

Identificação do Vírus do Frisado Amarelo do Tomateiro (TYLCV) e do Vírus do Mosaico do Tomateiro (ToMV), na cultura de tomate na ilha de Santiago, Cabo Verde.

João Francisco Semedo Monteiro

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em
Agronomia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Arlindo Lima

Júri:

Presidente: Professora Doutora Judite Nascimento – UNI-CV

Vogais: Professor Doutor António Mexias – ISA-UTL

Praia 2012

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Arlindo Lima por toda a orientação prestada durante a dissertação, pelos ensinamentos, conselhos, incentivos e principalmente, pelo esforço dispensado para que tudo desse certo no decorrer da elaboração desta dissertação.

Aos meus pais, por me terem proporcionado a educação necessária, pela confiança longe dos olhos e, acima de tudo pelo amor incondicional.

À minha família pelo apoio e compreensão demonstrada ao longo desses dois anos.

Ao pessoal do Laboratório da Fitopatologia do ISA-UTL, especialmente a Eng^a Marta Rocha pelos apoios que me proporcionaram em Lisboa.

Aos colegas de curso do Mestrado em Agronomia e Recursos Naturais por todos os momentos de alegria e de superação vividos juntos durante o curso.

Aos professores do ISA-UTL que leccionaram neste curso pelos ensinamentos dispensados durante o ano lectivo.

Às universidades UNI-CV e ISA-UTL por me proporcionar esta grande oportunidade de poder efectuar este curso aqui em Cabo Verde.

À INIDA por me ter permitido realizar esse trabalho nas suas instalações.

Ao IPAD pelo apoio financeiro dispensado, tornando realidade este curso.

DEDICATÓRIA

Dedico:

Aos meus pais: Agostinho Tavares Monteiro e Paulina Varela Semedo, pela dedicação, respeito, confiança, força, amor e principalmente pelos ensinamentos básicos fundamentais à formação da minha personalidade;

Aos meus filhos: Edna Mendes Monteiro, Florentino Mendes Monteiro e Edson Pedro Correia Monteiro, pelos momentos felizes de convivência e pela amizade fraternal;

À minha esposa: Cesarina Mendes Correia, pela compreensão, apoio e amor que sempre me transmitiu.

RESUMO

Sintomas atribuídos ao vírus do Frisado Amarelo do Tomateiro (TYLCV) e ao vírus do Mosaico do Tomateiro (ToMV) são frequentemente registados em solanáceas em Cabo Verde e a eles associam-se prejuízos em culturas, sobretudo de tomate.

Para confirmar a presença de TYLCV e ToMV em solanáceas em Cabo Verde, avaliaram-se por teste DAS-ELISA 16 amostras de plantas das espécies *Solanum lycopersicum*, *S. melanogeta*, *Capsicum annum* e *C. frutescens* com sintomas de viroses. Determinou-se ainda a presença de TYLCV e ToMV em seis lotes de sementes de três cultivares de tomateiro, “Calor”, “CV01” e “Produtor”, produzidas no país em 2008 e 2009 e em plantas provenientes dessas sementes. Finalmente avaliou-se a incidência de viroses e a produtividade em ensaios instalados com plantas obtidas dessas sementes.

TYLCV foi encontrado em 10 das amostras de solanáceas estudadas, constituindo *S. lycopersicum*, *S. melanogeta* e *C. annum* plantas hospedeiras do vírus em Cabo Verde. Por sua vez, ToMV foi registado numa amostra de *S. lycopersicum*. TYLCV foi detectado em sementes das três cultivares estudadas e ToMV nas sementes da cv. CV01. Nos ensaios de campo detectou-se apenas TYLCV que surgiu em amostras de plantas de todas as modalidades (cultivar x ano da semente).

A média da incidência de viroses registada nos ensaios de campo foi de 0,8% na cv. CV01, 44,5% na cv. Produtor e 51,5% na cv. Calor e as médias das produções no ensaio de S. Domingos foram de 20,6 t/ha em ‘CV01’, 17,4 t/ha em ‘Produtor’ e 11,6 t/ha em ‘Calor’.

Mostrou-se que “Tomatinho”, variedade espontânea de *S. lycopersicum*, e plantas de *S. melanogeta* que são mantidas nos campos para além do ciclo do tomateiro aparecem infectadas por TYLCV, constituindo importante reservatório do vírus.

Palavras-chave: Viroses, Tomateiro, Incidência, Severidade, TYLCD, DAS-ELISA

ABSTRACT

The diseases Tomato Yellow Leaf Curl (TYLCD) and the Tomato Mosaic Virus (TMV/ ToMV) are found with frequency on solanaceous crop plots in Cape Verde. The Tomato Yellow Leaf Curl is transmitted by the white fly *Bemisia tabaci* Genn, which is a very important pest of tomato. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus is transmitted mechanically through seeds, working tools, field workers, hands and plant contacts.

For identification and differentiation of the two types of viruses, symptomatic and non symptomatic leaf samples were collected from *Solanum lycopersicum*, *Solanum melanoana*, *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*, as well as from seeds of *Solanum lycopersicum* locally produced from three varieties produced in 2008 and 2009 which were submitted to ELISA TEST.

The sixteen (16) samples that came from field crops from the Santiago Island, ten of them showed symptoms of TYLCV about (62,5 % of the samples) and only one showed symptoms of the virus ToMV about (6 % of the samples). Among the tested species, the TYLCV was detected on *S. lycopersicum*, *S. melanoana* and *C. annum*, but not finding this same virus on *C. frutescens*.

From the eighteen (18) samples that came from the greenhouse experimental plots at S. Jorge experimental station, five of them showed symptoms of TYLCV which corresponded 27,7% of the samples.

Tests of ToMV conducted on seeds showed positive results on 'CV01' variety in about 33,3 % of the cases. However, plants gotten from these seeds did not show symptoms of ToMV. The seeds gave positive results in the order of 100 % in relation to TYLCV.

The Viruses incidence varied between 0% on the 'CV01' x 2008 and CV01' x 2009 modalities in the greenhouse experiment. And 'CV01' x 2009 under field test and 70,67% upon 'Produtor' x 2008 modalities also under field experiment. The severity was 0% for the combinations of 'CV01' x 2008 and 'CV01' x 2009 under the greenhouse experiment and the 'CV01' x 2009 combination under field experiment was 0,03.

The production was relatively good in the 'CV01' x 2009 with 21,8 t/ha. The 'CV01' x 2008 combination modalities produced 19,4 t/ha and 'Produtor' x 2008 produced 19,6 t/ha. The combination of 'Calor' x 2008 modality produced less about 10,0 t/ha. This low yield production on 'Calor' x 2008 combination can be said that it was due to the strong incidence of the virus upon the crop (65,4%), accompanied by a high level of severity (1,14).

Key-words: TYLCD, TYLCV, ToMV, DAS-ELISA,

EXTENDED ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L., synonym *Lycopersicon esculentum* Mill.) needs an overview among the vegetables with some importance worldwide and followed by tuber crops (potato, cassava and sweet potato) considering the areas made available for its growing and volumewise production (Faostat, 2012). It is originated from the West Coast of South America (Ecuador, Perú e Chile) where wild varieties are found in high elevations from which the actual cultivated varieties originated. Presently tomato is cultivated in all continents on more than 4,3 billions of hectares where more than 50% of the cultivated hectares are located in five countries: China, Índia, Turquia, Nigéria e Egípto (Faostat, 2012). Therefore, the productivity varies according to the growing conditions and the region. The international literature indicates various species of Viruses with economic importance on tomato where mostly belong to the Begomovirus genus of the family Geminiviridae (Lima *et al.*, 2001). Apart from the begomovirus there are also other important species belonging to the families of Bromoviridae, Bunyaviridae, Flexiviridae, Luteoviridae, Tombusviridae e Virgaviridae or to genres not grouped in families (Lima *et al.*, 2001). By importance, tomato viruses are ordered or grouped as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato virus Y* (PVY) and the *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Lima *et al.*, 2001).

The diseases Tomato Yellow Leaf Curl (TYLCD) and the Tomato Mosaic Virus (TMV/ ToMV) are found with frequency on solanaceous crop plots in Cape Verde. The Tomato Yellow Leaf Curl is transmitted by the white fly *Bemisia tabaci* Genn, which is a very important pest of tomato. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus is transmitted mechanically through seeds, working tools, field workers, hands and plant contacts.

For identification and differentiation of the two types of viruses, symptomatic and non symptomatic leaf samples were collected from *Solanum lycopersicum*, *Solanum melanoana*, *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens*, as well as from seeds of *Solanum lycopersicum* locally produced from three varieties produced in 2008 and 2009 which were submitted to ELISA TEST.

The sixteen (16) samples that came from field crops from the Santiago Island, ten of them showed symptoms of TYLCV about (62,5 % of the samples) and only one showed symptoms of the virus ToMV about (6 % of the samples). Among the tested species, the TYLCV was detected on *S. lycopersicum*, *S. melanoana* and *C. annum*, but not finding this same virus on *C. frutescens*.

From the eighteen (18) samples that came from the greenhouse experimental plots at S. Jorge experimental station, five of them showed symptoms of TYLCV which corresponded 27,7% of the samples.

Tests of ToMV conducted on seeds showed positive results on 'CV01' variety in about 33,3 % of the cases. However, plants gotten from these seeds did not show symptoms of ToMV. The seeds gave positive results in the order of 100 % in relation to TYLCV.

The Viruses incidence varied between 0% on the 'CV01' x 2008 and CV01' x 2009 modalities in the greenhouse experiment. And 'CV01' x 2009 under field test and 70,67% upon 'Produtor' x 2008 modalities also under field experiment. The severity was 0% for the combinations of 'CV01' x 2008 and 'CV01' x 2009 under the greenhouse experiment and the 'CV01' x 2009 combination under field experiment was 0,03.

The production was relatively good in the 'CV01' x 2009 with 21,8 t/ha. The 'CV01' x 2008 combination modalities produced 19,4 t/ha and 'Produtor' x 2008 produced 19,6 t/ha. The combination of 'Calor' x 2008 modality produced less about 10,0 t/ha. This low yield production on 'Calor' x 2008 combination can be said that it was due to the strong incidence of the virus upon the crop (65,4%), accompanied by a high level of severity (1,14).

Key-words: TYLCD, TYLCV, ToMV, DAS-ELISA,

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	O tomateiro.....	5
2.2	Principais vírus e viroses do tomateiro.....	6
2.3	A família <i>Gemnaviridae</i>	8
2.3.1	Hospedeiros.....	9
2.3.2	O género <i>Begomovirus</i>	9
2.3.3	Mecanismos de diversidade genética de begomovirus.....	13
2.3.4	A doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCD).....	14
2.4	A família <i>Virgaviridae</i>	17
2.4.1	Hospedeiros.....	18
2.4.2	O género <i>Tobamovirus</i>	18
2.4.3	A doença do mosaico do tomateiro.....	19
2.4.4	A espécie <i>ToMV</i>	20
2.5	Mecanismos de resistência aos vírus.....	21
2.6	Diagnóstico das doenças virais com recurso à serologia.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Ensaio de campo e em estufa.....	26
3.1.1	Características gerais das cultivares.....	26
3.1.2	Locais dos ensaios.....	26
3.1.3	Delineamento experimental.....	27
3.1.4	Dimensão dos ensaios.....	27
3.1.5	Itinerário cultural nos ensaios.....	27
3.2	Avaliação do comportamento das cultivares a viroses.....	29
3.3	Obtenção de amostras de plantas para os ensaios imunoenzimáticos.....	29
3.4	Ensaio imunoenzimáticos (Teste DAS-ELISA).....	30
3.4.1	Anticorpos utilizados.....	30
3.4.2	Preparação dos tampões.....	30
3.4.3	Preparação das amostras.....	32
3.4.4	Procedimentos para a realização do teste DAS-ELISA para ToMV.....	33

4	Resultados e discussão	36
4.1	Detecção de TYLCV e ToMV nas amostras estudadas.....	36
4.1.1	Avaliação da incidência e da severidade de viroses nos ensaios	38
4.2	Estudo da produção	41
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
	ANEXO 1.....	56

ÍNDICE DE FIGURA

Fig 2. 1 - Morfologia de geminivírus. Esquerda: organização dos capsómeros.....	8
Fig 2. 2 – Mosca branca <i>Bemisia tabaci</i> , biotipo B.....	11
Fig 2. 3 - Sintomas de TYLCV na planta de tomate	14
Fig 2. 4 - Organização genómica do <i>Tomato yellow leaf curl vírus</i> (TYLCV).....	17
Fig 2. 5 - <i>Virgaviridae</i> : Família de vírus helicoidal não envelopados	17
Fig 2. 6 – Sintomas de ToMV nas folhas de tomateiro	19
Fig 2. 7 - Morfologia do ToMV.....	20
Fig 3. 1 - Localização do ensaio de campo realizado em S. Jorge (1) e em S. Domingos (2).....	27
Fig 3. 2 - Amostra de folha.....	30
Fig 3. 3 - Amostra de sementes	30
Fig 3. 4 - Amostra de sementes macerada	33
Fig 3. 5 - Disposição das amostras na placa ELISA.....	34
Fig 4. 1 - Resultados do ensaio imunoenzimático para TYLCV.....	37
Fig 4. 2 - Resultados do ensaio imunoenzimático para ToMV.....	37

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Incidência de begomovírus no tomateiro e prejuízos associados aos ataques nalgumas regiões de produção	10
Quadro 2: Identificação das amostras avaliadas em ensaios imunoenzimáticos (DAS-ELISA)	31
Quadro 3: Resultado das análises de TYLCV e ToMV em material do campo dos ensaios e das sementes.	36
Quadro 4: Valores da incidência de viroses com base na observação dos sintomas e da severidade com base nas classes da escala de severidade dos sintomas nos ensaios de S. Jorge e S. Domingos	39
Quadro 5: Resultado da análise de variância da incidência de viroses com base na observação dos sintomas e da severidade com base nas classes da escala de severidade dos sintomas	40
Quadro 6: Componentes do rendimento no ensaio de tomate em S. Jorge (estufa) ...	41
Quadro 7: Componentes do rendimento no ensaio de tomate em S. Domingos (ar livre)	42
Quadro 8: Comparação das produções de tomate nos ensaios de S. Jorge (estufa) e S. Domingos (ar livre)	42
Quadro 9: Produção das cultivares no conjunto dos ensaios em função do ano de produção da semente	43
Quadro 10: Produção das cultivares no conjunto dos ensaios em função do ano de produção da semente e dos locais de produção - S. Jorge (estufa) e S. Domingos (ar livre)	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AC1, AC2, AC3 e AV1	As quatro ORFs do DNA-A
AV2	Uma ORF adicional
BC1, BV1	Duas ORFs do DNA-B
c	Sentido complementar
CMV	<i>Cumcumber mosaic vírus</i>
CP	Proteína de Encapsidação
DNA-A e DNA-B	Componentes genómicos
ELISA	Ensaio de Imuno-Adsorção Enzimática
EPPO:	Organização Europeia para a Protecção e Mediterrânica
ICTV:	International Committee on Taxonomy of Viruses
INFA:	Instituto Nacional de Fomento Agrário
INIDA:	Instituto Nacional de Investigação e Desenvolvimento Agrário
IR:	Região intergénica
Kb	kilobases
LIR:	Região intergénica maior
MP:	Proteína de Movimento
NSP:	Proteína Nuclear de Transporte
ORF:	Estrutura de Leitura Aberta
PCR:	Reacção Polimerase em Cadeia.
PepMoV	<i>Pepper mottle vírus</i>
PepMV	<i>Pepino mosaic vírus</i>
PepYMV	<i>Pepper yellow mosaic vírus</i>
PL:	Período de latência
PVY	<i>Potato vírus Y</i>
RC:	Região comum
Rep	Proteína associada a replicação
TAATATTAC :	Sequência conservada de nove nucleotídeos da RC
TCSV	<i>Tomato chlorotic spot virus</i>
TEV	<i>Tobacco etch vírus</i>
TICV	<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic vírus</i>
ToCV	<i>Tomato chlorosis virus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic vírus</i>
ToYTV	<i>Tomato yellow top vírus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt vírus</i>
TYBLV	<i>Tomato yellow bottom leaf vírus</i>
TYLCD	<i>Tomato yellow leaf curl disease</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
v:	Sentido viral

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., sinónimo *Lycopersicon esculentum* Mill.) merece destaque dentre as olerícolas de importância mundial, surgindo logo a seguir às principais culturas de tubérculo (batata, mandioca e batata doce), quanto à área dedicada ao seu cultivo e ao volume de produção (Faostat, 2012). A sua origem situa-se na costa oeste da América do Sul (Equador, Perú e Chile) onde, especialmente em altitudes elevadas, são encontradas variedades silvestres que foram precursoras das variedades presentemente cultivadas. O cultivo de tomate iniciou-se provavelmente no México e os espanhóis no século XVI levaram-no para a Europa, onde rapidamente se espalhou por toda a região do Mediterrâneo e, posteriormente, para todo o mundo (Rodriguez *et al.*, 1997).

Actualmente o tomateiro é cultivado em todos os continentes em mais de 4,3 milhões de hectares, dos quais mais de 50% se localizam em apenas cinco países: China, Índia, Turquia, Nigéria e Egipto (Faostat, 2012). Porém, a produtividade referida para a cultura varia de acordo com as condições de cultivo e com a região de produção. Enquanto nos países onde a cultura é feita em estufas e com perfeito controlo dos factores de produção a produtividade pode chegar aos 500 000 kg/ha/ano (casos da Dinamarca, Irlanda, Holanda e Bélgica), nos países de clima tropical e subtropical a produção é frequentemente inferior a 20 000 ou mesmo 10 000 kg/ha/ano (Faostat, 2012). De entre os inúmeros factores que contribuem para a baixa produtividade registada em muitas zonas de produção destacam-se problemas fitossanitários, causados quer por pragas, sobretudo de insectos, quer por patogénios, de entre os quais nemátodos, fungos, pseudofungos, bactérias e vírus (Fajardo, 2000; Kurosowa, 2005).

A literatura internacional indica várias espécies de vírus com importância económica no tomateiro, a maioria das quais pertencem ao género *Begomovirus*, família *Geminiviridae* (Lima *et al.*, 2001). No entanto, para além dos begomovírus surgem com inegável importância no tomateiro espécies pertencentes às famílias *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Flexiviridae*, *Luteoviridae*, *Tombusviridae* e *Virgaviridae* ou a géneros não colocados em família (Lima *et al.*, 2001). Pela sua importância, destacam-se na cultura o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)), o vírus do bronzeamento do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)), o vírus do mosaico amarelo das cucurbitáceas (*Cucumber mosaic virus* (CMV)), o vírus Y da batateira (*Potato virus Y* (PVY)) e o vírus do mosaico do tomateiro (*Tomato mosaic virus* (ToMV)) (Lima *et al.*, 2001).

A importância dos begomovírus, transmitidos por moscas brancas, sobretudo *Bemisia tabaci* (Genn.), tem aumentado consideravelmente desde o final da década de 80 e são o constrangimento principal à produção de várias culturas em todo o mundo (Polston & Anderson, 1997). No tomateiro em 2002 estavam assinaladas 31 espécies de begomovírus e em 2005 estavam referidas 50 espécies como patogénicas e 39 estavam a ser avaliadas (Polston, 2009). O vírus do mosaico do tomateiro é um dos mais frequentes na cultura e pode causar infecção latente ou mosaico severo e necroses em variedades susceptíveis, os quais conduzem a elevados prejuízos (Polston, 2009).

O tomateiro é uma hortícola tradicional da agricultura caboverdeana. No entanto, o interesse pela cultura tem crescido nas últimas décadas e os dados disponíveis mostram que a área cultivada e a produtividade aumentaram a partir dos anos 90 com a criação do INFA, em 1993. Nas décadas de 60 a 80 a área dedicada à cultura era de cerca de 20 hectares e a produtividade calculada era de 5 000 kg/ha (Faostat, 2012). Depois desse período, tanto a área como as produções cresceram, o que levou a que em 2010 a área cultivada fosse de aproximadamente 250 ha que originaram perto de 5 500 toneladas de tomate, tendo a produtividade atingido os 22 000 kg/ha/ano (Faostat, 2012).

Os principais constrangimentos à produção de tomate em Cabo Verde prendem-se com escassez de terra arável, salinidade de solos, reduzida disponibilidade de água para a rega e, não menos importante, severos ataques de inimigos da cultura, nomeadamente pragas e patogénios. De entre as pragas que atacam o tomateiro em Cabo Verde considera-se que *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Aculops lycopersici* (Masse), *Tetranychus urticae* (Koch) e, mais recentemente, *Tuta absoluta* Povolny são pragas-chave da cultura. Para além dessas pragas, afídeos e moscas brancas, sobretudo *B. tabaci*, são tidos como pragas potenciais, sendo algumas espécies importantes vectores de vírus. No que diz respeito às doenças que ocorrem no país, Kroll (1996) assinalou oídio (*Oidiopsis haplophylli* (Magnus) Rulamort), alternariose (*Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout), rizoctoniose (*Rhizotonia solani* Kühn), fusariose vascular (*Fusarium oxysporum* (Schl.) f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen), míldio (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) e viroses. Considerou que os vírus tinham importância secundária na cultura, referindo, no entanto, o vírus do mosaico do tabaco (TMV, provavelmente ToMV uma vez que actualmente se considera que este vírus é mais frequente que TMV no tomateiro), o vírus do bronzeamento do tomateiro (TSWV) e o vírus Y da batateira (PVY). Posteriormente foram observados sintomas que correspondem aos causados pelo vírus da doença do

frisado amarelo do tomateiro (TYLCV), sem que exista, tanto quanto se saiba, qualquer referência bibliográfica à ocorrência da doença no país.

A cultura do tomateiro em Cabo Verde pode ser realizada ao longo de todo o ano, verificando-se que a incidência das viroses é diferente nas distintas épocas de plantação, sendo habitualmente mais elevada nas culturas realizadas na estação quente. Frequentemente, numa parcela em campos dos agricultores a totalidade das plantas pode manifestar sintomas de viroses no final do ciclo e sofrer quebra muito evidente da produção. Apesar de não existirem estudos sobre a incidência de viroses em tomateiro nem sobre a diagnose das doenças causadas por vírus, os sintomas que as plantas manifestam indicam serem mais frequentes no tomateiro no país o TYLCV e o ToMV. Por outro lado, a produtividade tem dependido das variedades utilizadas, tendo havido um grande esforço dos serviços oficiais em introduzir cultivares adaptadas às condições de produção no país e, posteriormente, obter novas cultivares. Actualmente o INIDA, através do Centro de Produção de Sementes em S. Domingos, produz sementes de tomates das cultivares mais utilizadas pelos agricultores em Cabo Verde.

Deste modo, considerando a importância que as viroses têm na cultura do tomateiro em Cabo Verde, a suspeita de que o TYLCV e o ToMV estão associados à maioria dos casos de viroses na cultura na ilha de Santiago, o conhecimento de que esses vírus afectam outras solanáceas para além do tomateiro e a possibilidade/incerteza desses vírus serem transmitidos pela semente, desenvolveu-se este trabalho que no qual se estudou:

- ✓ A presença do TYCLV e do ToMV no tomateiro e em outras solanáceas, cultivados e não cultivados, colhidos na ilha de Santiago, Cabo Verde, através de testes DAS-ELISA.
- ✓ O estado sanitário das sementes produzidas no Centro de Produção de Sementes do INIDA em S. Domingos, relativamente à presença do TYCLV e do ToMV.
- ✓ A incidência do TYCLV e do ToMV em ensaios de campo com sementes produzidas no Centro de Produção de Sementes do INIDA em S. Domingos e o efeito desses vírus na produtividade.

Para cumprir os objectivos propostos a dissertação foi organizada em quatro capítulos sendo:

O primeiro capítulo, a **Introdução**, com o enquadramento e a justificação do tema e a estrutura e a organização interna do trabalho escrito.

O segundo capítulo, a **Revisão da Literatura**, com apresentação do estado da arte sobre o tomateiro e sobre os principais vírus que o afectam, com particular realce para o TYLCV e para o ToMV..

O terceiro capítulo apresenta o estudo sobre o diagnóstico do TYLCV e do ToMV em material vegetal com origem em Santiago, Cabo Verde, plantas e sementes de tomate, e a determinação da incidência e da severidade de viroses em ensaios de campo com base em sementes de tomate produzidas no Centro de Produção de Sementes do INIDA em S. Domingos. Descreveu-se a metodologia utilizada e bem como a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

No quarto capítulo apresentou-se as principais conclusões e as perspectivas para a cultura de tomateiro em Cabo Verde.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O tomateiro

O tomateiro (*S. lycopersicum*) é originário de costa oeste da América do Sul (Equador, Perú e Chile). Trata-se de uma planta anual que em cultura apresenta um ciclo relativamente curto, o que permite obter, nas condições favoráveis de cultura, os primeiros frutos 30-55 dias após a floração ou 60-120 após a sementeira. Apresenta diferenças quanto ao hábito de crescimento, distinguindo-se cultivares de crescimento indeterminado e cultivares de crescimento determinado. Multiplica-se facilmente por sementes postas a germinar em viveiro ou diretamente no local definitivo. Deve ser cultivado em pleno sol, em solo fértil, profundo, drenável, enriquecido com matéria orgânica e regado regularmente. Prefere clima ameno e é bastante exigente em nutrientes. Necessita de cuidados específicos tais como transplante, amontoa e tutoragem. Em condições de elevada humidade do solo e calor torna-se muito susceptível a pragas e doenças (Maroto-Borrego, 1986).

O tomateiro faz parte da família das Solanáceas e do género *Solanum*. Em 1753, Linnaeus classificou o tomateiro no género *Solanum* (ao lado da batata) como *S. lycopersicum* L.. Em 1768, porém, Miller mudou esse enquadramento para o tomateiro e criou o género *Lycopersicon* e a espécie *L. esculentum* Mill. Este nome foi usado amplamente, mas estava em violação das regras de nomenclatura botânica. Tecnicamente, a combinação *Lycopersicon lycopersicum* H. Karst (L.) seria mais correcta, mas esta designação (publicada em 1881) quase não é utilizada, excepto nos catálogos de sementes (Curtney, 1989).

Segundo Curtney (1989), o género *Lycopersicon* compreende mais oito espécies conhecidas:

- *Lycopersicon peruvianum*: espécie selvagem que na agricultura moderna foi utilizada como fonte de resistência a doenças causadas por *Cladosporium fulvum* (sin. *Passalora fulva*), *Fusarium oxysporum*, *Meloidogyne* spp. e vírus do mosaico do tabaco
- *Lycopersicon pimpinellifolium*: espécie selvagem que ofereceu resistência a doenças causadas por *C. fulvum*, *F. oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Verticillium dahliae* e *Pseudomonas tomat*.
- *Lycopersicon cheesmanii*: espécie endémica das Ilhas Galápagos que é resistente à água do mar e não tem abscisão no pedúnculo floral.
- *Lycopersicon hirsutum*: espécie selvagem e robusta que vive em grandes altitudes.

Evidencia elevada resistência a insetos, ácaros e vírus.

- *Lycopersicon parviflorum*: espécie cultivada nos altos vales dos Andes Peruanos.
- *Lycopersicon chilense*: espécie originária das regiões secas do norte do Chile e do sul do Peru. Mostra muito elevada resistência à seca.
- *Lycopersicon chmielewskii*: espécie que se caracteriza pela sua cor intensa e alto teor em açúcar.
- *Lycopersicon pennelii*: espécie originária do oeste do Peru e que resiste consideravelmente à seca. Caracteriza por apresentar um alto teor de açúcar e de vitaminas A e C.

O tomate dispõe de um grupo de pigmentos conhecidos sob o nome de caroteno. Os dois carotenos mais abundantes são o licopeno, que é vermelho, e o beta-caroteno que é laranja. Encontram-se também no tomate pigmentos menores tais como o fitoeno e o fitoflueno que aparecem incolores ao olho humano, assim como o delta-caroteno e o zeta-caroteno, que aparecem laranjas. Além dos carotenos, nos frutos imaturos e nos frutos maduros de algumas variedades encontra-se a clorofila, um pigmento verde comum nas folhas e caules. Todos esses pigmentos surgem na polpa do tomate (Curtney, 1989).

2.2 Principais vírus e viroses do tomateiro

Ssekyewa (2006) refere que 146 vírus podem infectar o tomateiro, surgindo agrupados em 33 géneros, dos quais 15, *Alfalfavirus*, *Begomovirus*, *Carlavirus*, *Crinivirus*, *Cucumovirus*, *Ilarvirus*, *Luteovirus*, *Nepovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tombusvirus*, *Topocuvirus*, *Tospovirus* e *Tymovirus*, apresentam espécies que originam prejuízos à produção. Estes géneros pertencem às famílias *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Closteroviridae*, *Flexiviridae*, *Geminiviridae*, *Luteoviridae* e *Potyviridae* (Pringle, 1998).

Por sua vez, Fajardo *et al.* (2000) e Kurosawa (2005) registam como vírus importantes no tomateiro:

- (i) espécies da família *Geminiviridae*, associadas com TYLCD, de entre as quais *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que são transmitidas de forma persistente pela mosca branca *B. tabaci* (Homoptera – Aleyrodidae);
- (ii) espécies da família *Bunyaviridae*, género *Tospovirus*, como *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV); podem alcançar altas incidências nas culturas (entre 50 e 90%), especialmente na época quente, período mais favorável à proliferação de tripses que são seus vectores (Thysanoptera – Thripidae);

(iii) espécies da família *Virgaviridae*, género *Tobamovirus*, como *Tomato mosaic vírus* (ToMV); este vírus pode causar prejuízos de até 70%, caso a infecção ocorra no início da cultura; a transmissão pode dar-se através de sementes infectadas e mecanicamente, durante os trabalhos culturais;

(iv) *Potato vírus Y* (PVY), da família *Potyviridae*, género *Potyvirus*, transmitido por diversas espécies de afídeos; pode causar prejuízos entre 20 e 70%;

(v) *Tomato yellow top vírus* (ToYTV), considerada uma estirpe de *Potato leafrol vírus* (PLRV), da família *Luteoviridae*, género *Polerovirus*; é transmitido por afídeos de forma circulativa, não-propagativa.

Há relato também de uma doença do tomateiro denominada de amarelo baixeiro, atribuída a um vírus denominado *Tomato yellow bottom leaf vírus* (TYBLV), cuja posição taxionómica ainda não está definida, mas que se acredita ser da mesma família do ToYTV (Kurosawa & Pavan, 2005).

O vírus do mosaico amarelo do pimentão (*Pepper yellow mosaic vírus* (PepYMV)) da família *Potyviridae*, do género *Potyvirus*, foi relatado na cultura de tomateiro pela primeira vez no Estado de Espírito Santo no Brasil, (Maciel-Zambolim *et al.*, 2004) e um estudo posterior mostrou ser esse o vírus de maior prevalência na região (Ávila *et al.*, 2004).

No Estado de Alabama, E.U.A., levantamentos realizados a partir de 1992 mostraram a presença de pelo menos cinco vírus na cultura de tomateiro, de entre os quais *Cumcumber mosaic vírus* (CMV), *Tobacco etch vírus* (TEV) e *Tobacco mosaic vírus* (TMV). Esses vírus, isoladamente ou em conjunto, têm causado recorrentes epidemias, algumas delas devastadoras (Sikora *et al.*, 1998).

Na Holanda, em 1999, em cultura protegida de tomateiro, foi identificado, por meio de inoculação de plantas indicadoras, testes serológicos e análise de fragmentos de cDNA da região não traduzida e da parte terminal 3' do gene da proteína capsial, *Pepino mosaic vírus* (PepMV), da família *Flexiviridae*, do género *Potexvirus* (Vlugt *et al.*, 2000).

Em 2000, na Guatemala, *Pepper mottle vírus* (PepMoV) da família *Potyviridae*, do género *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 capsial), sugerindo que esse vírus tenha encontrado, no tomateiro, um hospedeiro alternativo para o seu desenvolvimento (Verhoeven *et al.*, 2002).

Em Portugal, segundo Borges (2005), são frequentemente detectados no tomateiro *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) ou Vírus do bronzeamento do tomateiro, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ou Vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro, *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) ou Vírus do mosaico do tomateiro, *Tomato chlorosis virus* (ToCV) ou Vírus da síndrome amarelo do tomateiro, *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) ou vírus da clorose infecciosa do tomateiro e *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) ou Vírus do mosaico do pepino no tomateiro.

2.3 A família *Geminiviridae*

Os geminivírus são vírus de DNA circular de cadeia simples, de 2,5-3,0 kb, com um ou dois componentes genómico envoltos por proteínas da capa, formando uma partícula geminada, de aproximadamente 18 x 30 nm, de morfologia icosaédrica incompleta (Fig. 2.1). São transmitidos por insectos e infectam monocotiledóneas e dicotiledóneas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Faria & Zerbini, 2000; Rojas *et al.*, 2005; Fauquet *et al.*, 2008).

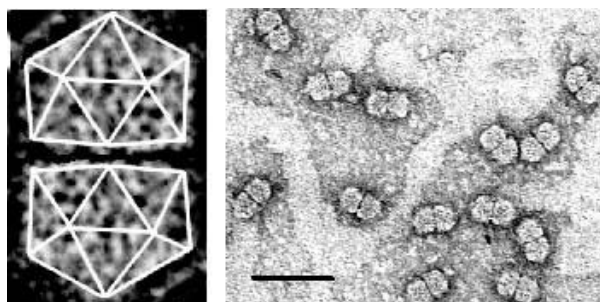


Fig 2. 1 - Morfologia de geminivírus. Esquerda: organização dos capsómeros.

Direita: subunidades de geminivírus. Bar = 100 nm (Faria & Zerbini, 2000).

Todos os geminivírus têm uma região intergénica (IR) que contém a origem de replicação e uma estrutura em forma de grampo que contém uma sequência conservada de nove nucleotídeos (TAATATTAC) envolvida no ciclo replicativo (Harrison, 1985; Rojas *et al.*, 2005). Essa sequência é o ponto de partida da transcrição bi-direcional que se efectua ora no sentido viral (v), ora no sentido complementar (c). A replicação é realizada no núcleo por enzimas celulares, por um mecanismo de tapete rolante sobre uma forma replicativa bi-catenária (Astier *et al.*, 2001).

Entre os genes de senso viral e senso complementar existe uma região intergénica (RI), onde um sinal regulador da replicação e da transcrição viral actua (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). A RI contém sequências que condicionam a expressão dos genes e a replicação, incluindo pequenos motivos específicos reiterados ('iterons') nos

quais a Rep se liga (Eagle *et al.*, 1994).

2.3.1 Hospedeiros

Actualmente, os geminivírus causam prejuízos em inúmeras culturas em todo o mundo, constituindo um dos principais problemas fitossanitários de espécies como milho, tomate, pimentão, mandioca, feijão e algodão. Muitos geminivírus foram isolados e caracterizados por causa da sua importância económica e facilidade de clonagem do seu genoma (Morales & Anderson, 2001; Fauquet *et al.*, 2003; Assunção *et al.*, 2006).

Infectam igualmente muitas infestantes perenes que podem manter populações virais entre as estações de cultivo. Essas infestantes têm chamado a atenção de investigadores porque servem como reservatórios para vários geminivírus e assim, actuam como hospedeiros adequados para recombinação génica dos vírus (Jovel *et al.*, 2004). Espécies do género *Sida* (Malvaceae) têm sido consideradas importantes no contexto das epidemias virais, pois são largamente disseminadas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo onde servem como hospedeiras de diversos geminivírus (Jovel *et al.*, 2004). Além disso, plantas desse género estão frequentemente associadas com culturas hortícolas tipicamente afectadas por geminivirose (Jovel *et al.*, 2007).

A distribuição de geminivírus está intimamente relacionada com a disseminação da mosca branca. Estima-se que esse vector possui mais de 500 plantas hospedeiras por todo o mundo (Morales & Anderson, 2001).

2.3.2 O género *Begomovirus*

Dentro da família Geminiviridae, o género *Begomovirus* é o mais numeroso e espécies que o constituem causam prejuízos e frequentemente perdas totais em culturas importantes para indústria e alimentação em agrosistemas tropicais por todo o mundo (Goodman, 1981; Brown, 1994; Morales & Anderson, 2001; Zerbini *et al.*, 2005). O nome dado ao género *Begomovirus* é originário da espécie-tipo *Bean golden yellow mosaic virus* (Fauquet *et al.*, 2008).

O género *begomovirus* infecta importantes culturas de várias famílias botânicas tais como Solanáceas (tomateiro, tabaco, pimentão, petúnia), Cucurbitáceas (melão, melancia, abóbora), Malváceas (algodão, quiabo), Fabáceas (feijão comum, feijão fava, soja), Euforbiáceas (mandioca) e tem sido um factor limitante na produção em muitas áreas tropicais e subtropicais (Polston & Anderson, 1997). Os autores referem que o tomateiro é uma das culturas mais severamente afectadas por *begomovirus*,

ocorrendo prejuízos severos em várias zonas de produção desde finais do século passado (Quadro 1).

Quadro 1: Incidência de begomovírus no tomateiro e prejuízos associados aos ataques nalgumas regiões de produção

Local	Anos	Incidência (%)	Prejuízos (%)
USA (Florida)	1990-1991	até 100	20
Cuba	1990-1993	25	30
México (Sul)	1988-1989	-	57
México (Yucatan)	1989	-	52
México (Coahuila)	1994-1995	-	40-100
Belize	1995	100	-
Guatemala	1991-1992	até 100	-
Honduras	1992	-	100
Nicarágua (Sebaco)	1990-1991	-	20-50
Nicarágua (Sebaco)	1991-1992	-	30-100
Costa Rica	-	-	20-80
Venezuela	-	-	30-50
Brasil (São Paulo)	1997	20	-

Fonte: Polston & Anderson (1997).

O genoma dos begomovírus bipartidos é composto de duas moléculas de DNA (DNA-A e DNA-B) de mesmo tamanho e não possuindo similaridade de sequência, excepto numa região comum (RC) altamente conservada (mais de 90% de identidade) de aproximadamente 200 nucleotídeos, presente na região intergénica (Harrison, 1985). O DNA-A dos begomovírus bipartidos pode replicar-se automaticamente e produzir viriões, porém o DNA-B é necessário para a infecção sistémica (Fauquet *et al.*, 2003). A região comum contém sequências essenciais para replicação e transcrição de ambos os componentes, o que mantém a fidelidade do genoma bipartido (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). O DNA-A possui quatro ORFs (AC1, AC2, AC3 e AV1), codificando proteínas necessárias para replicação, transcrição e encapsidação. Geminivírus bipartidos do velho mundo possuem ainda uma ORF adicional, AV2, relacionada com o movimento do vírus (Rojas *et al.*, 2005). O DNA-B possui duas ORFs (BC1, BV1) que codificam proteínas envolvidas no movimento viral e no desenvolvimento de sintomas. Dessa forma, os dois componentes de DNA são essenciais para o estabelecimento de uma infecção sistémica eficiente. Como cada componente é individualmente encapsidado, viriões distintos carregando a molécula de DNA-A ou DNA-B devem ser introduzidos numa célula-alvo para que seja iniciada a

infecção sistémica (Rojas *et al.*, 2005).

Segundo Fauquet *et al.* (2003), os begomovírus possuem uma proteína capsial (CP) conservada que envolve o ssDNA, mas que diverge em termos de especificidade na transmissão pelo insecto vector. A CP codificada pela ORF AV1 é necessária em algumas espécies para a infecção sistémica de seus hospedeiros e indispensável para a maioria das outras. A CP é essencial ainda para a transmissão do vírus e determina a especificidade do insecto vector. No caso dos begomovírus monopartidos, a CP funcional é essencial para a infecção sistémica do hospedeiro e para a transmissão pelo vector (Azzam *et al.*, 1994; Sudarshana *et al.*, 1998).

Os begomovírus são transmitidos pela mosca branca *B. tabaci* (Fig. 2.2), biótopo B, de modo circulativo e persistente (Cohen & Nitzani, 1966; Duffus, 1987; Rubinstein & Czosnek, 1997). Para que o vírus seja adquirido e transmitido pelo insecto vector a proteína capsial (CP) produzida pelo geminivírus é um factor determinante na realização desses factos (Ghanim *et al.*, 2001). O elevado potencial biótico de *B. tabaci*, a sua vasta gama de plantas hospedeiras, ampla distribuição geográfica e facilidade de aquisição de resistência a pesticidas têm tornado esta espécie numa praga-chave em muitas culturas por todo o mundo. Entre as culturas mais atingidas estão as do tomate, pimento, beringela, batata-doce, pepino, feijão, bem como outras cucurbitáceas, solanáceas e leguminosas, além de ornamentais (Guimarães & Louro, 1995; Lopes, 2003).



Fig 2. 2 – Mosca branca *Bemisia tabaci*, biótopo B.

(www.forestryimages.org)

A proteína capsial é o único produto génico begomoviral que interage com factores da mosca branca durante a transmissão circulativa do vírus (Czosnek *et al.*, 2002).

É durante o processo de alimentação dos insectos que os vírus são adquiridos. Ninfas

e adultos de mosca branca alimentam-se inserindo a probóscide na folha, penetrando o floema e sugando a seiva. Moscas adultas ao se dispersarem transmitem o vírus para novas plantas enquanto se alimentam (Jones, 2003).

Estudos anatómicos e de imunolocalização revelaram que as partículas virais ingeridas através do estilete do insecto penetram o esófago e a câmara de filtro do insecto. Posteriormente os viriões são transportados através da parede do intestino para a hemocele e a partir daí alcançam as glândulas salivares. Os vírus são translocados pelo ducto da glândula salivar e finalmente excretados com a saliva durante a alimentação.

O tempo que o vírus leva para completar este ciclo é o período de latência (PL), isto é, o período mínimo de tempo entre o início do período de alimentação do insecto nas plantas infectadas e a transmissão do vírus pelo vector (Ghanim *et al.*, 2001).

De acordo com Gutierrez (1999) o ciclo replicativo dos geminivírus depende inteiramente de intermediários replicativos e de DNA polimerases do hospedeiro e ocorre dentro do núcleo das células infectadas. Ele pode ser subdividido em diversas fases funcionalmente distintas caracterizadas por factos específicos.

Durante o processo de infecção, as partículas virais são injectadas pelo insecto vector, provavelmente sem a CP, e o genoma viral é transportado para o núcleo da célula hospedeira (Gutierrez, 1999). Uma vez dentro do núcleo, a amplificação do genoma viral que envolve um processo eficiente de replicação do DNA ocorre em três estádios (Stenger *et al.*, 1990).

O primeiro estágio envolve a conversão do ssDNA genómico circular em um intermediário de dsDNA super enrolado circular covalentemente fechado, denominado forma replicativa I (RFI) (Gutierrez, 1999). Durante este estágio, o ssDNA é convertido num produto de dsDNA que se associa a histonas celulares formando mini cromossomas virais. Esta parte do ciclo replicativo é completada com participação exclusiva das proteínas das células infectadas em que o dsDNA é o modelo de transcrição activo (Gutierrez, 2000). O segundo estágio consiste na utilização do dsDNA como modelo para amplificação do dsDNA pelo mecanismo do círculo rolante, no qual a proteína viral Rep é absolutamente necessária (Gutierrez, 1999). Após o estágio inicial, os factores necessários para completar a fase de círculo rolante são de origem celular (Gutierrez, 2000). O último estágio é a produção e a encapsidação do ssDNA genómico circular maduro em partículas virais (Gutierrez, 1999).

É importante ressaltar que a replicação dos geminivírus depende totalmente do sistema enzimático de seus hospedeiros, responsável pela síntese da RF e de novas

cadeias de ssDNA de sentido viral. Portanto, é fundamental que as células infectadas sintetizem o DNA. Caso contrário, as enzimas responsáveis pela síntese não estarão presentes em concentração suficiente para permitir a replicação do vírus (Faria & Zerbini, 2000).

Como os geminivírus infectam células vegetais completamente diferenciadas, a síntese de novos DNAs praticamente não ocorre. Dessa forma, o vírus deve ser capaz de modificar o ciclo celular do hospedeiro de forma a reiniciar a síntese de DNA, ou pelo menos activar a transcrição das enzimas envolvidas nesse processo (Faria & Zerbini, 2000).

Ao que se sabe, os begomovírus não são transmitidos por semente ou por contacto entre plantas infectadas e sadias (Costa, 1976).

2.3.3 Mecanismos de diversidade genética de begomovírus

A diversidade dos vírus é gerada através de mutações, recombinações ou pseudo-recombinações. A geração de diversidade genética em populações virais proporciona oportunidade para a adaptação a novos hospedeiros e a mudanças de condições ambientais (Monci *et al.*, 2002).

As mutações são geralmente relatadas para vírus de RNA e ocorrem em menor frequência em vírus de DNA devido à actividade 'proof-reading' da DNA polimerase, que corrige os erros de leitura durante a replicação (Rossinck, 1997).

A recombinação tem um papel crucial na evolução viral contribuindo para diversidade genética de populações de geminivírus (Umaharam *et al.*, 1998; Monci *et al.*, 2002). A recombinação é o processo no qual segmentos de uma cadeia nucleotídica se incorporam à cadeia de outro componente durante a replicação (Seal *et al.*, 2006).

Seal *et al.* (2006) referiram que três factores podem contribuir significativamente para a recombinação: as infecções mistas comuns em geminivirose, os altos níveis de replicação atingidos com a forma replicativa de DNA dupla cadeia e o aumento da gama de hospedeiros com a emergência do biótipo B da mosca branca.

Através de recombinação os vírus podem adquirir novas informações genéticas de outros vírus ou até mesmo das plantas hospedeiras, facilitando sua rápida evolução (Seal *et al.*, 2006). Os vírus também usam a recombinação como um mecanismo de resgate de mutações prejudiciais através da troca genética com genoma silvestres (Monci *et al.*, 2002). A recombinação pode proporcionar vantagens selectivas na evolução dos vírus ao nível de espécie, género ou família (Keese & Gibbs, 1993; Holland, 1998).

A alta-fidelidade associada à replicação do DNA viral, proporcionada pela maquinaria de replicação de DNA do hospedeiro, impõe certa restrição à evolução de geminivírus. Para ultrapassar essa barreira, estes vírus dependem da recombinação e da pseudo-recombinação para desenvolver variantes para selecção (Harrison & Robinson, 1999). Para este fim, os geminivírus desenvolveram um modo de recombinação dependente da replicação do DNA (Preiss & Jeske, 2003).

Nos begomovírus bipartidos, as pseudo-recombinações são geralmente restritas a componentes de DNA de espécies intimamente relacionadas, isto é, do mesmo grupo filogenético, provavelmente devido a limitações impostas pela especificidade da ligação da Rep (Stanley, 1991; Harrison & Robinson, 1999). Contudo, os begomovírus parecem ter desenvolvido inúmeras maneiras para vencer essas limitações (Rojas *et al.*, 2005).

2.3.4 A doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCD)

A doença do frisado amarelo do tomateiro (*Tomato yellow leaf curl disease* ou TYLCD) foi relatada pela primeira vez em Israel, no final dos anos 1930, e tornou-se economicamente importante durante os anos 1960, causando prejuízos importantes (Faria *et al.*, 1997).

2.3.4.1 Sintomas da doença do frisado amarelo do tomateiro

Os sintomas da doença tornam-se visíveis no tomateiro em aproximadamente 2 a 3 semanas após a infecção. Em geral, os sintomas manifestam-se como clorose das nervuras, a partir da base da folha, seguido de mosaico amarelo, rugosidade e até mesmo enrolamento das folhas, margens cloróticas, folhas pequenas que surgem em concha e espessas (Sahar, 2009) (Fig. 2.3).



Fig 2. 3 - Sintomas de TYLCD na planta de tomate

(fotografia do autor)

As folhas ao mostrarem amarelecimento e deficiente desenvolvimento nas bordas ficam viradas para cima ('curling'). A maioria das flores (até 90%) aborta após a

infecção, portanto, são produzidos poucos frutos (Sahar, 2009). Quando a infecção é precoce, a perda de produção pode ser total e o controle da doença é muito difícil, por causa da alta população de mosca branca presente no campo.

2.3.4.2 Distribuição geográfica da doença do frisado amarelo do tomateiro

Como referido, a doença do frisado amarelo do tomateiro foi observada pela primeira vez no Médio Oriente (Israel) em 1939, vindo o seu agente causal a ser identificado apenas na década de 90 como vírus do frisado amarelo do tomateiro (Cohen & Antignus, 1994; Pico *et al.*, 1996). Na África, a doença do frisado amarelo do tomateiro foi descrita pela primeira vez no Sudão (Yassin & Nour, 1965; Yassin, 1975), seguindo-se a Nigéria, mas o agente causal foi identificado somente em 1997 (Czosnek & Laterrot, 1997). Paralelamente a doença do frisado amarelo do tomateiro foi relatada em muitos outros países africanos: Camarões (Czosnek & Laterrot, 1997), Burkina Faso (Konaté *et al.*, 1995), Mali e Senegal (D'Hondt & Russo, 1985) e Egípto (Czosnek *et al.*, 1990). A ocorrência de doença do frisado amarelo do tomateiro foi relatada a partir do sul de Casablanca em 1996-97 e em 1998 espalhou-se para as áreas de cultura de tomateiro de Marrocos (Peterschmitt *et al.*, 1999; Jebbour & Abaha, 2002).

No final de 1980, foram feitos os primeiros relatos sobre a ocorrência de doença do frisado amarelo do tomateiro nas Américas e na Europa (MacGlashan *et al.*, 1994; Nakhla *et al.*, 1994; Polston & Anderson, 1997; Ramos *et al.*, 1996; Sinisterra & Patte, 2000; Bird *et al.*, 2001). A doença também se espalhou para as ilhas do Caribe, chegando às Antilhas Francesas em 2001 (Urbino *et al.*, 2003). Em 1997 o vírus surgiu na Flórida e um ano mais tarde (Abril de 1998) foi observado até 100% de incidência em campos de tomate naquela região (Polston *et al.*, 1999).

2.3.4.3 Vírus associados à doença do frisado amarelo do tomateiro

Pelo menos nove estirpes de vírus diferentes, mais ou menos relacionadas filogeneticamente, têm sido associadas à doença do frisado amarelo do tomateiro em diversos países. São, no entanto, referidas como mais frequentes *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* (TYLCMaV) e *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* (TYLCAxV) (Moriones & Navas-Castillo, 2000; Fauquet & Stanley, 2005; Stanley *et al.*, 2005; Abhary *et al.*, 2007).

Duas estirpes do vírus que infectaram culturas de tomate no Médio Oriente, *Tomato yellow leaf curl vírus-Israel* (TYLCV-IL) e *Tomato yellow leaf curl vírus-Mild* (TYLCV-Mld), foram clonadas e sequenciadas na década de 1990. Posteriormente, uma

terceira estirpe do vírus, *Tomato yellow leaf curl virus Sardinia-Espanha* (TYLCV-ES) foi identificada na Jordânia (Anfoka *et al.*, 2005).

2.3.4.4 Recombinação como fonte de diversidade genética em populações de vírus associados ao TYLCD

Durante as infecções mistas os vírus podem trocar material genético através de recombinação de segmentos se apresentarem na mesma célula da planta hospedeira. Uma geração de vírus híbrido pode então surgir, alguns deles bem adaptados na população e que podem causar doenças emergentes. Aspectos específicos sobre a ocorrência de recombinação entre os vírus do complexo da doença do frisado amarelo do tomateiro foram revistos recentemente por Moriones *et al.* (2007).

A recombinação natural foi observada em *Tomato yellow leaf curl virus Sardinia* (TYLCSV) e TYLCV em Espanha e o recombinante resultante mostrou-se melhor adaptado do que os dois isolados originais (Monci *et al.*, 2002). Verificou-se que genótipos recombinantes emergiram e se propagaram rapidamente na população após a introdução da nova estirpe de vírus de TYLCV em epidemias na Espanha. Durante levantamentos de campo dois tipos de recombinantes foram encontrados naquele país, TYLCMaIV e TYLCAxV (Monci *et al.*, 2002; García-Andrés *et al.*, 2006). Curiosamente, para estes dois recombinantes foram demonstradas novas propriedades patogénicas, sugerindo maior adaptação ecológica à área invadida. Assim, além de serem facilmente transmissíveis por *B. tabaci*, exibiram uma maior gama de hospedeiros do que qualquer um dos parentes, o que é coerente com a selecção natural (Fauquet & Stanley, 2005).

2.3.4.5 A espécie TYLCV

O vírus do frisado amarelo do tomateiro é a excepção à regra nos begomovírus, apresentando um único componente genómico (Fig. 2.4), isto é, não possui o DNA B e as suas ORFs são denominadas V1, V2, C1, C2, C3 e C4. Esse vírus é frequentemente associado a um DNA satélite denominado DNA β , com 1400 nucleotídeos e possui uma ORF. Apesar de não possuir DNA B, não apresenta problemas de movimento nem da infecciosidade. Neste caso, os produtos das ORFs V1 e C4 são responsáveis pelo movimento e desenvolvimento de sintomas (Faria & Zerbini, 2000; Zerbini *et al.*, 2002).

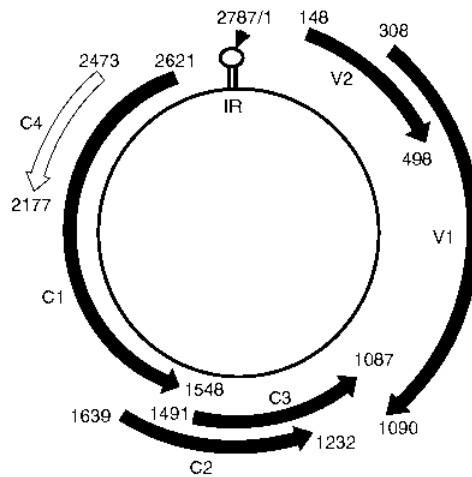


Fig 2. 4 - Organização genômica do *Tomato yellow leaf curl vírus* (TYLCV)

(Faria & Zerbini, 2000).

2.4 A família *Virgaviridae*

A família *Virgaviridae* foi criada em 2008 para incluir todos os vírus ssRNA de sentido positivo em forma de bastonete (Fig. 2.5) e inclui os gêneros *Furovirus*, *Hordeivirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus* e *Tobravirus*. O virião possui forma de bastonete, não envelopado, geralmente em linha recta, com canal central distinto e 20 a 23 nm de diâmetro. O comprimento das partículas difere entre os gêneros e entre as espécies (Michael *et al.*, 2009).

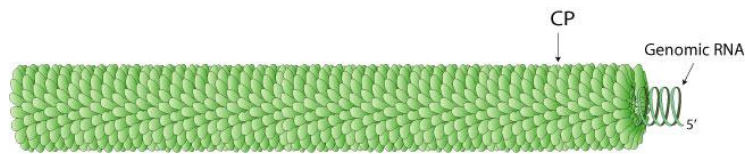


Fig 2. 5 - *Virgaviridae*: Família de vírus helicoidal não envelopados

(viralzone.expasy.org)

Segundo Michael *et al.* (2009), o genoma desses vírus é monopartido ou segmentado, dependendo do gênero considerado, linear e ssRNA (+). Os ARNs genômicos exibem uma estrutura de tRNA em 3' mas sem cauda poli-A, com exceção de alguns *hordeivirus* que têm um poli-A entre a sequência de codificação e a estrutura tRNA.

Todos os membros da família *Virgaviridae* podem ser transmitidos experimentalmente por inoculação mecânica e para os do gênero *Tobamovirus* este é o único meio conhecido de transmissão. Em alguns gêneros a transmissão é feita ainda por vectores, através do solo, enquanto os membros do gênero *Hordeivirus* são transmitidos através de pólen e sementes (Michael *et al.*, 2009).

Segundo Michael *et al.* (2009), na altura da replicação o vírus penetra na célula hospedeira e dá-se a descapsidação e libertação do RNA viral genômico para o

citoplasma. O RNA viral é traduzido para produzir as duas proteínas necessárias para a síntese de RNA (replicação e transcrição). Um ssRNA (-) sentido complementar é sintetizado utilizando RNAs genómico como modelo. O genoma anti RNA (-) é usado como molde para sintetizar novo RNA genómico e RNA subgenómico. Os novos segmentos são encapsidados e novos viriões são libertados.

2.4.1 Hospedeiros

Lartey *et al.* (1996), ao analisarem a evolução dos *Tobamovirus*, consideraram como principais hospedeiros do grupo espécies de solanáceas, considerando ainda plantas não solanáceas como cucurbitáceas, crucíferas e a crotalária. Por sua vez, Borges (2005) assinalou, de entre plantas espontâneas e cultivadas de interesse económico ou de diagnóstico, as seguintes plantas hospedeiras de vírus actualmente na família *Virgariidae*: *Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. murales*, *Ch. quinoa*, *Datura metel*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum melongena*, *S. pimpinellifolium* e *S. nigrum*.

No entanto, Michael *et al.* (2009), ao discutirem os hospedeiros de vírus da família *Virgaviridae*, referem como hospedeiros de *Furovirus* e *Hordeivirus* o trigo, a cevada, o centeio e o sorgo e como hospedeiros de *Tobamovirus* e/ou *Tobravirus* plantas solanáceas, ressaltando espécies dos géneros *Solanum*, *Capsicum* e *Brugmansia*, cucurbitáceas e malváceas.

2.4.2 O género *Tobamovirus*

Os vírus do género *Tobamovirus* possuem genoma monopartido e dispõem de uma proteína de movimento, proteína 30K (Michael *et al.*, 2009). O género é formado por várias espécies (dezanove) que se separam de acordo com o número de nucleotídeos presentes entre as ORFs da proteína de movimento e da proteína capsial e com base na análise filogenética e na gama de plantas hospedeiras (Lartey *et al.*, 1996; Astier *et al.*, 2001; Michael, *et al.*, 2009). O género *Tobamovirus* pode ser dividido nos seguintes subgrupos: subgrupo 1 que compreende as espécies que infectam solanáceas, subgrupo 2 compreendido pelas espécies que infectam crucíferas e subgrupo 3 abrangendo as espécies de cucurbitáceas (Lartey *et al.*, 1996).

Os tobamovírus são transmitidos mecanicamente e em alguns casos pela semente, desconhecendo-se vectores biológicos. Na natureza são eficientemente transmitidos por contacto entre plantas e pela acção do homem através das mãos contaminadas, ferramentas e utensílios utilizados nas operações culturais exigidas pela cultura,

principalmente em condições de cultura protegida (Tanzi & Canova, 1986).

2.4.3 A doença do mosaico do tomateiro

O mosaico do tomateiro é, segundo Borges (2005), causado por dois vírus: o *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) ou Vírus do mosaico do tabaco e o *Tomato mosaic virus* (ToMV) ou vírus do mosaico do tomateiro. São quase idênticos e por vezes descritos sob o nome de Vírus do Mosaico de Tabaco. Diferem ligeiramente na gama de hospedeiros, nas reacções serológicas e em reacções cruzadas de protecção.

O vírus do mosaico do tabaco e o vírus do mosaico do tomateiro são vírus ssRNA (+) que infectam especialmente plantas da família *Solanaceae*. A infecção causa padrões de sintomas característicos nas folhas, tais como manchas e descoloração. O TMV foi o primeiro vírus a ser descoberto quando em 1930 se concluiu que o agente infeccioso do mosaico do tabaco era um vírus que foi designado de vírus do mosaico de tabaco (Borges, 2005). Sabe-se actualmente que o vírus do mosaico do tabaco apresenta várias estirpes e que pode infectar mais de 125 espécies de plantas. O vírus do mosaico do tomateiro está restrito a menos espécies hospedeiras (Borges, 2005).

O sintoma mais comum nas infecções pelo vírus do mosaico do tabaco e o vírus do mosaico do tomateiro é o surgimento de uma coloração verde-clara entre as nervuras das folhas novas e a formação de um mosaico que alterna a coloração do tecido entre um verde-escuro e um verde-claro. Pode ocorrer afilamento dos folíolos, sobretudo nos meses mais frescos (Fig. 2.6). Nalguns casos ocorre marmoreado e distorção das folhas mais novas, necrose dos caules, pecíolos, folhas e frutos. A produção de frutos é reduzida entre 20% e 70% e é muito influenciada pela cultivar, pela estirpe e pelas condições ambientais (Fajardo *et al.*, 2000; Borges, 2005;). Por outro lado, o vírus pode causar infecção latente, não se observando sintomas da infecção (Ávila *et al.*, 2004).



Fig 2. 6 – Sintomas de ToMV nas folhas de tomateiro

(Ávila *et al.*, 2004).

2.4.3.1 Distribuição geográfica da doença do mosaico do tomateiro

Segundo Eiras *et al.* (2003), a maioria das espécies do género *Tobamovirus* apresenta distribuição mundial em regiões de clima temperado e tropical. Associado a actividade humana na cultura do tomate, o vírus do mosaico do tomateiro tornou-se um vírus cosmopolita que já foi encontrado no ar (Castello *et al.*, 1995) e em soluções nutritivas usadas na cultura do tomateiro (Cordero & Gaborjanyi, 1983)

2.4.3.2 Vírus associados à doença do mosaico do tomateiro

Os vírus associados ao mosaico do tomateiro pertencem ao género *Tobamovirus* e ao subgrupo 1 que compreende os vírus que infectam solanáceas, no qual se enquadram as espécies *Tobacco Mosaic Virus*, (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV) e *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) (Eiras *et al.*, 2003).

2.4.4 A espécie ToMV

O vírus do mosaico do tomateiro apresenta morfologia alongada, simetria helicoidal e mostra-se rígido com aproximadamente 300 nm de comprimento e 18 nm de diâmetro. Os capsómeros pesam cerca 18 kDa (Fig. 2.7).

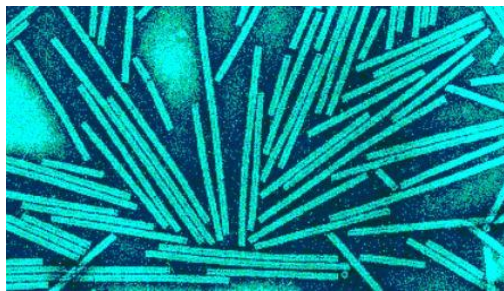


Fig 2. 7 - Morfologia do ToMV

(Cerkauskas, 2004).

O ácido nucleico é constituído por uma cadeia simples de RNA de polaridade positiva ((ssRNA (+), com aproximadamente 6 395 nucleotídeos que codificam quatro proteínas de peso 183 kDa (polimerase), 126 kDa (metiltransferase e helicase), 30 kDa (proteína de movimento-MP) e 17,5 kDa (proteína capsidial (CP)).

As partículas do vírus do mosaico do tomateiro são constituídas por 5% de ácido nucleico e 95% de proteínas (Astier *et al.*, 2001).

Esses vírus multiplicam-se muito rapidamente nas células infectadas e atingem elevadas concentrações (até 60×10^6 viriões por células) que originam inclusões paracristalinas (Astier *et al.*, 2001). Além de actuarem como contaminantes na parte externa das sementes, representando a principal fonte de disseminação a longas distâncias (Erkan & Delen, 1985), possuem alta estabilidade, permanecendo desta

forma por longos períodos em restos de cultura no solo (Pares & Gunn, 1989; Duarte, 1995).

A transmissão pela semente pode dar-se em até 90% das sementes mas permanecem apenas no tegumento ou endosperma, não atingindo o embrião. O vírus do mosaico do tomateiro pode ser eliminado em sementes secas submetidas a 70°C durante 2 a 4 dias. Também se pode eliminar o vírus por imersão das sementes em fosfato de sódio a 10% durante 20 minutos. Sem tratamento o vírus pode manter-se no endosperma durante 9 anos (Borges, 2005).

2.5 Mecanismos de resistência aos vírus.

A luta contra as doenças causadas por vírus passa por estratégias que combinam medidas indirectas e medidas directas. Se nas viroses causadas por geminivírus o controlo químico das moscas brancas pode apresentar algum efeito benéfico, na maioria das doenças virais as medidas indirectas, sobretudo a alteração do nível de resistência das plantas, são as de maior interesse.

Há diferentes mecanismos de resistência que podem ser identificados no processo de selecção de plantas resistentes aos vírus, podendo estes ser complexos e envolver vários factores. De acordo com Matthews (1991), os indivíduos podem ser classificados em imunes e sujeitos à infecção. Uma planta imune é aquela na qual o vírus não se replica no protoplasma das suas células ou em quaisquer células da planta intacta. Pode haver descapsidação do vírus, mas não há replicação, não sendo, portanto, a planta hospedeira do vírus. Os indivíduos sujeitos à infecção são aqueles considerados hospedeiros, pois o vírus se replica em seu protoplasma e nas células da planta intacta quando inoculados mecanicamente ou transmitidos naturalmente. Esses indivíduos podem ser divididos em susceptíveis e resistentes.

Quando o indivíduo é susceptível, além de ocorrer replicação, há o movimento sistémico do vírus pela planta. São considerados dois padrões para a susceptibilidade; i) um padrão de susceptibilidade é aquele representado pelo indivíduo sensível, onde a planta reage à infecção com um quadro patológico, podendo ser severo ou moderado; ii) o outro padrão de susceptibilidade é a tolerância, na qual a planta permite a replicação do vírus, porém sem manifestação de sintomas, ou seja, o efeito visível da infecção na planta é muito discreto ou inexistente. Plantas tolerantes tornam-se fonte de inóculo para outras culturas e podem também contribuir para a selecção de estirpes mais severas do vírus (Matthews, 1991).

Indivíduos resistentes são aqueles que não apresentam um quadro de infecção

sistémica. Matthews (1991) divide-os em resistentes por extrema hipersensibilidade (resistência extrema) e resistentes por hipersensibilidade, de acordo com o factor que impede a disseminação sistémica do vírus na planta. A resistência por extrema hipersensibilidade ocorre quando o vírus se replica, mas fica limitado às células inicialmente infectadas. Na resistência por hipersensibilidade, a infecção é limitada por uma reacção das células do hospedeiro ao redor das células inicialmente infectadas, formando geralmente lesão local necrótica, sendo que a restrita localização do vírus é considerada uma resposta de resistência ao patogénio viral (Fraser, 1990).

A resposta de hipersensibilidade (RH) é um facto altamente específico que depende de uma combinação entre um gene de resistência (*R*) na planta e um gene de avirulência (*avr*) no patogénio, um conceito referido por Flor (1971) como resistência gene-a-gene.

A pesquisa de genes de resistência ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro remonta aos anos 70 e o primeiro gene de resistência, *Ty-1*, foi encontrado na espécie *L. chilense*. Este gene interfere na proteína viral responsável pela circulação do vírus na planta (movimento célula a célula) e é mais eficiente em condições de baixo nível de inóculo. Posteriormente, resistência ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro foi encontrada em linhagens de *L. peruvianum*, e foi mostrado que nesse hospedeiro a resistência é controlada por cinco genes recessivos, e em *L. pimpinellifolium* e *L. hirsutum*, nos quais a resistência é conferida por um gene recessivo e um gene dominante (Pilowsky & Cohen, 1990; Michelson *et al.*, 1994; Zakay *et al.*, 1991). Nas espécies *L. hirsutum* (*S. abrochaites*) e *L. chilense*, os genes de resistência ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro foram identificados como *Ty-2* e *Ty-3*, respectivamente (Hanson *et al.*, 2006; Ji *et al.*, 2007). Actualmente cultivares de tomateiro com resistência ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro surgem em catálogos de sementes de vários países.

No que diz respeito à resistência a tobamovírus, sabe-se que em *Capsicum* spp. a resistência ao vírus do mosaico do tabaco é controlada por reacção de hipersensibilidade, estando envolvidos diferentes genes referidos como L^+ , L^1 , L^2 e L^3 (Boukema, 1984; Grube *et al.*, 2000). Quanto ao tomateiro a resistência ao vírus do mosaico do tomateiro é devida aos genes *Tm-1*, *Tm-2* e *Tm-2²* que resultaram da introgressão de genes encontrados, respectivamente, em *L. hirsutum*, *L. peruvianum* e *L. peruvianum* (Pelham, 1966). De acordo com Boukema (1984) diversos tobamovírus que infectam solanáceas são actualmente controlados através do uso de cultivares resistentes.

Segundo Camargo & Bergamin Filho (1995), três etapas básicas devem ser consideradas em qualquer programa de obtenção e utilização de cultivares resistentes:

1. identificação de fontes de resistência, ou seja, identificação de germoplasma que possua os genes de resistência procurados;
2. incorporação desses genes em cultivares comerciais por técnicas de melhoramento;
3. finalmente, após a obtenção de um cultivar resistente, delineamento da melhor estratégia para que a resistência seja durável à natureza dinâmica das populações patogénicas.

2.6 Diagnóstico das doenças virais com recurso à serologia

Estabelecer correctamente um diagnóstico, isto é, saber reconhecer uma doença e detectar com precisão o agente causal é um pressuposto indispensável para a maior parte dos estudos no domínio da virologia vegetal. A estratégia a adoptar para chegar a um diagnóstico depende do problema em causa e implica uma escolha minuciosa de exames visuais e/ou laboratorial. A escolha do método mais apropriado e sua adaptação faz-se caso a caso, em função da precisão esperada (especificidade e sensibilidade), dos equipamentos disponíveis no laboratório e dos custos das análises.

A observação dos sintomas é frequentemente insuficiente para estabelecer um diagnóstico fiável e preciso dos vírus nas plantas, mas ele revela-se por vezes muito útil na orientação da investigação. Para se precisar a determinação do vírus, recorre-se aos diversos métodos baseados nas propriedades biológicas, morfológicas, bioquímicas ou imunológicas dos vírus. Os meios de detecção são geralmente cada vez mais variados e precisos consoante o vírus é melhor caracterizado, particularmente no plano molecular (Astier *et al.*, 2001).

O diagnóstico por via biológico inclui a inoculação mecânica, a inoculação através de vectores e a enxertia.

Um outro meio potente de diagnóstico é o microscópio electrónico que permite a observação directa dos vírus. Esse instrumento permite ainda associar o método serológico com a microscopia electrónica.

O método de diagnóstico serológico é muito usado nos nossos dias e foi o que serviu de suporte ao presente trabalho. As técnicas serológicas aplicadas à virologia colocam em acção a interacção específica de dois tipos de proteínas: antigénio ou proteína de origem viral e anticorpos ou proteínas específicas deste antigénio, produzidas por um

animal em resposta à uma injeção de antigénio.

Os anticorpos utilizados podem ser policlonais ou monoclonais, garantindo estes últimos maior sensibilidade e fiabilidade na detecção dos patogénios. No entanto, os anticorpos policlonais são os mais usados (Borges, 2005).

Diversos métodos têm sido utilizados em estudos serológicos, destacando-se os que se baseiam na precipitação em soluções, na precipitação em gel (imunodifusão radial simples, imunodifusão dupla, imunolectroforese), na aglutinação, na imunofluorescência e nos ensaios imunoenzimáticos com base na técnica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Hoje em dia, a técnica ELISA é largamente usada em fitopatologia para a detecção de vírus, sendo utilizado mais frequentemente o ELISA directo ou sanduíche de duplo anticorpo, vulgarmente referido como DAS-ELISA (*Double antibody sandwich*).

Na técnica ELISA utilizam-se anticorpos marcados com uma enzima que hidrolisa um substrato adequado quando posto em contacto com a mesma. Esta reacção é cromática e a intensidade da cor resultante, dependendo da concentração da enzima que, por sua vez, depende da concentração de partículas de vírus adsorvidas na placa ELISA, permite a quantificação da reacção por colorimetria (Borges, 2005).

Nesta técnica de diagnóstico utilizam-se placas de plástico de microtitulação, habitualmente com 96 cavidades ou poços, a cujas paredes os reagentes se aderem, o que permite ensaiar de uma forma prática um elevado número de amostras. A técnica DAS-ELISA introduzida no diagnóstico de vírus de plantas por Clark & Adams (1977) inclui as seguintes fases:

- fazer aderir aos poços da placa o anticorpo específico para um dado vírus;
- colocar em seguida em cada poço uma amostra a ensaiar. Se existirem vírus estes ficam retidos pelo anticorpo específico;
- juntar depois o anticorpo marcado (conjugado) com um enzima que irá fixar-se aos viriões (partículas virais) retidos na placa. Assim, cada antigénio fica imobilizado entre dois anticorpos, o que originou a designação de sanduíche duplo anticorpo. A enzima habitualmente utilizada é a fosfatase alcalina;
- finalmente adicionar o substrato (P-nitrophenil fosfato) que, ao ser hidrolisado, desenvolverá cor amarelada tanto mais intensa quanto maior for a concentração de enzima e, portanto, de vírus presente.

Entre cada etapa é feita uma série de lavagens da placa para remoção de reagentes não fixados às paredes dos poços ou não aderidos na reacção de especificidade.

Após a reacção, a leitura dos resultados pode ser feita visualmente por comparação com o controlo positivo (resultado positivo - conteúdo dos poços amarelo) ou num colorímetro adaptado às placas utilizadas, onde é medido para cada poço o valor da absorvância, normalmente no comprimento de onda de 405 nm. Os valores da observância são proporcionais à quantidade de enzima presente no conjugado que se fixou ao vírus (Borges, 2005).

A técnica ELISA teve grande aceitação e é correntemente utilizada por ser um método rápido, prático e relativamente barato de diagnosticar vírus e outros patogénios para os quais seja possível obter soros específicos.

Apesar de exigir soros de elevada qualidade para produzir bons resultados, apresenta numerosas vantagens quando aplicada ao diagnóstico (Clark & Bar-Joseph, 1984):

- alta sensibilidade, permitindo a detecção de baixas concentrações de vírus (1 a 10 ng);
- rapidez na obtenção de resultados (6 a 24 horas);
- possibilidade de se realizarem ensaios de grande escala com processamento de várias amostras;
- ensaio de amostras de mais variados tipos e dimensões desde suspensões de vírus a órgãos de plantas e de insectos vectores;
- especificidade suficiente para identificação de serótipos diferentes;
- possibilidade de automatização e quantificação dos resultados;
- custo relativamente baixo pelo aproveitamento dos reagentes que são estáveis;
- execução simples e fácil sem exigir grande preparação dos operadores.

A técnica ELISA e as suas diferentes variantes, com ganhos importantes de sensibilidade que trouxeram, revolucionaram o panorama de diagnóstico na virologia vegetal. A comercialização dos reagentes de qualidade tem permitido alargar a utilização não somente aos laboratórios de investigação, mas também aos estabelecimentos públicos e privados que operam nesse domínio (Clark & Bar-Joseph, 1984).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente capítulo refere os materiais e os métodos utilizados na elaboração do trabalho experimental, sendo este dividido em duas partes distintas: i) ensaio de campo e numa estufa protegida contra a presença de *B. tabaci* para avaliação do comportamento de três cultivares de tomateiro, *S. lycopersicum*, quando colocadas em condições de produção; ii) realização de ensaios imunoenzimáticos com base na técnica ELISA para detecção do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCV), vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) em amostras (material vegetal) de sementes e de tomateiros dos ensaios e de plantas de quatro espécies da família das solanáceas colhidas em campos de cultura na ilha de Santiago.

3.1 Ensaio de campo e em estufa

Na escolha dos locais para a instalação dos ensaios tomou-se em consideração a presença endémica de viroses no tomateiro e de *B. tabaci*, de acordo com levantamentos fitossanitários realizados pelos serviços oficiais, e a disponibilidade de uma estufa em S. Jorge dos Órgãos. As cultivares seleccionadas são as que apresentam actualmente maior interesse para a produção de tomate em Cabo Verde.

3.1.1 Características gerais das cultivares

As cultivares 'Calor' e 'Produtor' foram obtidas pelo Centro Agrícola de S. Domingos – INIDA, ex-CPDA. São cultivares consideradas precoces e de porte determinado. A cultivar 'Calor' mostra-se um pouco melhor adaptada à estação quente do que a cultivar 'Produtor'. Estas cultivares são tidas como resistentes a nemátodes, elevadas temperaturas, necrose apical e rachamento fisiológico. São muito populares na ilha de Santiago e ocupam uma boa parte da área de produção da cultura na ilha.

A cultivar 'CV01' é proveniente de Cuba e mostra-se adaptada às condições agroecológicas de Cabo Verde. Apresentou tolerância ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro em ensaios realizados no Centro Agrícola de S. Domingos. Tem ciclo vegetativo semelhante às cultivares 'Calor' e 'Produtor' e maior produtividade, o que tem levado ao aumento da área por ela ocupada na ilha de Santiago.

3.1.2 Locais dos ensaios

O ensaio de campo foi realizado no campo experimental do INIDA em S. Domingos (Fig. 3.1), concelho de S. Domingos, com as coordenadas 15°1'5,49" N, 23°32'49,36" W e 230m de altitude. O ensaio em estufa decorreu em S. Jorge dos

Órgãos, concelho de S. Lourenço dos Órgãos (Fig. 3.1), com as coordenadas 15°3'12,4" N, 23°36'14,38" W e 310m de altitude.

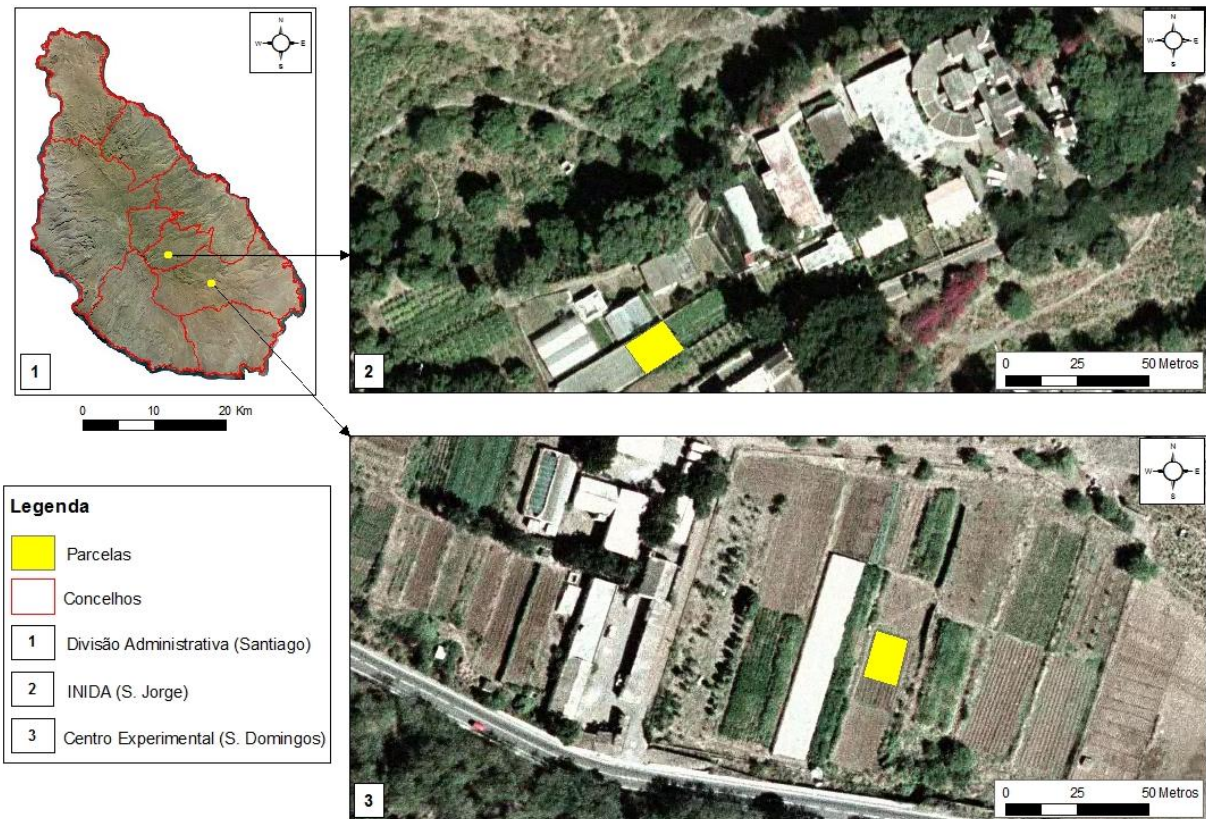


Fig 3. 1 - Localização do ensaio de campo realizado em S. Jorge (1) e em S. Domingos (2).

3.1.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi feito em blocos casualizados com 3 repetições no ensaio de campo de S. Domingos e em blocos completamente casualizados no ensaio de S. Jorge. Os ensaios decorreram durante a campanha de culturas hortícolas de 2011, sendo utilizadas três cultivares de tomateiro com sementes produzidas localmente nos anos de 2008 e 2009 (Quadro 2).

3.1.4 Dimensão dos ensaios

Utilizaram-se 18 parcelas elementares em cada local de ensaio (3 variedades x sementes de 2 anos de produção x 3 repetições), tendo cada parcela elementar uma linha de dez plantas. A distância entre as linhas foi de 0,70 m e o comprimento da parcela foi de 5 m, tendo cada ensaio uma área total 84 m². Para minimizar o efeito da bordadura foi instalada uma linha entre cada parcela sobre a qual não foi feita avaliação de rendimento nem determinação da incidência e da severidade de viroses.

3.1.5 Itinerário cultural nos ensaios

Ao nível do itinerário cultural adoptaram-se as técnicas e os procedimentos tidos como

os mais frequentes no INIDA.

Preparação do viveiro: As plantas de tomate utilizadas nos ensaios foram produzidas no viveiro em S. Domingos cujas sementes são oriundas da Estação de Produção de Sementes do INIDA em S. Domingos produzidas nos anos 2008 e 2009 de três cultivares de tomate ('Calor', 'Produtor' e 'CV01').

A preparação do viveiro consistiu numa lavoura efectuada à enxada e o substrato utilizado foi uma mistura de solo do viveiro, areia e matéria orgânica (estrume) bem decomposta. A sementeira foi efectuada em 30/05/11, tendo as plantas destinadas ao ensaio na estufa protegidas com rede anti-insectos.

3.1.5.1 Ensaio S. Domingos

Preparação de solo, adubação e transplante: na preparação de solo para plantação foi utilizado a charrua para reviramento do solo e a fragmentação do torrão fez-se manualmente com ajuda de uma enxada.

As **adubações** foram divididas em 2 fases: i) antes da sementeira aplicou-se 630 g de um adubo NPK 16-10-20, ii) 30 dias após a sementeira fez-se aplicação localizada de 315 g de um adubo NPK solúvel 15-05-30 + microelementos.

O transplante foi realizado no dia 27/06/11 com incorporação prévia de aproximadamente 500 kg de estrume de caprinos.

Relativamente à utilização de **pesticidas**, fez-se um tratamento preventivo com enxofre para prevenção de ataques de oídio e de ácaros.

Para a irrigação utilizou-se o sistema de rega localizada, tendo havido o cuidado de manter o solo à capacidade de campo nos períodos em que não ocorreram precipitações.

3.1.5.2 Ensaio S. Jorge

Preparação de solo e transplante: O transplante foi realizado no dia 24/06/11 com incorporação prévia de aproximadamente 500 kg de estrume de caprinos no solo.

As **adubações** foram divididas em 2 fases: i) antes da sementeira aplicou-se 630 g de NPK 16-10-20, ii) 30 dias após a sementeira fez-se aplicação localizada de 315 g de um adubo NPK solúvel 15-05-30 + microelementos.

Relativamente à utilização de **pesticidas**, foi feito um tratamento com deltametrina ('Decis 12.5 EC') para o controlo de *Tuta absoluta*.

Para a irrigação utilizou-se o sistema de rega localizada, tendo havido o cuidado de manter o solo à capacidade de campo nos períodos em que não ocorreram

precipitações.

3.2 Avaliação do comportamento das cultivares a viroses

A avaliação da incidência e da severidade das viroses nos ensaios foram feitas através da observação de sintomas no campo durante o ciclo da cultura. A observação dos sintomas foi efectuada aos 45 dias após a transplantação. Determinou-se a percentagem de plantas com sintomas de viroses (incidência) e a avaliação da severidade foi feita de acordo com uma escala adaptada da escala de severidade dos sintomas descrita por Friedmann *et al.* (1998) para o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro, como segue:

0 = sem sintomas visíveis;

1 = amarelecimento muito ligeiro das margens nas folhas apicais;

2 = algum amarelecimento e deformação em colher das folhas apicais;

3 = amarelecimento de várias folhas, ondulação e deformação, com redução do tamanho; no entanto, as plantas continuam a desenvolver-se;

4 = plantas de baixa estatura, amarelecimento das folhas, pronunciada ondulação e deformação e paragem de crescimento das plantas; sintomas severos.

Para determinação da produção procederam-se a colheitas escalonadas, à medida que os frutos foram amadurecendo, até ao final do ciclo das culturas. No ensaio de S. Domingos fez-se a primeira colheita no dia 06/09/11 e foram efectuadas 9 colheitas ao longo do ciclo cultural, sendo a última realizada no dia 07/10/11. No ensaio de S. Jorge fez-se a primeira colheita no dia 05/09/11 e foram efectuadas apenas 6 colheitas, sendo a última realizada no dia 23/09/11.

3.3 Obtenção de amostras de plantas para os ensaios imunoenzimáticos

As amostras de plantas do ensaio de S. Jorge foram prelevadas em todas as parcelas elementares, tendo sido obtidas de várias plantas da parcela com sintomas de viroses. Por outro lado, as amostras de plantas de solanáceas (folhas de tomateiro em cultivo e espontâneo, pimento, malagueta e beringela (Fig. 3.2 e Quadro 2)) presentes em campos de cultura na ilha de Santiago foram obtidas a partir de plantas com sintomas de viroses em diversos estados fenológicos.

As amostras consistiram de cerca de 2 g de folhas, estas foram colocadas entre folhas de papel absorvente em sacos de plástico e mantidas no frio até que foram transportadas e analisadas no Laboratório de Patologia Vegetal do ISA/Laboratório de

Patologia Vegetal 'Veríssimo de Almeida' - UTL (Lisboa). Procurou-se que as amostras fossem colhidas o mais próximo possível da data do seu transporte para o laboratório.

Foram ainda obtidas amostras de sementes das cultivares 'Calor', 'Produtor' e 'CV01', produzidas em 2008 e em 2009 (Fig. 3.3 e Quadro 2).



Fig 3. 2 - Amostra de folha
(fotografia do autor)



Fig 3. 3 - Amostra de sementes
(fotografia do autor)

3.4 Ensaios imunoenzimáticos (Teste DAS-ELISA)

3.4.1 Anticorpos utilizados

Para realização dos ensaios imunológicos foram adquiridos anticorpos para ToMV e TYLCV à empresa LOEWE Biochemica GmbH®.

ToMV: ToMV complete Kit – 07047C/096

TYLCV: TYLCV complete Kit – 07177C/096

3.4.2 Preparação dos tampões

A preparação dos tampões obedeceu ao protocolo proposto pela LOEWE Biochemica GmbH.

“Preparação de tampões para teste ELISA – ToMV

- ‘Coating Buffer’: Dissolver o conteúdo da embalagem em 900 ml de água destilada, ajustar o pH a 9,6 e completar a 1 litro. Guardar no frigorífico a 4°C até à utilização.
- ‘Wash Buffer’: Dissolver o conteúdo da embalagem (47,7g) em 5 litros de água destilada. Adicionar 2,5 ml de ‘Tween 20’; ajustar o pH da solução a 7,4. Guardar no frigorífico a 4°C até à utilização.

Quadro 2: Identificação das amostras avaliadas em ensaios imunoenzimáticos (DAS-ELISA)

Código	ID Amostras	Local	Espécie	Cultivar/Varietade	Data de Colheita/ Ano de Produção
Material de campo					
1	SJ02	São Jorge	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	28-06-2011
2	SD04	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	27-06-2011
3	SD24	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	27-06-2011
4	SD13	São Domingos	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	27-06-2011
5	SD14	São Domingos	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	27-06-2011
6	SD27	São Domingos	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	27-06-2011
7	SD28	São Domingos	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	27-06-2011
8	SD02	São Domingos	<i>Capsicum frutescens</i>	'Safi rouge'	27-06-2011
9	SD11	São Domingos	<i>Capsicum frutescens</i>	'Safi rouge'	27-06-2011
10	SD21	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	27-06-2011
11	SD22	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	27-06-2011
12	SD19	São Domingos	<i>Solanum melanogena</i>	'Ciça'	27-06-2011
13	SD20	São Domingos	<i>Solanum melanogena</i>	'Ciça'	27-06-2011
14	SJ01	São Jorge	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	28-06-2011
15	SJ04	São Jorge	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	28-06-2011
16	SJ05	São Jorge	<i>Solanum lsp</i>	Tomatinho	28-06-2011
Material do ensaio em estufa					
17	Talhão 1 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
18	Talhão 1 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
19	Talhão 1 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
20	Talhão 2 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
21	Talhão 2 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
22	Talhão 2 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011
23	Talhão 3 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
24	Talhão 3 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
25	Talhão 3 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
26	Talhão 4 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
27	Talhão 4 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
28	Talhão 4 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011
29	Talhão 5 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
30	Talhão 5 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
31	Talhão 5 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
32	Talhão 6 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
33	Talhão 6 – R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
34	Talhão 6 – R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011
Sementes					
35			<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	2008
36			<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	2009
37			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	2008
38			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	2009
39			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	2008
40			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	2009

- ‘Cojugate/Sample Buffer’: Dissolver o conteúdo da embalagem em 900 ml de água destilada, ajustar o pH a 7,4. Adicionar 0,5 ml de ‘Tween 20’ e completar a 1 litro. Guardar no frigorífico a 4°C até a utilização.
- ‘Substrate Buffer’: Dissolver 25 ml da solução 5x-concentrada em 100 ml de água destilada, ajustar o pH a 9,8 e completar a 125 ml. Guardar no frigorífico a 4°C até a utilização.
- ‘Substrate Solution’: Dissolver uma pastilha de 5mg de PNPP (p-nitrofenil fosfato) em 5ml de ‘substrate buffer’ imediatamente antes de utilizar”.

“Preparação de tampões para teste ELISA – TYLCV

- ‘Wash Buffer’: Dissolver o conteúdo da embalagem (47,7 g) em 5 litros de água destilada. Adicionar 2,5 ml de ‘Tween 20’; ajustar o pH da solução a 7,4. Guardar no frigorífico a 4°C até à utilização.
- ‘Standard Cojugate/Sample Buffer’: Dissolver o conteúdo da embalagem em 900 ml de água destilada, ajustar o pH a 7,4. Adicionar 0,5 ml de ‘Tween 20’ e completar a 1 litro. Guardar no frigorífico a 4°C até a utilização.
- Nota: O tampão não deve ser usado para a preparação das amostras, mas apenas para a diluição de IgG e Rat-anti-mouse ((H+P)-AP-conjugate)
- Sample Buffer LOEWE III: (Só para a preparação de amostras) Dissolver o conteúdo da embalagem em 900 ml de água destilada, ajustar o pH a 8,6 e completar a 1 litro. Não adicionar ‘Tween 20’.
- ‘Substrate Buffer’: Dissolver 25 ml da solução 5x-concentrada em 100 ml de água destilada, ajustar o pH a 9,8 e completar a 125 ml. Guardar no frigorífico a 4°C até a utilização.
- ‘Substrate Solution’: Dissolver uma pastilha de 5mg de PNPP (p-nitrofenil fosfato) em 5ml de ‘substrate buffer’ imediatamente antes de utilizar”.

3.4.3 Preparação das amostras

Com uma balança de precisão, pesou-se 0,5 g do material vegetal que foi depois lavado sob água corrente, secado em papel absorvente, lavado posteriormente em água destilada e seco de novo em papel de filtro. Este material vegetal foi macerado em almofariz de porcelana (Fig. 3.4) e adicionou-se 4 ml de ‘Simple conjugate buffer’, a macerando até à perfeita homogeneização.



Fig 3. 4 - Amostra de sementes macerada

(fotografia do autor)

O macerado foi depois colocado em tubo de centrifugação e centrifugado a 4 950 rpm, durante 5 minutos. Recolheu-se 1,5 ml do sobrenadante que foi colocado em microtubo ('eppendorf') e guardado a 4°C. Posteriormente foram utilizadas 100 µl da amostra para cada análise.

3.4.4 Procedimentos para a realização do teste DAS-ELISA para ToMV

- **Revestimento da placa com anticorpos de ToMV**

Tendo como objectivo a utilização dos 96 poços de uma placa de microtitulação (Nunc-Immuno plates™, Maxisorp™) preparou-se 10 ml de tampão de revestimento com o anticorpo específico diluído na proporção de 1:200, isto é 50 µl para 10 ml. 100 µl dessa solução foram colocados em cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal, processo conhecido como 'sensibilização da placa'. A placa foi depois tapada com parafilme e colocada numa incubadora a 37°C, durante 4 horas. Realizou-se de seguida quatro lavagens com o tampão de lavagem 'Wash Buffer', sendo duas lavagens rápidas e duas lavagens de 3 minutos cada.

- **Colocação do antigénio na placa (amostras)**

Em cada poço foram colocadas 100 µl da amostra da planta a analisar, repetidas 2 vezes. As amostras foram devidamente identificadas conforme a Fig. 3.5. O controlo positivo e o controlo negativo foram diluídos em tampão 'conjugate sample buffer', na proporção de 1:20. A placa foi selada com parafilme e incubada 'over-night' a 4°C. Uma série de quatro lavagens foi de seguida efectuada, sendo duas lavagens rápidas e duas de 3 minutos cada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	Tp	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
B	H ₂ O	Tp	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37
C	H ₂ O	CP	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
D	H ₂ O	CP	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38
E	H ₂ O	CN	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
F	H ₂ O	CN	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39
G	H ₂ O	H ₂ O	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
H	H ₂ O	H ₂ O	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40

Fig 3. 5 - Disposição das amostras na placa ELISA

Legenda: H₂O – Água; Tp – Solução Tampão; CP – Controlo Positivo; CN – Controlo Negativo; 1-40 – amostras analisadas

- **Adição do conjugado**

O conjugado ‘antibody-AP-conjugate’ foi diluído em tampão ‘conjugate sample buffer’ numa proporção de 1:200, isto é 50 µl de conjugado para 10 ml de tampão. 100 µl dessa solução foram utilizados para cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal. A placa foi tapada com parafilme e colocada numa incubadora a 37°C, durante 4 horas. Fez-se quatro lavagens com o tampão de lavagem ‘Wash Buffer’, sendo duas lavagens rápidas e duas lavagens de 3 minutos cada.

- **Adição do substrato**

A solução de substrato foi preparada na altura da sua utilização, conforme a recomendação do fabricante. Dissolveu-se dois comprimidos em 10 ml do tampão ‘substrate buffer’. 100 µl dessa solução foram utilizados para cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal. A placa foi selada com parafilme e colocada numa gaveta, na ausência da luz e a temperatura ambiente, durante 2 horas, antes da leitura dos resultados.

3.4.5. Procedimentos para a realização do teste DAS-ELISA para TYLCV

- **Revestimento da placa com anticorpos de TYLCV**

Foram utilizados 10 ml de ‘Coating Buffer’ para a diluição de 50 µl de IgG, isto é uma proporção de 1:200. 100 µl dessa solução foram colocados em cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal, ‘sensibilização da placa’. A placa foi selada com parafilme e colocada numa incubadora a 37°C, durante 4 horas. Realizou-se quatro lavagens com o tampão de lavagem ‘Wash Buffer’, sendo duas lavagens rápidas e duas lavagens de 3 minutos cada.

- **Colocação do antígeno na placa (amostras)**

As amostras foram preparadas em tampão 'Sample Buffer LOEWE III'. 100 µl da amostra da planta a analisar foram colocadas em cada poço, repetidas 2 vezes conforme o esquema da Fig. 3.5. O controlo positivo e o controlo negativo foram diluídos em 2 ml de tampão 'Sample Buffer LOEWE III'. A placa foi selada com parafilme e ficou em incubação over-night a 4°C. Uma série de cinco lavagens foi efectuada com o tampão de lavagem 'Wash Buffer', sendo as lavagens nas etapas 3 e 4 de 3 minutos cada.

- **Adição de 'Specific monoclonal antibody (MAb)'**

O 'Specific monoclonal antibody (MAb)' foi diluído em tampão 'Standard conjugate sample buffer' numa proporção de 1:200, isto é 50 µl de conjugado para 10 ml de tampão. 100 µl dessa solução foram utilizados para cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal. A placa foi selada com parafilme e colocada numa incubadora a 37°C, durante 2 horas. Uma série de cinco lavagens foi efectuada com o tampão de lavagem 'Wash Buffer', sendo as lavagens nas etapas 3 e 4 de 3 minutos cada.

- **Adição do conjugado 'rat-anti-mouse-AP-conjugate'**

O 'rat-anti-mouse-AP-conjugate' foi diluído em tampão 'Standard conjugate sample buffer' numa proporção de 1:200, isto é 50 µl de conjugado para 10 ml de tampão. 100 µl dessa solução foram utilizados para cada poço da placa com ajuda de uma micropipeta multicanal. A placa foi selada com parafilme e colocada numa incubadora a 37°C, durante 2 horas. Realizaram-se cinco lavagens com o tampão de lavagem 'Wash Buffer', sendo as lavagens nas etapas 3 e 4 de 3 minutos cada.

- **Adição do substrato**

A solução de substrato foi preparada na altura da sua utilização, conforme a recomendação do fabricante. Dissolveu-se dois comprimidos em 10 ml de tampão 'substrate buffer'. 100 µl dessa solução foram utilizados para cada poço da placa com ajuda de micropipeta multicanal. A placa foi selada com parafilme e colocada numa gaveta na ausência da luz e na temperatura ambiente, durante 2 horas, antes da leitura dos resultados.

3.5. Tratamento estatístico

Para avaliação do comportamento das cultivares nos ensaios recorreu-se à ANOVA para analisar as componentes da produção e a incidência de vírus, com um erro de significância determinado pelo teste de Tuckey ($p < 0,05$).

4 Resultados e discussão

4.1 Detecção de TYLCV e ToMV nas amostras estudadas

Os resultados dos ensaios imunoenzimáticos (técnica DAS-ELISA) são apresentados no Quadro 3 e nas Figs. 4.1 e 4.2.

Quadro 3: Resultado das análises de TYLCV e ToMV em material do campo dos ensaios e das sementes.

Código	ID Amostras	Local	Espécie	Cultivar/Varietade	Data de Colheita/ Ano de Produção	Resultado das análises	
						TYLCV	ToMV
Material de campo							
1	SJ02	São Jorge	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	28-06-2011	x	
2	SD04	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	27-06-2011	x	
3	SD24	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	27-06-2011	x	x
4	SD13	São Domingos	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	27-06-2011	x	
5	SD14	São Domingos	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	27-06-2011	x	
6	SD27	São Domingos	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	27-06-2011		
7	SD28	São Domingos	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	27-06-2011	x	
8	SD02	São Domingos	<i>Capsicum frutescens</i>	'Safi rouge'	27-06-2011		
9	SD11	São Domingos	<i>Capsicum frutescens</i>	'Safi rouge'	27-06-2011		
10	SD21	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	27-06-2011		
11	SD22	São Domingos	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	27-06-2011	x	
12	SD19	São Domingos	<i>Solanum melanogena</i>	'Ciça'	27-06-2011		
13	SD20	São Domingos	<i>Solanum melanogena</i>	'Ciça'	27-06-2011	x	
14	SJ01	São Jorge	<i>Capsicum annum</i>	'Bonita'	28-06-2011	x	
15	SJ04	São Jorge	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	28-06-2011	x	
16	SJ05	São Jorge	<i>Solanum sp</i>	Tomatinho	28-06-2011		
Material do ensaio em estufa							
17	Talhão 1 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011	x	
18	Talhão 1 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011		
19	Talhão 1 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011		
20	Talhão 2 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011		
21	Talhão 2 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011		
22	Talhão 2 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	28-06-2011	x	
23	Talhão 3 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011		
24	Talhão 3 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011	x	
25	Talhão 3 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011		
26	Talhão 4 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011		
27	Talhão 4 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011		
28	Talhão 4 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	28-06-2011	x	
29	Talhão 5 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011		
30	Talhão 5 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011		
31	Talhão 5 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011		
32	Talhão 6 - R1	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011	x	
33	Talhão 6 - R2	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011		
34	Talhão 6 - R3	São Jorge	<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	28-06-2011		
Sementes							
35			<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	2008	x	x
36			<i>Solanum lycopersicum</i>	'CV01'	2009	x	x
37			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	2008	x	
38			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Calor'	2009	x	
39			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	2008	x	
40			<i>Solanum lycopersicum</i>	'Produtor'	2009	x	

Como se pode verificar, das 16 amostras de material do campo, constituídas por formas cultivadas e não cultivadas de *S. lycopersicum*, por cultivares de *S. melanogeta*, *C. annuum* e *C. frutescens*, provenientes de campos de cultura em Santiago, analisadas através de teste ELISA, 10 acusaram presença do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCV) (62,5 % das amostras) e apenas uma a presença do vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) (6 % das amostras). Dentre as espécies analisadas, detectou-se o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro em *S. lycopersicum*, *S. melanogeta* e *C. annuum*, não se encontrando o referido vírus em *C. frutescens*. A forma espontânea de tomate 'Tomatinho' é portadora do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro e mostra-se como planta reservatório do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro, assim como *S. melanogeta* que frequentemente é mantido no campo por longos períodos ou em bordadura, comportando-se como cultura plurianual. O vírus do mosaico do tomateiro apenas foi detectado numa amostra de *S. lycopersicum* ('Produtor').

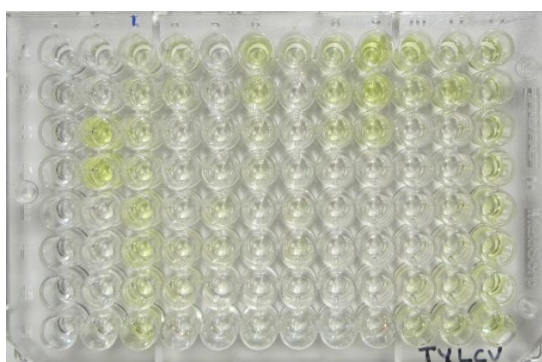


Fig 4. 1 - Resultados do ensaio imunoenzimático para TYLCV
(fotografia do autor).

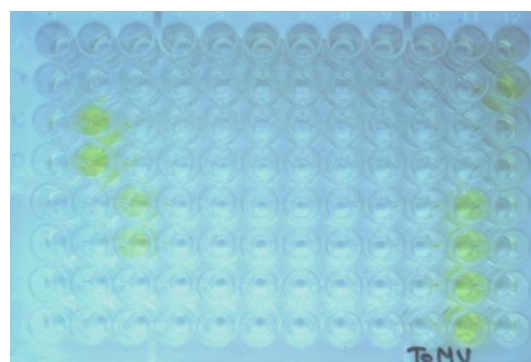


Fig 4. 2 - Resultados do ensaio imunoenzimático para ToMV
(fotografia do autor).

(para identificação das amostras ver Fig. 3.5)

As sementes provenientes de culturas de tomateiro produzidas no centro agrícola de S. Domingos, analisadas através de teste DAS-ELISA, deram resultados positivos na ordem dos 100 % em relação ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro. Não obstante os conhecimentos disponíveis de que o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro não é transmitido pela semente (Costa, 1976), Delatte *et al.* (2003) ao analisarem frutos de tomate detectaram o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro em 8% dos casos numa parcela com 27% de infecção nas folhas. A interpretação dos resultados positivos obtidos com as amostras de sementes produzidas em Santiago deve merecer algum cuidado enquanto não forem repetidos os testes imunológicos. Por outro lado, a detecção do vírus na semente não implica necessariamente a sua transmissão, porquanto poderá estar apenas no tegumento ou

no endosperma e não passar sistemicamente à plântula. Para os testes do vírus do mosaico do tomateiro apresentaram resultado positivo as sementes da cultivar 'CV01', produzidas tanto em 2008 como em 2009, ou seja, 33,3% das amostras. No entanto, as plantas provenientes dessas sementes quando sujeitas ao teste ELISA não acusaram a presença do vírus do mosaico do tomateiro. A amostra de sementes de 'Calor' de 2008 originou um falso positivo (Fig. 4.2), tendo havido hidrólise do substrato em apenas um dos poços utilizados com o extracto da amostra. A repetição do ensaio não confirmou a presença do vírus do mosaico do tomateiro nessa amostra.

Nas amostras onde não se detectou o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro nem o vírus do mosaico do tomateiro, os sintomas observados podem ser decorrentes de infecção por outros vírus, uma vez que sintomas de mosaico, amarelecimento e deformação do limbo foliar podem ser induzidos por outros vírus do tomateiro (Zerbini et al., 2005). Esses sintomas também podem ser induzidos por factores abióticos.

Nas amostras provenientes dos 18 talhões do ensaio na estufa em S. Jorge, cinco acusaram presença do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (Fig. 4.1), correspondendo a 27,7% das amostras. A presença do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro nas amostras provenientes da estufa pode ser explicada por possível infecção das plantas no viveiro ou pelo mau estado de conservação das redes da estufa, o que possibilitou a entrada de *B. tabaci*, observada na altura das amostragens. Porém, como foi detectado o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro em sementes, ter-se-á de ponderar a transmissão do vírus via semente, o que, a ser verdade, contradiz os conhecimentos sobre a possibilidade de transmissão ou não de geminivírus pela semente (Costa, 1976). Nessas amostras não se detectou o vírus do mosaico do tomateiro. A não detecção do vírus do mosaico do tomateiro nas amostras proveniente da estufa poderá ser surpreendente (ou não) uma vez que as sementes da cultivar 'CV01' tiveram resultado positivo nas análises a que foram submetidas (Quadro 3). Vários autores mostraram a transmissibilidade do vírus do mosaico do tomateiro por semente e a elevada persistência do mesmo no tegumento e no endosperma (Erkan & Delen, 1985; Borges, 2005). No entanto, Pradhanang (2009) referiu que não conseguiu despistar o vírus do mosaico do tomateiro por DAS-ELISA em plantas provenientes de sementes de campos severamente infectados por esse vírus.

4.1.1 Avaliação da incidência e da severidade de viroses nos ensaios

Os resultados da incidência e da severidade de viroses nos ensaios são apresentados

no Quadro 4.

Apesar dos sintomas observados nos ensaios levarem à suspeita da doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCD), ao não ter sido encontrado o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro em todas as amostras dos ensaios analisadas por DAS-ELISA (Quadro 3) achou-se prudente não considerar que os sintomas foram devidos apenas ao TYLCV mas sim a viroses, nas quais, naturalmente, se inclui a doença do frisado amarelo do tomateiro.

Quadro 4: Valores da incidência de viroses com base na observação dos sintomas e da severidade com base nas classes da escala de severidade dos sintomas nos ensaios de S. Jorge e S. Domingos

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Incidência de viroses (%)		Severidade de viroses (media das classes)	
		S. Jorge	S. Domingos	S. Jorge	S. Domingos
'CV01'	2008	0,00	3,33	0,00	0,03
'CV01'	2009	0,00	0,00	0,00	0,00
'Calor'	2008	22,50	70,00	0,31	1,70
'Calor'	2009	31,47	46,67	0,39	1,03
'Produtor'	2008	60,83	70,67	0,86	1,69
'Produtor'	2009	28,50	53,33	0,46	1,13

A incidência de viroses, avaliada através das observações visuais dos sintomas em culturas conduzidas no ensaio de campo e no ensaio em estufa, variou entre 0% na modalidade 'CV01' x 2008 e CV01' x 2009 na estufa de S: Jorge e CV01' x 2009 no ensaio de campo de S. Domingos e 70,67% na modalidade 'Produtor' x 2008 no ensaio de campo de S. Domingos. Regista-se que a cultivar 'CV01' apresentou menor incidência de viroses, o que está de acordo com o conhecimento da sua maior tolerância ao vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (§ 3.1.1.). Por outro lado, a incidência de viroses foi, aparentemente, menor no ensaio em estufa em S. Jorge comparativamente ao ensaio de campo de S. Domingos. A não normalidade dos dados registados levou a que não se fizesse uma análise de variância para comparação dos dois sistemas de produção.

Para a análise de cultivar vs severidade de viroses, registou-se que a severidade foi de 0% na combinação 'CV01' x 2008 e 'CV01' x 2009 na estufa de S: Jorge e 'CV01' x 2009 no ensaio de campo de S. Domingos e de 0,03 na combinação 'CV01' x 2009 no ensaio de campo de S. Domingos. Os valores mais elevados para a severidade, média superior a 1, foram observados no ensaio de campo de S. Domingos, tendo sido registados quer para a cultivar 'Produtor' quer para a cultivar 'Calor'. Mais uma vez

ressaltou a aparente resistência da cultivar 'CV01' às viroses que ocorrem na ilha de Santiago.

Para o conjunto dos dados dos ensaios de S. Jorge e S. Domingos os valores da incidência e da severidade de viroses nas três cultivares estudadas são apresentados no Quadro 5.

A incidência de viroses, avaliada através das observações visuais dos sintomas em culturas conduzidas no ensaio de campo e no ensaio em estufa, variou entre 0% na modalidade 'CV01' x 2009 e 65,4% na modalidade de 'Calor' x 2008. Registrou-se mais uma vez que a cultivar 'CV01' apresentou menor incidência de viroses, com a modalidade 'CV01' x 2008 com apenas 1,7% de incidência. A análise de variância colocou em evidência uma diferença significativa entre a cultivar 'CV01' e as cultivares 'Calor' e 'Produtor' com menor incidência de viroses para a cultivar 'CV01' (Quadro 5). A modalidade 'Calor' x 2009 e a modalidade 'Produtor' x 2008 foram estatisticamente idênticas entre si e diferentes das modalidades 'Produtor' x 2009 e 'Calor' x 2008 que tiveram um nível de incidência semelhante.

Quadro 5: Resultado da análise de variância da incidência de viroses com base na observação dos sintomas e da severidade com base nas classes da escala de severidade dos sintomas

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Incidência de viroses (%)	Severidade de viroses (media das classes)
'CV01'	2009	0,0a	0,0a
'CV01'	2008	1,7a	0,02a
'Calor'	2009	37,6b	0,7b
'Produtor'	2008	37,9b	0,74b
'Produtor'	2009	51,1bc	1,03b
'Calor'	2008	65,4c	1,14b

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

A severidade de viroses, avaliada através das observações visuais dos sintomas em culturas conduzidas em ensaios de campo e na estufa e utilizando a escala adaptada a partir da que havia sido descrita por Friedmann *et al.* (1998), variou entre 0% na modalidade 'CV01' x 2009 e 1,14 na modalidade 'Calor' x 2008 (Quadro 5). A análise de variância demonstrou que a severidade das viroses foi menor na cultivar 'CV01' que nas cultivares 'Calor' e 'Produtor' que tiveram nível de severidade semelhante entre si.

De uma forma geral os sintomas de viroses na cultivar 'CV01' foram muito discretos,

passando quase sempre despercebidos. Porém, o teste ELISA confirmou a presença do vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro na cultivar 'CV01'.

4.2 Estudo da produção

Para o ensaio realizado na estufa em S. Jorge as informações relativas ao peso dos frutos, número de frutos obtidos bem como a correspondente produtividade estimada (t/ha) encontram-se no Quadro 6.

A produção no ensaio de tomate na estufa em S. Jorge (Quadro 6) foi relativamente fraca, inferior ao ensaio ao ar livre em S. Domingos (Quadro 7 e Quadro 8) e inferior ao potencial produtivo das cultivares 'Calor' e 'Produtor'. A modalidade 'Produtor' x 2008 foi a única a atingir a sua produção normal, tendo as produções das outras modalidades ficado aquém da capacidade produtiva das cultivares. Apesar da baixa incidência de viroses na cultivar 'CV01' não conseguiu expressar a boa produtividade registada em S. Domingos.

Quadro 6: Componentes do rendimento no ensaio de tomate em S. Jorge (estufa)

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Peso (g)	Nº de frutos	Produção (t/ha)
'Calor'	2008	4787	141	6,6
'Calor'	2009	10237	212	13,0
'Produtor'	2008	11277	203	15,4
'Produtor'	2009	7406	156	9,7
'CV01'	2008	9314	167	11,8
'CV01'	2009	4963	89	7,3

A fraca e descaracterizada produção de tomate nesse ensaio em S. Jorge não nos pareceu estar relacionada com a incidência e/ou a severidade de viroses. Contudo, ela pode ser relacionada com parâmetros meteorológicos desfavoráveis aos quais a cultura esteve submetida, nomeadamente:

- o ciclo da produção coincidiu com períodos de chuvas, por vezes fortes, com períodos de céu encoberto em S. Jorge (Anexo 1) durante vários dias no mês de Agosto (14 dias de chuvas e 222.2 mm de precipitação);
- a estufa onde foi implantada a cultura não dispunha de um sistema de drenagem, acumulando água durante alguns dias, o que provocou asfixia radicular e podridões no caule, ramos e frutos das plantas em zonas alagadas; a senescência da cultura ocorreu mais cedo, reduzindo o ciclo cultural em cerca de 14 dias em relação à cultura em S. Domingos.

Para o ensaio realizado ao ar livre em S. Domingos as informações relativas ao peso dos frutos, número de frutos obtidos bem como a correspondente produtividade estimada (t/ha) encontram-se no Quadro 7.

Quadro 7: Componentes do rendimento no ensaio de tomate em S. Domingos (ar livre)

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Peso (g)	Nº de frutos	Produção (t/ha)	Potencial (t/ha)
'Calor'	2008	8425	206	10,0	20 t/ha
'Calor'	2009	13800	329	13,3	
'Produtor'	2008	16625	325	19,6	15 t/ha
'Produtor'	2009	11925	232	15,1	
'CV01'	2008	15900	357	19,4	
'CV01'	2009	18425	482	21,8	

Dos resultados obtidos ressalta a relativa boa produção nas modalidades 'CV01' x 2009 com 21,8 t/ha, 'CV01' x 2008 com 19,4 t/ha e 'Produtor' x 2008 com 19,6 t/ha. A modalidade 'Calor' x 2008 com a produção de 10,0 t/ha foi a menos produtiva. Essa baixa de produção na modalidade 'Calor' x 2008 pode ser explicada pela forte incidência de virose observada (65,4%), conjugada com a alta severidade verificada (1,14) (Quadro 5). De resto, a cultivar 'Calor' com o seu potencial estimado em 20 t/ha ficou com uma produção bastante inferior, tanto na modalidade 'Calor' x 2008 como na modalidade 'Calor' x 2009 com a produção de 13,3 t/ha. Relativamente à cultivar 'CV01' não dispomos de dados sobre o seu potencial produtivo, mas os produtores afirmam que para esta cultivar as produções normalmente obtidas são superiores às conseguidas com as cultivares 'Calor' e 'Produtor'.

A média da produção dos talhões do ensaio em S. Jorge foi comparada com a média da produção dos talhões do ensaio conduzido em S. Domingos e encontram-se no Quadro 8.

Quadro 8: Comparação das produções de tomate nos ensaios de S. Jorge (estufa) e S. Domingos (ar livre)

Local do Ensaio	Média da produção do talhão (g)	Produção (t/ha)
S. Jorge	3029,9a	10,6
S. Domingos	4797,5b	16,5

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

Analisando a produção de tomate vs local do ensaio, verificou-se que o ensaio conduzido na estufa em S. Jorge (10,6 t/ha) teve uma produção estatisticamente

inferior ao ensaio conduzido ao ar livre em S. Domingos (16,5 t/ha), contrariamente ao que se esperava. Como já se referiu, a fraca produção de tomate nesse ensaio não se deveu à incidência e/ou à severidade de viroses, mas sim com as condições meteorológicas desfavoráveis em fases do ciclo da cultura e a incapacidade de se efectuar a drenagem de determinadas zonas da estufa que ficaram inundadas após ocorrência de chuvas.

Para o conjunto dos ensaios de S. Jorge e de S. Domingos os valores médios da produção dos talhões em função do ano de produção das sementes nas três cultivares estudadas são apresentados no Quadro 9. Os valores das repetições das diferentes modalidades apresentaram elevado desvio em relação à média da modalidade, o que teve reflexos na separação de valores estatisticamente significativos. Assim, na análise de cultivar vs ano de produção de sementes, registou-se que a modalidade 'Calor' x 2008 com uma produtividade de 7,7 t/ha não diferiu significativamente da modalidade 'Produtor' x 2009 com 12,6 t/ha. Porém, a produtividade de 'Calor' x 2008 foi significativamente inferior à das outras modalidades ('CV01' x 2009, com 14,0 t/ha, 'Calor' x 2009, com 14,2 t/ha, 'CV01' x 2008 com 15,1 t/ha e 'Produtor' x 2008 com 16,9 t/ha). Os resultados não indicam nenhuma influência do ano de produção de sementes sobre a produtividade nas diferentes modalidades. A baixa produtividade da modalidade 'Calor' x 2008 parece estar relacionado com a incidência de viroses (65,4%), conjugada com a severidade (1,14) (Quadro 5).

Quadro 9: Produção das cultivares no conjunto dos ensaios em função do ano de produção da semente

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Média da produção do talhão (g)	Produção (t/ha)
'Calor'	2008	2261,7a	7,7a
'Produtor'	2009	3664,9ab	12,6ab
'CV01'	2009	4070,9b	14,0b
'Calor'	2009	4147,0b	14,2b
'CV01'	2008	4400,4b	15,1b
'Produtor'	2008	4937,6b	16,9b

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

Para o conjunto de todas as modalidades ensaiadas, cultivar x ano de obtenção da semente x local do ensaio (S. Jorge e S. Domingos), não havendo interacção cultivar x ano de obtenção da semente e local do ensaio os valores médios da produção são apresentados no Quadro 10.

Quadro 10: Produção das cultivares no conjunto dos ensaios em função do ano de produção da semente e dos locais de produção - S. Jorge (estufa) e S. Domingos (ar livre)

Cultivar	Ano de obtenção da semente	Local	Produção (gr)	Aumento de produção em relação à modalidade 'Calor' x 2008 (%)
'Calor'	2008	S. Jorge	1715,0a	-
'CV01'	2009	S. Jorge	2000,1a	17
'Calor'	2008	S. Domingos	2808,3ab	64
'Produtor'	2009	S. Jorge	3138,2ab	83
'CV01'	2008	S. Jorge	3299,0ab	92
'Calor'	2009	S. Jorge	3693,9ab	115
'Produtor'	2009	S. Domingos	4191,7ab	144
'Produtor'	2008	S. Jorge	4333,5ab	153
'Calor'	2009	S. Domingos	4600,0ab	168
'CV-01'	2008	S. Domingos	5501,9ab	221
'Produtor'	2008	S. Domingos	5541,7ab	223
'CV-01'	2009	S. Domingos	6141,7b	258

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

A produção mais baixa foi registada para a cultivar 'Calor' x 2008 no ensaio de S. Jorge com 1715,0 g. O aumento das produções variou entre 17 e 258%, ressaltando que os valores mais altos ocorreram para algumas modalidades do ensaio de S. Domingos. Mais uma vez, como os valores das repetições das diferentes modalidades apresentaram elevado desvio da média da modalidade, a separação das produções das várias modalidades com base em diferenças estatisticamente significativas não apresenta grande interesse para discussão.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo permitiu confirmar com base na técnica DAS-ELISA que o vírus da doença do frisado amarelo do tomateiro (TYLCV) e o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV) infectam hortícolas em Cabo Verde.

O vírus do frisado amarelo do tomateiro foi encontrado em diversas amostras de *S. lycopersicum* (tomateiro), *S. melanoгена* (beringela) e *C. annum* (pimentão). O vírus não foi detectado nas duas amostras de *C. frutescens* (malagueta) analisadas.

O vírus do mosaico do tomateiro foi encontrado em apenas uma amostra de *S. lycopersicum*, cultivar 'Produtor', com origem em S. Domingos.

S. lycopersicum 'Tomatinho' espontânea é portadora do vírus do frisado amarelo do tomateiro e serve de planta reservatório do TYLCV nos campos de cultura em Cabo Verde. Igual papel desempenha *S. melanoгена* (beringela) que frequentemente é mantido nos campos por longos períodos, comportando-se como cultura plurianual.

Nalgumas amostras com sintomas de mosaico, amarelecimento e deformação do limbo foliar não foi detectado o vírus do frisado amarelo do tomateiro ou o vírus do mosaico do tomateiro, o que pressupõe estarem possivelmente outros vírus associados a viroses das solanáceas em Cabo Verde.

A cultivar 'CV01', mostrou-se tolerante a viroses, incluindo o vírus do frisado amarelo do tomateiro, ao contrário das cultivares 'Produtor' e 'Calor'.

As sementes provenientes de culturas de tomateiro produzidas no centro agrícola de S. Domingos apresentaram nível de infecção da ordem dos 100%, tendo-se despistado em todas elas o vírus do frisado amarelo do tomateiro. Os testes para o vírus do mosaico do tomateiro apresentaram resultado positivo apenas nas sementes de cultivar 'CV01'.

A produção nos ensaios de tomateiro mostrou uma boa produção nas modalidades 'CV01' x 2009, 'CV01' x 2008 e 'Produtor' x 2008. A modalidade 'Calor' x 2008 foi a menos produtiva. Essa baixa de produção na modalidade 'Calor' x 2008 esteve relacionada com a forte incidência e severidade de viroses.

As produções na estufa de S. Jorge estiveram aquém do esperado devido às dificuldades encontradas em conduzir a cultura na estufa, uma vez que as chuvas ocorridas durante o ciclo produtivo dos tomateiros levaram ao encharcamento do solo e estagnação da água por longos períodos.

Tendo em consideração a importância das viroses no tomateiro em Cabo Verde,

nomeadamente do TYLCV nas solanáceas, as perspectivas vão no sentido de:

- continuar a investigação das viroses das culturas hortícolas, atendendo ao papel económico e social que as hortícolas desempenham para a agricultura caboverdeana e para a segurança alimentar das famílias que dependem da fileira destes produtos agrícolas no país;

- desenvolver estratégias de gestão das viroses das culturas em Cabo Verde, dando especial atenção às medidas directas e indirectas de luta. Particular cuidado deverá ser tomado com a fitossanidade dos viveiros, com o controlo das populações de insectos vectores, caso das moscas-branca, e com a eliminação nos campos de cultura de plantas que funcionam como reservatório de vírus durante os períodos em que as culturas não estão no terreno.

O estudo da transmissão ou não do TYLCV pela semente justifica uma linha de trabalho que deverá ser iniciada em colaboração com um laboratório de investigação. Institucionalmente, à semelhança do que foi feito no passado, o INIDA deverá envolver-se nesta linha de trabalho e noutras sobre o diagnóstico e sobre a gestão das viroses de culturas em Cabo Verde.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhary M., Patil B.L. & Fauquet C.M. 2007. Molecular biodiversity, taxonomy, and nomenclature of *tomato yellow leaf curl-like viruses*. In Czosnek, H. (Ed.), *Tomato Yellow Leaf Curl Disease, Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*: pp. 85-118.
- Anfoka G.H., Abhary M. & Nakhla M.K. 2005. Molecular identification of species of the *Tomato yellow leaf curl virus* complex in Jordan. *Journal of Plant Pathology* 87:61-66.
- Assunção, I.P., Listik, A. F., Barros, M.C.S., Amorice, E.P.R., Silva, S.J.C., Izael, O., Ramalho-Neto C.E. & Lima, G.S.A. 2006. Diversidade genética de begomovirus que infectam plantas invasoras na região nordeste. *Planta Daninha* 24:239-244.
- Astier, S., Albouy, J., Maury, Y. & Lecoq, H. 2001. Principes de virology végétale: genome, pouvoir pathogène, écologie des virus. INRA, Paris: pp. 444.
- Ávila, A.C., Ionue-Nagata, A.K., Costa. H., Boiteux, L.S., Neves, L.O.Q., Prates, R.S. & Bertini, L.A. 2004. Ocorrência de viroses em tomate e pimentão na região serrana do estado do Espírito Santo. *Horticultura Brasileira*. 22:655-658.
- Azzam, O., Frazer, J., de la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P. & Maxwel, D.P. 1994. Whitefly transmission and efficient ss-DNA accumulation of beam golden mosaic geminivírus require functional coat protein. *Virology* 204:289-296.
- Bird, J., Idris, A.M., Rogan, D. & Brown, J.K.. 2001. Introduction of the exotic *tomato yellow leaf curl virus* - Israel in tomato to Porto Rico. *Plant Disease* 85:1028.
- Borges, M.L.V. 2005. Vírus, viróides e doenças de plantas. EAN, 1ª ed. pp 504.
- Boukema, I.W. 1984. Resistance to TMV *Capsicum chacoense* Hunz. Is governed by an allele of the L-locus. *Capsicum Newsletter* 3:47-48.
- Brown, J.K. 1994. The status of *Bemisia tabaci* (Genn.) as a pest and vector in world agroecosystems. *Food Agric. Plant Prot. Bull.* 42:3-32.
- Camargo, L.E.A. & Bergamin filho, A. 1995. Controle Genético. In: Bergamin filho *et al.* (Ed.). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. 3ª. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. pp.729–760.
- Clark, M.F.& Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of ezyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.

- Clark, H. & Bar-Joseph, A. 1984. Enzyme Immunosorbent Assays in plant virology. In: Methods in virology, 7 ed. Maramorosch & Koprowsky. Academic press, New York: pp. 234.
- Cerkauskas, R.F. 2004. Tobacco Mosaic Virus, Tomato Mosaic Virus Mechanically Transmitted Tobamoviruses. AVRDC – The World Vegetable Center, 04-594 <http://www.avrdc.org/LC/pepper/TMV.pdf> (acedido em 27/03/2012)
- Cohen, S. & Antignus, Y. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus*, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* 10:259-288.
- Cohen, S. & Nitzani, F.E. 1966. Transmission and host range of *tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 56:1127-1131.
- Cordero, M. & Gaborjanyi, R. 1983. Study of interrelationship between TEV and TMV viruses in tomato plants. *Agrotecnia de Cuba* 15:101-111.
- Costa, A.S. 1976. Whitefly-Transmitted diseases. *Ann Rev Phytopathol* 14:429-449.
- Crowther, J.R. 1995. ELISA: theory and practice. Totowa: Humana Press 223. (Methods in Molecular Biology, 42).
- Curtney, 1989 -http://www.kokopelli-seed-foundation.com/actu/new_news.cgi?id_news=114, acedido em 27/03/2012.
- Czosnek, H. & Laterrot, H. 1997. A worldwid survey of *tomato yellow leaf curl viruses*. *Archives of Virology* 142:1391-1406.
- Czosnek, H., Ghanim, M. & Ghanim, M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* – insights from studies with *Tomato yellow leaf curl virus*. *Ann. appl. Biol.* 140:215-231.
- Czosnek, H., Navot, N. & Laterrot, H. 1990. Geographical distribution of *Tomato yellow leaf curl virus*. A first survey using a specific DNA probe. *Phytopathology Mediterranean* 29:1-6.
- D'Hondt, M. & Russo, M. 1985. *Tomato yellow leaf curl* in Senegal. *Plant Pathol.* 112:153-160.
- Duarte, K.M.R. 1995. Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV). 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Duffus, J.E. 1987. Whitefly transmission of plant viruses. *Vector Research* 4:73-91.
- Eagle, P.A., Orozco, B.M. & Hanley-Bowdoin, L. 1994. A DNA sequence required for

geminivírus replication also mediates transcriptional regulation. *Plant Cell* 6:1157-1170.

- Eiras, M., Colariccio, A., Chaves, A.L.R., Moreira, S.R. & Araujo, J. 2003. *Pepper mild mottle Tobamovirus*: Caracterização biológica, molecular e identificação sorológica em sementes de pimenta. *Summa Phytopathologica* 29:60-61.
- Erkan, S. & Delen, N. 1985. Seed treatments to eliminate seed-borne tobacco mosaic virus in pepper seeds. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 4:50.
- Fajardo, T.V.M., Avila, A.C., & Resende, R.O. 2000. Doenças causadas por vírus no tomate. *Hortaliças* 2:24.
- Faostat, 2012. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> acessado em 26/01/2012
- Faria, J.C., Sousa-Dias, J.A.C., Slack, S.A. & Maxwell, D.P. 1997. A new geminivírus associated with tomato in the State of São Paulo, Brazil. *Plant disease* 81:423.
- Faria, J.C. & Zerbini, F.M. 2000. Família *Geminiviridae* – taxonomia, replicação e movimento. *RAPP* 8:27-57.
- Fauquet, C.M., Bisaro, D.M., Briddon R.W., Brown, J.K., Harrison, B.D., Rybicki, E.P., Stenger, D.C. & Stanley, J. 2003. Revision of taxonomic criteria of species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovírus species. *Archives of Virology* 148:405-421.
- Fauquet, C.M., Briddon R.W., Moriones E., Stanley, J. Zerbini, M. & Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology* 153:783-821.
- Fauquet, C.M. & Stanley, J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch. Virol.* 150:2151–2179.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9:275-296.
- Fraser, R.S.S. 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28:179-200.
- Friedmann, M., Lapidot, M., Cohen, S. & Pilowsky, M. 1998. A novel source of resistance to *tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123:1004-1007.
- Ghanim, M., Morin, S. & Czosnek, H. 2001. Rate of *tomato yellow leaf curl virus* translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly

- Bemisia tabaci*. Phytopathology 91:188-196.
- Goodman, R.M. 1981. Geminivirus. J Gen Virol 54:9-21.
- Grube, R., Takeda F., Demchak K., Warmund M.R., Handley D.T., & Feldhake, C. 2000. New source of resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*. Plant Disease . St Paul. 84:885-891.
- Guimarães, J.M., Louro, D. & Pereira, V.A. 1995. A mosca branca *Bemisia tabaci* e o vírus do frisado amarelo do tomateiro. IPPAA-CNPPA pp. 7.
- Gutierrez, C. 1999. Geminivirus DNA replication. Cell Mol. Life Sci. 56: 313-329.
- Gutierrez, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. EMBO Journal 19:792-799.
- Gutierrez, C. 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60:219-230.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B.M., Nagar, S. & Robertson, D. 1999. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Critical Reviews in Plant Sciences. 18:71-106.
- Hanson, P. M., Green, S. K., & Kuo, G. 2006. Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. Tomato Genet. Crop Rep. 56:17-18.
- Harrison, B.D. 1985. Advances in geminivirus research. Ann. Rev. Phytopathology 23:83-96.
- Harrison, B.D. & Robinson, D.J. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). Ann. Rev. Phytopathology 37:369-398.
- Holland, J.D.E. 1998. Origin and evolution of viruses. Virus Genes 16:13-21.
- Jebbour, F. & Abaha, L. 2002. Situation of TYLCV in Morocco and diagnostic methods. Bulletin OEPP 32:17-19.
- Ji, Y., Schuster, D. J. & Scott, J. W. 2007. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. Mol. Breed. 20:271-284.
- Jones, D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109: 195-219.
- Jovel, J., Preib, W. & Jeske H. 2007. Characterization of DNA intermediates of an

- arising geminivirus. *Virus research* 130:63-70.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. & Jeske, H. 2004. *Sida micrantha mosaic* is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. *Archives virology* 149:829-841.
- Keese, P. & Gibbs, A. 1993. Plant viruses: master explorers of evolutionary space. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:873-877.
- Konaté, G., Barro, N., Fargette, D., Swanson, M.M. & Harrison, B.D. 1995. Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation. *Annals of Applied Biology* 126:121-129.
- Kröll, J. 1996. Manual das doenças das principais culturas de Cabo Verde. Instituto Nacional de Investigação e Desenvolvimento Agrário (INIDA): pp. 121.
- Kurosawa, C. & Pavan, M.A. 2005. Doenças do tomateiro. In Kimati, H., Amorin, L., Resende, J.A.M., Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres 2: 607-626.
- Lartey, R.T., Voss, T.C. & Melcher, U. 1996. Tobamovirus evolution: genes overlaps, recombination and taxonomic implications. *Molecular Biological Evolution* 13:1327-1338.
- Lima, M.F., Bezerra, I.C., Ribeiro, S.G. & Ávila, A.C. 2001. Distribuição de *geminivírus* nas culturas do tomate e pimentão em doze municípios do Submédio do Vale São Francisco. *Fitopatologia Brasileira* 26:81-85.
- Lopes, A. 2003. Distribución y dinámica poblacional de *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos de tomate de Portugal: relación com la incidência del virus TYLCV. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid, Espanha: pp. 333.
- Maciel-Zambolim, E., Capucho, H.C.A.S., Ávila, A.C.; Ionue-Nagata, A.K. & Kitajima, E.W. 2004. Surto epidemiológico do vírus do mosaico amarelo do pimentão em tomateiro na região serrana do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*. 29:325-327.
- Maroto-Borrego, J.V. 1986. Horticultura: herbácea especial. 2.ed. Mundi-Prensa. Madrid: pp. 590.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. San Diego, California. Academic Press 3:835.
- Mcglashan, D., Polston, J.E. & Bois, D. 1994. *Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus* in Jamaica. *Plant Dis.* 78:

- Michael, J.A., John F.A. & Jan K. 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. Virology division news. Archives Virologie 154:1967–1972.
- Michelson, I., Zamir, D. & Czosnek, H. 1994. Accumulation and translocation of *tomato yellow leaf curl virus* in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* tolerance gene Ty-1. Phytopathology 84: 928-933.
- Monci, Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J. & Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. Virology 303:317-326.
- Morales, F.J. & Anderson, P.K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. Archives Virologie 146:415-441.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2000. *Tomato yellow leaf curl virus*, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. Virus Res. 71:123-134.
- Moriones, E., García-Andrés, S., & Navas-Castillo, J. 2007. Recombination in the TYLCV complex: A mechanism to increase genetic diversity. Implications for plant resistance development. Pages 119-138 in: *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease. Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance*. H. Czosnek, ed., Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Nakhla, M.K., Maxwell, D.P., Martinez, R.T., Carvalho, M.G. & Gilbertson, R.L. 1994. Widespread occurrence of the eastern Mediterranean strain of *tomato yellow leaf curl* geminivirus in tomatoes in the Dominican Republic. Plant Disease 78:926.
- Pares, R.D. & Gunn, L.V. 1989. The role of non-vectored soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic viruses in glasshouse-grown capsicum in Australia. Journal of Phytopathology 126:353-360.
- Peterschmitt, M., Granier, M. & Aboulama, S. 1999. First report of *Tomato yellow leaf curl geminivirus* in Morocco. Plant Disease 83:1074.
- Pico, B., Diez, M.-J. & Nuez, F. 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *tomato yellow leaf curl virus* - a review. Scientia Hort. 67:151-196.
- Pilowsky, M. & Cohen, S. 1990. Tolerance to *tomato yellow leaf curl virus* derived from *lycopersicum peruvianum*. Plant Dis. 74:248-250.
- Polston, J.E. & Anderson, P.K. 1997. The emergence of whitefly-transmitted

- geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358-1369.
- Polston, J.E., Mcgovern, R. J. & Brown, L.G. 1999. Introduction of *Tomato yellow leaf curl virus* in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Dis.* 83:984-988.
- Polston J.E. 2009. *Begomoviruses: High Risk Pathogens*. University of Florida. *Plant Path.* 3:50
- Pradhanang, P.M. 2009. *Tomato mosaic virus*: Does it transmit through tomato seeds? *ISHS Acta horticulturae* 808.
- Preiss, W. & Jeske, H. 2003. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *Journal Virol.* 77:2972-2980.
- Pringle, C. R. 1998. The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Archives of Virology* 143:203-210.
- Ramos, P.L., Guerra, O., Dorestes, V. & Ramirez, N. 1996. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease* 80:1208.
- Rodriguez, R.R., Rodriguez, J.M.T. & San Juan, J.A.M. 1997. *Cultivo moderno del tomate*. 2ª ed. Madrid. Mundi-Prensa pp. 255.
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.G. & Gilbertson, R.L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Ann. Rev. Phytopathology* 43:361-394.
- Rossinck, M.J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Ann. Rev. Phytopathology* 35:191-209.
- Rubinstein, G. & Czosnek, H. 1997. Long-term association of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: Effect on the insect transmission capacity, longevity, and fecundity. *Journal Gen Virol* 78:2683-2689.
- Sahar A.S.A. 2009. Biological and molecular studies on TYLCV severity, and incidence on tomato cultivars in Al-Arroub Agricultural Experimental Station. Hebron university, College of Graduate Studies: pp. 109.
- Seal, S.E., Vandenbosch, F. & Jeger, M.F. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25:23-46.
- Sikora, E.J., Murphy J.F., Sammons, B. & Kaniewski, W. K. 1998. Performance of

Transgenic Tomatoes Expressing Cucumber Mosaic Virus CP Gene under Epidemic Conditions. *HortScience*.33:1032-1035.

Sinisterra, X. & Patte, C.P. 2000. Identification of *Tomato yellow leaf curl virus-Is* in the Bahamas. *Plant Disease* 84:592.

Ssekyewa C. 2006. Incidence, distribution and characteristics of major *Tomato leaf curl and mosaic virus diseases* in Uganda. PhD-thesis. Faculty of bioscience engineering, Ghent University, Ghent, Belgium. pp. 233

Stanley, J. 1991. The molecular determinants of geminivirus pathogenicity. *Semin Virol.* 2:139-149.

Stanley, J., Bisaro, D.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Fauquet, C.M., Harrison, B.D., Rybicki, E.P. & Stenger, D.C. 2005. Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses: pp. 301-326.

Sudarshana, M.R., Wang, H.L., Lucas, W.J. & Gilbertson, R.L. 1998. Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long distance in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:277-291.

Tanzi, M. & Canova, A. 1986. Behaviour of two new commercial pepper cvs. With L1 , L3 genotype towards TMV pepper strain infection. *Capsicum and Eggplant Newsletter, Grugliasko* 5:45.

Umaharam, P., Padidam, M., Phelps, R.H., Beachy, R.N. & Fauquet, C.M. 1998. Distribution and diversity of geminivirus in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88:1262-1268.

Urbino, C., Gerion, A.L., Poliakoff, F., Coranson, R., Dalmon, A., Tiego, G. & Babo, E. 2003. Begomovirus diseases on tomatoes in French atlantic overseas departments. *Phytoma* 15:52-55.

Verhoeven, J.T.J., Van der Vlugt, R.A.A., Roenhorst, J.W. 2003. High similarity between isolates of pepino mosaic virus suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* 109: 419-425.

Vlugt, R.A.A., Stijger, C.M., Naaldwijk, A.A., Verhoeven, J.T.J., Lesemann, D.E. 2000. First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Disease* 84: 103.

Yassin, A.M. 1975. Epidemics and chemical control of leaf curl virus disease of tomato in the Sudan. *Experimental Agriculture* 11:161-165.

- Yassin, A.M. & Nour, M.A. 1965. *Tomato leaf curl disease* in the Sudan and its relation to *tobacco leaf curl*. *Annals of Applied Biology* 56:207-217.
- Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Kedar, N., Rabinowitch, H., Czosnek, H. & Zamir, D. 1991. Screening in *Lycopersicon* accessions for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*: Presence of viral DNA and symptom development. *Plant Disease* 75: 279-281.
- Zeidan, M., Green, S.K., Maxwell, D.P., Nakhla, M. K., & Czosnek, H. 1998. Molecular analyses of whitefly-transmitted tomato geminiviruses from Souteast and East Asia. *Trop. Agr. Res. Exten.* 1:107-115.
- Zerbini, F.M., Andrade, E.C., Barros, D.R., Ferreira, S.S. Lima, A.T.M., Alfenas, P.F. & Mello R.N. 2005. Traditional and novel strategies for geminivirus management in Brazil. *Australasien Plant Pathology* 34:475-480.
- [Http://viralzone.expasy.org/all_by_species/734.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/734.html) acedido em 12/04/2012.
- www.forestryimages.org acedido em 127/04/2012.

ANEXO 1

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA E GEOFÍSICA DELEGAÇÃO DA PRAIA

ILHA-SANTIAGO

Estação: S. Jorge Orgãos

Parâmetro: Pluviometria Diária Total (mm)

Ano: 2011

Dias	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
1		7,5							66,2			
2								4,1	19,8			
3							1,2	6,7		21,4		
4												
5												
6												
7												
8								22,4	0,9			
9								21,2				
10								0,6				
11												
12							1,5					
13							1,8					
14												
15								6,7				
16								3,4				
17										45,7		
18							4,3			14,3		
19							7,6	42,5				
20							1,0	47,2	9,1			
21								11,4	24,3			
22										37,4		
23								26,3		31,3		
24								24,2		18,7		
25								2,1	11,4	65,5		
26							2,5		2,7	25,3		
27							1,0					2,9
28												
29												
30	7,6											
31								3,4				

1 Década	0,0	7,5	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	55,0	86,9	21,4	0,0	0,0
2 Década	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,2	99,8	9,1	60,0	0,0	0,0
3 Década	7,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	67,4	38,4	178,2	0,0	2,9
Tot/Mês	7,6	7,5	0,0	0,0	0,0	0,0	20,9	222,2	134,4	259,6	0,0	2,9
Dias Chuvas	1	1	0	0	0	0	8	14	7	8	0	1
R>=1,0mm	1	1	0	0	0	0	8	13	6	8	0	1
R>=5,0mm	1	1	0	0	0	0	1	9	5	8	0	0
R>=10,0mm	0	0	0	0	0	0	0	7	4	8	0	0
Tot/Ano	655,1	Observação:										
NDias/Ano	40											
PluMax/Ano	66,2											

Fonte: INMG-Praia

