecção precoce em relação às sadias; em infecção tardia a redução média foi de 23%. A germinação foi prejudicada em alguns cultivares, com índices menores que 80%.

McKirdy; Jones e Nutter (2002) quantificaram os danos em rendimento do trigo e da aveia causados pelo *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e notaram que a infecção das plantas com esse vírus pode resultar em diminuição do número de plantas por linha, do número de espigas por planta, do número de floretes ou sementes por espiga e do peso de sementes. Nos cinco ensaios realizados, a relação entre a incidência do vírus e as perdas de rendimento foram lineares, com valores variando de 1.300 a 2.700 kg por hectare. Para cada 1% no aumento da incidência do BYDV ocorreu um decréscimo de 18 kg por hectare no rendimento do trigo.

O *Okra mosaic virus* (OMV), um dos fatores limitantes para o cultivo de quiabeiro na Tanzânia, acarretou, em campos com incidência variável de 30 a 89%, variações significativas entre os componentes de produção avaliados para plantas sadias e infectadas. As plantas doentes mostraram reduções de 19,5% na altura, 34,5% no número de frutos por planta, 32,1% no comprimento do pecíolo foliar e 11,3% no comprimento do fruto (NDUNGURU; RAJABU, 2004).

Num estudo envolvendo dois clones de pepino (*Solanum muricatum* L.), denominados “Sweet Long” e “Sweet Round”, infectados com o *Tomato mosaic virus* (ToMV), que pertence ao gênero *Tobamovirus*, realizado por Benlloch; Prohens e Nuez (2001), foi verificado que a relação do rendimento comercial (frutos com mais de 100 gramas) pelo rendimento total foi maior nas plantas sadias dos clones “Sweet Long” e

“Sweet Round” (90,2 e 89,4%, respectivamente) do que nas infectadas, cujos valores foram de 15,4% para o clone “Sweet Long” e 0% para o “Sweet Round”.

Na Tabela 10 são apresentados os dados relativos à análise da qualidade dos frutos de tomate do cv. Alambra colhidos de plantas sadias, infectadas com o ToYVSV e com o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro no campo em Sumaré. Nota-se que os frutos oriundos de plantas sadias e infectadas não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos caracteres de qualidade analisados. Esses resultados são semelhantes os obtidos por Giordano et al. (2005), que também não verificaram efeito da infecção do tomateiro industrial (cv. Viradoro) com um isolado distinto de begomovirus, geneticamente relacionado com o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), sobre o teor de sólidos solúveis dos frutos (°Brix).

Tabela 10 - Qualidade de frutos de tomate cv. Alambra colhidos de plantas sadias, infectadas pelo Tomato yellow vein streak virus (ToYVSV) e pelo vírus do amarelo baixeiro do tomateiro (Tomato yellow bottom leaf virus – TYBLV), isoladamente e em infecção mista, em condições de campo no município de Sumaré

Tratamentos	Caracteres avaliados*			
	SS, °Brix	pH	ATT	SS.ATT ⁻¹
Sadia	4,68 a	4,25 a	0,34 a	14,36 a
ToYVSV	4,77 a	4,22 a	0,35 a	13,36 a
TYBLV	4,50 a	4,22 a	0,35 a	12,74 a
ToYVSV + TYBLV	4,36 a	4,15 a	0,31 a	14,23 a

Nota: *Valores na coluna, seguidos de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

Em outros casos de infecção de plantas com outras espécies de begomovirus há relatos de danos qualitativos na produção. Costa e Cupertino (1976), por exemplo, notaram que o BGMV afetou a qualidade das sementes de feijão, uma vez que as plantas infectadas produziram sementes descoloridas, deformadas e pequenas.

Benlloch; Prohens e Nuez (2001) avaliaram o conteúdo de sólidos solúveis (°Brix) para os frutos de pepino dos clones “Sweet Round” e “Sweet Long” colhidos de

plantas sadias e infectadas com *Tomato mosaic virus* (ToMV). Os valores encontrados para o segundo clone foram maiores nos frutos infectados enquanto que para o primeiro clone foram menores quando comparados com os obtidos de frutos de plantas sadias de ambos os clones. Entretanto, ambos tiveram uma redução no conteúdo de suco obtido e suas cascas ficaram com aparência prejudicada (pele de cortiça) pela infecção viral.

A magnitude dos valores encontrados para outros patossistemas na literatura e aqueles encontrados neste ensaio, permite acreditar que em condições de alta incidência, o produtor possa ter uma significativa redução no retorno financeiro, caso medidas de controle efetivas não sejam adotadas. Almeida et al. (1984), analisando o patossistema feijoeiro-*Bean golden mosaic virus*, sugerem que medidas de controle devem procurar evitar principalmente a infecção que ocorre nos primeiros dias após a semeadura ou transplante em campo, realizar o isolamento da plantação, usar barreiras à movimentação do vetor, usar medidas de controle contra os insetos vetores, evitar plantio escalonado, eliminar plantas hospedeiras de vírus e do vetor, entre outras medidas que se julgarem necessárias.

3 CONCLUSÕES

- O begomovirus diagnosticado nos plantios dos ensaios conduzidos em Sumaré e Elias Fausto foi o Tomato yellow vein streak vírus (ToYVSV) e o outro vírus associado ao plantio em Sumaré foi identificado como sendo o do amarelo baixeiro do tomateiro;
- A análise da dinâmica temporal permitiu verificar um nítido efeito de bordo, associado ao comportamento de vôo do inseto vetor virulífero do ToYVSV;
- As curvas de progresso da doença tanto para os ensaios conduzidos em campo aberto no município de Sumaré quanto para aqueles conduzidos em casas-de-vegetação em Elias Fausto denotam um crescimento linear dos valores de incidência do ToYVSV e pouca transmissão do patógeno de planta para planta;
- A análise da dinâmica espacial permitiu verificar a importância da localização externa às áreas de plantio de fontes de inóculo do ToYVSV;
- Um leve padrão agregado do ToYVSV foi verificado em função da localização mais externa das parcelas para o ensaio conduzido em campo no município de Sumaré;
- Um forte padrão de agregação do ToYVSV foi verificado para os ensaios conduzidos em casa-de-vegetação no município de Elias Fausto, nas três diferentes fases de observação;
- A análise de áreas isópatas indica que o ToYVSV é introduzido na área de plantio a partir de fora, ou seja, de plantas externas à área plantada;
- O ToYVSV e o vírus do amarelo baixeiro do tomateiro, mesmo que presentes em baixa incidência numa área, podem ocasionar perdas significativas na produção da ordem de 37,6% e 14,8%, respectivamente, sem contudo serem capazes de afetar qualitativamente os caracteres analisados.

REFERÊNCIAS

- ABOUZID, A.M.; POLSTON, J.E.; HIEBERT, E. The nucleotide sequence of *Tomato mottle virus*, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. **Journal of General Virology**, London, v. 73, n. 12, p. 3225-3229, 1992.
- ACCOTTO, G.P.; VAIRA, A.M.; VECCHIATI, M.; FINETTI SIALER, M.M.; GALLIETTI, D.; DAVINO, M. First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, p. 1208, 2001.
- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 485-490, 1993.
- ALBUQUERQUE, L.C; FERNANDES-CARRIGO, F.R; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L. S.; ÁVILA, A.C.; FONSECA, M.E.N.; NAGATA, T.; INOUE-NAGATA, A.K. A new begomovirus species in the tomato crop on Central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 29, p. 218-219, 2004.
- ALMEIDA, L.D.; PEREIRA, J.C.V.N.A.; RONZELLI JÚNIOR, P.; COSTA, A.S. Avaliação de perdas causadas pelo mosaico dourado do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 9, p. 213-219, 1984.
- AMBROZEVICIUS, L.P.; CALEGARIO, R.F.; FONTES, E.P.B.; CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 27, p. 372-377, 2002.
- ÁVILA, A.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; COSTA, H.; BOITEUX, L.S.; NEVES, L.Q.; PRATES, R.S.; BERTINI, L.A. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. **Horticultura Brasileira**, Botucatu, v. 22, n. 3, p. 655-658, 2004.
- BENLLOCH, L.P.; PROHENS, J.; NUEZ, F. Yield and fruit quality losses caused by ToMV in pepino (*Solanum muricatum* L.) and search for sources of resistance. **Euphytica** Wageningen , v. 120, p. 247-256, 2001.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais**: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1996. 289 p.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.F.; BERGER, R.D.; HAU, B. Análise temporal do Amarelecimento Fatal do dendezeiro como ferramenta para elucidar sua etiologia. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 23, p. 391-396, 1998.
- BOS, L. **Plant viruses, unique and intriguing pathogens**. Leiden: Backhuys Publishers, 1999. 358 p.

BRIDDON, R.W.; BEDFORD, I.D.; TSAI, J.H.; MARKHAM, P.G. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted geminivirus, *Tomato pseudo-curly top virus*, suggests a recombinant origin. **Virology**, London, v. 219, p. 387-394, 1996.

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

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 40, p. 511-534, 1995.

CALEGARIO, R.F.; FERNANDES, J.J.; ZERBINI, F.M. Detecção e caracterização de geminivirus em tomateiros na região do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p.115, jan./mar. 2001. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 24., 2001, Piracicaba.

CALEGARIO, R.F.; AMBROZEVICIUS, L.P.; SILVEIRA, S.F.; RODRIGUES, I.L.; MACIEAL-ZAMBOLIN, E.; ZERBINI, F.M. Survey of tomato geminivirus in Rio de Janeiro State, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 25, p. 438, 2000.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532 p.

COHEN, S.; NITSANY, F.E. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p.1127-1131, 1966.

COLARICCIO, A.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CHAGAS, C.M.; SAWAZAKI, H.E.; CHAVES, A.L.R.; EIRAS, M. Novo surto de geminivirus em *Lycopersicon esculentum* na região de Campinas, SP. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p. 105, jan./mar. 2001. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 24., 2001, Piracicaba.

COLVIN, J.; OMONGO, C.A.; MARUTHI, M.N.; OTIM-NAPE, G.W.; THRESH, J.M. Dual begomovirus infections and high *Bemisia tabaci* populations: two factors driving the spread of a cassava mosaic disease pandemic. **Plant Pathology**, Oxford, v. 53, p. 577-584, 2004.

COSTA, A.S. Moléstias do tomateiro no Brasil transmitidas pela mosca branca *Bemisia tabaci*. In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE FITOPATOLOGIA, 7., Brasília, 1974. **Resumo ...**

COSTA, A.S. Avaliação das perdas causadas pelas fitoviroses. In: COSTA, A. S.; MÜLLER, G.W.; NAGAI, H.; COSTA LIMA, M.L.R.Z.; KUNIYUKI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; OLIVEIRA, A.R.; YAMAMOTO, K.; FREITAS, F.C. (Ed.). **Virologia**. Piracicaba: ESALQ, 1975. p.1-27.

COSTA, C.L.; CUPERTINO, F.P. Avaliação das perdas na produção do feijoeiro causadas pelo vírus do mosaico dourado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.1, p.18-25, 1976.

COSTA, A.S.; OLIVEIRA, A.R.; SILVA, D.M. Transmissão mecânica do agente causal do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 3, p.195-200, 1977.

CREAMER, R.; LUQUE-WILLIAMS, M.; HOWO, M. Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 80, n. 5, p.533-535, 1996.

DANIELS, J.; CARVALHO, T.C.P.; COUTO, M.E.O. Alta incidência do vírus do mosaico do tomateiro causa preocupação aos produtores de tomate da serra gaúcha. **Horti Sul**, Pelotas, v. 3, p. 5-10, 1994.

EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, n. 6, p.1349, 1991.

EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; CHAVES, A.L.R.; TAVARES, C.A.M.; HARAKAWA, R. Levantamento preliminar de geminivirus em tomateiros no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v 28, n.1, p. 97, jan./mar. 2002. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 25., 2002, Espírito Santo do Pinhal.

ESPINOZA, W. **Manual de produção de tomate industrial no vale do São Francisco**. Brasília: CODEVASF, 1991. 301 p.

FAJARDO, T.V.M.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Doenças causadas por vírus em tomate. In ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. v.2, cap. 24,p. 843-877.

FARIA, J.C.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; SLACK, S.A.; MAXWELL, D.P. A new geminivirus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 423, 1997.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, V.; BALL, L. A. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. London: Elsevier Academic Press, 2005. 1259 p.

FAUQUET, C.M.; BISARO, D.M.; BRIDDON, R.W.; BROWN, J.K.; HARRISON, B.D.; RYBICKI, E.P.; STENGER, D.C.; STANLEY, J. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. **Archives of Virology**, New York, v. 148, p. 405-421, 2003.

FILGUEIRA, F.A.R. **Manual de olericultura**: cultura e comercialização de hortaliças. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 338 p.

FLORES, E.; SILBERSCHMIDT, K.; KRAMER, M. Observações de 'clorose infecciosa' das malváceas em tomateiros no campo. **O Biológico**, São Paulo, v. 26, p. 65-69, 1960.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **AGRIANUAL 2005**: anuário de agricultura brasileira. São Paulo: Argos Comunicação, 2005. 520 p.

FRANÇA, F.H.; VILLAS-BOAS, G.L.; CASTELO-BRANCO, M. Occurrence of *Bemisia argentifolli* Bellows & Perring (*Homoptera:Aleyrodidae*) in the Federal District. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p.369-372, 1996.

GÁMEZ, R.; SAAVEDRA, F. Maize rayado fino: A model of a leafhopper-borne virus disease in the neotropics. In MCLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. (Ed.). **Plant virus epidemics**: monitoring, modelling and predicting outbreaks. Sydney: Academic, 1986. p. 315-326.

GARRET, R.G.; RUESINK, W.G.; MCLEAN, G.D. Epilogue: a perspective. In MCLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. **Plant virus epidemics**: monitoring, modelling and predicting outbreaks. Sydney: Academic, 1986. p. 525-535.

GÄUMANN, E. **Principles of plant infection**. London: Crosby Lockwood, 1950. 543 p.

GENT, H.D.; SCHWARTZ, H.F. Distribution and incidence of *Iris yellow spot virus* in Colorado and its relation to onion plant population and yield. **Plant Disease**, Saint Paul, v.88, n.5, p. 446-452, 2004.

GHANIM, M.; MORIN, S.; ZEIDAN, M.; CZOSNEK, H. Evidence for transovarial transmission of Tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. **Virology**, London, v.240, p. 295-303, 1998.

GILLIGAN, C.A. Statistical analysis of the spatial pattern of *Botrytis fabae* on *Vicia faba*: a methodological study. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 79, p. 193-200, 1982.

GIORDANO, L.B.; FONSECA, M.E.N.; SILVA, J.B.C.; INOUE-NAGATA, A.K.; BOITEUX, L.S. Efeito da infecção precoce por *Begomovirus* com genoma bipartido em características de frutos de tomate industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.3, p. 815-819, 2005.

GONÇALVES, P.M.R.; JULIATTI, F.C.; FERNANDES, J.J.; TAKATA, S.M.S.; SILVA, O.A.; GOULART, L.R.; MILITÃO NETO, V. Efeito da época de inoculação em casa de vegetação na determinação de perdas por geminivirus no tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 22, p. 335-336, 1997.

GOTTWALD, T.R. Spatio-temporal analysis and isopath dynamics of citrus scab in nursery plots. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p.1082-1092, 1995.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; BORBÓN, J.C. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 621-636, 1998.

GOTTWALD, T.R.; GIDTTI, F.B.; SANTOS, J. M.; CARVALHO, A. C. Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis (CVC) in São Paulo, Brazil. In: IOCV CONFERENCE, 12., 1993. **Proceedings ...** p. 327-335.

GOTTWALD, T.R.; GIBSON, G.J.; GARNSEY, S.M.; IREY, M. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by stochastic modeling. **Phytopathology**, Saint Paul, v 89, p. 603-608, 1999.

GOTTWALD, T.R.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; CAMARASA, E.; PIQUER, J. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in eastern Spain. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p. 45-55. 1996a.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBON, J. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza. **Proceedings. I.O.C.V. Conference**, 13, p.120-129, 1996b.

GOTTWALD, T.R.; GARNSEY, S.M.; CAMBRA, M.; MORENO, P.; IREY, M.; BORBON, J. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. **Fruits**, Paris, v. 52, p. 397-404, 1997.

GROVES, R.L.; WALGENBACH, J.F.; MOYER, J.W; KENNEDY, G.G The role of weed hosts and Tobacco Thrips, *Frankliniella fusca*, in the Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86, n.6, p.573-582, 2002.

HOLT, J.; COLVIN, J.; MUNIYAPPA, V. Identifying control strategies for *Tomato leaf curl virus* disease using an epidemiological model. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v.36, p. 625-633, 1999.

HUGHES, G.; MADDEN, L.V. Aggregation and disease incidence. **Plant Pathology**, Oxford, v. 41, p. 657-660, 1992.

HUGHES, G.; MADDEN, L.V. Using the beta-binomial distribution to describe aggregated patterns of disease incidence. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, p. 759-763, 1993.

HUGHES, G.; McROBERTS, N.; MADDEN, L.V.; NELSON, S. Validating mathematical models of plant-disease progress in space and time. **IMA Journal of Mathematics Applied in Medicine and Biology**, Oxford, v 14, p. 85-112. 1997.

JEGER, M. J. **Spatial components of plant disease epidemics**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1989. 243 p.

JONES, D.G. **The epidemiology of plant diseases**. Dordrecht: Kluwer, 1998. 460p.

JONES, D.R. Plant viruses transmitted by whiteflies. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 195-209, 2003.

KRANZ, J. Comparison of epidemics. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 355-374, 1974.

KRANZ, J. **Epidemiologie der pflanzenkrankheiten**. Stuttgart: Eine Einführung Stuttgart Ulmer, 1996. 413 p.

KUROSAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças do tomateiro. In KIMATI, H.; AMORIM L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, cap. 67, p. 607-626.

LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica espacial e temporal da clorose variegada dos citros** 1997. 144 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

LIU, T.X.; OETTING, R.D.; BUNTIN, G.D. Population dynamics and distribution of *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on poinsettia following applications of three chemical insecticides. **Journal of Entomological Science**, Athens, v. 28, n.1, p.126-135, 1993.

LOURENÇÃO, A.L.; NAGAI, H. Surtos populacionais de *Bemisia tabaci* no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.53-59, 1994.

MACIEL-ZAMBOLIM, E.; COSTA, H; CAPUCHO, A.S.; ÁVILA, A.C.; INOUE- NAGATA, A.; KITAJIMA, E.W. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo, **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, n.3, p.325-327, 2004.

MADDEN, L.V. Dynamic nature of within-field disease and pathogen distributions. In: JEGER, M.J. (Ed.). **Spatial components of plant disease epidemics**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1989. p. 96-126.

MADDEN, L.V.; CAMPBELL, C.L. Descriptions of virus disease epidemics in time and space. In: MCLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. **Plant virus epidemics: monitoring, modelling and predicting outbreaks**. Sydney: Academic, 1986. p. 273-293.

MADDEN, L.V.; HUGHES, G. Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 529-564, 1995.

- MADDEN, L.V.; PIRONE, T.P.; RACCAH, B. Temporal analysis of two viruses increasing in the same tobacco fields. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, p. 974-980. 1987.
- MADDEN, L.V.; NAULT, L.R.; MURRAL, D.J.; APELT, M.R. Spatial pattern analysis of the incidence of aster yellow disease in lettuce. **Research Population Ecology**, v. 37, p. 279-289, 1995.
- MANSOUR, A.; AL-MUSA, A. Tomato yellow leaf curl virus: host range and virus-vector relationship. **Plant Pathology**, Oxford, v. 31, p. 122-125, 1992.
- MANTOVANI, D. M. B.; CARVALHO, C. R. L.; CARVALHO, P. R. N.; MORAES, R. M. **Análises químicas de alimentos**: manual técnico. Campinas: ITAL, 1990. 121p.
- MARCUS, R.; FISHMAN, S.; TALPAZ, H.; SOLOMON, R.; BAR-JOSEPH, M. On the spatial distribution of tristeza virus disease. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 12, p. 45-52, 1984.
- MATOS, E.S.; SIQUEIRA, W.J.; LOURENÇAO, A.L.; MELO, A.M.T.; SAWAZAKI, H.E.; SOUSA-DIAS, J.A.C.; COLARICCIO, A. Resistência de genótipos de tomateiro a um isolado de geminivirus do cinturão verde de Campinas, São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p.159-165, 2003.
- MATYIS, J.C.; SILVA, D.M.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, A.S. Purificação e morfologia do vírus do mosaico dourado do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 1, p.267-275, 1975.
- MCKIRDY, S.J.; JONES, R.A.C.; NUTTER JR, F.W. Quantification of yield losses caused by *Barley yellow dwarf virus* in wheat and oats. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 7, p. 769-773, 2002.
- McLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. **Plant virus epidemics**: monitoring, modelling and predicting outbreaks. Sydney: Academic, 1986. 550p.
- MEHTA, P.; WYMAN, J.A.; NAKHLA, M.K.; MAXWELL, D.P. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 87, p.1291-1297, 1994.
- MINAMI, K.; HAAG, H. P. **O tomateiro**. Campinas: Fundação Cargill, 1989. 397 p.
- NAKHALA, M.K.; MAXWELL, D.P. Epidemiology and management of tomato yellow leaf curl disease. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R. K.; KOGANEZAWA, H. (Eds.) **Plant virus disease control**. Saint Paul: APS Press. 1998.
- NDUNGURU, J.; RAJABU, A.C. Effect of *Okra mosaic virus* disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.99, p.225-235, 2004.

NUTTER JUNIOR, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. **Crop Protection**, Guildford, v. 16, p. 603-618, 1997.

PAPLOMATAS, E.J.; PATEL, V.P.; HOU, Y.M.; NOUEIRY, A.O.; GILBERTSON, R.L. Molecular characterization of a new sap-transmissible, bipartite geminivirus infecting tomatoes in Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1215-1224, 1994.

PERRING, T.M. The *Bemisia tabaci* species complex. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 725-737, 2001.

PFENDER, W.F. Monocyclic and polycyclic root diseases: Distinguishing between the nature of the disease cycle and the shape of the disease progress curve. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, p. 31-32. 1982.

PLUMB, R.T.; THRESH, J.M. **Plant virus epidemiology**: the spread and control of insect-borne viruses. Oxford: Blackwell, 1983. 377 p.

POLSTON, J.E.; ANDERSON, P.K. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western hemisphere. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p.1358-1369, 1997.

POLSTON, J.E.; CHELLEMI, D.O.; SCHUSTER, D.J.; MCGOVERN, R.J.; STANSLY, P.A. Spacial and temporal dynamics of *Tomato mottle geminivirus* and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. **Plant Disease**, Saint Paul, v.80, n.9, p.1022-1028, 1996.

POUR, A.K.; BENDAHDANE, M.; MATZEIT, V.; ACCOTTO, G.P.; CRESPI, S.; GRONENBORN, B. *Tomato yellow leaf curl virus* from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6763-6769, 1991.

RIBEIRO, S.G.; BEZERRA, I.C.; LIMA, M.F.; AVILA,, A.C.; GIORDANO, L.B. Occurrence of Geminivirus in tomato plants in Bahia. In: SOCIEDADE DE VIROLOGIA MEETING BRAZIL, 8., 1996, São Lourenço. **Proceedings ...** São Lourenço: Sociedade de Virologia, 1996. p. 290.

RIBEIRO, S.G.; AMBROZEVICIUS, L.P.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.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 begomovirus in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v.148, n.2, p.281-295, 2003.

RIBEIRO, S.G.; ÁVILA, A.C.; BEZERRA, I.C.; FERNANDES J.J.; FARIA, J.C.; LIMA M.F.; GILBERTSON, R.L.; ZAMBOLIM, E.M.; ZERBINI, F.M. Widespread occurrence of tomato geminiviruses in Brazil, associated with the new biotype of the whitefly vector. **Plant Disease**, Saint Paul, v.82, p.830, 1998.

RODRIGUEZ, R.R.; RODRIGUEZ, J.M.T.; SAN JUAN, J.A.M. **Cultivo moderno del tomate**. 2. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 1997. 255 p.

ROJAS, M.R.; GILBERTSON, R.T.; RUSSEL, D.R.; MAXWELL, D.P. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 77, p. 340-347, 1993.

SANTOS, C.D.G.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Estudo da interação de um begomovirus isolado de tomateiro com a mosca branca. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p.664-673, 2003.

SANTOS, C.D.G.; BEZERRA, I.C.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Occurrence of geminivirus in tomato crops in the state of Goiás. **Virus Reviews & Research**, São Paulo, v. 3, p. 144, 1998.

SIKORA, E.J.; GUDAUSKAS, R.T.; MURPHY, J.F.; PORCH, D.W.; ANDRIANIFAHANANA, M.; ZEHNDER, G.W.; BAUSKE, E.M.; KEMBLE, J.M.; LESTER, D.F. A multivirus epidemic of tomatoes in Alabama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, p. 117-120, 1998.

SOUZA-DIAS, J.A.C.; YUKI, V.A.; RIBEIRO, S.G.; RAVAGNANE, V. A. Risca amarela da nervura do tomateiro é causada por geminivirus que infecta batata. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 22, n.1, p. 57, jan./mar. 1996. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 19., 1996, Campinas.

TAYLOR, L.R. Aggregation, variance and the mean. **Nature**, London, v. 189, p. 732-735, 1961.

TAYLOR, L.R.; PERRY, J.N.; WOIWOD, I.P.; TAYLOR, R.A.J. Specificity of the spatial power-law exponent in ecology and agriculture. **Nature**, London, v. 332, p. 721-722, 1988.

THRESH, J.M. Temporal patterns of virus spread. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 111-128, 1974.

THRESH, J.M. Gradients of plant virus diseases. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 82, p. 381-406, 1976.

THRESH, J.M. An ecological approach to the epidemiology of plant virus diseases. In: PALTÍ, J.; KRANZ, J. (Ed.). **Comparative epidemiology**. Wageningen: Pudoc, 1980.

THRESH, J.M. Progress curves of plant virus disease. **Advances in Applied Biology**, v. 8, p. 1-85, 1983.

THRESH, J.M. In: MCLEAN, G.D.; GARRET, R.G.; RUESINK, W.G. (Ed.). **Plant virus epidemics: monitoring, modelling and predicting outbreaks**. Sydney: Academic, 1986. p. 15-16.

THRESH, J.M. Cocoa swollen shoot: an archetypal crowd disease. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 95, p. 428-446, 1988.

THRESH, J.M. The ecology of tropical plant virus. **Plant Pathology**, Oxford v. 40, p. 324-339, 1991.

TIMMERMANS, M.C.P.; DAS, O.P.; MESSING, J. Geminivirus and their use as extrachromosomal replicons. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 45, p. 79-112, 1994.

TONHASCA, A.; PALUMBO, J.C.; BYRNE, D.N. Aggregation patterns of *Bemisia tabaci* in response to insecticide applications. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 72, n.3, p. 265-272, 1994.

TRUMBLE, J.T. Implications of changes in arthropod distribution following chemical applications. **Research Population Ecology**, Kyoto, v.27, n.2, p.277-285, 1985.

UPTON, G.; FINGLETON, B. **Spatial data analysis by example: point pattern and quantitative data**. Chichester: Wiley, 1985. 409 p.

VAN REGENMORTEL, M.H.V; DUBS, M.C. Serological procedures. In: MATTHEWS, R.E.F. (Ed.). **Diagnosis of plant virus disease**. Boca Raton: CRC Press, 1993. chap. 7, p. 159-214.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H. C.; CARTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MC GEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of virus**. San Diego: Academic Press, 2002. 1162 p.

VANDERPLANK, J.E. Analysis of epidemics. In: HORSFALL, J.G.; DIMOND, A.E. (Ed.). **Plant Pathology: an advanced treatise**. New York: Academic Press, 1960. v. 3,

VANDERPLANK, J.E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic Press, 1963. 349 p.

VERHOEVEN, J.T.H.J.; WILLEMEN, T.M.; ROENHORST, J.W. First report of *Pepper mottle virus* in Tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n.2, p. 186, Feb. 2002.

VLUGT, R.A.A. van der.; STIJGER, C.C.M.M. von der; NAALDWIJK, A.A.; VERHOEVEN, J.T.H.J.; LESEMANN, D.E. First report of *Pepino mosaic virus* on Tomato. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n.1, p. 103, Jan. 2000.

WYATT, S.D.; BROWN, J.K. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, p.1288-1293, 1996.

ZADOKS, J.C. The role of epidemiology in modern plant pathology. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 64, p. 918-923, 1974.

ZADOKS, J.C. Reflections on space, time, and diversity. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 1-17, 1999.

ZADOKS, J.C.; SCHEIN, R.D. **Epidemiology and plant disease management**. New York: Oxford University Press, 1979. 427 p.

ZEIDAN, M.; CZOSNEK, K. Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of General Virology**, London, v. 72, p. 2607-2614, 1991.