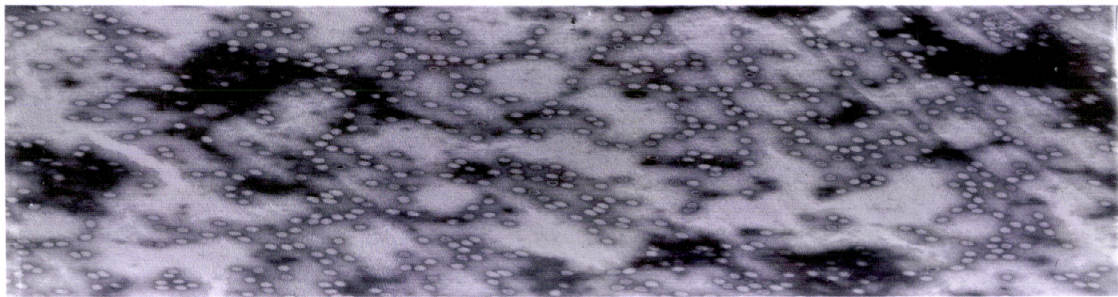


Universidade de Évora

Mestrado Luso-Brasileiro em Gestão e Políticas Ambientais

Caracterização de um isolado viral de *Olea europaea* L.,
produção de anticorpos policlonais específicos,
e aplicação de métodos de diagnóstico



Trabalho realizado por:

Teresa de Jesus Farinha Marques Louro

Trabalho orientado por:

Professora Doutora Maria Ivone Esteves da Clara

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

Évora
2004

Universidade de Évora

Mestrado Luso-Brasileiro
em Gestão e Políticas Ambientais

Caracterização de um isolado viral de *Olea europaea* L.,
produção de anticorpos policlonais específicos,
e aplicação de métodos de diagnóstico



Trabalho realizado por:
Teresa de Jesus Farinha Marques Louro

169703

Trabalho orientado por:
Professora Doutora Maria Ivone Esteves da Clara

“Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri”

Évora
2004

**“A Ciência não tem Pátria, porque o
conhecimento pertence à Humanidade”**

Louis Pasteur (1822 - 1895)

Agradecimentos

- À Professora Doutora Maria Ivone Clara agradeço ter aceite a orientação desta tese, bem como a sua imensa disponibilidade para qualquer assunto.
- Agradeço também ao Eng.º Serrano, que sempre se prontificou para trazer da Herdade da Abóboda as amostras das oliveiras, tão preciosas para este trabalho.
- Ao Eng.º Fausto Leitão, agradeço também a bibliografia cedida e a sua imensa simpatia e esclarecimentos prestados.
- À Rosarinho, agradeço o apoio, a ajuda, e os esclarecimentos nas alturas mais complicadas deste trabalho.
- Um bem haja para as minhas colegas de laboratório: Carla, Daniela, Joana e Mário.
- Ao Américo, ao Maia, à Sofia e ao Hugo, meus colegas na ETAPRONI, que mostraram sempre um sorriso e uma enorme disponibilidade para me ajudarem.
- Ao Mário Serafim, agradeço a cedência do coelho! Graças a ele (o coelho), grande parte deste trabalho foi realizado. Obrigado aos dois.
- Aos meus pais, que sempre estiveram muito presentes na minha vida e me apoiaram ao máximo neste período, nem sempre fácil. Obrigada por serem como são!!!!
- Ao Nuno, a sua ajuda, paciência, carinho e muito mais... que sempre me dedicou!

Sumário

Caracterização de um isolado viral de *Olea europaea L.*, produção de anticorpos policlonais específicos, e aplicação de métodos de diagnóstico

Os estudos aqui descritos, realizados sobre o isolado viral GP, de oliveira, permitiram caracterizá-lo e identificá-lo como um isolado de *Tobacco necrosis virus* (TNV).

O vírus foi propagado em plantas de *Nicotiana benthamiana* e, subsequentemente, purificado por três métodos diferentes sendo o mais eficaz, o que incluiu uma fase de precipitação com polietileno glicol. As preparações virais revelaram, através de análises apropriadas, morfologia isométrica, com diâmetro de 30 nm, cápside proteica e genoma constituídos, respectivamente, por um péptido de cerca de 30 KDa e por RNA de cadeia simples com 3800 Kb. Em hospedeiros herbáceos infectados com GP, observaram-se três espécies replicativas de RNA, com $2,6 \times 10^6$ Da; $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da. As preparações de GP reagiram positivamente em testes ELISA (enzyme linked-immunosorbent assay), com antisoro (comercial) para TNV. O conjunto destas propriedades demonstram que GP é um isolado de TNV.

Para efeitos de diagnóstico, produziu-se um antisoro policlonal específico para GP e optimizaram-se todos os parâmetros para aplicação na detecção viral, por ELISA

A aplicação comparativa de três métodos de diagnóstico viral, a tecidos de oliveiras infectadas, não foram conclusivos, tornando-se necessário adaptá-los melhor à natureza específica deste material lenhoso.

Abstract

Characterization of a viral isolate from *Olea europaea* L., yield of a specific polyclonal antisera, and application of diagnostic methods

Studies here described on a viral isolate obtained from olive, GP, allowed its characterization and identification as *Tobacco necrosis virus* (TNV)

Virus was propagated in *Nicotiana benthamiana* plants and purified through three different methods, the best of which involved a precipitation step with polyethylene glycol. Further analysis of virus preparations revealed an isometric morphology with 30 nm in diameter, a coat protein and genome made up, respectively, of a peptide with 30 KDa and a single strand RNA molecule with 3800 Kb. In GP-infected herbaceous hosts, three replicative RNA species with 2.6×10^6 Da; 1.05×10^6 Da e 0.94×10^6 Da were observed. Viral GP preparations reacted positively, in ELISA (enzyme linked-immunosorbent assay), with a specific (commercial) anti-TNV. All these properties show that GP is a TNV isolate.

For diagnosis purposes a specific polyclonal GP antiserum was produced, conditions for ELISA tests were optimised and applications to plant material were carried out.

Comparative application of three different virus diagnostic methods to olive plant tissues, were not conclusive regarding their efficacy, and more work is needed to adapt them to the specific nature of this woody material.

Índice

1. Introdução	1
----------------------	----------

Revisão Bibliográfica

2. Enquadramento geral	2
3. Controlo sanitário em Portugal	9
4. Sintomas sugestivos da presença de vírus	11
5. Vírus detectados em oliveira	12
5.1 Família <i>Bromoviridae</i>	13
5.1.1 Género <i>Cucumovirus</i>	13
5.1.1.1 CMV	13
5.1.2 Género <i>Oleavirus</i>	13
5.1.2.1 OLV-2	13
5.2 Família <i>Closteroviridae</i>	14
5.2.1 Género <i>Closterovirus</i>	14
5.2.1.1 OLYaV	14
5.3 Família <i>Comoviridae</i>	14
5.3.1 Género <i>Nepovirus</i>	14
5.3.1.1 SLRV	14
5.3.1.2 AraMV	15
5.3.1.3 CLRV	16
5.3.1.4 OLRV	16
5.4 Família <i>Tombusviridae</i>	17
5.4.1 Género <i>Necrovirus</i>	17
5.4.1.1 OLV-1	17
5.4.1.2 TNV	17
5.5 Géneros de vírus não incluídos em famílias	19

5.5.1 Género <i>Potexvirus</i>	19
5.5.1.1 OYVaV	19
5.5.2 Género <i>Tobamovirus</i>	19
5.5.2.1 TMV	19
5.6 Vírus ainda não incluídos em géneros	19
5.6.1 OYMDaV	19
5.6.2 OSLV	20
5.7 Distribuição geográfica	20
6. Métodos de diagnóstico viral	21
6.1 Transmissão mecânica	22
6.1.1 Vantagens	23
6.1.2 Desvantagens	23
6.2 ELISA	24
6.2.1 Vantagens	25
6.2.2 Desvantagens	26
6.3 Análise de dsRNA	26
6.3.1 Vantagens	27
6.3.2 Desvantagens	28

Material e Métodos

1. Material vegetal	30
2. Estudo da gama de hospedeiros do isolado viral	31
3. Caracterização físico-química do isolado viral	31
3.1 Purificação	31
3.2 Morfologia das partículas virais	34
3.3 Caracterização da proteína da cápside viral	34
3.3.1 Isolamento e preparação para electroforese	34
3.3.2 Electroforese	35

3.4 Caracterização do genoma viral	37
3.4.1 Isolamento	37
3.4.2 Tratamento enzimático	38
3.4.3 Electroforese	39
3.5 Análise de dsRNA	40
3.5.1 Isolamento	40
3.5.2 Tratamento enzimático	41
3.5.3 Electroforese	42
4. Produção de imunoreagentes para um kit de teste ELISA, para detecção de TNV	43

4.1 Preparação dos anticorpos	43
4.1.1 Préadsorção do antisoro	43
4.1.2 Purificação das IgG	44
4.1.3 Conjugação enzimática das IgG	44
4.1.4 Determinação do título do antisoro	45
4.2. Condução do teste DAS-ELISA	45
4.2.1 Cobertura das placas	45
4.2.2 Aplicação das amostras	46
4.2.3 Aplicação das IgG conjugadas	46
4.2.4 Aplicação do substrato enzimático	47
4.2.5 Leitura dos resultados	47
5. Aplicação dos métodos de diagnóstico: transmissão mecânica, DAS-ELISA e dsRNA, ao material de <i>O. europaea</i> L. proveniente do campo	48

5.1 Transmissão mecânica	48
5.2 ELISA	49
5.3 Análise de dsRNA	49
5.3.1 Isolamento	49
5.3.2 Tratamento enzimático	51
5.3.3 Electroforese	52

Apresentação e Discussão dos Resultados
--

1. Estudo da gama de hospedeiros do isolado viral	54
2. Caracterização físico-química do isolado viral	57
2.1 Purificação	57
2.2 Morfologia das partículas virais	58
2.3 Proteína da cápside viral	59
2.4 Caracterização do genoma viral	59
2.5 Análise de dsRNA	60
3. Produção de anticorpos policlonais	62
3.1 Utilização das IgG em testes DAS-ELISA	62
4. Aplicação dos métodos de diagnóstico: transmissão mecânica, DAS-ELISA e dsRNA ao material de <i>O. europaea</i> L. proveniente do campo	64
4.1 Transmissão mecânica	64
4.2 ELISA	65
4.3 Análise de dsRNA	68
5. Gestão ambiental	69
Conclusões Gerais	73
Bibliografia	76
Anexo	

1. Introdução

A cultura da oliveira (*Olea europaea L.*) é uma das mais antigas da humanidade e é considerada uma das espécies melhor adaptadas ao clima mediterrâneo (Ippolito & Nigro, 2002).

No entanto, é afectada por um grande número de agentes patogénicos, nomeadamente por vírus (Martelli, 1998). A virologia em oliveira é considerada uma ciência jovem, muitos dos estudos estão ainda incompletos e há necessidade de explorar a etiologia, epidemiologia, diagnóstico e muito importante, o efeito que os vírus poderão ter na produção (Barba, 1993). Apesar do conhecimento nesta área não ser ainda suficiente, o uso de material isento de vírus pode prevenir problemas futuros (Barba, 1993; Clara *et al.*, 1997; Clara, 1998).

Visto a importância da cultura da oliveira nas regiões mediterrâneas, há necessidade de certificar o material de propagação desta espécie (Martelli *et al.*, 1995). A União europeia (UE) tendo em conta este problema, elaborou directivas que permitem implementar programas de certificação sanitária a serem adoptadas pelos países membros, nomeadamente em Portugal (Barba & Mainolfi, 1996).

Este trabalho pretende contribuir para os estudos de selecção sanitária da oliveira em Portugal, através da caracterização biológica e físico-química de um isolado (GP) de *Tobacco Necrosis Virus* (*Vírus das Necroses do Tabaco* - TNV), da produção de anticorpos específicos necessários à realização de testes imunoenzimáticos, e da aplicação de vários métodos de diagnóstico, com vista à detecção deste vírus em material de campo.

A selecção de clones não infectados é fundamental para obter uma fonte de material vegetativo saudável de oliveiras, para usar em futura propagação e implementação no campo, prevenindo-se assim a dispersão viral no ambiente, para outras oliveiras e, eventualmente, outras culturas.

Revisão Bibliográfica

2. Enquadramento geral

Em consequência da degradação ambiental sentida a vários níveis na Europa, nos anos setenta começaram a manifestar-se as primeiras preocupações ambientais por parte de técnicos e do público, tendo estas preocupações vindo a intensificar-se sobretudo durante as décadas de oitenta e noventa (s/ autor, 2001; Pinto-Correia, 2000). Foram dados passos muito significativos para integrar o ambiente nas políticas e estratégias de desenvolvimento a todos os níveis: global, regional, nacional e local (Henriques, 2002).

De todas as conferências e acordos importantes que vêm estabelecendo objectivos e filosofias de gestão para o ambiente, merece destaque a Conferência das Nações Unidas para o Ambiente e Desenvolvimento (CNUAD), também designada Cimeira da Terra, que teve lugar no Rio de Janeiro em Junho de 1992 (Pereira, 1995), uma vez que representa uma inflexão fundamental nas políticas de ambiente, pois reconhece que o desenvolvimento socioeconómico não é, necessariamente, antagónico da protecção do ambiente. Estes 2 factores são indissociáveis para o desenvolvimento sustentável (Henriques, 2002). Este desenvolvimento deve incluir, a par da produção alimentar, a conservação de recursos finitos e a protecção do meio natural, de forma a permitir satisfazer as necessidades da geração presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras satisfazerem as suas próprias necessidades (<http://europa.eu.int/comm/agriculture>)

A noção de sustentabilidade pretende ser uma das traves mestras da arquitectura das políticas da União Europeia (EU), tal como foi estabelecido no Tratado de Amesterdão e posteriormente no Conselho de Helsínquia de Dezembro de 1999 (Caldas & Cary, 2001). O incentivo à introdução ou manutenção de métodos de exploração compatíveis com a protecção e a melhoria do ambiente, dos recursos naturais, dos solos e da diversidade

genética, bem como, da preservação da paisagem e do espaço natural tem uma importância cada vez maior, face ao aumento crescente das exigências da sociedade em matéria ambiental. Sendo a agricultura a actividade económica que ocupa uma maior percentagem do território europeu, ela é responsável, em grande parte pelas alterações registadas nas características ambientais da Europa, mas também pelas mesmas razões poderá constituir-se como factor determinante na preservação e conservação do meio ambiente (Divisão de valorização do ambiente natural e do património cultural, s/ data). Em 1992, com a reforma da Política Agrícola Comum (PAC), a componente ambiental foi introduzida também na gestão do sector agrícola (Salgueiro, 1998; Pinto-Correia, 2000), manifestando-se já uma “nova mentalidade agrícola” que privilegia a qualidade e o respeito pelas normas ambientais comunitárias com vista a concretizar uma grande finalidade que é o desenvolvimento sustentável (<http://www.uni.pt/conferencias/seminario/tema2.pdf>), nomeadamente através da conservação e melhoria de espaços cultivados de grande valor natural como é o caso do olival. A PAC, pretende que todos os processos agrícolas se orientem de modo a i) salvaguardar o meio ambiente e, ii) restabelecer se necessário o equilíbrio ecológico nas zonas afectadas (Cuenca & Aguilar, 1997).

Em Portugal, em 1987 na Lei de Bases do Ambiente (Lei nº 11/87) é referido que: i) todos os cidadãos têm direito a um ambiente: humano, ecologicamente equilibrado e o dever de o defender e, ii) que a política de ambiente tem por fim otimizar e garantir a continuidade de utilização dos recursos naturais, qualitativa e quantitativamente, como pressuposto básico de um desenvolvimento auto-sustentado (Lei nº 11/87, Diário da República nº 81 de 7 de Abril de 1987 – I Série). Também no Programa Operacional do Ambiente (POA), nomeadamente no capítulo onde são descritas as linhas de actuação para 2000-2006, é referido que a estratégia ambiental para Portugal assentará em vectores como: i) a gestão sustentável dos recursos naturais e a melhoria da qualidade ambiental, considerados como direitos essenciais para todos os portugueses, e ii) a conservação e valorização do património natural no quadro de uma estratégia de conservação da natureza e da biodiversidade (<http://www.qca.pt>).

Num sentido restrito, e operacional, e no que respeita à agricultura, a "sustentabilidade" procura traduzir um objectivo de manutenção dos níveis de produtividade a longo prazo, na utilização dos recursos, sem perda da sua capacidade regenerativa, tendo em vista o aproveitamento pelas gerações futuras (Alves, 1995). O que é novo na "sustentabilidade", mais do que grande parte do seu conteúdo, é o enquadramento de actualidade, a premência de encontrar soluções e operacionalidades, perante a problemática da sobre-exploração dos recursos naturais (Alves, 1995). A sustentabilidade no seu sentido actual, é uma consequência, da movimentação geral de esforços de reconversão das actividades produtivas, na sequência da problemática ambiental e, em particular, da entrada do ambiente na economia (Alves, 1995). Alves (1995) refere como orientações básicas para a sustentabilidade na agricultura o seguinte: i) procurar imitar cada vez mais o funcionamento dos ecossistemas naturais, ii) utilizar ao máximo a diversidade dos recursos naturais, no iii) quadro económico e social dos espaços rurais (Alves, 1995). Plenamente aplicada, a política de desenvolvimento rural constitui um elemento essencial para criar as condições de uma agricultura sustentável (s/ autor, 2001). Neste tipo de agricultura foram consideradas como principais áreas de intervenção: os nutrientes e fertilizantes, as rotações, a conservação do solo, a protecção das plantas, o regadio e a biodiversidade (Alves, 1995).

Tradicionalmente os sistemas de produção estão orientados para a obtenção de níveis máximos produtivos, ignorando a qualidade da produção, as funções do agro-ecossistema e o meio ambiente (Kabourakis, 1999). A produção deve fundamentar-se na optimização do uso do meio produtivo (solo, disponibilidade de água, radiação solar, etc), e nunca na utilização de factores externos de produção (fertilizantes, fungicidas, herbicidas, etc). Deve eleger-se entre os diferentes sistemas e técnicas de cultivo, aqueles que permitam optimizar a produção, sem esquecer a conservação do meio, a economia das explorações e as exigências sociais (Pastor *et al*, 1999). É, hoje em dia, imperioso compatibilizar a prática da agricultura com a defesa do ambiente, porque, se é certo que aquela não deve prejudicar o ambiente, não é menos certo que a sua protecção inviabilize a agricultura (Salgueiro, 1998). Assim, a agricultura não

deve degradar o ambiente, mas precisa de ser tecnicamente adequada, economicamente viável e socialmente aceitável (Caldas & Cary, 2001).

O problema fundamental é aumentar a produção de alimentos nas áreas subdesenvolvidas através do aumento da produtividade dos solos, e do fomento do emprego agrícola que evitará o êxodo. São necessárias medidas de conservação e reabilitação dos solos, utilização de plantas apropriadas, controle de pragas, rotação de culturas, e aproveitamento de resíduos agrícolas (Neves, 1994). No entanto, muitas das actuais práticas agrícolas ainda constituem um factor que contribuiu para a degradação do meio ambiente e do espaço natural. Para minimizar esta situação, a UE elaborou uma série de normas que regem a actual PAC (Cuenca & Aguilar, 1997) e que ultrapassam o âmbito das boas práticas agrícolas e da legislação ambiental (Comunicação da Comissão ao Conselho nº 99, Jornal Oficial nº C 173 de 19 de Junho de 1999). Como exemplos podem referir-se a directiva nº 91/676/CEE do conselho que determina entre outras coisas, que os estados membros elaborem um ou mais códigos de boas práticas agrícolas tendo em vista minimizar tanto quanto possível os riscos da poluição da água provenientes dos nitratos de origem agrícola (Directiva do conselho 91/676/CEE, Jornal Oficial nº L 375 de 31 de Dezembro de 1991), e o regulamento (CE) 1257/1999 do conselho, que é relativo aos apoios da EU no desenvolvimento rural. Este regulamento constitui o enquadramento das medidas agro-ambientais, criadas para apoiar métodos de produção agrícola compatíveis com a protecção do ambiente e a manutenção das características específicas e diversificadas da paisagem rural europeia (Regulamento (CE) nº 1257/1999, Jornal Oficial nº L 160 de 26 de Junho de 1999).

Como resultado das linhas de orientação da PAC, e na sequência do regulamento anterior, Portugal aprovou na portaria nº 1212/2003 o Plano de Desenvolvimento Rural (RURIS) no qual se integram as medidas agro-ambientais que têm como objectivos: i) promover formas de exploração das terras agrícolas compatíveis com a protecção e a melhoria do ambiente, da paisagem e das suas características, dos recursos naturais, dos solos e da diversidade genética, ii) incentivar uma extensificação da actividade agrícola e

a manutenção de sistemas de pastagem extensivos, iii) permitir a preservação da paisagem e das características históricas e tradicionais nas terras agrícolas e iv) contribuir para a conservação de espaços cultivados de grande valor natural como é o caso do olival de modo a promover a sua sustentabilidade (Portaria nº 1212/2003, Diário da República nº 240 de 16 de Outubro de 2003 – I Série-B). As medidas agro-ambientais orientam-se precisamente no sentido de assegurar uma agricultura sustentável e competitiva, levada a cabo de acordo com modelos e técnicas de produção amigos do ambiente e da paisagem.

Surgem muitas vezes designações próximas como sejam “agricultura orgânica”, “agriculturas alternativas”, “agricultura ecológica”. “biológica”, etc sempre numa perspectiva de oposição à “agricultura convencional”, em particular nas suas modalidades mais intensivas ou industriais (Alves, 1995). A agricultura biológica deve ser entendida como componente de um sistema de exploração sustentável e como alternativa viável em relação a formas tradicionais de agricultura (<http://europa.eu.int/comm/agriculture>). É conveniente notar que uma agricultura mais respeitadora do ambiente não é sinónimo de retorno a métodos arcaicos (s/ autor, 2001). O objectivo final da plantação de oliveira, como a de qualquer outra actividade agrícola, é obter o máximo benefício, o que se consegue alcançando uma produção/qualidade máxima com custos mínimos de cultivo (Pastor *et al*, 1999). Um olival “biológico” pode ser um olival “tratado”, com os produtos e técnicas autorizados, pelo Regulamento (CEE) nº2092/91 (Regulamento (CEE) nº 2092/91, Jornal Oficial nº L 198 de 22 de Julho de 1991). A exigência de uma qualidade superior no produto final (azeite e azeitona) para possibilitar melhor preço no consumidor e no produtor, obriga este a ter especial atenção às pragas e doenças do seu olival, pois um olival doente não pode produzir boa azeitona nem bom azeite (Ferreira & Strecht, 1999). Criar um olival ecológico significa que o novo olival optimize os recursos disponíveis dentro e fora da exploração agrícola. Em consequência, antes de proceder-se ao seu desenho deverá avaliar-se os recursos naturais, humanos, financeiros e tecnológicos. Um olival ecológico deverá ter em conta o carácter agronómico (a plantação deverá construir-se de forma que a produção seja óptima, entendido segundo o

novo critério de primar pela qualidade em vez de quantidade e se proteja o meio ambiente), ecológico (o olival deverá preservar a paisagem) e socioeconómico. Ter em conta estas premissas pode ajudar a construir um olival sustentável (Kabourakis, 1999). O olival convertido a um sistema agrícola biológico mais facilmente valoriza o ecossistema, a sua biodiversidade, os produtos, o rendimento dos olivicultores e em última instância o desenvolvimento sustentado da região (Turner, 1990 in Azevedo, 1999; Alcobia, 2003).

Ao nível da certificação fitossanitária da oliveira, a abertura das fronteiras no âmbito do mercado comum europeu, com conseqüente livre circulação de produtos vegetais e a necessidade de produtos qualitativamente competitivos, estimulou a tendência para regulamentar aspectos técnicos e operativos de produção, certificação e comercialização dos produtos vegetais, onde se inclui a oliveira (Barba & Mainolfi, 1996). Neste sentido, a UE criou algumas directivas indicando os requisitos sanitários e qualitativos que as plantas, nomeadamente a oliveira, devem possuir para poderem circular no território europeu (Barba & Mainolfi, 1996).

Em 1976 foi criada a Directiva do Conselho 77/93/CEE relativa às medidas de protecção contra a introdução nos estados-membros de organismos prejudiciais às plantas e produtos vegetais. No artigo 2º, esta directiva define o conceito de organismos prejudiciais, onde contempla também os vírus, no entanto, não aplicados à oliveira. (Directiva do Conselho 77/93/CEE, Jornal Oficial nº L 026 de 31 de Janeiro de 1977). Em 1992 a Directiva do Conselho 92/34/CEE vem legislar a comercialização de material de propagação de fruteiras e de fruteiras destinadas à produção de frutos. Nesta directiva, para além de serem mantidas as normas fitossanitárias constantes na directiva anterior, é incluída a oliveira na lista de espécies a que se aplica a presente directiva. Introduce a designação material CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*) para os materiais de propagação e fruteiras que preenchem as condições fitossanitárias mínimas (Directiva do Conselho 92/34/CEE, Jornal Oficial nº L 152 de 10 de Junho de 1992).

O estado sanitário do material de propagação é regulado pela Directiva da Comissão 93/48 de 23 de Junho de 1993 "Conformitas Agraria Communitatis" (CAC) (Grieco *et al*, 2000; Grieco *et al*, 2002) (Ver anexo). Esta directiva vem operacionalizar a Directiva do Conselho 92/34/CEE, uma vez que apresenta a ficha onde objectivamente são definidas as condições a satisfazer pelas fruteiras e material de propagação destinado à produção de frutos (Directiva da Comissão 93/48/CEE, Jornal Oficial nº L 250 de 7 de Outubro de 1993).

De modo a melhorar a identificação das variedades (contidas na Directiva do Conselho 92/34/CEE) presentes nas listas de fornecedores, a Directiva da Comissão 93/79/CEE estabelece regras de modo a uniformizar toda a informação (Directiva da Comissão 93/79/CEE, Jornal Oficial nº L 256 de 14 de Outubro de 1993).

Em Portugal, ao contrário do que acontece em Itália, não existe legislação específica para a cultura da oliveira. Existe sim, um conjunto de legislação mais geral, onde se contempla entre outras culturas, a oliveira.

Em 1991 é criado o decreto-lei nº 277/91 que vem revogar o decreto-lei nº 44592 de 1962 e as portarias nºs 19900 e 19902 de 1963 por estarem muito desactualizadas, em virtude da evolução e das transformações verificadas, quer ao nível do país, quer no plano internacional, no domínio da produção e comercialização dos materiais de propagação vegetativa das plantas (Decreto-Lei nº 277/91, Diário da República nº 181 de 8 de Agosto de 1991 – I Série).

Com as directivas comunitárias a ditarem novas regras, o decreto-lei anterior foi actualizado com o decreto-lei nº 33/93 (de acordo com o regime comunitário), que vem completar a legislação já existente em Portugal, bem como a transposição para o direito interno da directiva 92/34/CEE (Decreto-Lei nº 33/93, Diário da República nº 36 de 12 de Fevereiro de 1993 – I Série).

Em 1996, e de acordo com a legislação nacional em vigor e com as directivas comunitárias, nomeadamente a directiva 93/48/CEE, que vem a ser transposta, é criada a portaria nº 106/96 que fixa as normas a respeitar na produção e comercialização de materiais de viveiro CAC de fruteiras, e estabelece o

respectivo sistema de controlo. Aqui, são estabelecidos parâmetros de sanidade que o material tem que apresentar para poder ser produzido e comercializado. No caso da oliveira, são objecto de controlo sanitário os insectos, ácaros e nemátodes em todas as fases do seu desenvolvimento das espécies: *Eusophera pinguis*, *Meloidogyne spp.*, *Sissetia oleae*, nas bactérias faz-se referência à *Pseudomonas syringae pv. Savastanoi*, nos fungos o *Verticillium dahliae*, e todos os vírus e organismos similares (Portaria nº 106/96, Diário da República nº 84 de 9 de Abril de 1996 – I Série).

3. Controlo sanitário em Portugal

As perdas no rendimento agrícola causadas por vírus são difíceis de estimar, pois só recentemente se reconheceu que estes organismos afectam a oliveira (Matthews, 1992; Clara *et al*, 1997; Bertolini *et al*, 1998). Estas perdas podem ser qualitativas e/ou quantitativas, e diferem bastante entre países e regiões (Clara *et al*, 1997). Normalmente, nos países em desenvolvimento, onde se verifica um controlo inadequado, as perdas são mais elevadas. Tal facto, revela-se de particular importância, uma vez que a dependência das culturas agrícolas nestes países é grande (Matthews, 1992).

Os vírus são agentes para os quais não existe meio de controlo adequado. Estão frequentemente associados, na oliveira, a uma baixa produção, perda de qualidade do produto final, perda de longevidade e vigor da árvore (Leitão *et al*, 1996), baixa capacidade de enraizamento das estacas contaminadas quando comparadas com as plantas sãs (Henriques *et al*, 1992; Serrano *et al*, 1995; Clara, 1998) e baixa capacidade das árvores em suportar o stress ambiental (Henriques, 1994; Clara *et al*, 1997). Deste modo, torna-se necessário um plano de protecção da oliveira contra vírus, que se revele eficaz (Clara, 1998).

À luz da precisa indicação comunitária sobre a qualidade do material de viveiro, nomeadamente do material de propagação da oliveira, com o mercado internacional a exigir um elevado estado sanitário, não é pois possível deixar para segundo plano o problema das infecções virais (Grieco *et al*, 2000).

Devido à grande importância económica da oliveira em muitos países mediterrâneos, importa dar especial atenção às perdas potencialmente associadas às infecções virais, e por isso fazer um esforço para obter e utilizar somente material vegetal isento de vírus na propagação vegetativa (Matthews, 1987; Henriques, 1994; Clara *et al*, 1997; Quacquarelli & Savino, 1997; Bertolini *et al*, 1998; Félix *et al*, 2002; Martelli *et al*, 2002).

A certificação representa um eficiente sistema para garantir a qualidade sanitária do material de propagação (Barba & Mainolfi, 1996).

Avanços recentes na biologia, focam a atenção no diagnóstico serológico e molecular desenvolvido para a certificação do material propagativo (Martelli *et al*, 2002) uma vez que, a principal via de transmissão dos vírus da oliveira é provavelmente o uso de material vegetal infectado (Clara *et al*, 1997). A biotecnologia oferece também estratégias para a obtenção de plantas resistentes a vírus (Vloten-Doting, 1988).

Também no melhoramento por selecção clonal, das variedades de oliveira, não se devem só considerar as características: maior produção, homogeneidade e estabilidade genética, mas também os dados relativos ao estado sanitário, uma vez que, podem afectar a produtividade da oliveira (Leitão *et al*, 1996). A selecção sanitária das principais variedades permitiu contribuir para um melhoramento da oleicultura (Serrano *et al*, 1997).

Em 1987, com base em oliveiras situadas na província de Trás-os-Montes, iniciaram-se estudos com vista à selecção clonal e sanitária da cultivar Negrinha de Freixo (Leitão *et al*, 1994; 1996). Em 1990 são publicados os primeiros resultados com referência à ocorrência e identificação de vírus em oliveira em Portugal (Henriques *et al*, 1990), e em 1995 é iniciado também, um programa de selecção clonal e sanitária para a cultivar Santulhana (Leitão *et al*, 1997).

Actualmente, esta selecção continua a realizar-se sobretudo em cultivares das regiões de Trás-os-Montes, nomeadamente nas cultivares Negrinha de Freixo (Leitão *et al*, 1996) e Santulhana (Leitão *et al*, 1997), e do Alentejo, onde se

estudam as cultivares Azeitoneira, Branquita, Carrasquenha, Cobrançosa, Cordivil de Serpa, Galega vulgar, Maçanilha, Algarvia, Manzanilla dos Hermanas, Redondil e Verdeal Alentejana (Serrano *et al*, 1997). Os estudos realizados incidem sobre a produção, relação polpa/caroço dos frutos, existência de anomalias que sugerem a presença de vírus, testes ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Henriques *et al*, 1991; Rei *et al*, 1993; Leitão *et al*, 1996; Leitão *et al*, 1994) e inoculação mecânica (Henriques *et al*, 1991; Leitão *et al*, 1997). Os vírus diagnosticados, muitas vezes encontram-se em órgãos que não apresentam nenhum sintoma. Este facto, tem crucial importância nos estudos de selecção clonal porque obriga a que se realizem testes específicos para detectar a presença de vírus, a fim de seleccionar árvores não infectadas (Leitão *et al*, 1996).

4. Sintomas sugestivos da presença de vírus

Os aspectos relacionados com viroses em oliveira ainda não estão bem claros, podendo considerar-se três situações diferentes: i) doenças em que o agente causal viral não está identificado, ii) plantas assintomáticas de onde se isolaram vírus e iii) plantas com mal formações associadas a infecções de vírus (Barba, 1993).

Das doenças em que o agente causal não está definido, mas que são similares às provocadas por vírus em plantas, podem citar-se:

- **paralisia parcial:** esta doença foi identificada pela primeira vez em 1950, na Argentina, mas a sua associação a vírus ainda não está esclarecida. Provoca anéis e mosaico nas folhas das plantas (Nicolini & Traversi, 1959 *in* Barba, 1993);

- **folhas fauciformes:** foi descrita em 1958 na Califórnia, mas também foi identificada no Chile, Portugal, Israel e Itália. As folhas apresentavam-se curvas em forma de foice, cloróticas e com o limbo assimétrico (Thomas, 1958);

- **deformação foliar:** foi identificada em Itália e apresenta sintomas idênticos aos descritos na doença anterior (Corte *et al*, 1961 in Barba, 1993). No entanto, esta doença transmite-se por enxertia ao *Ligustrum lucidum*, ao contrário da anterior (Barba, 1993);

- **amarelecimento infeccioso:** foi descrito em Itália em 1959 (Ribaldi, 1959 in Barba, 1993). A planta identificada com estes sintomas apresentava amarelecimento parcial das folhas e uma redução na produção;

- **spherosis:** nos anos 50, foram descritos em Israel árvores da cultivar 'Manzanillo' que apresentavam nanismo acentuado e um grande número de mini-esferoblastos (Lavee & Tanne, 1984).

5. Vírus detectados em oliveira

Estudos de microscopia electrónica realizados por Pacini e Cresti, em 1977, aos grãos de pólen de oliveira da cultivar Corregiolo, revelaram a presença de partículas semelhantes a vírus. Como consequência deste facto, vários estudos foram iniciados, para descobrir qual a incidência de vírus em oliveira. Desde então, algumas das doenças que afectam as oliveiras foram identificadas em vários países como sendo causadas por vírus (Lavee & Tanne, 1984; Marte *et al*, 1986; Henriques, 1994; Clara *et al*, 1997). Por vezes, estes agentes são detectados em oliveiras que apresentam sintomas. No entanto, o campo das observações ajuda muito pouco, porque a ausência de sintomas não significa a ausência de infecção, muitas vezes as infecções virais são assintomáticas (Lavee & Tanne, 1984; Henriques, 1994; Clara *et al*, 1997), ou contribuem para o baixo vigor exibido pelas árvores (Serrano *et al*, 1995 in Félix *et al*, 2002).

A presença de vírus em plantas de oliveira pode demonstrar-se quando se inoculam extractos dos seus órgãos em plantas indicadoras herbáceas e estas manifestam sintomas (Martelli *et al*, 1995; Clara *et al*, 1997).

Muito pouca informação está disponível sobre a distribuição geográfica dos vírus que afectam a oliveira na natureza (Saponari *et al*, 2002) (Tabela 1).

Até à data, 13 vírus diferentes, distribuídos por 7 géneros, foram identificados em oliveira (Grieco *et al*, 2000), mas é possível que outros vírus ocorram em pequenas concentrações nos tecidos vegetais (Saponari *et al*, 2002), e, não tenham ainda sido detectados com as metodologias actualmente disponíveis.

5.1 Família *Bromoviridae*

5.1.1 Género *Cucumovirus*

5.1.1.1 *Cucumber Mosaic Virus* (CMV - *Vírus do Mosaico das Cucurbitáceas*)

O vírus foi isolado de árvores que não apresentavam sintomas notórios (Savino & Gallitelli, 1981).

O CMV é um vírus multicomponente com cerca de 28 nm de diâmetro e o seu genoma é constituído por cinco cadeias simples de RNA (ssRNA) com os seguintes pesos moleculares: $1,2 \times 10^6$ Da; $1,07 \times 10^6$ Da; $0,78 \times 10^6$ Da; $0,39 \times 10^6$ Da e $0,15 \times 10^6$ Da. A cadeia com massa molecular mais baixa ($0,15 \times 10^6$ Da) constitui um RNA satélite deste vírus (Savino & Gallitelli, 1983).

O CMV é transmitido muito facilmente por afídeos a outras culturas, não havendo informação relativa à transmissão deste vírus por insectos em oliveira (Martelli *et al*, 2002).

5.1.2 Género *Oleavirus*

5.1.2.1 *Olive Latent Virus 2* (OLV-2 - *Vírus Latente da Oliveira 2*)

Foi isolado de árvores que não apresentavam sintomas sugestivos de viroses (Martelli & Gallitelli, 1985 *in* Henriques, 1994).

A sua cápside proteica apresenta um único polipéptido com uma massa molecular de 24 KDa (Grieco *et al*, 1992 *in* Grieco *et al*, 1995).

As partículas virais apresentam formas que variam entre o esférico, com cerca de 26 nm de diâmetro, e o baciliforme com comprimentos que variam entre 37-55 nm, e largura de 19 nm (Grieco *et al*, 1992 *in* Grieco *et al*, 1995).

Os coeficientes de sedimentação das partículas são 82 S e 77 S. O seu genoma é constituído por 4 ssRNAs com 3300, 2800, 2450 e 2100 nucleótidos, respectivamente (Grieco *et al*, 1992 *in* Grieco *et al*, 1995).

5.2 Família *Closteroviridae*

5.2.1 Género *Closterovirus*

5.2.1.1 *Olive Leaf Yellowing-associated Virus* (OLYaV - *Vírus Associado ao Amarelecimento das Folha na Oliveira*)

OLYaV está associado a intensa descoloração das folhas da árvore. As partículas virais são filamentosas e o genoma é constituído por ssRNA.

Sequências de RNA, idênticas às de OLYaV, foram encontradas nos insectos *Euphyllura olivina* e numa espécie não identificada de *Pseudococos*, o que sugere alguma relação com possíveis vectores, no entanto, ainda não claramente definida. Não foi ainda possível transmitir mecanicamente este vírus a plantas herbáceas, o que tem dificultado muito a sua caracterização (Savino *et al*, 1996; Sabanadzovic *et al*, 1999).

5.3 Família *Comoviridae*

5.3.1 Género *Nepovirus*

5.3.1.1 *Strawberry Latent Ringspot Virus* (SLRV - *Vírus Latente das Manchas em Anel do Morangueiro*)

Este vírus foi identificado na cultivar Italiana 'Ascolana tenera', associado a sintomas severos, entre os quais se destacam os frutos deformados, folhas

estreitas, finas e torcidas e crescimento e rendimento reduzidos das árvores (Marte *et al*, 1986; Martelli *et al*, 1995; 2002).

Estes sintomas foram também observados na cultivar Portuguesa 'Negrinha de Freixo', onde foi também diagnosticado o vírus SLRV (Henriques *et al*, 1992).

A sua cápside proteica é constituída por 2 polipéptidos com pesos moleculares de 29 KDa e 44 KDa (Savino *et al*, 1979).

Este vírus, é composto por partículas isométricas com cerca de 30 nm de diâmetro, apresenta 3 componentes, T (Top), M (Middle) e B (Bottom) que sedimentam às taxas de 62 S, 99 S e 135 S respectivamente (Savino *et al*, 1979). O componente M contém uma ssRNA, com peso molecular de $1,6 \times 10^6$ Da e o componente B contém dois ssRNA com pesos moleculares de $1,6 \times 10^6$ Da e $2,6 \times 10^6$ Da. O componente de sedimentação T não contém ácido nucleico. A infecciosidade do vírus está dependente da presença conjunta dos componentes M e B no inóculo (Savino *et al*, 1979).

Os nemátodes fitófagos do género *Xiphinema* (*X. diversicaudatum*, *X. coxi*), são vectores deste vírus em outras culturas, mas desconhece-se se o são na oliveira, por não haver estudos nesse âmbito (Taylor & Thomas, 1968; Brown & Trudgill, 1997; Martelli *et al*, 2002).

5.3.1.2 *Arabid Mosaic Virus* (AraMV - Mosaico do Arabis)

Este vírus foi isolado de árvores que apresentavam um certo declínio (Savino *et al*, 1979).

A cápside proteica viral é constituída por um polipéptido com peso molecular de 54 KDa (Savino *et al*, 1979).

Identificaram-se partículas virais com cerca de 30 nm de diâmetro, e com 3 componentes: T, M e B com taxas de sedimentação de 50 S, 91 S e 126 S, respectivamente. O componente M possui um ssRNA, com peso molecular de $1,6 \times 10^6$ Da e o componente B possui dois ssRNAs com pesos moleculares de $1,4 \times 10^6$ Da e $2,6 \times 10^6$ Da (Savino *et al*, 1979).

Os nemátodes fitófagos do género *Xiphinema* (*X. diversicaudatum*, *X. coxi*, *X. bakeri*, *X. index*), são igualmente vectores deste vírus em outras culturas, mas desconhece-se se o são na oliveira, por não haver estudos nesse âmbito

(Taylor & Thomas, 1968; Lamberti *et al*, 1986; Brown & Trudgill, 1997; Belin *et al*, 2001; Martelli *et al*, 2002).

5.3.1.3 Cherry Leaf Roll Virus (CLRV - *Vírus do Enrolamento Foliar da Cerejeira*)

O vírus foi isolado de árvores que não apresentavam sintomas evidentes (Savino & Gallitelli, 1981).

As partículas isométricas do CLRV purificadas apresentavam um diâmetro de aproximadamente 30 nm, com dois componentes de sedimentação M e B, com taxas de 112 S e 124 S, respectivamente (Savino & Gallitelli, 1981).

CLRV é transmitido pelos grãos de pólen de árvores infectadas (Martelli *et al*, 2002) mas, verificou-se também experimentalmente, que a sua transmissão pode ser efectuada através de sementes (Saponari & Savino, *in* Martelli *et al*, 2002).

5.3.1.4 Olive Latent Ring Spot Virus (OLRSV - *Vírus Latente das Manchas em Anel da Oliveira*)

O vírus foi isolado de árvores que apresentavam sintomas de desfoliação parcial (Savino *et al*, 1983).

As suas partículas são isométricas e apresentam um diâmetro com cerca de 28 nm. Sedimentam com coeficientes de 52 S, 97 S e 132 S. As partículas contêm duas ssRNAs com pesos moleculares de $1,4 \times 10^6$ Da e $2,65 \times 10^6$ Da (Savino *et al*, 1983).

Transmite-se mecanicamente por inoculação a hospedeiros herbáceos (Savino *et al*, 1983).

5.4 Família *Tombusviridae*

5.4.1 Género *Necrovirus*

5.4.1.1 *Olive Latent Virus-1* (OLV-1 - *Vírus latente da Oliveira 1*)

As árvores infectadas não mostram sintomas óbvios de doença, à excepção de poderem apresentar, ocasionalmente, fasciação e bifurcação dos ramos (Gallitelli & Savino, 1985).

Transmite-se por inoculação mecânica aos hospedeiros herbáceos, os quais, de um modo geral, infecta localmente, à excepção de *Nicotiana benthamiana* onde a sua infecção pode ser sistémica (Gallitelli & Savino, 1985; Martelli *et al*, 2002). Foi identificado em Portugal em *Olea europaea* L. nas cultivares Galega e Verdeal Alentejana (Félix & Clara, 2000).

Apresenta partículas isométricas com diâmetro com cerca de 30 nm, que sedimentam numa única banda em gradientes de densidade, com uma taxa de 111 S. O seu RNA genómico tem cerca de 4100 nucleótidos e a cápside viral apresenta uma única proteína, com um peso molecular de 32 KDa (Gallitelli & Savino, 1985). No entanto, Merciega *et al*, (1996) refere que alguns isolados de OLV-1 possuem RNA com 3800 nucleótidos, uma massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da e a cápside proteica com 30 KDa.

Este vírus sintetiza nas plantas infectadas, três cadeias duplas de RNA (dsRNA) com massas moleculares de $2,6 \times 10^6$ Da; $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da (Grieco *et al*, 1996).

Não se conhecem vectores que transmitam OLV-1 para as culturas (Martelli *et al*, 2002), mas verificou-se experimentalmente a sua transmissão através de sementes (Martelli *et al*, 2002).

5.4.1.2 *Tobacco Necrosis Virus* (TNV – *Vírus das Necroses do Tabaco*)

Tobacco necrosis virus foi o nome dado por Smith e Bald, (1935) a um vírus comum nas plantas de tabaco (Kassanis, 1981).

O seu principal sintoma são as necroses que se desenvolvem na planta, no entanto, por vezes o vírus pode ocorrer de modo assintomático (Teakle, 1960;

Kassanis, 1981). A transmissão por inoculação mecânica a algumas espécies de plantas hospedeiras causa lesões necróticas nas folhas inoculadas, mas raramente provoca infecções sistémicas (Kassanis, 1970; 1981; Uyemoto, 1981). Este vírus foi também identificado em Portugal nas cultivares Galega e Verdeal Alentejana (Clara & Félix, 2000; Félix & Clara, 2001).

O tamanho das partículas virais de TNV parece ainda não ser consensual, provavelmente dependendo das técnicas de preparação, tendo-se referido diâmetros de 26 nm (Kassanis, 1970), 28 nm (Lesnaw & Reichmann, 1969; Regenmortel *et al*, 2000) e 30 nm (Uyemoto, 1981).

A cápside viral apresenta uma única proteína com massa molecular de 30 KDa (Lesnaw & Reichmann, 1969; Condit & Fraenkel-Conrat, 1979).

Este vírus sedimenta com um só componente, com uma taxa de sedimentação de 118 S (Uyemoto, 1981; Regenmortel *et al*, 2000).

Cada partícula apresenta um ssRNA, de 'sentido positivo', com peso molecular de $1,3 - 1,6 \times 10^6$ Da (Kassanis, 1970; Uyemoto, 1981; Zhang, 1993).

Ao TNV aparece, por vezes, associado um vírus satélite (STNV) (Kassanis, 1970), o qual depende da polimerase do TNV para a sua própria replicação (Kassanis, 1962 *in* Murrant & Mayo, 1982; Mirkov *et al*, 1989).

Babos & Kassanis (1963) descobriram que 7 estirpes diferentes de TNV podem ser divididas em 2 grupos ou serótipos, a que chamaram A e D (Kassanis & Phillips, 1970; Babos & Kassanis, 1963 *in* Zhang, 1993). As estirpes do TNV pertencentes ao serótipo A, suportam sempre a replicação do vírus satélite, enquanto que os do serótipo D não (Babos & Kassanis, 1963 *in* Coutts *et al*, 1991).

TNV é transmitido pelos zoosporos do fungo *Ospidium brassicae*, um parasita obrigatório, que coloniza as raízes das células de um grande leque de hospedeiros (Teakle, 1960; 1962; Teakle & Gold, 1963; Kassanis, 1970; Harrison, 1977; Kassanis, 1981; Zhang, 1993; Félix & Clara, 2001; Martelli *et al*, 2002). Embora a transmissão possa às vezes depender de uma reacção específica entre os zoosporos e o vírus, algumas investigações sugerem ainda que este fenómeno depende muitas vezes da reacção do hospedeiro invadido (Kassanis & Macfarlane, 1965).

5.5 Gêneros de vírus não incluídos em famílias

5.5.1 Género *Potexvirus*

5.5.1.1 *Olive Vein Yellowing-associated Virus* (OVYaV - *Vírus Associado à Clorose das Nervuras da Oliveira*)

Provoca nas árvores que infecta o amarelecimento das nervuras e fraca consistência do fruto. (Martelli *et al*, 1995; Faggioli & Barba, 1995 *in* Martelli, 1998; Martelli *et al*, 2002).

OYVaV apresenta partículas filamentosas e o genoma é constituído por ssRNA.

5.5.2 Género *Tobamovirus*

5.5.2.1 *Tobacco Mosaic Virus* (TMV - *Vírus do Mosaico do Tabaco*)

TMV foi isolado várias vezes a partir de oliveiras que apresentavam desfoliação intensa, fraco crescimento, declínio, folhas com cloroses ao longo das nervuras e frutos com polpa pouco consistente (Triolo *et al*, 1996).

O vírus é constituído por partículas alongadas e rígidas, com 302 nm de comprimento. A proteína da cápside viral tem uma massa molecular de 20 KDa. A análise dos dsRNA mostrou que este vírus apresenta apenas uma molécula de dsRNA com massa molecular de $4,3 \times 10^6$ Da (Triolo *et al*, 1996).

5.6 Vírus ainda não incluídos em géneros

5.6.1 *Olive Yellow Mottling and Decline-associated Virus* (OYMDaV - *Vírus Associado ao declínio e mosqueado amarelo da oliveira*)

OYMDaV está associado a sintomatologia do tipo mosqueado amarelo e necroses nas folhas, extensa desfoliação e declínio generalizado da árvore (Savino *et al*, 1996; Sabanadzovic *et al*, 1999).

As partículas virais são filamentosas, com um comprimento de 650 nm e uma largura de 12 nm. A cápside proteica tem um peso molecular de 27 KDa (Mohamed, 1996). O genoma viral é constituído por três ssRNAs, com os seguintes pesos moleculares: $2,0 \times 10^6$ Da, $0,8 \times 10^6$ Da e $0,6 \times 10^6$ Da. Em hospedeiros herbáceos infectados produz três dsRNA, com massas moleculares de $4,0 \times 10^6$ Da, $1,6 \times 10^6$ Da e $1,2 \times 10^6$ Da. No entanto, em oliveiras das quais foi isolado, produz apenas um tipo de dsRNA com $4,0 \times 10^6$ Da de massa molecular (Mohamed, 1996).

5.6.2 Olive Semi-Latent Virus (OSLV - *Virus Semi-Latente da Oliveira*)

Árvores infectadas com este vírus apresentam uma sintomatologia caracterizada por suaves cloroses das nervuras das folhas. No entanto, ainda não está provado a associação do vírus com os referidos sintomas (Materazzi *et al*, 1996 *in* Martelli *et al*, 2002).

Este vírus é composto por partículas isométricas de 28 nm de diâmetro (Materazzi *et al*, 1996 *in* Martelli *et al*, 2002).

5.7 Distribuição geográfica

Na tabela 1 pode observar-se a distribuição geográfica conhecida dos vírus que infectam a oliveira.

Tabela 1 – Distribuição geográfica dos vírus conhecidos que infectam a oliveira

Vírus	Género	Distribuição geográfica
CMV	<i>Cucumovirus</i>	Itália, Portugal e Espanha
OLV-2	<i>Oleavirus</i>	Itália e Líbano
OLYaV	<i>Closterovirus</i>	Itália e Israel
SLRV	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal e Espanha
AraMV	<i>Nepovirus</i>	Itália e Portugal
CLRV	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal e Espanha

OLRSV	<i>Nepovirus</i>	Itália e Portugal
OLV-1	<i>Necrovirus</i>	Itália, Portugal, Jordânia e Turquia
TNV	<i>Necrovirus</i>	Portugal e Espanha
OYVaV	<i>Potexvirus</i>	Itália
TMV	<i>Tobamovirus</i>	Itália
OYMDaV	Indeterminado	Itália
OSLV	Indeterminado	Itália

(Adaptado de Martelli *et al*, 1995; Clara, 1998; Grieco *et al*, 2000; Martelli *et al*, 2002).

6. Métodos de diagnóstico viral

As técnicas que se desenvolveram para a detecção de vírus em plantas incluem: i) transmissão mecânica a hospedeiros herbáceos, ii) observação directa dos vírus por microscopia electrónica, muitas vezes associado a técnicas serológicas, como a imunoelectromicroscopia, iii) isolamento e observação das dsRNA em gel, após electroforese, iv) técnicas serológicas, como o teste ELISA, v) detecção do genoma viral por hibridização com sondas específicas marcadas e vi) detecção do genoma viral por amplificação por PCR (Polimerase Chain Reaction) com recurso a 'primers' (iniciadores) específicos (Candresse, 1995).

Neste trabalho, os meios de diagnóstico da infecção viral utilizados foram: i) a transmissão mecânica a plantas indicadoras, ii) o teste ELISA e iii) o isolamento de dsRNA (Clara, 1998), com o objectivo de os testar e comparar, primeiro num hospedeiro herbáceo, e depois em plantas de *Olea europaea* L.. Os três diferentes meios de diagnóstico referidos possuem vantagens e desvantagens relativas (Clara *et al*, 1997) e poderão ser aplicados em conjunto, para um diagnóstico tão completo quanto possível (Clara *et al*, 1998).

6.1 Transmissão mecânica

Esta técnica consiste na maceração de tecidos vegetais (frutos, folhas, flores ou raízes), suspeitos de estarem infectados com vírus, na presença de uma solução tampão adequada (por exemplo 0,1M ou 0,05M de fosfato de sódio, pH 7,0) e de um abrasivo (normalmente carboneto de silício), cuja função é produzir pequenas lesões nas paredes celulares, facilitando a entrada das partículas virais nas células (Clara *et al*, 1997). Este macerado será depois aplicado na superfície foliar de plantas indicadoras com uma suave fricção (Agrios, 1997).

Das plantas que até agora se têm revelado mais sensíveis à infecção dos vírus isolados de oliveira, destacam-se 12 espécies (Tabela 2) (Clara *et al*, 1997; 1998).

Tabela 2 – Plantas herbáceas indicadoras, adequadas para vírus de oliveira

Família	Espécie
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn
	<i>C. murale</i> L.
	<i>C. quinoa</i> Willd.
Curcubitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Leguminosae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
	<i>Vigna unguiculata</i> Walp.
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin.
	<i>N. clevelandii</i> Gray
	<i>N. glutinosa</i> L.
	<i>N. tabaccum</i> L.
	<i>Petunia hybrida</i> Vilm

(Adaptado de Clara *et al*, 1997)

Os sintomas que se observam nas plantas indicadoras dependem dos vírus presentes. Podem ser locais ou sistémicos, e variam na sua expressão: lesões arredondadas cloróticas ou necróticas, mosqueado, necrose generalizada com

forte distorção foliar e, em certos casos, murchidão súbita e subsequente morte da planta (Agrios, 1997; Félix, 1998).

Existem vários factores que podem condicionar o sucesso do teste, nomeadamente o vírus utilizado e o genótipo e idade da planta, uma vez que podem conferir caracteres de resistência (Valverde *et al*, 1990; Matthews, 1992). Outros factores, estão dependentes da sensibilidade do operador, tanto na aplicação do inóculo, como nas lavagens do excesso de inóculo. Também as condições de luz, temperatura e humidade influenciam a susceptibilidade à infecção e, como consequência, o sucesso do teste (Valverde *et al*, 1990; Bawden, 1964 *in* Félix, 1995).

6.1.1 Vantagens

Este teste apresenta algumas vantagens, uma vez que é de fácil execução, requer equipamento simples e é muito económico (Clara *et al*, 1997).

6.1.2 Desvantagens

No entanto, também apresenta limitações como o facto de i) os resultados só serem obtidos passado algum tempo (dias ou semanas), ii) o método não detectar vírus não transmissíveis mecanicamente e iii) não ser um teste específico, ou seja, não permite saber qual o vírus presente na planta (Clara *et al*, 1997).

Por vezes, este teste identifica plantas com resultados negativos quanto à presença de vírus, que quando submetidas a outras técnicas são positivas (Ralph, 1969; Grieco *et al*, 2000). Isto deve-se ao facto, ou do vírus em estudo não ser transmitido mecanicamente, ou apresentar uma gama de hospedeiros muito restrita.

6.2 ELISA

Os testes imunológicos têm por base uma reacção de ligação que ocorre entre um anticorpo (imunoglobulina) específico e um determinado antigénio (a partícula viral, neste caso) (Avrameas, 1970 *in* Engvall & Perlmann, 1972; Clara, 1998).

Os anticorpos são produzidos num animal vertebrado, (com frequência utilizam-se coelhos) como reacção à introdução do antigénio. Os anticorpos encontram-se no sangue, e os mais comuns usados em testes de diagnóstico são as imunoglobulinas G (IgG). No caso dos vírus das plantas, o que induz à produção de anticorpos é, na maior parte das vezes o invólucro proteico (Clark, 1981; Bos, 1999).

O uso de métodos serológicos, nomeadamente do teste ELISA para a detecção de vírus de plantas está bem documentado (Casper, 1977; Clark & Adams, 1977) e é um meio de diagnóstico 'standard' no procedimento dos laboratórios de todo o mundo (Clark, 1981).

O teste ELISA apresenta muitas variantes, por exemplo, directo ou indirecto. No método directo ou de "Dupla Sandwiche de Anticorpos" ("Double-Antibody Sandwich" / DAS), o antigénio reage directamente com o anticorpo marcado com a enzima, que é posteriormente revelada. No método indirecto o anticorpo que reage directamente com o antigénio não está conjugado com a enzima, mas está ligado a outro anticorpo, produzido num animal diferente, e este sim, conjugado com a enzima (Barbara & Clark, 1986; Van Regenmortel *et al*, 1988).

O método DAS tem provado ter uma grande aplicabilidade na detecção viral em numerosas culturas, incluindo a oliveira (Lommel *et al*, 1982; Henriques *et al*, 1993; Barbara & Clark, 1986), onde os vírus são facilmente detectados a partir de folhas, raízes e frutos com e sem sintomas aparentes (Henriques *et al*, 1993).

Nesta técnica, os antigénios são fixados selectivamente por anticorpos previamente adsorvidos a uma superfície sólida (placas de microtitulação), e a

sua presença é detectada por adição de anticorpos específicos ligados a uma enzima, a qual é revelada quando se adiciona um substrato específico (para a enzima), que origina um produto final corado (Clark & Adams, 1977; Clark, 1981; Varennes, 1982). Em fitopatologia, as enzimas mais usadas para a conjugação com os anticorpos têm sido a fosfatase alcalina e a peroxidase (Clark, 1981). A presença ou a concentração do vírus, é estimada por medida fotométrica da intensidade da cor, resultante da reacção final da hidrólise do substrato. No caso de se usar a fosfatase alcalina, a leitura da reacção final é feita no comprimento de onda de 405 nm e, no caso da reacção com a peroxidase faz-se a leitura a 490 nm (Clark & Adams, 1977).

O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis em que os resíduos celulares potencialmente inibidores das reacções são removidos por lavagem, como a técnica ELISA (Clark & Adams, 1977) permitiu a detecção de vírus em situações em que os métodos convencionais de diagnóstico não podiam ser utilizados (Converse, 1978).

6.2.1 Vantagens

É uma técnica serológica quantitativa, de grande sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção de vírus a baixas concentrações. É de fácil execução, económica, rápida, e pode ser utilizada em larga escala oferecendo a possibilidade de standardização (Voller *et al*, 1976; Wisdom, 1976; Clark & Adams, 1977; Thresh *et al*, 1977; Marco & Cohen, 1979; Clark, 1981; Varennes, 1982; Valverde *et al*, 1990; Clark, 1981; Barbara & Clark, 1986; Mendonça *et al*, 1997).

Permite ainda processar numerosas amostras recolhidas do campo (Thresh *et al*, 1977) e devido à sua grande sensibilidade, detectar um grande número e tipos de vírus (Clark & Adams, 1977; Barbara & Clark, 1986).



6.2.2 Desvantagens

Para muitos vírus não é possível recorrer a esta técnica, especialmente se apresentam concentrações muito baixas nas plantas, ou se há presença, nos extractos de plantas, de substâncias inibidoras (Clark & Adams, 1977).

A técnica ELISA apresenta ainda o inconveniente de só ser possível realizar-se se houver anticorpos específicos disponíveis para os vírus em estudo. Além disso, devido ao seu elevado grau de especificidade, não permite detectar, numa mesma reacção estirpes virais que sejam serotipicamente diferentes ou muito afastadas (Martelli, 1998; Van Regenmortel *et al*, 1988).

Outra das desvantagens desta técnica é a necessidade de aparelhagem dispendiosa (leitor de placas de microtitulação), e o custo das placas de microtitulação (que foi superado com a possibilidade de reutilização das placas tornando esta técnica bastante competitiva) (Bar-Joseph *et al*, 1979; Varennes, 1982).

6.3 Análise de dsRNA

A análise de dsRNA tem-se revelado bastante eficiente para a determinação do estado sanitário da oliveira, nomeadamente ao nível da infecção viral (Ralph, 1969; Clara, 1998; Grieco *et al*, 2000).

Morris e Dodds (1979) adaptaram um método de isolamento e análise dos dsRNA de vírus de plantas e de fungos. Este método detecta dsRNA que são produzidos em plantas infectadas com vírus com RNA genómico. As moléculas de dsRNA são muito resistentes à degradação enzimática e normalmente não estão presentes em plantas saudáveis (Bar-Joseph *et al*, 1983 *in* Valverde *et al*, 1990).

Este teste é baseado no facto dos vírus que possuem um genoma de RNA, induzirem a síntese, nos tecidos vegetais infectados, de moléculas específicas, dsRNA, que podem ser isoladas e depois detectadas por electroforese em gel

de agarose ou de poliacrilamida (Morris & Dodds, 1979; Dodds, 1986; Jones, 1992; Rei, 1995; Clara *et al*, 1997). Por isso, esta técnica constitui um meio de diagnóstico viral (Morris & Dodds, 1979; Dodds *et al*, 1984; Dodds, 1986; Rei, 1995), uma vez que os dsRNA não se encontram em material vegetal são

O uso dos dsRNA para diagnosticar vírus, é baseado na premissa de que as plantas saudáveis não contêm dsRNA de alto peso molecular ($> 0,1 \times 10^6$) (Dodds *et al*, 1984; Dodds, 1986; Jones, 1992). Por vezes, dsRNA de baixo peso molecular ($< 1,0 \times 10^6$) são encontrados em plantas aparentemente saudáveis, mas a explicação para este facto ainda não está muito clara (Jones, 1992).

A maioria dos vírus de plantas conhecidos são compostos por ssRNA. Após a penetração do vírus na célula da planta, o RNA viral liberta-se da cápside proteica e inicia a sua replicação. A enzima RNA-polimerase em presença do RNA viral (cadeia de sentido positivo) promove a síntese de uma cadeia de RNA complementar (cadeia de sentido negativo) formando-se uma dsRNA na célula hospedeira, chamada forma replicativa (RF), cujo tamanho é 2 vezes o tamanho do ssRNA. Esta cadeia dupla, posteriormente, separar-se-à parcialmente permitindo o início de várias replicações em simultâneo, resultando numa molécula designada forma replicativa intermédia (RI), parcialmente dupla e parcialmente simples. A cadeia de RNA de sentido negativo, irá servir de matriz para a síntese de novas cadeias de RNA (cadeia de sentido positivo) por acção da RNA-polimerase. As cadeias de sentido positivo são depois rodeadas pela cápside proteica, constituindo novas partículas virais (Nilsson-Tillgren, 1970; Jackson *et al*, 1971; Derrick, 1978; Morris & Dodds, 1979; Dodds & Bar-Joseph, 1982; Zelcer *et al*, 1982 *in* Bar-Joseph *et al*, 1983; Dodds, 1986; Valverde *et al*, 1990).

6.3.1 Vantagens

A simplificação, aliada ao facto deste método não requerer o uso de muitos materiais, nem de equipamento sofisticado, permitiu que esta técnica ficasse

mais prática e atractiva para o diagnóstico viral de plantas (Dodds, 1986; Valverde *et al*, 1990; Jones, 1992).

A técnica é simples, relativamente económica e os resultados são obtidos rapidamente (48 horas) a partir de pequenas quantidades de material vegetal (0,5-5g), especialmente se o vírus estiver presente nos tecidos em grande quantidade, mas podendo aumentar-se o peso da amostra caso a concentração viral seja baixa (Dodds, 1986). É ainda possível fazer a análise de várias amostras em simultâneo (mas não tantas como no teste ELISA) (Morris & Dodds, 1979; Dodds *et al*, 1984; Dodds, 1986; Valverde *et al*, 1990; Jones, 1992; Clara *et al*, 1997; Grieco *et al*, 2000).

Esta técnica pode detectar infecções mistas (originadas por mais que um vírus), que não seriam detectadas por métodos de diagnóstico como os serológicos. Pode ser usada para distinguir não só diferentes vírus, mas também vírus satélites com RNA genómico (Dodds, 1986; Valverde *et al*, 1990).

Para a utilização desta técnica não é necessário conhecer a natureza do vírus, e o sucesso do isolamento não está dependente do hospedeiro (Dodds, 1986).

A análise das dsRNA, apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos de diagnóstico viral, ultrapassando dois dos principais problemas apresentados por outros diagnósticos: a interferência dos componentes do hospedeiro e a instabilidade do vírus ou do seu RNA (Valverde *et al*, 1990).

6.3.2 Desvantagens

Também apresenta limitações, como o facto de necessitar de equipamento dispendioso (transiluminador de radiação ultravioleta) e de utilizar substâncias tóxicas como o brometo de etídio.

Apenas os vírus possuidores de RNA genómico podem ser detectados através desta técnica. Certos géneros de vírus, como os luteovirus e os potyvirus

produzem uma pequena quantidade de vírus e portanto de dsRNA, o que torna este método impraticável no seu diagnóstico de rotina (Valverde *et al*, 1990).

Material e Métodos

1. Material vegetal

O isolado viral, designado GP (proveniente de uma oliveira da cultivar Galega), utilizado para os estudos realizados neste trabalho, foi cedido pelo Laboratório de Sanidade Vegetal, da Universidade de Évora.

As plantas indicadoras herbáceas utilizadas em todo o trabalho foram provenientes das espécies constantes na tabela 3.

Tabela 3 – Plantas herbáceas indicadoras de vírus usadas em testes de inoculação mecânica

Família	Espécies testadas
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste e Reyn
	<i>C. ambrosioides</i> L.
	<i>C. botrys</i> L.
	<i>C. murale</i> L.
	<i>C. quinoa</i> Willd
	<i>Spinacea oleracea</i> L.
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Leguminoseae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
	<i>Vigna unguiculata</i> L.
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i> L.
	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin
	<i>N. paniculata</i> L.
	<i>N. rustica</i> L.
	<i>N. occidentalis</i> L.
	<i>N. tabaccum</i> L. cv. White Burley

Os recursos vegetais lenhosos: raminhos e frutos de *Olea europaea* L., utilizados neste trabalho, foram provenientes de 4 árvores adultas da cultivar

Verdeal Alentejana (árvores 4, 6, 8 e 10) localizadas na Herdade da Abóbada - Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (Direcção Regional de Agricultura do Alentejo). É importante referir, que em estudos realizados anteriormente, verificou-se que estas árvores encontravam-se infectadas com o vírus TNV (Clara & Félix, 2000; Félix & Clara, 2002).

2. Estudo da gama de hospedeiros do isolado viral

O estudo da gama de hospedeiros do isolado viral GP foi efectuado por inoculação mecânica, de um extracto de *N. benthamiana* infectada com GP, feito em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0 e na presença de um abrasivo (carborundo), nas plantas indicadoras referidas na tabela 3. Todas as plantas foram semeadas e transplantadas para substrato de solo e vermiculite (1:1), previamente esterilizado por autoclavagem.

Os extractos realizados com frutos de oliveira, foram inoculados apenas em *N. benthamiana* e *C. quinoa*.

3. Caracterização físico-química do isolado viral

3.1 Purificação

Foram utilizados 3 métodos de purificação, a fim de avaliar qual o que permite obter a maior quantidade de vírus, a partir da mesma quantidade de material vegetal.

No método A, seguiu-se o referido por Dijkstra & Jager (1998). Utilizaram-se 100 g de material vegetal de *N. benthamiana* infectado, que se homogeneizaram num homogeneizador juntamente com 100 ml de tampão de extracção [fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,1% de ácido tioglicólico, pH 7,6]. Filtrou-se o homogeneizado através de duas camadas de gaze e, sob agitação

constante, adicionaram-se 8 ml de n-butanol, ficando esta mistura a incubar toda a noite a 4°C.

Realizou-se, seguidamente, uma centrifugação a 8000 g durante 15 minutos, e o sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 78000 g durante 2 horas. A "pellet" resultante contendo o vírus, foi ressuspensa em 2 ml de tampão de ressuspensão [tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,6] (2ml de tampão/100 g do material vegetal infectado original). Esta operação foi repetida 2 vezes.

Fez-se ainda uma nova centrifugação a 8000 g durante 15 minutos e o sobrenadante resultante foi colocado no topo de gradientes de sacarose (10% a 40%, em tampão de ressuspensão). Estes gradientes foram previamente preparados (cerca de 16 horas antes da sua utilização), colocando sucessivamente sem misturar 1,2 ml de solução 40%, 1 ml de solução 30%, 1 ml de solução 20% e 1 ml de solução 10% em tubos do rotor basculante, modelo Sorvall AH-650. Estes gradientes descontínuos, foram colocados no frigorífico durante a noite, de modo a que as quatro fases das soluções de sacarose produzissem um gradiente contínuo. Centrifugou-se 3 horas a 55000 g, e depois, a banda de sedimentação correspondente ao vírus foi visualizada sob um feixe luminoso, e recolhida com o auxílio de uma agulha e seringa que se introduziu lateralmente no tubo. Esta fracção foi centrifugada durante 2 horas a 160000 g, o sobrenadante foi desprezado, e a "pellet" contendo o vírus purificado, foi ressuspensa em 50 µl de água desionizada.

No método B, adaptado de Merciega *et al* (1996), a purificação inicia-se por homogeneização num homogeneizador do material vegetal infectado com o tampão de extracção (tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0), numa proporção de 1:5 (p/v) contendo 1% de ascorbato de sódio. O homogeneizado foi filtrado através de 2 camadas de gaze, clarificado por adição de 10% de mistura de clorofórmio - butanol (1:1) e agitado no frio, durante 30 minutos. Foi depois submetido a uma centrifugação de 7600 g durante 10 minutos.

Ao sobrenadante juntou-se 10% de PEG (polietileno glicol) e 1% de NaCl. Agitou-se até à completa ressuspensão do PEG, e depois incubou-se 4 horas a 4°C para permitir a precipitação do vírus. A seguir, centrifugou-se a 12000 g

durante 30 minutos, ressuspendeu-se a "pellet" em 2 ml de tampão de ressuspensão (tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0) e deixou-se a ressuspender 16 horas a 4°C.

Fez-se nova centrifugação a 12000 g durante 20 minutos, recuperando-se o sobrenadante que foi submetido a uma outra centrifugação de 2 horas a 186000 g. A "pellet" foi ressuspensa, durante a noite, em tampão de ressuspensão e clarificada por uma breve centrifugação de 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur de bancada) durante 5 minutos.

O sobrenadante assim obtido, foi submetido a uma centrifugação de 150000 g durante 40 minutos, em gradientes de sacarose, e a banda correspondente ao vírus foi retirada como descrito no método A, à qual se juntaram cerca de 2 ml de tampão de ressuspensão, e centrifugou-se a 186000 g durante 4 horas.

Finalmente, ressuspendeu-se a "pellet" em 250 µl de tampão de ressuspensão.

No método C, conforme Zhang *et al* (1993), iniciou-se a purificação com 100 g de material vegetal infectado, ao qual se juntou 300 ml de tampão citrato de amónio [0,1 M citrato de amónio, 10 mM EDTA (ácido etilendiaminatetracético) e 1% de ditionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), pH 5,2] e homogeneizou-se durante 2 a 3 minutos num homogeneizador.

O preparado foi filtrado com 2 camadas de gaze e clarificado por uma centrifugação de 16000 g durante 20 minutos a 5° C. O sobrenadante foi centrifugado a 106000 g durante 90 minutos a 15°C, e a "pellet" ressuspensa em 1 ml água destilada esterilizada. Foi clarificada por centrifugação a 4500 g durante 5 minutos a 5°C, e o sobrenadante centrifugado a 160000 g durante 90 minutos.

A "pellet" resultante foi ressuspensa em 300 µl de água destilada esterilizada, e submetida a uma centrifugação de 150000 g durante 40 minutos em gradientes de sacarose em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0, preparados de forma semelhante ao descrito no método A. A banda viral foi localizada e extraída de forma semelhante, também ao referido no método A.

A suspensão viral foi centrifugada a 186000 g durante 4 horas, e a "pellet" daqui resultante ressuspensa em 200 μ l de água destilada esterilizada.

Para estimar a quantidade de vírus que cada um dos métodos permitiu purificar, realizaram-se leituras no espectrofotómetro (Beckman DU 530). Calibrou-se o espectrofotómetro com uma célula de quartzo contendo 1ml do tampão (ou água) onde o vírus foi ressuspensa aquando da purificação. Noutra célula de quartzo, colocaram-se 20 μ l do vírus purificado e 980 μ l de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0 ou de água (utiliza-se o mesmo tampão onde o vírus foi ressuspensa) e realizaram-se leituras entre os 240 nm e os 300 nm, tendo em conta que a absorvância é máxima para um comprimento de onda de 260 nm. Sabendo que 1mg/ml de vírus TNV (uma vez que se veio a revelar que o isolado viral GP pertence a esta espécie) absorve 5 OD (densidade óptica), foi possível determinar a quantidade de vírus purificada.

3.2 Morfologia das partículas virais

A morfologia das partículas virais foi analisada por microscopia electrónica de transmissão. Sobre a grelha foi depositada uma gota de suspensão viral purificada, retirando-se o excesso com papel de filtro. A seguir, depositou-se uma gota de solução aquosa de acetato de uranilo a 2%, cujo excesso foi também retirado com papel de filtro. As grelhas com as preparações assim contrastadas, foram observadas ao microscópio electrónico de transmissão, modelo JEOL 200.

3.3 Caracterização da proteína da cápside viral

3.3.1 Isolamento e preparação para electroforese

Colocaram-se num tubo "ependorf" 20 μ l de suspensão viral purificada, 10 μ l de tampão da amostra 4X [1X: 0,25 M Tris, pH 6,8, 5% mercaptoetanol, 0,25%

SDS (sulfato dodecil de sódio) e 0,25% azul de bromofenol] e alguns cristais de sacarose.

Noutro tubo "ependorf", colocou-se 10 µl de uma solução de mistura de vários marcadores proteicos de baixo peso molecular (Sigma), que incluem albumina de soro bovino 66 KDa, albumina de ovo 45 KDa, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 KDa, anidrase carbónica 29 KDa, tripsinogénio 24 KDa, inibidor de tripsina 20,1 KDa e α-lactoalbumina 14,2 KDa, e adicionaram-se 20 µl de tampão das amostras e algumas cristais de sacarose.

Ambos os tubos, contendo a amostra e os marcadores, foram tratados em banho de água a 100°C durante 4 minutos, após o que se arrefeceram de imediato em banho de gelo antes de serem analisados por electroforese.

3.3.2 Electroforese

A electroforese foi realizada em gel vertical descontínuo de poliacrilamida, no sistema SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com o gel separador a 12,5% [3,1 ml de água destilada, 4,2 ml de acrilamida a 30% (mistura constituída por: 29% de acrilamida $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ e 1% de bisacrilamida $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$), 2,5 ml de Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, 0,1 ml de SDS a 10%, 0,1 ml de APS (persulfato de amónia) a 10% e 0,01 ml de TEMED] e o gel concentrador a 4% [6 ml de água destilada, 1,3 ml de acrilamida a 30% (mistura constituída por: 29% de acrilamida e 1% de bisacrilamida), 2,5 ml de Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, 0,1 ml de SDS a 10%, 0,1 ml de APS a 10% e 0,01 ml de TEMED].

Para a elaboração, tanto do gel separador, como do gel concentrador, deve respeitar-se a seguinte ordem na junção das soluções que os compõem. Colocou-se num copo de vidro esterilizado primeiro a água, depois a acrilamida, seguido do Tris-HCl, depois o SDS, o APS e por último o TEMED. Sempre que se adicionou cada um dos componentes, agitou-se cuidadosamente o copo, afim de homogeneizar a solução, não permitindo no

entanto, que esta crie bolhas de ar. A solução de APS só deve ser preparada no mesmo dia da elaboração do gel.

A estrutura onde o gel foi colocado consistiu em duas placas de vidro (uma com 10,2 cm x 8,2 cm e outra com 10,2 cm x 7,2 cm), seladas na base com agarose e lateralmente com tiras de plástico (com 1 mm de espessura), que aderiram ao vidro pela aplicação de uma camada de silicone. As placas de vidro foram apertadas lateralmente por um conjunto de molas.

Após a montagem das placas de vidro, colocou-se no seu interior, com a ajuda de uma pipeta Pasteur, a mistura do gel separador (até cerca de 2 cm do topo da placa), e cobriu-se com uma camada de butanol saturado com água (50 ml de n-butanol e 5 ml de água destilada) a fim de permitir que o gel polimerize formando uma superfície horizontal, sem o efeito de menisco. Após cerca de 30 minutos o gel encontrava-se polimerizado, e por isso retirou-se a fase de butanol através de lavagens sucessivas com água destilada, e secou-se a superfície com auxílio de papel de filtro. O gel concentrador foi colocado com uma pipeta Pasteur por cima deste, até ao limite superior das placas de vidro, bem como o "pente" plástico para formar os alvéolos, o que se obtém após a polimerização deste gel. Em cerca de 15 minutos o gel estava polimerizado e retirou-se o pente, cuidadosamente.

Colocaram-se as placas de vidro contendo o gel na tina de electroforese GibcoBRL Mini V 8.10, totalmente coberto pelo tampão do reservatório Tris-Glicina 5X (1X: 25 mM Tris base, 250 mM glicina e 0,1% (p/v) SDS). Depois, introduziram-se em cada alvéolo, e com a ajuda de uma micropipeta, 30 μ l das amostras a analisar.

A electroforese decorreu a 100 V (voltagem constante), até que o corante azul de bromofenol chegasse a cerca de 0,5 cm do fim do gel, o que normalmente demorava 1:30 horas.

O gel foi retirado das placas de vidro, corado numa solução de coomassie blue [40% de metanol, 7% de ácido acético e 0,025% de coomassie blue R-250 (g/ml)] durante uma noite, e descorado numa solução descorante (7% de ácido

acético e 5% de metanol), com substituições sucessivas desta solução, para conseguir a descoloração total, ficando as “bandas” proteicas bem visíveis e azuis.

Depois, o gel foi lavado em várias águas para remover o ácido acético, colocado em cima de um papel de filtro coberto com uma fina película de plástico aderente e seco no secador Savant Slab Gel Dryer SGD 4050.

A massa molecular da cápside proteica do isolado viral, foi determinado por comparação com as massas moleculares conhecidas dos marcadores de baixo peso molecular (Sigma) com 66; 45; 36; 29; 24 e 20,1 KDa. Para isso, mediu-se com uma régua a migração das bandas visualizadas e, por extrapolação gráfica foi possível determinar qual a massa molecular da banda correspondente à proteína da cápside viral, a partir da distância migrada por esta proteína.

3.4 Caracterização do genoma viral

3.4.1 Isolamento

Todo o material de vidro utilizado na extracção dos ácidos nucleicos foi descontaminado da presença de ribonucleases (RNase), tendo ficado durante uma noite, imerso numa solução de DEPC (dietilpirocarbonato) (1µl DEPC/ml de água destilada). A água tratada com o DEPC, bem como o material atrás referido foram depois submetidos a um ciclo de autoclavagem a 120°C a 1 bar, durante 1 hora. O material de plástico foi submetido a 2 ciclos de autoclavagem a 120°C à pressão de 1 bar.

A extracção dos ácidos nucleicos foi realizada sempre em banho de gelo. O método baseou-se no uso do “Rneasy Mini Kit”, da Qiagen. A 460 µl de suspensão de vírus purificado, num tubo “eppendorf”, adicionaram-se 460 µl de tampão de lise RLT daquele kit, 10µl de β-mercaptoetanol/ml de tampão RLT e agitou-se vigorosamente no vórtex, aproximadamente 1 minuto. Juntaram-se mais 460 µl de etanol a 70%, e voltou a agitar-se no vórtex.

Aplicou-se a solução obtida na coluna de eluição do kit, e centrifugou-se 15 segundos a 10000 rpm na centrífuga de bancada (Sanyo MSE Micro Centaur). Descartou-se o conteúdo do tubo colector, lavou-se a coluna com 700 µl de tampão RW1 do kit, e voltou a centrifugar-se 15 segundos a 10000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur). Repetiu-se a lavagem da coluna com 500 µl de tampão RPE do kit (previamente diluído em 4 volumes de etanol absoluto) e centrifugou-se 15 segundos a 10000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur).

Para eluir o RNA retido na coluna, aplicaram-se 50 µl de água destilada (isenta de RNase) e centrifugou-se 1 minuto a 10000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur). O RNA foi guardado no congelador para estudos posteriores.

3.4.2 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático do ácido nucleico viral com o enzima Ribonuclease A, tem por objectivo determinar se a sua natureza é RNA, e para isso, seguiu-se o protocolo adaptado de Saldarelli *et al* (1994).

A 20 µl dos ácidos nucleicos extraídos como anteriormente descrito, adicionaram-se 3 µl de tampão SSC 20X (1X: 0,15 M NaCl e 0,0125 M citrato de sódio, pH 7,2); 6,4 µl de água tratada com DEPC, 0,2 µl de uma solução stock de Ribonuclease A (10 µg/µl) e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente, centrifugou-se a mistura a 7500 g durante 20 minutos, aproveitou-se o sobrenadante e tratou-se por duas vezes com 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:22:1), com agitação manual durante 1 minuto, e mais um minuto no vórtex, e voltou a centrifugar-se 10 minutos a 7500 g.

A fase aquosa foi retirada e adicionou-se igual volume de clorofórmio para arrastar o fenol que ainda existisse, e centrifugou-se 10 minutos a 7500 g. À fase aquosa resultante, adicionaram-se 2,5 vezes o volume de etanol absoluto à temperatura de -20° C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, ficando o ácido nucleico a precipitar durante 18 horas a -20° C.

No dia seguinte, fez-se uma centrifugação a 12000 g durante 40 minutos, e a "pellet" contendo o ácido nucleico foi ressuspensa em 30 µl de água tratada com DEPC.

3.4.3 Electroforese

A tina de electroforese foi lavada com detergente, depois passada por álcool etílico absoluto, e durante 10 minutos ficou imersa numa solução de H₂O₂ a 3%. Depois, foi lavada com água previamente tratada com DEPC.

Num balão "Erlenmayer" preparou-se um gel de agarose a 1%, colocando-se 40 ml de tampão TBE (1X: 89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 2,5 mM EDTA, pH 8,3) e 0,4 g de agarose. A mistura foi aquecida no microondas a fim de solubilizar a agarose. Foi depois vertida para um suporte horizontal apropriado onde se colocou logo o "pente" de plástico para formar os alvéolos, antes do gel polimerizar, o que aconteceu ao fim de cerca de 15 minutos.

O gel foi colocado na tina de electroforese coberto com tampão TBE 0,5X. Nos vários alvéolos do gel, com a ajuda de uma micropipeta, foram colocados: 20 µl do marcador [2 µl de marcador de alto peso molecular da Fermentas, 2 µl de corante orange G (1% de orange G em água destilada, g/ml) e 16 µl de água destilada]; 20 µl da amostra (18 µl da suspensão de RNA e 2 µl de corante orange G); e 20 µl da amostra tratada com RNase (18 µl da suspensão de RNA tratada com RNase e 2 µl de corante orange G).

A electroforese decorreu a 80 V (voltagem constante) durante aproximadamente 1:30 horas. Quando terminou, o gel foi corado numa solução de brometo de etídio (0,5µg/ml) durante cerca de 20 minutos, e observado e fotografado no transiluminador de radiação ultravioleta (Pharmacia LKB MacroVue).

O número de bases dos ácidos nucleicos virais em estudo, foi determinado por comparação com o número de bases dos marcadores RNA conhecidos,

correspondentes às diferentes bandas observadas nos geles: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 e 200 bases, adquiridos à empresa Fermentas como já foi referido. Para isso, mediu-se com uma régua a migração das bandas visualizadas e, por extrapolação gráfica foi possível determinar qual o número de bases da banda correspondente ao RNA em estudo.

3.5 Análise de dsRNA

3.5.1 Isolamento

O protocolo de extracção dos dsRNA foi aplicado em plantas de *N. benthamiana* saudável, *N. benthamiana* infectadas com OLV1 e *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral GP, segundo o método adaptado de Morris e Dodds (1979).

O material vegetal infectado (6 g), foi macerado num almofariz com 13,5 ml de STE 2X (1X: 0,1 M NaCl, 0,05 M Tris, 0,05 mM EDTA, pH 7,5), 7,5 ml de clorofórmio, 7,5 ml de fenol saturado com água (colocou-se o fenol cristalino em banho-maria até derreter, depois juntou-se 0,1% de hidroxiquinolina e igual volume de água destilada estéril; agitou-se vigorosamente e deixou-se repousar até que as 2 fases se separassem), 5,1 ml de SDS a 10%, e sujeito a agitação durante 1 hora, à temperatura ambiente, sendo depois centrifugado durante 20 minutos a 7600 g.

Ao sobrenadante adicionou-se etanol absoluto à temperatura ambiente, para uma concentração final de 16%, e celulose CF 11 (Whatman) (1g de celulose/10g de tecido vegetal), deixando-se agitar lentamente, cerca de 10 minutos, à temperatura ambiente.

Colocou-se esta suspensão numa seringa (contendo na base interior um filtro de entretela) e lavou-se a coluna de celulose (na seringa), com 10 vezes o volume da suspensão de celulose presente na seringa, com STE 2X a 16% de etanol e depois, lavou-se com 2 ml de STE 2X, tendo-se desprezado o líquido resultante da eluição.

A eluição dos dsRNA foi feita com 4 vezes o volume da suspensão existente na seringa, de STE 2X, e recolheram-se na extremidade da seringa. A sua precipitação foi feita pela adição de 2,5 vezes o volume recolhido, de etanol absoluto a -20°C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2; durante a noite no congelador.

Após esse tempo, centrifugou-se durante 20 minutos a 7600 g e ressuspendeu-se a "pellet" em 50 μl de tampão TE (1X: 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5). Colocou-se a solução em tubos "eppendorf" e voltou a centrifugar-se durante 3 minutos a 6500 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur de bancada) a fim de eliminar o eventual excesso de celulose. Recuperou-se o sobrenadante, e juntaram-se 2,5 vezes o volume de etanol absoluto a -20°C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, ficando a precipitar no congelador durante pelo menos 1 noite.

Fez-se nova centrifugação durante 40 minutos a 7600 g, e ressuspendeu-se a "pellet" contendo os dsRNA em 98 μl de água destilada esterilizada.

3.5.2 Tratamento enzimático

O tratamento enzimático com Desoxirribonuclease (DNase), RNase e proteinase K foi aplicado à preparação dos dsRNA, extraídos de: *N. benthamiana* infectadas com OLV1 e infectadas com o isolado viral GP, bem como a uma fracção extraída do mesmo modo de *N. benthamiana* saudável, segundo o protocolo adaptado de Saldarelli *et al*, (1994).

A 181 μl de dsRNA juntaram-se 1,9 μl de cloreto de magnésio 1M; 3,1 μl de DNase I (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Sigma), incubou-se a 37°C durante 30 minutos e centrifugou-se a 7500 g durante 20 minutos.

Ao sobrenadante juntaram-se 24,5 μl de tampão SSC 20X (1X: 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sódio $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$, pH 7,2), 52,2 μl de água destilada

esterilizada e 1,6 μ l de RNase (10 μ g/ μ l, Stratagene). A mistura incubou a 37° C durante 30 minutos e fez-se uma centrifugação a 7500 g durante 20 minutos.

O sobrenadante foi recolhido, adicionaram-se 2,5 μ l de proteinase K (35,5U/mg; Stratagene) e incubou-se a 37° C durante 30 minutos.

Esta mistura, foi tratada com um volume de fenol/clorofórmio (1:1), com agitação manual durante 1 minuto e mais 1 minuto no vórtex. Centrifugou-se a 7500 g durante 10 minutos, e a fase superior (aquosa) foi retirada e lavada uma vez com clorofórmio para arrastar os restos de fenol. Fez-se nova centrifugação a 7500 g durante 10 minutos e aproveitou-se a fase superior. A esta, adicionou-se 2,5 vezes o seu volume de etanol absoluto a -20° C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 para precipitação dos ácidos nucleicos que ficaram no congelador durante uma noite.

No dia seguinte fez-se nova centrifugação a 12000 g durante 40 minutos e a "pellet" foi ressuspensa em 30 μ l de tampão TE.

3.5.3 Electroforese

A 17 μ l da preparação contendo dsRNA, de cada amostra, adicionaram-se 3 μ l de uma solução corante Orange G (1% de orange G em água destilada, g/ml) e alguns cristais de sacarose.

Preparou-se um gel de agarose a 1%, em tampão TBE 0,5X, como descrito em 3.4.3, tendo-se colocado as amostras nos alvéolos previamente formados no gel.

A electroforese decorreu em tampão TBE 0,5X à voltagem constante de 50 V, durante aproximadamente 2 horas, até o corante se aproximar da extremidade do gel. Quando terminou, o gel foi retirado da tina e imerso em brometo de etídio (0,5 μ g/ml) durante cerca de 20 minutos para corar. Foi depois observado no transiluminador de radiação ultravioleta (Pharmacia LKB MacroVue) para

detectar as “bandas” correspondentes aos ácidos nucleicos e finalmente foi fotografado.

A massa molecular dos dsRNA extraídos de material vegetal infectado com o isolado viral GP, foi determinado por comparação com os dsRNA isolados de plantas infectadas com o vírus OLV1, já conhecidos.

4. Produção de imunoreagentes para um kit de teste ELISA, para detecção de TNV

4.1 Preparação dos anticorpos

Seguiu-se o procedimento de Ball *et al* (1990) e Converse & Martin (1990) para a produção de anticorpos policlonais. Imunizou-se um coelho com uma serie de 3 injeções intramusculares, administradas semanalmente. A preparação injectada foi uma mistura de vírus altamente purificada (a partir de plantas *N. benthamiana* sintomáticas), e de adjuvante incompleto de Freund, na proporção de 2 ml de suspensão aquosa contendo 1 mg de vírus/2 ml de adjuvante de Freund (1:1, v/v).

Recolheram-se para um copo de vidro seco 5 ml de sangue do coelho imunizado, uma semana após a última injeção, e deixou-se coagular os glóbulos vermelhos durante uma noite, a 4°C. O antisoro foi separado do coágulo por centrifugação a 2000 g durante 20 minutos, e depois de se realizar a préadsorção (ver abaixo) foi dividido em pequenos volumes, por vários “ependorfs” conservados a -20°C.

4.1.1 Préadsorção do antisoro

Com o objectivo de remover possíveis anticorpos contra proteínas normais de planta, eventualmente presentes na preparação viral usada na imunização, e portanto, falsos positivos em futuros testes, procedeu-se à préadsorção do

antisoro com extractos de plantas sãs. Para isso, material vegetal saudável (*N. benthamiana*) foi triturado num almofariz em 3 volumes de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 e centrifugado a 2000 g durante 10 minutos. A 1,5 ml do sobrenadante foram misturados 1,5 ml do antisoro obtido anteriormente. A mistura ficou a incubar durante 1 noite a 4°C. No dia seguinte, a preparação foi centrifugada a 7600 g durante 15 minutos e o sobrenadante recolhido.

4.1.2 Purificação das IgG

Numa seringa de 2,5 ml (contendo uma rodela de papel de filtro no fundo) adicionou-se 1 ml de agarose conjugada com proteína A (GibcoBRL), formando uma coluna, a qual foi lavada com 50 ml de tampão de eluição (Glicina HCl 0,1 M, pH 3,0), e com 50 ml de tampão PBS (0,137 M NaCl, 0,002 M KH₂PO₄, 0,005 M Na₂HPO₄·7H₂O, 0,003 M KCl, 0,003 M NaN₃, pH 7,4). Juntou-se à coluna de agarose 1 ml do antisoro préadsorvido (sem nunca deixar secar a coluna) e voltou a lavar-se com 50 ml de tampão PBS. As IgG que ficaram retidas pela proteína A foram eluídas com a adição de 10 ml de tampão de eluição, e recolhidas em fracções de 1 ml, em tubos "eppendorfs". O pH de cada fracção foi neutralizado em cada um dos "eppendorfs" pela adição de 25 µl de tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 9,0). A densidade óptica de cada fracção foi lida num espectrofotómetro (Beckman DU 530) a 280 nm, e as fracções que apresentaram valores superiores a 1,445 OD conservaram-se a -20°C. A coluna voltou a ser lavada com 50 ml de tampão PBS e conservada a 4°C, para eventual uso posterior. A concentração das IgG foi determinada nas fracções eluídas tendo em conta que 1 mg/ml absorve, a 280 nm, 1,445 OD.

4.1.3 Conjugação enzimática das IgG

A 1 ml de IgG (1mg/ml) juntaram-se 40 µl (1000 unidades) da enzima fosfatase alcalina (Sigma) e colocou-se numa manga de diálise por 12 horas a 4°C sob agitação, num litro de tampão PBS, com 3 substituições do tampão em

intervalos de 4 horas. De seguida, retirou-se a preparação da manga, e juntou-se 6 μ l de uma solução de glutaraldeído a 10% (concentração final: 0,06%) e deixou-se a incubar à temperatura ambiente aproximadamente 4 horas. Colocou-se, novamente, em manga de diálise para eliminar o excesso de glutaraldeído, durante toda a noite, a 4°C. Por fim, juntaram-se 5 mg de BSA (albumina de soro bovino) e os anticorpos assim conjugados, foram conservados a 4°C.

4.1.4 Determinação do título do antisoro

O título do antisoro foi determinado por DAS-ELISA (ver a seguir) e realizado em placas de microtitulação, de fundo plano, cada uma com 96 alvéolos. Considerou-se o título como sendo a diluição mais elevada que permitia detectar o isolado viral GP.

4.2. Condução do teste DAS-ELISA

4.2.1 Cobertura das placas

A cobertura dos alvéolos da placa foi realizada com um volume de 200 μ l das diferentes diluições das imunoglobulinas G: 1/250, 1/500, 1/1000 e 1/2000 em tampão de cobertura (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6), conforme esquematizado na figura 1. Numa caixa de plástico com o fundo revestido com papel humedecido com água destilada, colocou-se a placa do teste, tapou-se a caixa, e incubou-se a 37°C durante 4 horas.

Após o período de incubação as placas foram sacudidas e os alvéolos preenchidos com tampão de lavagem (0,137 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, 0,05% Tween 20, pH 7,2-7,4) durante 3 minutos, após os quais foram novamente sacudidas. Esta operação foi efectuada 3 vezes, e no final, a placa foi sacudida em cima de papel absorvente para retirar todo o tampão.

4.2.2 Aplicação das amostras

De seguida foram maceradas, separadamente, folhas de *N. benthamiana* saudáveis, e infectadas com o isolado viral GP, na proporção de 1 g de folhas para 5 ml de tampão da amostra [tampão de lavagem contendo 2% de PVP (polivinil pirrolidona) (viscosidade K10-K40), 0,2% de BSA, 1,5mM NaN₃, pH 7,4].

No caso das plantas lenhosas, como é a oliveira (frutos e raminhos) utilizou-se o tampão da amostra constituído por: 0,5 M Tris, 0,14 M NaCl, 2% de PVP (viscosidade K25), 1% de PEG, 3 mM NaN₃, 0,05% de Tween 20 em água destilada, pH 8,2 na proporção de 1g de frutos ou raminhos/ 5 ml de tampão.

Em ambos os casos, centrifugou-se o preparado a 7600 g durante 8 minutos e aproveitou-se o sobrenadante.

Em cada alvéolo da placa foram colocados 190 µl de cada amostra. Cada amostra foi duplicada em linhas e colunas diferentes, conforme a figura 1.

A placa ficou a incubar durante 16 a 18 horas a 4°C, dentro de uma caixa plástica com o fundo revestido com papel humedecido com água destilada e tapada. Após este período a placa foi submetida a 5 lavagens conforme descrito no ponto 4.2.1.

4.2.3 Aplicação das IgG conjugadas

Em cada alvéolo colocaram-se 190 µl de IgG conjugadas com a fosfatase alcalina, diluídas no tampão do conjugado [tampão de lavagem contendo 2% PVP (polivinil pirrolidona) (viscosidade K10-K40), 0,2% BSA, 1,5 mM NaN₃, pH 7,4] nas concentrações: 1/250, 1/500, 1/1000 e 1/2000, como esquematizado na figura 1. A placa foi novamente colocada dentro da caixa plástica, com o fundo revestido com papel humedecido com água destilada, tapada e incubou-se durante 4 horas a 37°C. Após este período a placa foi submetida a 5 lavagens, conforme descrito no ponto 4.2.1.

		Concentração de IgG simples										
		1/250		1/500		1/1000		1/2000				
Concentração de IgG conjugadas com a enzima	1/250	1	2	1	2	1	2	1	2			
		2	1	2	1	2	1	2	1			
	1/500	1	2	1	2	1	2	1	2			
		2	1	2	1	2	1	2	1			
	1/1000	1	2	1	2	1	2	1	2			
		2	1	2	1	2	1	2	1			
	1/2000	1	2	1	2	1	2	1	2			
		2	1	2	1	2	1	2	1			

Figura 1 - Esquema para determinação do título do antisoro, segundo Converse & Martin (1990). 1- Extracto de *N. benthamiana* sã e 2- Extracto de *N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP.

4.2.4 Aplicação do substrato enzimático

Adicionaram-se 190 μ l, em cada alvéolo da placa, de substrato enzimático p-nitrofenil fosfato. Este, foi preparado dissolvendo 15 mg de p-nitrofenil fosfato (Sigma) em 15 ml de tampão do substrato (9,7% de dietanolamina, 0,98 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 9,8). A placa foi incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente, num local escuro. No caso do material lenhoso (frutos e raminhos) incubou-se a placa durante 2 horas.

4.2.5 Leitura dos resultados

A leitura dos resultados do teste DAS-ELISA foi realizada visualmente ao fim de 30 minutos, tendo em conta a intensidade da cor amarela resultante da hidrólise do substrato. Por não se dispor na altura, de um leitor automático de microplacas (o do laboratório encontrava-se avariado), a placa foi lavada como descrito no ponto 4.2.1 e conservada a $-10^\circ C$. Posteriormente, adicionou-se a

cada alvéolo 190 µl de substrato enzimático e após 2 horas a placa foi lida no espectrofotómetro (Beckman DU 530) no comprimento de onda de 405 nm, a fim de aferir qual a melhor concentração de IgG simples e conjugadas, a usar em análises subsequentes.

As amostras que apresentavam uma absorvância duas vezes superiores à média da absorvância dos controlos negativos, foram consideradas positivas, ou seja, infectadas com o isolado viral GP.

5. Aplicação dos métodos de diagnóstico: transmissão mecânica, DAS-ELISA e dsRNA, ao material de *O. europaea L.* proveniente do campo

Para os 3 métodos de diagnóstico abaixo indicados foram testadas 4 amostras de plantas diferentes: Árvore 4, Árvore 6, Árvore 8 e Árvore 10, provenientes de oliveiras da cultivar Verdeal Alentejana, da Herdade da Abóbada (Centro de Experimentação do Baixo Alentejo, Direcção Regional de Agricultura do Alentejo). Estas oliveiras já tinham sido alvo de estudos anteriores (Clara & Félix, 2000; Félix & Clara, 2002), e por isso sabia-se que estavam infectadas com o vírus TNV.

5.1 Transmissão mecânica

As inoculações mecânicas foram feitas de forma semelhante ao descrito no ponto 1. Foram utilizadas as azeitonas de cada amostra (armazenadas no frigorífico durante cerca duas semanas) e inoculados em plantas *N. benthamiana* e *C. quinoa*.

5.2 ELISA

O teste DAS-ELISA foi realizado de forma semelhante ao descrito no ponto 4.2, utilizando as IgG simples e conjugadas com a fosfatase alcalina, numa concentração de 1:500. Esta concentração foi considerada a mais adequada de acordo com os resultados anteriormente obtidos com a leitura visual.

Este teste foi realizado com frutos e raminhos de oliveira das amostras acima mencionadas. Utilizaram-se, como controlo positivo, extractos de plantas *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral GP, e como controlo negativo plantas *N. benthamiana* saudáveis. Não se utilizaram extractos de oliveiras “saudáveis”, por não se conhecer ao certo o seu estado fitossanitário.

As reacções finais do teste foram “lidas” visualmente ao fim de 2 horas, e a placa foi lavada como descrito em 4.2.1 e conservada a -10°C. Posteriormente, pelas razões apresentadas em 4.2.5, adicionou-se de novo o substrato enzimático, incubou-se por 2 horas e as reacções foram “lidas” no espectrofotómetro (Beckman DU 530) no comprimento de onda de 405 nm, a fim de avaliar se as amostras se encontravam infectadas com o isolado viral GP.

5.3 Análise de dsRNA

5.3.1 Isolamento

Dez gramas de “raspas”, contendo tecidos floémicos, obtidas dos raminhos de oliveira das amostras referidas, foram macerados com azoto líquido ficando reduzidos a pó. Adicionou-se 30 ml de STE 2X, 10 ml de SDS a 10%, pH 7.2, 600 µl de bentonite (45 mg de bentonite /ml de KH₂PO₄ 0,1M, previamente autoclavada), 600 µl de β-mercaptoetanol, 12 ml de fenol saturado com água e tratado com NH₄OH (4 µl de NH₄OH /ml de fenol saturado com água) e 12 ml de clorofórmio. Agitou-se esta mistura 45 minutos à temperatura ambiente, e centrifugou-se a 8000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Ao sobrenadante resultante, adicionaram-se 12 ml de fenol saturado com água e tratado com NH_4OH e 12 ml de clorofórmio, para realizar uma segunda extracção. Deixou-se a agitar 10 minutos à temperatura ambiente, e fez-se uma nova centrifugação a 8000 g durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Ao sobrenadante resultante, adicionou-se etanol absoluto a -20°C de modo a que a concentração final de etanol fosse de 17%, celulose CF11 na concentração de 0,7g/5g de tecido vegetal, e deixou-se agitar cerca de 1 hora. Seguidamente, centrifugou-se a preparação a 11000 g durante 8 minutos. A “pellet” foi ressuspensa em 35 ml de tampão STE 1X - 17% de etanol, agitou-se durante 5 minutos, e depois foi centrifugada a 11000 g durante 8 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento repetiu-se 5 vezes, seguido de uma última centrifugação.

A “pellet” resultante deixou-se secar durante 30 minutos invertendo os tubos do rotor sobre papel de filtro, ressuspendeu-se depois em 10 ml de STE 1X e agitou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Centrifugou-se novamente a 11000 g durante 10 minutos, e o sobrenadante contendo dsRNA, foi precipitado com 2,5 vezes o volume de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, durante uma noite a -20°C .

Esta preparação, contendo os dsRNA foi centrifugada a 12000 g durante 30 minutos a 4°C . Deixou-se secar a “pellet”, contendo dsRNA durante cerca de 30 minutos, ressuspendeu-se em 1 ml de tampão TE 1X e centrifugou-se a 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur), durante 4 minutos, à temperatura ambiente para retirar o excesso de celulose.

Colocaram-se em 2 “ependorfs” durante 2 horas a -80°C , 400 μl do sobrenadante e adicionaram-se 2,5 vezes o volume de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, para precipitar os dsRNA. Depois, centrifugou-se a 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

A "pellet" foi lavada com etanol a 70% a -20°C e centrifugou-se mais uma vez a 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur) durante 30 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi desprezado e a "pellet" seca ao ar, e depois ressuspensa em 50 μl de água destilada estéril e conservada a -20°C .

5.3.2 Tratamento enzimático

Para eliminar eventuais vestígios de DNA nas preparações, a 50 μl de cada amostra adicionou-se 1 μl de MgCl_2 1 M, 8,3 μl de DNase (1 unidade, Sigma), 40,7 μl de água destilada estéril e incubou-se durante 30 minutos a 37°C .

Seguidamente, para remover alguns vestígios de ssRNA, adicionou-se à preparação anterior 15 μl de SSC 20X, 34 μl de água destilada estéril e 1 μl de RNase (1 unidade, Stratagene). Incubou-se a mistura durante 30 minutos a 37°C .

Adicionou-se ainda, para eliminar possíveis vestígios de proteína, 3 μl de proteinase K (0,53 unidades, Stratagene) e voltou a incubar-se a mistura 30 minutos a 37°C .

No final, para inactivar e remover as enzimas e produtos da sua reacção, juntaram-se 20 μl de SDS a 10%, 30 μl de água destilada estéril e 200 μl de fenol saturado com Tris-HCl às amostras anteriores. O fenol saturado com Tris-HCl foi previamente preparado juntando igual volume de fenol saturado com água e de Tris 0,5 M, pH 7,6. Agitou-se vigorosamente e deixou-se repousar 1 noite. Depois, retirou-se o Tris que se encontrava na fase superior, e voltou a adicionar-se à fase fenólica, igual volume de Tris 0,1 M, pH 7,6. Agitou-se vigorosamente e deixou-se repousar mais uma noite até ser utilizado.

Agitaram-se as preparações das amostras anteriores contendo dsRNA, e após os tratamentos enzimáticos referidos, centrifugaram-se a 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur) durante 3 minutos.

Ao sobrenadante, adicionou-se 100 μ l de fenol saturado com Tris-HCl e 100 μ l de clorofórmio. Agitou-se alguns minutos e repetiu-se a extracção novamente.

O sobrenadante colocou-se num "eppendorf" refrigerado e juntaram-se 2,5 vezes o volume de etanol absoluto a -20° C e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, deixando precipitar cerca de 24 horas a -20° C.

A mistura foi centrifugada a 13000 rpm (Sanyo MSE Micro Centaur) durante 30 minutos e a "pellet", contendo os dsRNA, foi ressuspensa em 15 μ l de água destilada estéril.

5.3.3 Electroforese

A electroforese foi realizada num gel de poliacrilamida a 6% [14,2 ml de água destilada estéril, 3,320 ml de acrilamida a 40%, 2 ml de TAE 10X (1X: 0,04 M Tris, 0,02 M ácido acético e 10% de EDTA 0,5M, pH 8,0), 240 μ l de APS a 10% e 24 μ l de TEMED], de forma semelhante ao descrito em 3.3.2.

A 15 μ l de cada amostra adicionou-se 3 μ l de tampão da amostra, contendo corante 10x concentrado (loading buffer - Takara).

A electroforese correu em tampão TAE à voltagem constante de 90 V, durante cerca de 5 horas.

O gel foi corado com nitrato de prata, usando o "Rapid Silver Staining Kit", da Sigma. A fixação do gel foi feita durante 20 minutos, numa mistura contendo 10 ml da solução fixadora de prata (incluída no kit), 100 ml de metanol, 20 ml de ácido acético glacial e 70 ml de água destilada. Após este período, o gel foi lavado duas vezes em 100 ml de água destilada, durante 10 minutos. Depois, foi imerso durante cerca de 20 a 30 minutos na solução reveladora, constituída por 35 ml de água destilada; 2,5 ml do componente 1A; 2,5 ml do componente 1B; 5 ml do componente 2; 5 ml do componente 3 e 50 ml do componente 4 (os componentes 1A, 1B, 2, 3 e 4 encontravam-se incluídos no kit). Quando as

“bandas” do gel ficaram visíveis aplicou-se a solução Stop, constituída por 95 ml de água destilada e 5 ml de ácido acético glacial.

O gel foi lavado, fotografado e seco no secador Savant Slab Gel Dryer SGD 4050, como descrito no ponto 3.3.2.

O peso molecular das moléculas de dsRNA, das 4 amostras de oliveira, separadas no gel, foi determinado por comparação com os dsRNA isolados de plantas de *N. benthamiana* infectadas com TNV, já conhecidas.

Apresentação e Discussão dos Resultados

1. Estudo da gama de hospedeiros do isolado viral

Verificou-se que o isolado viral GP é transmissível mecanicamente à maioria das plantas indicadoras utilizadas.

As inoculações realizadas em 16 plantas herbáceas de várias famílias, a partir de um extracto de planta infectada com o isolado GP (Tabela 4) demonstraram que apenas 2 delas, *Datura stramonium* L. e *Spinacea oleracea* L., não exibiam qualquer sintomatologia. As restantes, são sensíveis à infecção local e apenas *N. benthamiana* manifesta, para além dos sintomas locais, por vezes, sintomas sistémicos (Figura 2).

Tabela 4. – Sintomatologia apresentada pelas plantas inoculadas com extractos de *N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP

Família/Espécies testadas	Sintomas locais	Sintomas sistémicos
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Necroses	---
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste e Reyn	Necroses	---
<i>C. ambrosioides</i> L.	Necroses	---
<i>C. botrys</i> L.	Necroses	---
<i>C. murale</i> L.	Necroses	---
<i>C. quinoa</i> Willd	Necroses	---
<i>Spinacea oleracea</i> L.	---	---
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis sativus</i> L.	Necroses	---
Leguminoseae		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Necroses	---
<i>Vigna unguiculata</i> L.	Necroses	---

Solanaceae

<i>Datura stramonium</i> L.	—	---
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Necroses	cloroses e necroses*
<i>N. paniculata</i> L.	Necroses	---
<i>N. rustica</i> L.	Necroses	---
<i>N. occidentalis</i> L.	Necroses	---
<i>N. tabaccum</i> L. cv. White Burley	Necroses	---

Legenda: — ausência de sintomas e de infecção; * sintomas ocasionalmente observados.

Nas plantas com sintomas locais, confirmou-se que o isolado viral GP não se encontrava latente nas folhas assintomáticas, uma vez que após inoculação mecânica dessas folhas em plantas jovens de *N. benthamiana* (por serem bastantes sensíveis à infecção viral) não se verificaram quaisquer sintomas.

No caso da espécie *N. benthamiana* verificou-se, ocasionalmente, que mesmo quando não apresentava sintomas sistêmicos, o vírus encontrava-se nessas folhas no estado latente.

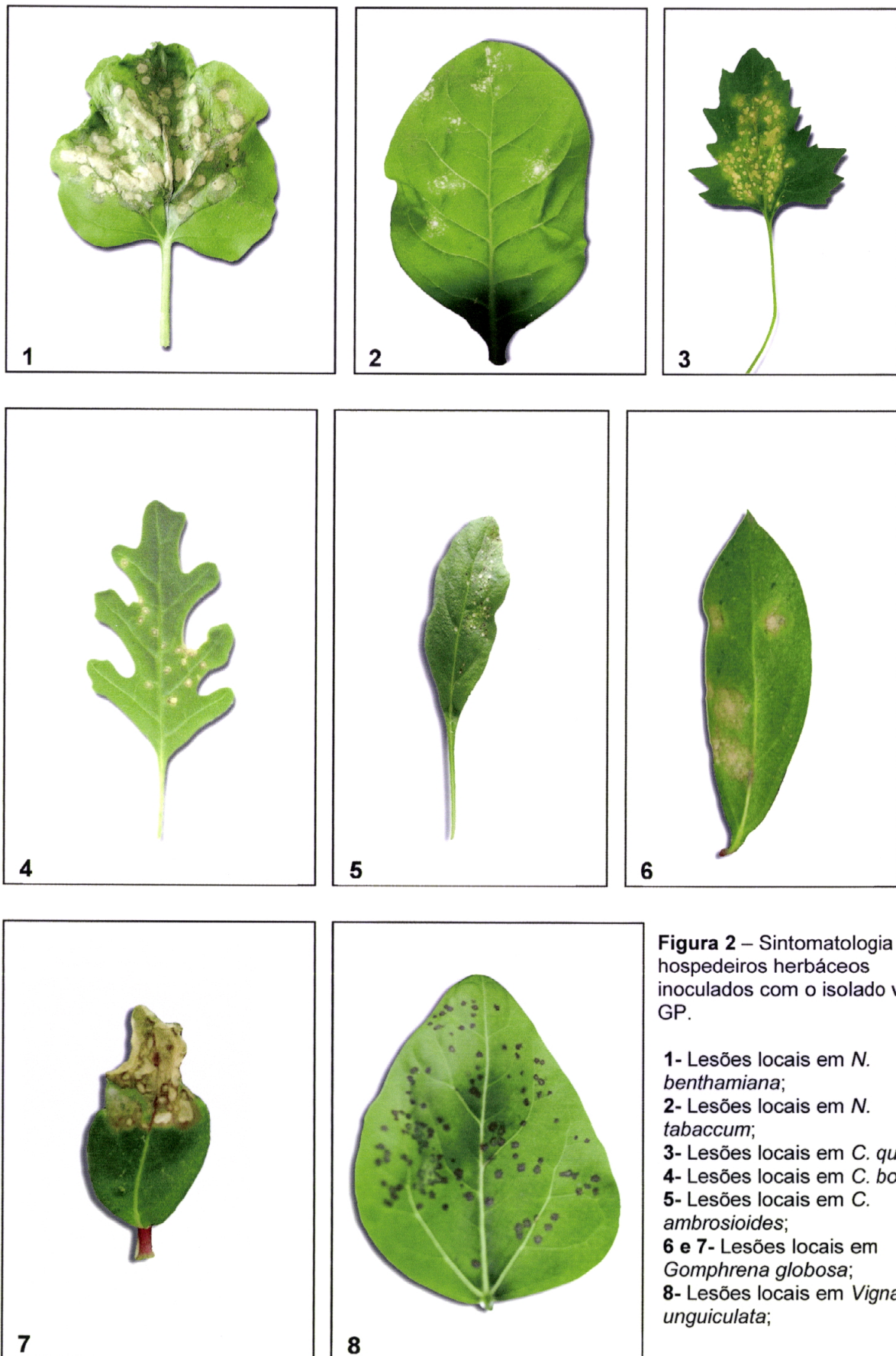


Figura 2 – Sintomatologia em hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral GP.

- 1- Lesões locais em *N. benthamiana*;
- 2- Lesões locais em *N. tabaccum*;
- 3- Lesões locais em *C. quinoa*;
- 4- Lesões locais em *C. botrys*;
- 5- Lesões locais em *C. ambrosioides*;
- 6 e 7- Lesões locais em *Gomphrena globosa*;
- 8- Lesões locais em *Vigna unguiculata*;

2. Caracterização físico-química do isolado viral

2.1 Purificação

Para a purificação do isolado viral GP foram utilizados 3 métodos, a fim de aferir aquele que permitia obter melhores resultados, ou seja, maior quantidade de vírus.

Este isolado foi purificado a partir de plantas *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral, utilizando material vegetal fresco ou congelado a -20°C . Verificou-se que a utilização de material vegetal congelado não alterava a infecciosidade das preparações virais obtidas.

O método A (Dijkstra & Jager, 1998) não se revelou eficiente na purificação do isolado viral GP, uma vez que não se obtiveram bandas correspondentes ao isolado viral nos gradientes de sacarose. Tal resultado poder-se-á dever ao facto de: i) o pH do tampão (7,6) ser mais elevado que o dos métodos B e C, onde se obtiveram melhores resultados, ii) a clarificação com butanol ter sido muito prolongada, iii) o isolado viral ter-se degradado ou perdido durante as diferentes etapas do método.

O método B, referido por Merciega *et al* (1996), revelou ser bastante eficaz na purificação do isolado viral GP. A utilização do clorofórmio/butanol permitiu fazer uma boa clarificação do vírus, uma vez que a “pellet” obtida após a ultracentrifugação se apresentava translúcida, não revelando vestígios de cor verde.

O método C (Zhang *et al*, 1993), também permitiu purificar o vírus. No entanto, o método B (Merciega *et al*, 1996), revelou-se bastante mais eficiente que o método C (Zhang *et al*, 1993), possivelmente devido à utilização do PEG que permitiu uma maior precipitação do isolado viral, e porque possui também períodos de incubação durante a clarificação e a precipitação que o método C não apresenta.

Verificou-se que, partindo da mesma quantidade inicial de material vegetal (sensivelmente com a mesma intensidade de sintomas) era possível obter uma

maior quantidade do isolado viral GP aplicando o método B (Merciega *et al*, 1996), uma vez que nos gradientes de sacarose, existia uma banda mais espessa, o que indica a presença de uma maior quantidade de vírus. Confirmando estes resultados com leituras realizadas no espectrofotómetro, verificou-se que com o método B se obtinha uma concentração viral de 2,6 mg/ml e com o método C obteve-se 0,7mg/ml.

Da aplicação dos métodos B e C, verificou-se que a centrifugação do isolado viral em gradientes de sacarose, resultou na presença de uma única banda, indicando tratar-se de um vírus simples e não multicomponente.

2.2 Morfologia das partículas virais

Após observação do isolado viral GP ao microscópio electrónico foi possível observar que as suas partículas são isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro.

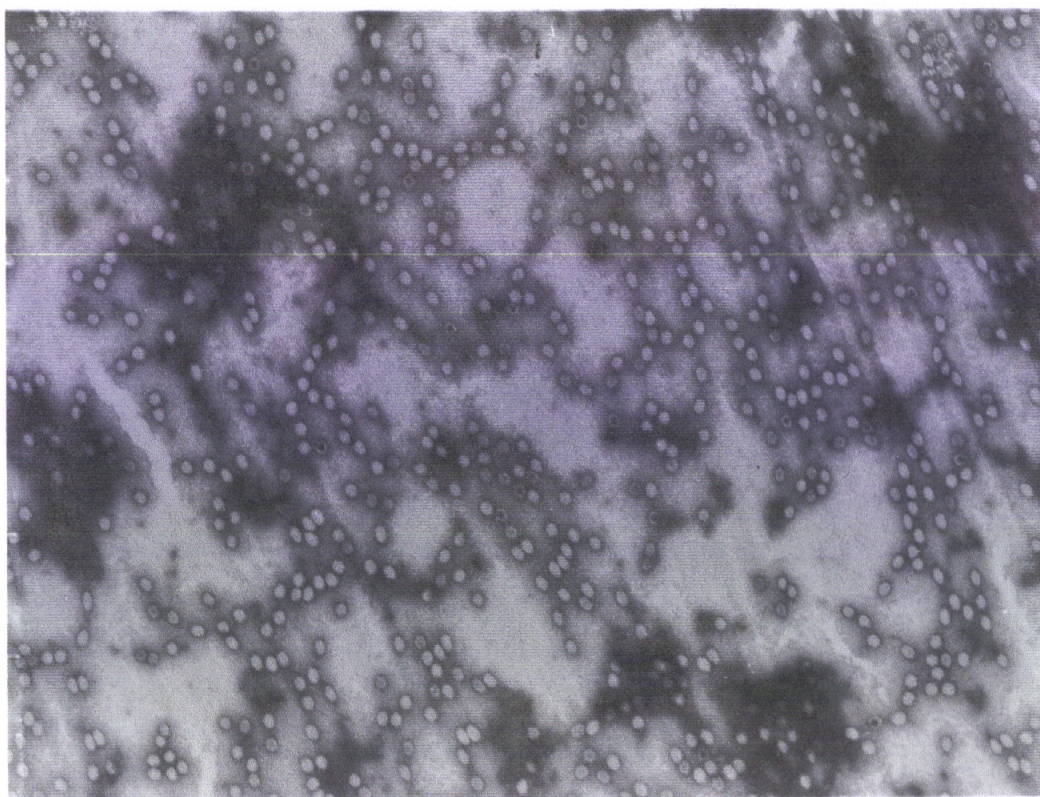


Figura 3 – Preparação purificada do isolado viral GP, observada ao microscópio electrónico. Ampliação: 100000 X.

2.3 Proteína da cápside viral

A análise electroforética, em gel de poliacrilamida, da proteína da cápside viral do isolado GP, revelou que a proteína é constituída apenas por um péptido, de massa molecular com cerca de 30 KDa (Figura 4).

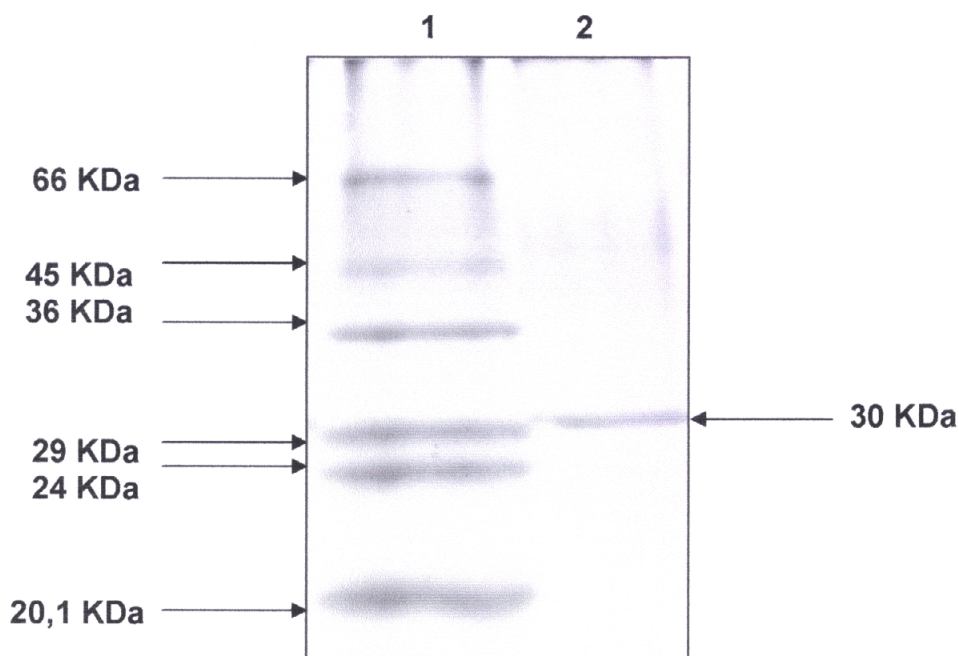


Figura 4 – Análise electroforética em SDS-PAGE da proteína da cápside viral, 1 – marcadores de massa molecular conhecida (KDa), indicada à esquerda e 2 – péptido do isolado viral GP com uma massa molecular de 30 KDa.

2.4 Caracterização do genoma viral

O ácido nucleico viral foi isolado a partir de preparações virais do isolado GP, com recurso à utilização do “Rneasy Mini Kit” (Qiagen), que revelou ser um bom método de extracção.

A análise electroforética da preparação obtida, em gel de agarose 1%, permitiu observar apenas uma banda com um tamanho de, aproximadamente, 3800 Kb (Figura 5).

O tratamento enzimático do ácido nucleico do isolado viral GP com a enzima RNase, resultou na sua total digestão, uma vez que não se observou qualquer “banda” no gel, o que indica que este ácido nucleico é constituído por RNA.

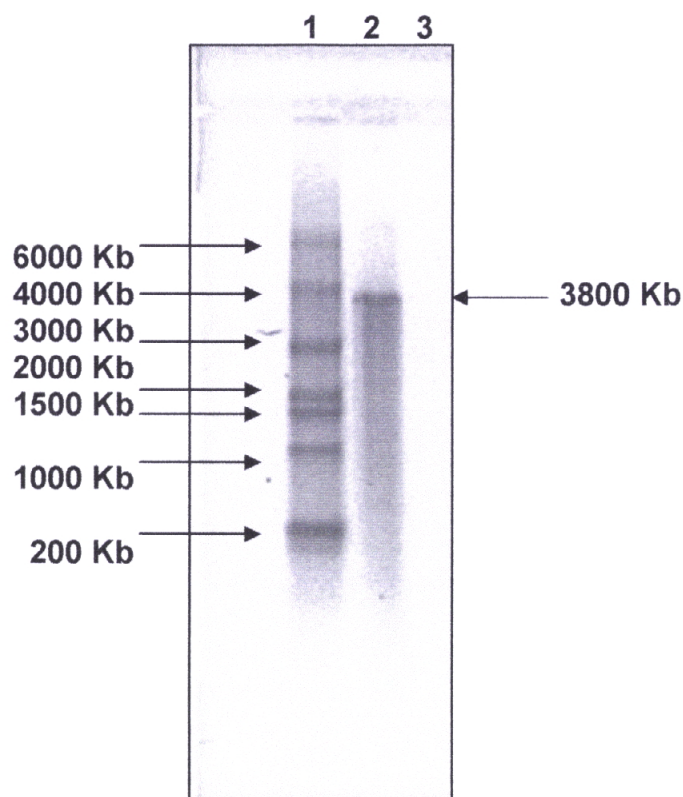


Figura 5 – Análise electroforética em gel de agarose 1% do ácido nucleico viral, **1** - marcadores com número de bases conhecidas, indicadas à esquerda; **2** – ácido nucleico viral do isolado GP, com 3800 Kb e **3** – preparação igual a 2, após tratamento enzimático com RNase.

2.5 Análise de dsRNA

A extracção dos dsRNA foi feita a partir de material vegetal fresco, de plantas da espécie *N. benthamiana* infectadas localmente com o isolado viral GP, de plantas *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral OLV-1 (que foi utilizado como marcador, uma vez que as suas massas moleculares eram conhecidas), e de plantas *N. benthamiana* saudáveis, que funcionaram como controlo negativo, uma vez que não deverão apresentar dsRNA.

A análise electroforética em gel de agarose 1% da fracção dos dsRNA, revelou a existência de 3 “bandas”, tanto para o isolado GP, como para o isolado OLV-1, correspondentes às formas replicativas (RF) dos vírus.

Por analogia, podemos verificar que o isolado GP apresenta, à semelhança do vírus OLV-1, massas moleculares de $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da, como é referido por Merciega *et al* (1996). Como era de prever, a análise

electroforética correspondente às plantas saudáveis não revelou qualquer “banda”. As “manchas” observadas no “poço” 1 são inespecíficas como se comprova com a ausência de “bandas” no “poço” 4 (Figura 6).

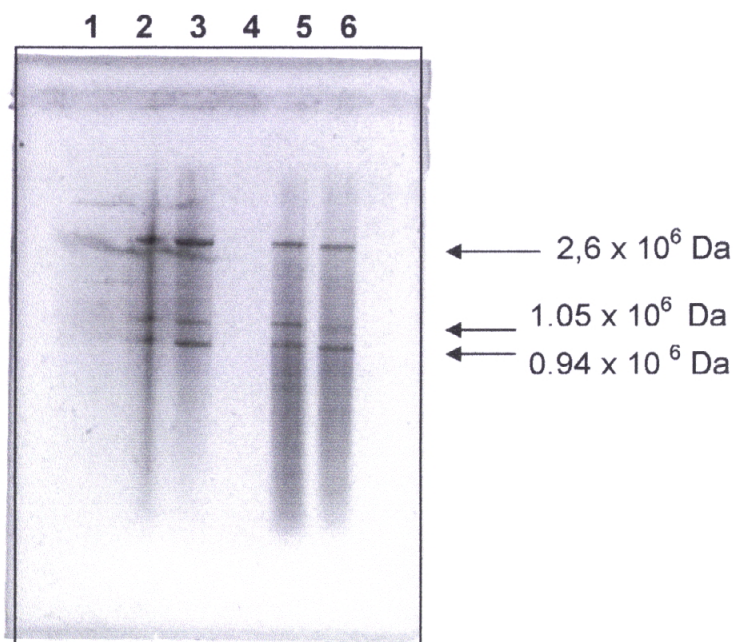


Figura 6 - Análise eletroforética em gel de agarose 1% dos dsRNA extraídos a partir de plantas de *N. benthamiana*, **1** - *N. benthamiana* saudável, **2** - *N. benthamiana* infectada com o vírus OLV1 (utilizado como marcador), **3** - *N. benthamiana* infectada com o isolado GP, **4** - *N. benthamiana* saudável após tratamento enzimático, **5** - *N. benthamiana* infectada com o vírus OLV1 após tratamento enzimático, **6** - *N. benthamiana* infectada com o isolado GP após tratamento enzimático. As massas moleculares dos dsRNA encontram-se indicadas à esquerda.

Em experiências anteriores a este trabalho, o isolado viral GP foi serologicamente identificado como sendo TNV, uma vez que reagia positivamente com anticorpos contra TNV, mas não com anticorpos específicos para o OLV-1 (Clara & Félix, 2000; Félix & Clara, 2002). Os estudos efectuados para a caracterização do isolado viral GP neste trabalho, estão de acordo com esta identificação, nomeadamente tendo em conta as massas moleculares do péptido da cápside viral e do RNA viral, que são idênticas às referidas por outros autores (Lesnaw & Reichmann, 1969; Kassanis, 1970; Condit & Fraenkel-Conrat, 1979; Uyemoto, 1981; Zhang, 1993).

3. Produção de anticorpos policlonais

Verificou-se que a administração, com intervalos de uma semana, de 3 injeções com 1 mg de vírus/2 ml de adjuvante incompleto de Freund (1:1, v/v), em coelho, permitiu obter cerca de 3ml de antisoro com 1,95 mg de imunoglobulinas/ml de antisoro. Este antisoro reagiu especificamente com o isolado viral GP, mas não com material vegetal são.

3.1 Utilização das IgG em testes DAS-ELISA

Para aferir qual a melhor concentração (diluição mais elevada que permita ainda detectar o isolado viral) para a utilização das IgG simples e das IgG conjugadas com a fosfatase alcalina, a usar em testes ELISA de diagnóstico, foi realizado um teste DAS-ELISA com várias concentrações, quer de IgG simples, quer de IgG conjugadas com fosfatase alcalina, utilizando plantas de *N. benthamiana* saudáveis e infectadas com o isolado viral GP (Figuras 1 e 7).

A leitura dos resultados do teste DAS-ELISA realizada visualmente, indicou que os melhores resultados eram obtidos para a concentração de 1/500, tanto para as IgG simples, como para as IgG conjugadas com a enzima. No entanto, após a leitura das reacções da placa do teste DAS-ELISA no espectrofotómetro, e da comparação dos valores resultantes de duas vezes a média da absorvância dos controlos negativos (Figura 9), com os valores da absorvância das amostras infectadas (Figura 8), verificou-se que o kit ELISA seria optimizado (diluições mais elevadas de IgG simples e conjugadas que ainda permitiam detectar o vírus), utilizando uma concentração de 1/1000 tanto para as IgG simples como para as IgG conjugadas, ou utilizando para as IgG simples uma concentração de 1/2000 e para as IgG conjugadas uma concentração de 1/500. Optou-se, no entanto, pelas concentrações de 1/2000 para as IgG simples e de 1/500 para as IgG conjugadas, pois a margem de segurança na detecção do isolado viral GP é mais elevada com estas concentrações (Figuras 7, 8 e 9).

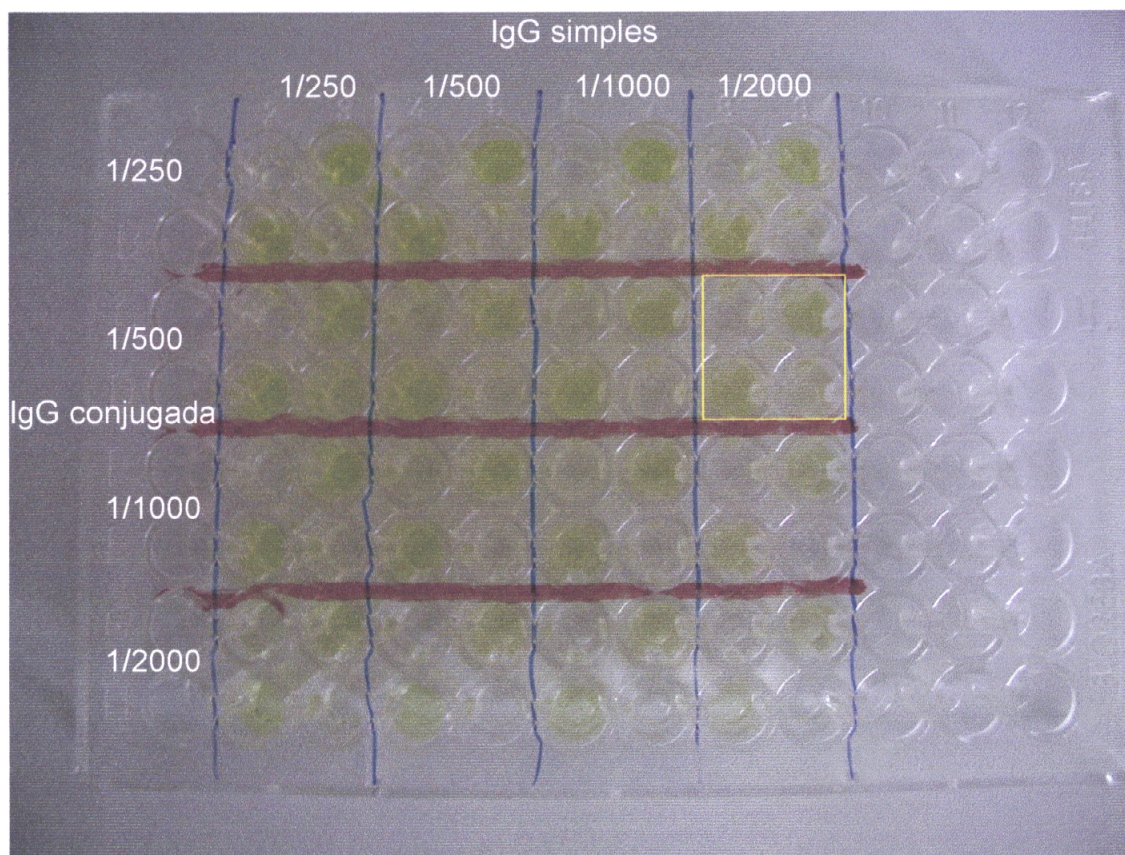


Figura 7 - Avaliação das concentrações de IgG utilizando *N. benthamiana* saudável e infectada pelo isolado viral GP.

		IgG simples												
		1/250		1/500		1/1000		1/2000						
IgG conjugada	1/250	A	0,053	0,169	3,291	0,142	2,533	0,186	2,171	0,194	1,371	0,057	0,079	0,060
		B	0,055	3,172	0,253	2,049	0,193	2,175	0,182	1,163	0,200	0,065	0,060	0,061
	1/500	C	0,057	0,188	1,592	0,251	1,336	0,203	1,067	0,193	0,734	0,060	0,058	0,062
		D	0,058	1,421	0,290	0,987	0,203	0,549	0,178	0,640	0,188	0,061	0,077	0,068
	1/1000	E	0,060	0,167	0,539	0,183	0,523	0,171	0,391	0,153	0,338	0,064	0,057	0,061
		F	0,055	0,636	0,183	0,571	0,154	0,456	0,157	0,253	0,150	0,058	0,057	0,054
	1/2000	G	0,077	0,183	0,337	0,155	0,425	0,157	0,325	0,152	0,274	0,062	0,059	0,056
		H	0,089	0,481	0,182	0,344	0,167	0,311	0,166	0,233	0,156	0,058	0,057	0,064

Figura 8 – Absorvância a 405 nm das reacções das amostras submetidas a teste ELISA (Figura 7),

- N. benthamiana* saudável,
- N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP,
- Ausência de extracto vegetal (branco).

		IgG simples								
		1/250		1/500		1/1000		1/2000		
		2	3	4	5	6	7	8	9	
IgG conjugada	1/250	A	0,422		0,335		0,368		0,394	
		B								
	1/500	C	0,478		0,454		0,381		0,381	
		D								
	1/1000	E	0,350		0,337		0,328		0,303	
		F								
	1/2000	G	0,365		0,322		0,323		0,308	
		H								

Figura 9 – Cálculo de duas vezes a média da absorvância dos controlos negativos (a 405 nm) das amostras submetidas ao teste ELISA (Figuras 7 e 8).

4. Aplicação dos métodos de diagnóstico: transmissão mecânica, DAS-ELISA e dsRNA ao material de *O. europaea L.* proveniente do campo

4.1 Transmissão mecânica

A inoculação mecânica dos frutos (azeitonas) das 4 amostras testadas, em plantas de *N. benthamiana* e *C. quinoa* não revelaram qualquer tipo de sintomatologia que indicasse a presença do isolado viral GP. Confirmou-se que o vírus não se encontrava em estado latente nas plantas referidas, uma vez que após inoculação mecânica em plantas jovens de *N. benthamiana* (por serem bastantes sensíveis à infecção viral) não se verificavam quaisquer sintomas, apesar de estudos anteriores, como já foi referido, terem confirmado a infecção destas 4 amostras pelo vírus TNV.

Uma das condicionantes do sucesso deste teste é o vírus ter que ser transmitido mecanicamente, premissa que já tinha sido confirmada aquando do estudo da gama de hospedeiros. Pensa-se, que o facto da inoculação mecânica não ter permitido identificar qualquer sintomatologia sugestiva da presença de vírus, se deve: i) ao facto da distribuição dos vírus na árvore não ser uniforme e como consequência os frutos testados não estarem infectados, ii) talvez o vírus presente nas amostras seja de uma estirpe diferente para o

qual foi produzido o anticorpo, ou iii) seja necessário alterar a metodologia do teste de forma a optimizá-lo para tecidos de oliveira.

4.2 ELISA

No teste DAS-ELISA utilizaram-se os anticorpos produzidos como descrito no ponto 4 do capítulo Materiais e Métodos. Para a realização do teste, utilizou-se tanto para as IgG simples, como para as conjugadas uma concentração de 1/500, de acordo com os resultados visuais obtidos em 3.1. Apesar das leituras posteriores realizadas no espectrofotómetro indicarem diluições de IgG simples e IgG conjugadas mais elevadas capazes de detectar o isolado viral GP, optou-se por manter a concentração de 1/500, uma vez que no material de campo, as concentrações de vírus podem ser muito reduzidas.

O teste foi realizado aos frutos (azeitonas) e raminhos das 4 oliveiras em estudo (armazenados cerca de duas semanas no frigorífico após a colheita) e também não se obtiveram resultados positivos, à excepção dos controlos positivos (plantas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral GP), uma vez que a absorvância das 4 amostras dos frutos foi sempre inferior a 0,295 (duas vezes a média da absorvância dos controlos negativos) e a absorvância das 4 amostras dos raminhos foi também sempre inferior a 0,274 (duas vezes a média da absorvância dos controlos negativos) (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Sabendo, de resultados anteriores a este trabalho que as 4 amostras estão infectadas com o vírus TNV, pensa-se que os resultados negativos obtidos neste teste para a presença do isolado viral GP poderão dever-se i) ao facto da distribuição viral nas plantas não ser homogénea, ii) possivelmente à baixa concentração de vírus nas amostras, o que não permitiu a detecção do isolado viral, apesar da sensibilidade deste teste, iii) degradação do vírus durante o tempo de armazenamento no frigorífico, iv) possivelmente à presença nos tecidos vegetais de substâncias inibidoras que não permitiram a detecção do vírus, v) ou o TNV presente nas plantas seria de uma estirpe diferente da do isolado viral GP, para o qual foram produzidos os anticorpos. Por outro lado,

poderá acontecer que o teste necessite de ser melhor adaptado à condição dos tecidos de oliveira, nomeadamente testando diferentes tempos de extracção e de incubação.

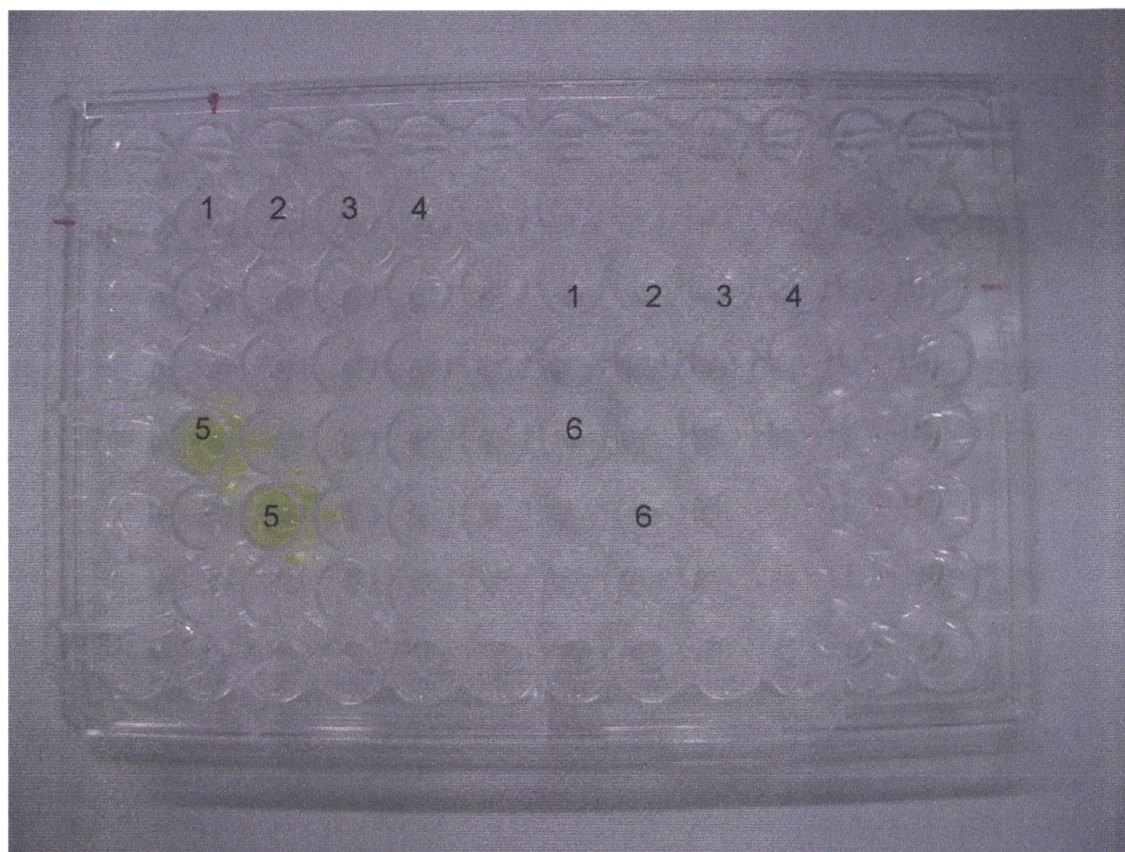


Figura 10 - Teste DAS-ELISA aplicado aos frutos. **1** - Verdeal Alentejana, Árvore 4; **2** - Verdeal Alentejana, Árvore 6; **3** - Verdeal Alentejana, Árvore 8; **4** - Verdeal Alentejana, Árvore 10; **5** - *N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP e **6** - *N. benthamiana* saudável. Os restantes alvéolos continham outras amostras, não relevantes para este trabalho.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,044	0,043	0,043	0,044	0,043	0,044	0,043	0,046	0,045	0,041	0,044	0,045
B	0,048	0,141	0,149	0,147	0,146	0,044	0,045	0,042	0,044	0,043	0,042	0,043
C	0,042	0,046	0,047	0,047	0,046	0,046	0,148	0,143	0,150	0,144	0,040	0,042
D	0,045	0,045	0,049	0,056	0,048	0,046	0,044	0,046	0,044	0,043	0,046	0,046
E	0,047	0,522	0,055	0,061	0,048	0,047	0,147	0,044	0,044	0,041	0,091	0,046
F	0,050	0,045	0,367	0,047	0,046	0,045	0,044	0,148	0,059	0,042	0,042	0,048
G	0,045	0,045	0,044	0,050	0,045	0,046	0,046	0,047	0,043	0,042	0,043	0,046
H	0,048	0,055	0,044	0,045	0,052	0,041	0,045	0,044	0,042	0,043	0,041	0,043

Figura 11 – Absorvância a 405 nm das reacções das amostras submetidas a teste ELISA (Figura 10),

- N. benthamiana* saudável,
- N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP.
- 4 amostras testadas (ver identificação no texto).

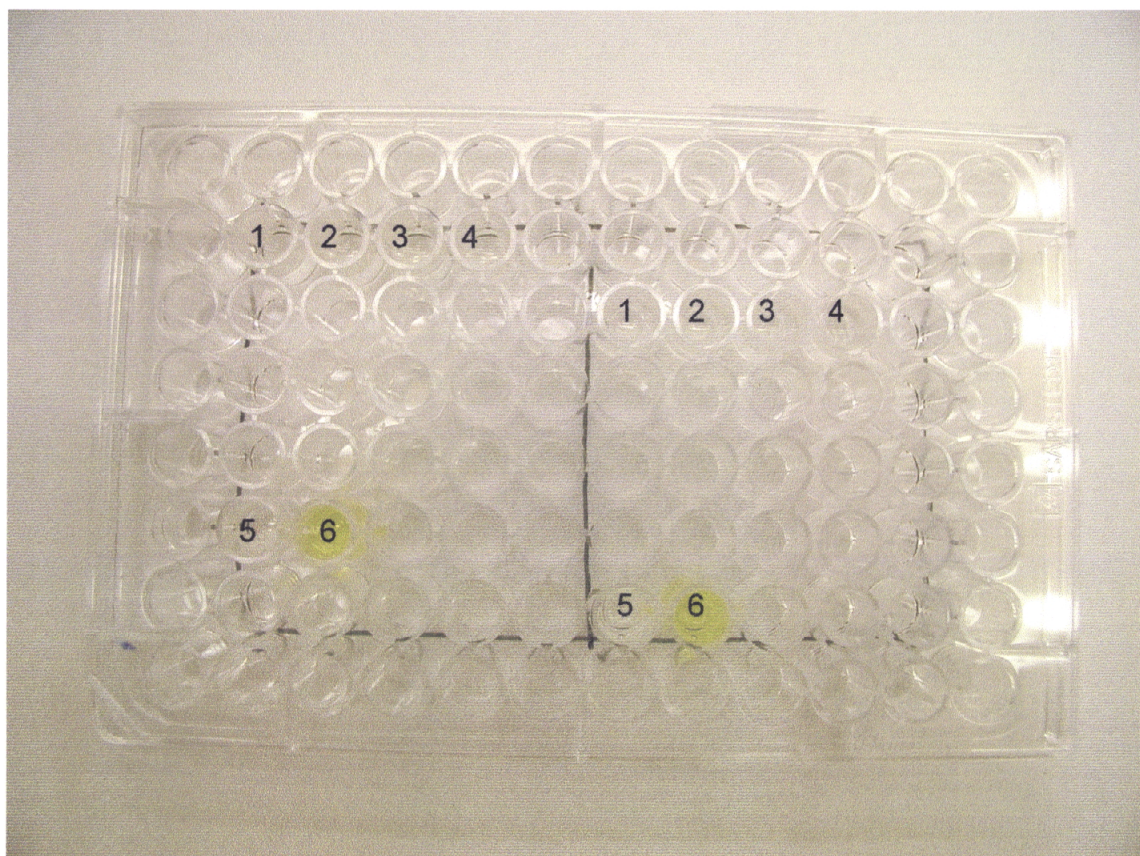


Figura 12 - Teste DAS-ELISA aplicado aos raminhos. **1** - Verdeal Alentejana, Árvore 4; **2** - Verdeal Alentejana, Árvore 6; **3** - Verdeal Alentejana, Árvore 8; **4** - Verdeal Alentejana, Árvore 10; **5** - *N. benthamiana* saudável e **6** - *N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP. Os restantes alvéolos continham outras amostras, não relevantes para este trabalho.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,040	0,042	0,036	0,042	0,040	0,043	0,041	0,042	0,041	0,040	0,042
B	0,050	0,143	0,148	0,150	0,144	0,041	0,043	0,041	0,042	0,041	0,041	0,042
C	0,042	0,044	0,042	0,042	0,041	0,041	0,147	0,146	0,150	0,145	0,040	0,043
D	0,041	0,047	0,040	0,043	0,041	0,041	0,043	0,043	0,043	0,048	0,042	0,040
E	0,042	0,041	0,043	0,042	0,041	0,042	0,040	0,046	0,040	0,041	0,047	0,041
F	0,041	0,136	0,301	0,043	0,042	0,041	0,042	0,045	0,044	0,049	0,043	0,042
G	0,061	0,045	0,042	0,045	0,041	0,039	0,138	0,297	0,041	0,041	0,040	0,039
H	0,092	0,054	0,053	0,040	0,047	0,041	0,040	0,040	0,042	0,039	0,040	0,042

Figura 13 - Absorvância a 405 nm das reacções das amostras submetidas a teste ELISA (Fig. 12),

- N. benthamiana* saudável,
- N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP,
- 4 amostras testadas (ver identificação no texto).

4.3 Análise de dsRNA

O método de diagnóstico, com recurso ao isolamento de dsRNA, foi realizado a partir de material vegetal fresco, nomeadamente dos raminhos das 4 oliveiras testadas (armazenadas cerca de 2 semanas no frigorífico após a colheita), e, como controlos, foram utilizadas plantas de *N. benthamiana* infectadas localmente com o isolado viral GP e plantas saudáveis.

A análise electroforética em gel de poliacrilamida a 6%, da fracção dos dsRNA, das 4 amostras testadas, revelou a existência de 2 “bandas”, correspondentes à forma replicativa (RF) do vírus. Comparando estes resultados com os obtidos em 2.5, verifica-se que a “banda” correspondente à massa molecular mais elevada não é aqui claramente visível, embora talvez seja perceptível muito perto do topo do gel nos “poços” 1, 3 e 4 (Figura 14). Possivelmente, as 5 horas da electroforese não foram suficientes para separar todos os dsRNA ou, talvez o vírus em oliveira só apresente 2 dsRNA.

Não foi possível determinar a massa molecular das “bandas” visualizadas no gel, pois pensa-se que a quantidade de vírus presente no “poço” 6 seria muito elevada, e por isso, não foi possível separar de forma perceptível as “bandas” correspondentes aos dsRNA dos extractos de plantas infectadas com o isolado GP, que funcionariam como marcadores. No entanto, por comparação com os resultados obtidos em 2.5, e sabendo que as 4 amostras testadas encontravam-se infectadas com TNV, poder-se-à colocar em hipótese que as 2 “bandas” possuam massas moleculares de $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da, e que a eventual “banda” situada perto do topo do gel possua $2,6 \times 10^6$ Da.

Deve salientar-se o facto das bandas serem muito finas, o que sugere uma baixa concentração de vírus nas amostras, apesar da quantidade de material vegetal inicial (10 g) ter sido aumentada em relação às quantidades inicialmente utilizadas (5 g). A análise electroforética de preparações semelhantes, correspondentes às plantas saudáveis, não revelou qualquer banda, como se previa (Figura 14).

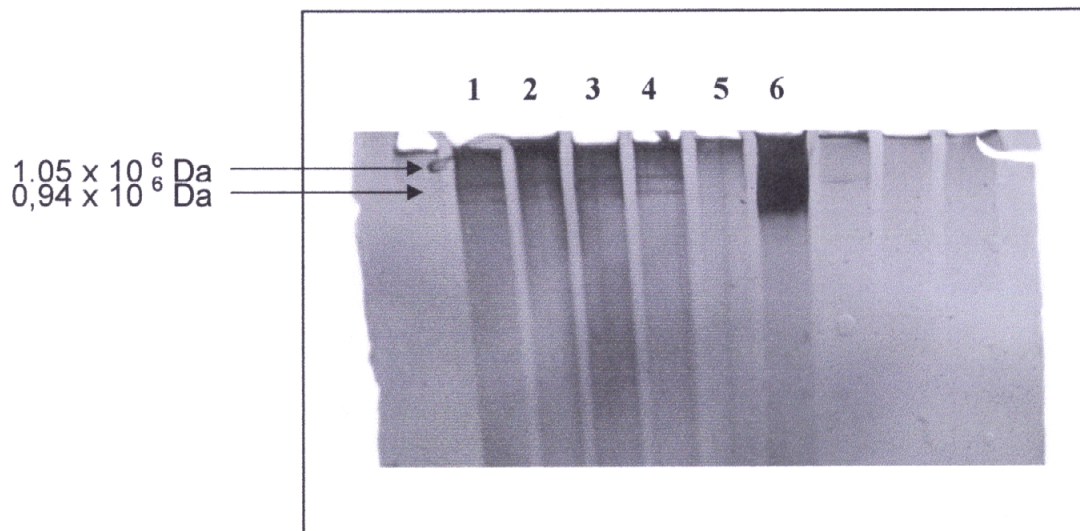


Figura 14 - Análise electroforética em gel de poliacrilamida 6% dos dsRNA. **1** – Verdeal Alentejana, árvore 8; **2**- Verdeal Alentejana, árvore 10; **3** - Verdeal Alentejana, árvore 4; **4** - Verdeal Alentejana, árvore 6; **5** – *N. benthamiana* saudável e **6** – *N. benthamiana* infectada com o isolado viral GP (marcador).

A dificuldade na interpretação dos resultados atrás referidos, estão com toda a certeza, também dependentes dos problemas técnicos verificados com a corrente eléctrica do Laboratório de Sanidade Vegetal. Como consequência deste facto, e apesar das inúmeras repetições desta metodologia, não foi possível apresentar em tempo útil o gel de poliacrilamida 6% da fracção dos dsRNA após o tratamento enzimático com DNase, RNase e proteinase K, realizado às preparações de dsRNA das 4 amostras de oliveira.

5. Gestão ambiental

Quando se fala de gestão ambiental, normalmente não se associa esta designação à área da agricultura e muito menos à olivicultura. Fala-se de sustentabilidade, de olival ecológico ou biológico, mas de uma maneira ainda bastante vaga em Portugal, o que parece estranho, uma vez que o azeite e a azeitona desempenham um papel de grande importância na economia da UE, bem como no contexto mundial, e Portugal é também um dos principais países produtores e consumidores de azeite (Tió, 1998).

É sabido que não existe no nosso país um regulamento específico para a oliveira, como já acontece por exemplo em Espanha (Pastor *et al*, 1999) ou em Itália. No entanto, com a entrada do ambiente na agricultura, a EU, nomeadamente ao nível da PAC criou algumas directivas para a protecção do meio ambiente nas actividades agrícolas. Destacam-se a directiva nº 91/676/CEE que visa minimizar os riscos de poluição da água devido às actividades agrícolas, e o Regulamento CE nº 1257/1999 que foi transposto para Portugal e aprovado na portaria nº 1212/2003 e que actualmente define o Plano de Desenvolvimento Rural (Ruris) cujo objectivo é atribuir incentivos financeiros, neste caso concreto para a conservação do olival. Também as técnicas culturais e os fitofármacos permitidos para esta cultura estão definidos no regulamento CEE nº 2092/91.

O olival é um ecossistema complexo e, por isso, relativamente estável na maior parte da bacia mediterrânea, facto que pode hoje ser considerado como uma vantagem que merece ser conservada (Crovetti, 1998), e é por isso urgente criar um documento legal em Portugal, específico para a oliveira onde seja contemplada toda a informação dispersa noutros documentos legais, bem como informação resultante da investigação científica que defina as regras necessárias para efectuar uma boa gestão ambiental do olival. Deverão ser contempladas áreas como as condições de instalação do novo olival, os tipos de fertilizantes permitidos, a protecção fitossanitária, etc, sempre numa perspectiva de boa gestão ambiental.

De acordo com a Agencia Europeia do Ambiente (EAA) os principais problemas que derivam da agricultura convencional são a erosão/degradação dos solos; a contaminação das águas por sedimentos; fertilizantes e fitossanitários; a diminuição da biodiversidade e as emissões supérfluas de CO₂ (s/ autor, 2001).

O que acontece em várias culturas, assim como no olival, é que os sintomas provocados pela presença de vírus são muitas vezes confundidos com carências de nutrientes. Desta forma, sem um estudo profundo sobre a origem dos sintomas continuam a introduzir-se na natureza nutrientes e fertilizantes em excesso, e com resultados insuficientes uma vez que a causa real do problema não está a ser resolvida. Também a produção em algumas situações

é baixa, e não se conhecem razões aparentes para que tal aconteça. No entanto, é hoje mais ou menos consensual que a presença de vírus afecta o vigor e o rendimento da árvore. Por isso, várias têm sido as directivas comunitárias (Directiva do Conselho 92/34/CEE, Directiva da Comissão 93/48, Directiva da Comissão 93/79/CEE) no domínio do estado sanitário do material de propagação de oliveira para comercialização. Em Portugal, a portaria nº 106/96 transcreve as referidas directivas e estabelece os parâmetros de sanidade que o material deve possuir para ser comercializado, onde entre outros aspectos se refere que a oliveira está sujeita a testes para todo o tipo de vírus.

Deste modo, o estudo realizado neste trabalho sobre o vírus TNV permitirá de acordo com as normas comunitárias, contribuir para o desenvolvimento dos planos de selecção fitossanitária de oliveira, nomeadamente na área da virologia, que estão em curso no nosso país. A par disto, a selecção de clones saudáveis permitirá realizar uma melhor gestão ao nível ambiental da dispersão dos vírus em oliveira e, eventualmente, noutras culturas, para que mais tarde não tenham que ser tratados através de produtos químicos, implicando um gasto adicional para o produtor, com o prejuízo da gestão ambiental nomeadamente ao nível do ecossistema provocando a consequente poluição das águas superficiais e subterrâneas, poluição do ar, degradação do solo, assoreamento de cursos de água, alteração da paisagem rural (Dias, 2000) e diminuição da biodiversidade com ameaças de extinção de muitas espécies faunísticas e florísticas (Dias, 2000). Para além disso, um mercado gradualmente mais exigente no que respeita à qualidade do azeite e que leva hoje em consideração aspectos de saúde, de higiene e ecológicos, requer um esforço constante dos agricultores para a redução de tratamentos químicos e a optimização das práticas e dos processos agronómicos (Crovetti, 1998).

Como consequência deste facto, e atendendo a que Portugal apresenta boas condições edafo-climáticas para o desenvolvimento da oliveira, é esperado que haja um incremento na plantação de novos olivais, o que implicará um desenvolvimento de todas as actividades que lhe estão associadas, que logicamente se traduzirá em melhorias económicas para os que mais

directamente dependem destas actividades, e, por inerência desenvolvimento económico do país.

Conclusões Gerais

Os estudos realizados sobre o isolado viral GP, originalmente obtido de uma oliveira da cultivar Galega, permitiram concluir que:

i) O isolado viral GP é transmissível mecanicamente, apresentando uma gama de hospedeiros bastante diversificada, onde se incluem plantas das famílias das *Chenopodiaceae* e *Solanaceae*, entre outras. Provoca essencialmente sintomas locais nas plantas herbáceas que infecta, à excepção da *N. benthamiana* onde, ocasionalmente, provoca infecções sistémicas.

As inoculações mecânicas realizadas a partir de azeitonas provenientes das 4 oliveiras testadas, que em estudos anteriores a este trabalho revelaram estar infectadas com TNV, não revelaram quaisquer sintomas sugestivos da presença de vírus nas plantas inoculadas. Sugere-se a) que este teste volte a ser repetido utilizando maior variedade de espécies indicadoras, b) para além das azeitonas deveria testar-se outro tipo de material vegetal como por exemplo folhas ou raminhos, c) e a metodologia aplicada deve talvez ser melhor adaptada a material lenhoso;

ii) Verificou-se que, partindo da mesma quantidade inicial de material vegetal (sensivelmente com a mesma intensidade de sintomas) o método indicado por Merciega *et al* (1996) que incluía uma fase de precipitação viral com PEG, foi o que permitiu obter maior quantidade de vírus purificado, em contraste com o método de Dijkstra & Jager (1998) que utilizava um tampão de extracção com alto pH, e do método de Zhang *et al* (1993), baseado essencialmente em ciclos de centrifugação diferencial;

iii) O isolado viral GP observado ao microscópio electrónico apresentou partículas isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro como referido por Uyemoto, 1981;

- iv) A sua cápside proteica apresenta um único péptido com peso molecular de 30 KDa, como referido por Lesnaw & Reichmann (1969) e Condit & Fraenkel-Conrat (1979) para o vírus TNV;
- v) O seu genoma é constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples com um tamanho de 3800 Kb como referido por Kassanis (1970); Uyemoto (1981); e Zhang (1993);
- vi) Em experiências anteriores a este trabalho, o isolado viral GP foi serologicamente identificado como sendo *Tobacco Necrosis Virus*. Os estudos efectuados para a caracterização do isolado viral GP neste trabalho, estão de acordo com esta identificação;
- vii) O perfil electroforético dos dsRNA, isolados de hospedeiros herbáceos infectados com GP, apresentou três espécies com pesos moleculares de $2,6 \times 10^6$ Da; $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da. A molécula com peso molecular mais elevado ($2,6 \times 10^6$ Da) corresponde ao dsRNA resultante da replicação do RNA genómico, os dsRNA com pesos moleculares de $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da correspondem à replicação de RNAs sub-genómicos (Regenmortel *et al*, 2000). A análise electroforética dos dsRNA, das 4 amostras de oliveira testadas, revelou a existência de 2 “bandas”, que supostamente apresentam massas moleculares de $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da, correspondentes à replicação dos RNA sub-genómicos. Devido aos problemas técnicos atrás referidos, estes resultados não puderam ser confirmados, pelo que se sugere a repetição deste teste aumentando as quantidades de material vegetal inicial. Ainda assim, este método apresenta por si só, e quando comparado com o da inoculação mecânica e com os testes ELISA, um elevado potencial no diagnóstico viral de oliveira que deve ser desenvolvido;
- viii) Foram produzidos para o isolado viral GP anticorpos policlonais, para os quais foi visualmente definida a concentração óptima, a utilizar em testes ELISA, de 1/500, tanto para as IgG simples, como para as IgG conjugadas com a enzima. As leituras realizadas no espectrofotómetro, mais rigorosas, indicaram como concentrações ideais 1/2000 para os anticorpos simples, e 1/500 para os anticorpos conjugados, por serem as diluições mais elevadas

que permitiam fazer a detecção do isolado viral GP. Contudo, mesmo aplicando a concentração de 1/500, em testes ELISA; às amostras de frutos e raminhos provenientes do campo não se obtiveram resultados positivos.

Não foi possível otimizar este método para a detecção do isolado viral GP em tecidos de oliveira infectados com TNV por impossibilidade de se dispor de mais material vegetal. No entanto, estes testes deverão ser repetidos e otimizados para oliveira, variando os tampões ou as condições do teste. Eventualmente, poder-se-à testar para além de frutos e raminhos também as folhas de oliveira.

Os anticorpos produzidos são específicos para o TNV e poderão ser utilizados em estudos posteriores a) para identificar TNV em plantas herbáceas infectadas, b) para identificar isolados purificados desconhecidos, e c) serem usados em estudos sobre a epidemiologia e a difusão geográfica do isolado viral GP.

Num sentido mais lato, este trabalho permitirá de acordo com as normas comunitárias, contribuir para o desenvolvimento dos planos de selecção fitossanitária de oliveira, nomeadamente na área da virologia, que estão em curso no nosso país. A par disto, a selecção de clones saudáveis permitirá realizar uma melhor gestão ao nível ambiental da dispersão dos vírus em oliveira e, eventualmente, noutras culturas. Como consequência deste facto, e atendendo a que Portugal apresenta boas condições edafo-climáticas para o desenvolvimento da oliveira, é esperado que haja um incremento na plantação de novos olivais, o que implicará um desenvolvimento de todas as actividades que lhe estão associadas, que logicamente se traduzirá em melhorias económicas para os que mais directamente dependem destas actividades, e, por inerência desenvolvimento económico do país. Os estudos realizados neste trabalho poderão ser ainda uma mais valia, caso Portugal venha a elaborar nova legislação dedicada exclusivamente à oliveira, como já acontece noutros países da EU.

Bibliografia

- **S/ autor**, 2001 – Agricultura de Conservación en el Olivar: cubiertas vegetales. Asociación Española Agricultura de Conservación/Suelos Vivos. Pp. 36.
- **S/ autor**, 2001 – Agro-meteorologia (2ª edição). Grupo Mundi-Prensa. Pp. 517.
- **S/ autor**, 2001 – A PAC e o ambiente. Newsletter 34.
- **Agrios, G.N.** (1997) Plant Pathology. Fourth edition. Academic Press. Pp. 635.
- **Alcobia, Dulce**, 2003 – Conversão do olival à agricultura biológica na terra quente transmontana – uma questão de sustentabilidade. A joaninha 72:22-24.
- **Alves, A. A. Monteiro**; 1995 – Agricultura sustentável. Colóquio/Ciências 17:86-94.
- **Andriessen, M.; Meulewaeter, F. & Cornelissen, M.** (1995) Expression of tobacco necrosis virus open reading frames 1 and 2 is sufficient for the replication of satellite tobacco necrosis virus. Virology 212: 222-224.
- **Azevedo, João**; 1999 – Utilização de princípios e métodos da ecologia da paisagem em ordenamento florestal. Revista florestal 1/2 vol.XII:112-118.
- **Ball, E.M.; Hampton, R.O.; Boer, S.H. & Schaad, N.W.** (1990) Polyclonal antibodies. In: Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens. Hampton, R; Ball, E. & Boer, S. (Eds). The American Phytopathological Society. Pp. 33-54.

-
- **Bar-Joseph, M.;** Moscovitz, M. & Sharafi, Y. (1979) Reuse of coated Enzime-Linked Immunosorbent Assay plates. *Phytopathology* 69(4):424-426.

 - **Bar-Joseph, M.;** Rosner, A.; Moscovitz, M. & Hull, R. (1983) A simple procedure for the extraction of double-stranded RNA from virus-infected plants. *Journal of Virological Methods* 6:1-8.

 - **Barba, M.** (1993) Virus and virus-like diseases of olive. *Bulletin OEPP/EPPO* 23:493-497.

 - **Barba, M. & Mainolfi** (1996) Certificazione volontaria del materiale di propagazione dell' olivo. *L' Informatore Agrario* 11:65-67.

 - **Barbara, D.J. & Clark, M.F.** (1986) Immunoassays in plant pathology. In: *Immunology in plant science*. Eds. Trevor Wang & John Innes. Cambridge University Press. Pp.: 197-223.

 - **Belin, C.;** Schmitt, C.; Demangeat, G.; Komar, V.; Pinck, L. & Fuchs, M. (2001) Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology* 291 (1): 161-171.

 - **Bertolini, E.;** Fadda, Z.; Garcia, F.; Celada, B.; Olmos, A.; Gorris, M.T.; Del Rio, C.; Caballero, J.; Duran-Vila, N. & Cambra, M. (1998) Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma* 102: 191-193.

 - **Bos, L.** (1999) Serology and electron microscopy. In: *Plant viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology*. Backhuys Publishers, Leiden. Pp. 358.

 - **Brown, D.J.F. & Trudgill, D.L.** (1997) Longidorid nematodes and their associated viruses. In: *An introduction to virus vector nematodes and their*

associated viruses. Santos, M.S.N.A.; Abrantes, I.M.O.; Brown, D.J.F. & Lemos, R.M. (Eds). Instituto do Ambiente e da Vida. Pp. 1-40.

- **Caldas**, Leonor Castro & Cary, Francisco; 2001 – Política Agrícola, Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Espaço Rural 23:18-21.
- **Candresse**, T. (1995) Recent developments in plant viruses detection. Acta Horticulturae 386:601-605.
- **Clara**, M.I.E. (1998) As viroses em *Olea europaea* L.: diagnóstico, dispersão, importância e estratégias para a protecção da cultura. Revista de Ciências Agrárias XXI(1, 2, 3, e 4):271-277.
- **Clara**, M.I.E.; Rei, F.T.; Félix, M.R.; Leitão, J.F. & Potes, M.F. (1997) Virosis que afectan a *Olea europaea* L. y técnicas de diagnóstico. Olivae 66: 56-60.
- **Clara**, M.I.E. & Félix, M.R (2000) Características de isolados de 'Tobacco Necrosis Necrovirus' de duas cultivares de *Olea europaea* L.. Brazilian Journal of Morphological Sciences 17(supl.):69.
- **Clark**, M.F. (1981) Immunosorbent assays in plant pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83-106.
- **Clark**, M.F & Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of Enzime-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34:475-483.
- **Comunicação da Comissão ao Conselho nº 99**, Jornal Oficial nº C 173 de 19 de Junho de 1999.
- **Condit**, C. & Fraenkel-Conrat, H. (1979) Isolation of replicative forms of 3' terminal subgenomic RNAs of Tobacco Necrosis Virus. Virology 97:122-130.

- **Converse, R.H.** (1978) Detection of tomato ringspot virus in red raspberry by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Disease Reporter* 62(3):189-192.
- **Converse, R.H. & Martin, R.R.** (1990) ELISA methods for plant viruses. In: *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. Hampton, R; Ball, E. & Boer, S. (Eds). The American Phytopathological Society. Pp. 179-196.
- **Coutts, R.H.A.; Rigden, J.E.; Slabas, A.R.; Lomonossoff, G.P. & Wise, P.J.** (1991) The complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain D. *Journal of General Virology* 72:1521-1529.
- **Crovetti, Antonello**, 1998 – Protecção das plantas – Desenvolvimento de metodologias e protecção da produção e do ambiente. . *In: Enciclopédia Mundial da Oliveira*. Plaza & Janés editores, AS – Conselho Oleícola Internacional. Pp. 239.
- **Cuenca, Antonio Delgado & Aguilar, Maria José Cuesta**, 1997 – La cobertura vegetal en el olivar. Um método de producción agroecológico. *Fruticultura profesional* 89:21-33.
- **Decreto-Lei nº 277/91**, Diário da República nº 181 de 8 de Agosto de 1991 – I Série.
- **Decreto-Lei nº 33/93**, Diário da República nº 36 de 12 de Fevereiro de 1993 – I Série.
- **Dias, José C. Soveral**, 2000 – Zonas vulneráveis e boas práticas agrícolas. *Gazeta das aldeias* Jan. Fev. Mar.:12-19.
- **Dijkstra, J. & Jager, C.P.** (1998) *Practical plant virology – Protocols and exercises*. Ed. Springer. Pp. 459.

- **Directiva do Conselho 77/93/CEE**, Jornal Oficial nº L 026 de 31 de Janeiro de 1977.
- **Directiva do Conselho 91//676/CEE**, Jornal Oficial nº L 375 de 31 de Dezembro de 1991.
- **Directiva do Conselho 92/34/CEE**, Jornal Oficial nº L 152 de 10 de Junho de 1992.
- **Directiva da Comissão 93/48/CEE**, Jornal Oficial nº L 250 de 7 de Outubro de 1993.
- **Directiva da Comissão 93/79/CEE**, Jornal Oficial nº L 256 de 14 de Outubro de 1993.
- **Divisão de valorização do ambiente natural e do património cultural, s/ data** – Medidas Agro-Ambientais aplicáveis no âmbito do plano de desenvolvimento rural – Ruris. Direcção Geral de Desenvolvimento rural. Pp. 75.
- **Dodds, J.A.** (1986) The potential for using double-stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. In: Developments and applications in testing. Jones, R.A.C. & Torrance, L. (Eds). Association of Applied Biologists, Wells Bourne, Warwick, England. Pp. 71-86.
- **Dodds, J.A.; Morris, T.J. & Jordan, R.L.** (1984) Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 151-168.
- **Engvall, E. & Perlmann, P.** (1972) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. III: Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *The Journal of Immunology* 109(1):129-135.

- **Félix, M.R.F.** (1995) Imunodiagnóstico de closterovírus associados à doença do enrolamento foliar da videira. Tese de licenciatura em Engenharia Agrícola. Universidade de Évora. Évora (Portugal). Pp. 106.
- **Félix, M.R.F.** (1998) Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L. na perspectiva de programas de selecção sanitária da oliveira. Tese de Mestrado em Melhoramento de Plantas. Universidade de Évora. Évora (Portugal), Pp. 57.
- **Félix, M.R.F. & Clara, M.I.E.** (2001) Detection of Tobacco necrosis virus and of *Olpidium brassicae* in *Olea europaea* L. in the soil and in field trees. Proceedings of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia: 40-42.
- **Félix, M.R.F.; Louro, T.M.; Clara, M.I.E.; Leitão, F. & Serrano, J.** (2001) Preparation and application of an ELISA kit to identify Olive latent virus 1 isolates obtained from *Olea europaea* L. cultivars grown in Portugal. Proceedings of 11th Congress of Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia: 214-216.
- **Félix, M.R.F. & Clara, M.I.E.** (2002) Two necrovirus isolates with properties of Olive latent virus 1 and of Tobacco necrosis virus from Olive in Portugal. *Acta Horticulturae* 586:725-728.
- **Félix, M.R.F.; Clara, M.I.E.; Leitão, F.A. & Serrano, J.M.F.** (2002) Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. *Acta Horticulturae* 586:721-724.
- **Ferreira, Jorge C. & Strech, António,** 1999 – Fertilização do olival em agricultura biológica (Fichas técnicas AGROBIO). Olival - nº 2.
- **Gallitelli, D. & Savino, V.** (1985) Olive latent virus-1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Ann. Appl. Biol.* 106:295-303.

- **Grieco, F.; Alkowni, R.; Saponari, M.; Savino, V. & Martelli, G.P. (2002)** Molecular detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO* 30: 469-473.
- **Grieco, F.; Alkowni, R.; Saponari, M.; Pantaleo, V.; Savino, V. & Martelli, G.P. (2002)** Molecular detection of olive-infecting viruses. *Acta Horticulturae* 586:737-740.
- **Grieco, F.; Martelli, G.P. & Savino, V. (1995)** The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of olive latent virus 2. *Journal of General Virology* 76:929-937.
- **Grieco, F.; Saponari, M.; Alkowni, R.; Savino, V.; Martelli, G.P. & Garau, R. (2000)** Progressi nella diagnosi dei virus dell'olivo. *Informatore Fitopatologico* 11:49-52.
- **Grieco, F.; Savino, V. & Martelli, G.P. (1996)** Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of olive latent virus 1. *Arch. Virol.* 141:825-838.
- **Harrison, B.D. (1977)** Ecology and control of viruses with soil-inhabiting vectors. *Ann. Rev. Phytopathol.* 15:331-360.
- **Henriques, António Gonçalves, 2002** – Cimeira de Joanes. *Ambiente* 21 6(ano I):21-23.
- **Henriques, M.I.E.C. (1994)** Virus diseases of olive: An overlook. *Acta Horticulturae* 356:379-385.
- **Henriques, M.I.E.C.; Leitão, F.; Potes, M.F. & Serrano, J.F. (1990)** Vírus detectados em *Olea europaea* L. I Congresso de Ciências Hortícolas (Comunicação oral).
- **Henriques, M.I.E.C.; Rei, F.T. & Leitão, F. (1993)** A aplicação da técnica ELISA para detecção do nepovirus 'Strawberry Latent Ringspot' e do

cucumovirus 'Cucumber Mosaic' em cultivares de *Olea europaea* L. Actas de Horticultura 9:215-220.

- **Henriques, M.I.C.;** Rei, F.T. & Leitão, F. A.; Serrano, J.F. & Potes, M.F. (1991) Occurrence of viruses infecting olive trees in Portugal. *Olea* 21:71.
- **Henriques, M.I.C.;** Rei, F.T. & Leitão, F. A.; Serrano, J.F. & Potes, M.F. (1992) Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of Strawberry Latent Ringspot nepovirus. *Phytopath. Medit.* 31:127-132.
- <http://europa.eu.int/comm/agriculture>
- <http://www.uni.pt/conferencias/seminario/tema2.pdf>
- <http://www.qca.pt>
- **Ippolito, A. & Nigro, F.** (2002) Shrivelling of olive fruits associated with water stress. *Acta Horticulturae* 586:745-747.
- **Jones, A.T.** (1992) Application of double-stranded RNA analysis of plant to detect viruses, virus-like agents, virus satellites and subgenomic viral RNAs. In: *Techniques for rapid detection of plant pathogens.* Duncan, J.M. & Torrance, L. (Eds.) Pp. 115-128.
- **Kabourakis, E.,** 1999 – Código de prácticas para los sistemas ecológicos de producción oleícola en Creta. *Olivae* 77:35-45.
- **Kassanis, B.** (1970) Satellite virus. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses* 15 (Junho).
- **Kassanis, B.** (1970) Tobacco necrosis virus. *C.M.I./A.A.B. Descriptions of plant viruses* 14 (Junho).

-
- **Kassanis, B.** (1981) Portraits of viruses: Tobacco necrosis virus and its satellite virus. *Intervirology* 15:57-70.

 - **Kassanis, B & Macfarlane, I.** (1981) Interaction of virus strain, fungus isolate, and host species in the transmission of tobacco necrosis virus. *Virology* 26:603-612.

 - **Kassanis, B & Phillips, M.P.** (1970) Serological relationship of strains of Tobacco Necrosis Virus and their ability to activate strains of satellite virus. *Journal of General Virology* 9:119-126.

 - **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

 - **Lamberti, F.; Roca, F.; Landriscina, S. & Ciancio, A.** (1986) Seasonal transmissibility of strawberry latent ringspot virus by *Xiphinema diversicaudatum*. *Nematol. Medit.* 14:173-180.

 - **Lavee, S. & Tanne, E.** (1984) Spherosis – A virus disease of the olive (*Olea europaea*). I. Symptoms, growth, tree development and production. *Olea Junho*:71-75.

 - **Lei nº 11/87**, Diário da República nº 81 de 7 de Abril de 1987 – I Série.

 - **Leitão, F.; Clara, M.I.E.; Félix, M.R.; Serrano, J.F.; Lopes, J.; Potes, M.F. & Rei, F.** (1997) Preliminary results on clonal and sanitary selection of *Olea europaea* L. CV. "Santulhana" in north-east of Portugal. *Olea* 24:106.

 - **Leitão, F.; Serrano, J.F.; Potes, M.F.; Clara, M.I.E.; Félix, M.R.; Rei, F. & Lopes, J.** (1997) Preliminary results on clonal and sanitary selection of *Olea europaea* L. cv. 'Santulhana' in North-east of Portugal. *Acta Horticulturae* 474:163-166.

- **Leitão, F.A.; Serrano, J.F.; Potes, M.F.; Clara, M.I.E.; Rei, F.T. & Gentil-Pinto, A. (1996)** Estudios de selección clonal del olivo cv. Negrinha, en la provincia de Trás-os-Montes. *Olivae* 62: 38-45.
- **Leitão, F.A.; Serrano, J.F.; Potes, M.F.; Henriques, M.I.; Rei, F.T. (1994)** Studies on selection of *Olea europaea* L. cv. Negrinha. *Acta Horticulturae* 356:102-105.
- **Lesnaw, J.A. & Reichmann, M.E. (1969)** The structure of tobacco necrosis virus. I. The protein subunit and the nature of the nucleic acid. *Virology* 39:729-737.
- **Lommel, S.A.; McCain, A.H. & Morris, T.J. (1982)** Evaluation of indirect Enzime-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72(8):1018-1022.
- **Marco, S. & Cohen, S. (1979)** Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by Enzime-Linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology* 69(12):1259-1261.
- **Marte, M.; Gadani, F.; Savino, V. & Rugini, E. (1986)** Strawberry Latent Ringspot Virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease* 70(2):171-172.
- **Martelli, G.P. (1998)** Enfermedades infecciosas y certificación del olivo: panorama general. *Phytoma* 102:180-186.
- **Martelli, G.P.; Savino, V.; Terlizzi, B.; Catalano, L.; Sabanadzovic, S. & Greco, N. (1995)** Viruses and certification of olive in Apulia (Southern Italy). *Acta Horticulturae* 386:569-573.
- **Martelli, G.P.; Salerno, M.; Savino, V. & Prota, U. (2002)** An appraisal of diseases and pathogens of olive. *Acta Horticulturae* 586:701-709.

-
- **Matthews, R.E.F.** (1987) The changing scene in plant virology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:10-23.

 - **Matthews, R.E.F.** (1992) *Fundamentals of plant virology.* Academic Press. Pp.403.

 - **Mendonça, D.; Lopes, M.S.; Machado, A.C. & Machado, M.L.C.** (1997) Diagnosis of viral diseases in stone fruits cultivated in the Azorean Islands Terceira and Graciosa. *Acta Horticulturae* 472:537-541.

 - **Merciega, V.; Boscia, D. & Savino, V.** (1996) Comparison of five isolates of olive latent virus 1. *Phytopath. mediterr.* 35:1-8.

 - **Meulewaeter, F.; Seurinck, J. & Emmelo, J.** (1990) Genome structure of tobacco necrosis virus strain A. *Virology* 177: 699-709.

 - **Mirkov, T.E.; Mathews, D.M.; Plessis, D.H. & Dodds, J.A.** (1989) Nucleotide sequence and translation of satellite tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 170: 139-146.

 - **Mohamed, M** (1996) *Caracterisation biologique physico-chimique et sérologique d'un virus filamenteux associée à un jaunissement de l'olivier.* Thèse pour l'obtention de 'Master of Sciences' en Virologie Végétale. Institut Agronomique Méditerranéen de Bari. Pp. 57

 - **Morris, T.J. & Dodds, J.A.** (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69(8):854-858.

 - **Neves, Maria do Rosário Baeta,** 1994 - *Gestão ambiental e desenvolvimento sustentável.* 3º congresso Nacional de áreas protegidas/ICN. Pp. 85-92.

 - **Murant, A.F. & Mayo, M.A.** (1982) Satellites of plant viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:49-70.

-
- **Pacini, E & Cresti, M. (1977)** Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta* 137:1-4.

 - **Pastor, Miguel; Caballero, J. Ignacio; Civantos, Manuel & Alvarado, Manuel, 1999** – Producción integrada del olivar. *Agricultura Revista Agro-pecuária* 802 (ano LXVIII):402-406.

 - **Pereira, Gustavo da Costa, 1995** – Políticas de gestão ambiental: objectivos e filosofias de gestão. Seminário sobre ecogestão e auditorias ambientais.

 - **Pinto-Correia, Teresa, 2000** – As medidas agro-ambientais como instrumento integrado para a preservação da paisagem rural: a importância da sensibilização dos técnicos locais e dos chefes de exploração. *Revista do departamento de Geografia e Planeamento Regional, Geo I Nova* nº 1:81-97.

 - **Portaria nº 106/96**, Diário da República nº 84 de 9 de Abril de 1996 – I Série.

 - **Portaria nº 1212/2003**, Diário da República nº 240 de 16 de Outubro de 2003 – I Série-B.

 - **Quacquarelli, A. & Savino, V. (1997)** La certificazione: aspetti tecnici e normativi. *I Geografili Quarderni* II: 119-132.

 - **Ralph, R.K. (1969)** Double-stranded viral RNA. *Adv. Virus Res.* 15:61-158.

 - **Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R. & Wickner, R.B. (Eds) (2000)** *Virus Taxonomy, seventh report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. AP-Academic Press. Pp.1162.

 - **Regulamento (CEE) nº 2092/91**, *Jornal Oficial* nº L 198 de 22 de Julho de 1991.

- **Regulamento (CE) nº 1257/1999**, Jornal Oficial nº L 160 de 26 de Junho de 1999.
- **Rei, F.M. (1995)** A aplicação do método de isolamento de cadeias duplas de RNA (double-stranded RNA – dsRNA) no diagnóstico de infecções virais em *Olea europaea* L.. Tese de mestrado em Protecção Integrada. Instituto Superior de Agronomia. Lisbon (Portugal), Pp. 91.
- **Rei, F.T.; Henriques, M.I.E.C. & Leitão, F.A. (1993)** Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. Bulletin OEPP/EPPO 23: 501-504.
- **Sabanadzovic, S.; Abou-Ghanem, N.; La Notte, P.; Savino, V.; Scarito, G. & Martelli, G.P. (1999)**.
- **Saldarelli, P.; Minafra, A.; Martelli, G.P. & Walter, B. (1994)** Detection of grapevine leaf-associated closterovirus III by molecular hybridization. Plant Pathology 43(1):91-96.
- **Salgueiro, Teodósio A., 1998** – Reflexões sobre a agricultura portuguesa. Revista de Ciências Agrárias, 4(vol. XXII):127-142.
- **Saponari, M.; Alkowni, R.; Grieco, F.; Pantaleo, V.; Savino, V.; Martelli, G.P.; Driouech, N.; Hassan, M.; Terlizzi, B. & Digiario, M. (2002)** Detection of olive-infecting viruses in the mediterranean basin. Acta Horticulturae 586:787-790.
- **Savino, V.; Barba, M.; Gallitelli, G. & Martelli, G.P. (1979)** Two nepoviruses isolated from Olive in Italy. Phytopath. Medit. 18:135-142.
- **Savino, V. & Gallitelli, D. (1981)** Cherry leafroll virus in olive. Phytopath. Medit. 20:202-203.
- **Savino, V. & Gallitelli, D. (1983)** Isolation of Cucumber mosaic virus from olive in Italy. Phytopath. Medit. 22:76-77.

-
- **Savino, V.; Gallitelli, D. & Barba, M. (1983)** Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Ann. Appl. Biol.* 103: 243-249.

 - **Savino, V.; Sabanadzovic, S.; Scarito, G.; Laviola, C. & Martelli, G.P. (1996)** Due giallumi dell' oloivo di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico* 5:55-59.

 - **Serrano, J.M.; Leitão, F.; Potes, M.F.; Clara, M.I.E.; Rei, F.T.; & Amaral, L. (1995)** – Studies on rooting ability of virus-infected vegetative material of *Olea europaea L.* cultivars. *Olea* 23:37-38.

 - **Serrano, J.M.; Leitão, F.; Potes, M.F.; Clara, M.I.E.; Rei, F.T.; & Amaral, L. (1997)** – Selección clonal y sanitaria de diez cultivares de *Olea europaea L.* en el sur de Portugal. *Olivae* 66: 51-53.

 - **Stussi-Garaud, C.; Lemius, J. & Fraenkel-Conrat (1977)** RNA polymerase from tobacco necrosis virus-infected and uninfected tobacco. *Virology* 81:224-236.

 - **Taylor, C.E. & Thomas, P.R. (1968)** The association of *Xiphinema diversicaudatum* (Micoletsky) with strawberry latent ringspot and arabis mosaic viruses in a raspberry plantation. *Ann. Appl. Biol.* 62:147-157.

 - **Teakle, D.S. (1960)** Association of *Olpidium brassicae* and Tobacco Necrosis Virus. *Nature* 188: 431-432.

 - **Teakle, D.S. (1962)** Transmission of Tobacco Necrosis Virus by a fungus, *Olpidium brassicae*. *Virology* 18:224-231.

 - **Teakle, D.S. & Gold, A.H. (1963)** Further studies of *Olpidium* as a vector of Tobacco Necrosis Virus. *Virology* 19:310-315.

 - **Thomas, H.E. (1958)** Sick leaf of olive. *Plant Disease Reporter* 42(10):1154.

- **Thresh, J.M.; Adams, A.N.; Barbara, D.J. & Clark, M.F. (1977)** The detection of three viruses of hop (*Humulus lupulus*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ann. Appl. Biol.* 87:57-65.

- **Tiό, Carlos, 1998** – Aspectos económicos e política comercial. *In: Enciclopédia Mundial da Oliveira*. Plaza & Janés editores, AS – Conselho Oleícola Internacional. Pp. 397.

- **Triolo, E.; Materazzi, A. & Toni, S. (1996)** An isolate of Tobacco Mosaic Tobamovirus from *Olea europaea* L.. *Adv. Hort. Sci.* 10:39-45.

- **Unge, T.; Liljas, L.; Strandberg, B.; Vaara, I.; Kannan, K.K.; Fridborg, K.; Nordman, C.E. & Lentz, P.J. (1980)** Satellite tobacco necrosis virus structure at 4.0Å resolution. *Nature* 285: 373-377.

- **Uyemoto, J.K. (1981)** Tobacco necrosis and satellite viruses. In *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Ed. E. Kurstak. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Pp.: 123-146.

- **Vala, R.M.T. (2001)** Métodos aplicados no diagnóstico viral em oliveira (*Olea europaea* L.), Inoculação mecânica, DAS-ELISA ("double antibody sandwich" enzyme-linked immunosorbent assay), Cadeias duplas de RNA (double stranded RNA-dsRNA). Tese de licenciatura em Engenharia Agrícola. Universidade de Évora. Évora (Portugal). Pp. 99.

- **Valverde, R.A.; Nameth, S.T. & Jordan, R.L. (1990)** Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74(3):255-258.

- **Van Regenmortel, M.H.V.; Dekker, E.L.; Dore, I.; Porta, C.; Weiss, E. & Burckard, J. (1988)** Recent advances in serodiagnosis of plant virus diseases. *Acta Horticulturae* 234:175-183.

- **Varenes, A. (1982)** A técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). *Anais do Instituto Superior de Agronomia*: 97-109.

-
- **Vloten-Doting, L.** (1988) New perspectives for control of plant virus diseases opened by biotechnology. *Acta Horticulturae* 234:497-503.

 - **Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwell, D.E.; Clark, M.F. & Adams, A.N.** (1976) The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal Gen. Virol.* 33: 165-167.

 - **Wisdom, G.B.** (1976) Enzime-Immunoassay. *Clinical Chemistry* 22(8): 1243-1255.

 - **Zhang, L.; French, R. & Langenberg, W.G.** (1993) Molecular cloning and sequencing of the coat protein gene of a Nebraskan isolate of tobacco necrosis virus: the deduced coat protein sequence has only moderate homology with those of strain A and strain D. *Archives of Virology* 132: 291-305.

ANEXO

Jornal Oficial nº L 250 de 07/10/1993 p. 0001 - 0008
Edição especial finlandesa: Capítulo 3 Fascículo 52 p. 0231
Edição especial sueca: Capítulo 3 Fascículo 52 p. 0231

DIRECTIVA 93/48/CEE DA COMISSÃO, de 23 de Junho de 1993 que estabelece a ficha contendo as condições a satisfazer pelas fruteiras e material de propagação de fruteiras destinados à produção de frutos, em conformidade com a Directiva 92/34/CEE do Conselho.

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Económica Europeia,
Tendo em conta a Directiva 92/34/CEE do Conselho, de 28 de Abril de 1992, relativa à comercialização de material de propagação de fruteiras e de fruteiras destinados à produção de frutos(1), e, nomeadamente, o seu artigo 4o,
Considerando que, para efeitos da aplicação do disposto na presente directiva, é conveniente atender aos ciclos de produção dos vários materiais;
Considerando que, nos termos do artigo 11o, alínea i), da Directiva 92/34/CEE, devem ser incluídas na ficha estabelecida de acordo com o artigo 4o exigências relativas ao documento redigido pelo fornecedor que acompanha os materiais de propagação CAC e as fruteiras;

Considerando que foi ou está a ser desenvolvido um sistema de certificação deste material (relativamente a determinadas espécies), a nível internacional, pela Organização Europeia para a Protecção das Plantas (OEPP);

Considerando que, dadas as actuais condições de produção na Comunidade, as exigências fixadas na presente directiva devem ser consideradas, nesta fase, as normas mínimas aceitáveis; que essas exigências serão gradualmente desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de atingir níveis de qualidade mais elevados;

Considerando que as medidas previstas na presente directiva estão em conformidade com o parecer do Comité permanente dos materiais de propagação e fruteiras,

ADOPTOU A PRESENTE DIRECTIVA:

Artigo 1º

1. A presente directiva estabelece a ficha referida no artigo 4o da Directiva 92/34/CEE e fixa as exigências relativas à rotulagem e selagem previstas no artigo 11o da mesma.
2. A ficha diz respeito à cultura, aos materiais de propagação (incluindo porta-enxertos) e às fruteiras deles derivadas de todos os géneros e espécies referidos no anexo II da Directiva 92/34/CEE, bem como aos porta-enxertos de outros géneros e espécies referidos no nº 1, alínea iii), do artigo 4o da mesma, independentemente do sistema de propagação utilizado, a seguir denominados «materiais».
3. O disposto na presente directiva será aplicado, tendo em conta os ciclos de produção dos materiais referidos no no 2.

Artigo 2º

Se for caso disso, os materiais devem satisfazer as condições fitossanitárias aplicáveis na matéria estabelecidas na Directiva 77/93/CEE do Conselho(2).

Artigo 3º

1. Sem prejuízo do disposto no artigo 2º e no caso de materiais CAC, estes devem, pelo menos através de um exame visual, estar substancialmente isentos de quaisquer organismos prejudiciais e doenças com incidência significativa na qualidade, bem como dos respectivos sinais e sintomas, que reduzam a eficácia dos materiais de propagação ou das fruteiras e, em especial, dos constantes em anexo, relativamente aos géneros ou espécies em causa.
2. Todos os materiais que apresentem sinais ou sintomas visíveis dos organismos prejudiciais ou doenças referidos no nº 1 durante o período vegetativo serão tratados de modo adequado imediatamente após o aparecimento dos mesmos ou, se for caso disso, retirados.
3. No caso dos materiais de citrinos, devem ser respeitadas, igualmente, as seguintes exigências:
 - i) Devem ser provenientes de materiais de origem que: - tenham sido controlados e considerados sem sintomas dos respectivos vírus, organismos similares ou doenças constantes em anexo, - tenham sido submetidos,

individualmente, a testes de detecção desses vírus, organismos similares e doenças, através dos métodos adequados, e considerados isentos dos mesmos;

ii) Devem ter sido controlados e considerados substancialmente isentos desses vírus, organismos similares ou doenças, desde o início do ciclo vegetativo; e

iii) Na última enxertia, devem ter sido enxertados em porta-enxertos não sensíveis a viróides.

Artigo 4º

1. Os materiais CAC devem ter a identidade e a pureza adequadas relativamente ao género e à espécie e, sem prejuízo do no 1, segunda frase, do artigo 9º da Directiva 92/34/CEE, devem, igualmente, ter a identidade e a pureza adequadas em relação à variedade.

2. No caso das variedades de conhecimento geral referidas no no 2, alínea i), do artigo 9º da Directiva 92/34/CEE, o fornecedor deve utilizar a designação oficial da variedade.

3. No caso das variedades já objecto de um pedido no âmbito dos direitos dos obtentores, ou de um registo oficial referido no no 2, alínea i), do artigo 9º da Directiva 92/34/CEE, deve ser utilizada a referência dos obtentores ou a designação proposta, até que seja concedida a autorização.

4. No caso das variedades inscritas em listas mantidas pelos fornecedores nos termos do no 2, alínea ii), do artigo 9º da Directiva 92/34/CEE, a exigência referida no no 1 relativamente à variedade deve basear-se nas descrições pormenorizadas constantes das referidas listas.

Artigo 5º

O material CAC deve estar substancialmente isento de quaisquer defeitos susceptíveis de prejudicar a sua qualidade enquanto material de propagação ou fruteiras.

Artigo 6º

No caso dos materiais pré-base, base e certificados, as exigências estabelecidas no artigo 3º, no no 1 do artigo 4º e no artigo 5º são aplicáveis desde que os sistemas de certificação referidos no artigo 7º não imponham condições mais rigorosas.

Artigo 7º

Na pendência da criação de um sistema comunitário de certificação, os materiais pré-base, base e certificados devem satisfazer as condições relativas às respectivas categorias previstas nos sistemas nacionais de certificação, desde que estes respeitem, tanto quanto possível, os sistemas internacionais de certificação existentes.

Artigo 8º

1. O documento redigido pelo fornecedor referido na alínea i) do artigo 11º da Directiva 92/34/CEE deve ser estabelecido num material adequado que não tenha sido previamente utilizado, e impresso, pelo menos, numa das línguas oficiais da Comunidade. Do documento constarão as seguintes informações:

- i) Indicação «Qualidade CEE»;
- ii) Indicação do código do Estado-membro CEE;
- iii) Indicação do organismo oficial responsável ou do respectivo código;
- iv) Número de registo ou de acreditação;
- v) Nome do fornecedor;
- vi) Número individual de série, semana ou lote;
- vii) Data de emissão do documento do fornecedor;
- viii) Nome botânico;
- ix) Denominação da variedade. No caso dos porta-enxertos, denominação da variedade ou respectiva designação;
- x) Quantidade;
- xi) Categoria;
- xii) No caso das importações de países terceiros nos termos do nº 2 do artigo 16º da Directiva 92/34/CEE, nome do país de colheita.

2. No caso de, nos termos da Directiva 92/105/CEE da Comissão(3), os materiais serem acompanhados de um passaporte fitossanitário, este constituirá, se o fornecedor assim o desejar, o documento do fornecedor referido no nº 1. Não obstante, é obrigatória a menção «Qualidade CEE», bem como uma indicação do organismo oficial responsável nos termos da Directiva 92/34/CEE e uma referência à denominação da variedade, do porta-enxerto e da categoria. No caso das importações de países terceiros nos termos do nº 2 do artigo 16º da Directiva 92/34/CEE, deve ser, igualmente, indicado o nome

iv

do país de colheita. Esta informação pode constar do mesmo documento que o passaporte fitossanitário, mas deve ser claramente separada.

Artigo 9º

1. As exigências relativas à rotulagem e selagem dos materiais qualificados como pré-base, base ou certificados referidos na alínea i) do artigo 11º da Directiva 92/34/CEE, são as estabelecidas nos sistemas nacionais de certificação referidos no artigo 7º da presente directiva.

2. Contudo, os Estados-membros velarão por que, no caso de o rótulo oficial não incluir todas as informações previstas no no 1 do artigo 8º, com excepção das alíneas iv), v) e vii), estas sejam incluídas. Além disso, é também obrigatória a indicação de que o material é «isento de vírus» ou «testado virologicamente».

Artigo 10º

1. Os Estados-membros porão em vigor as disposições legislativas, regulamentares e administrativas necessárias para dar cumprimento à presente directiva, o mais tardar, em 31 de Dezembro de 1993. Do facto informarão imediatamente a Comissão. Sempre que os Estados-membros adoptarem tais disposições, estas devem incluir uma referência à presente directiva ou ser acompanhadas dessa referência aquando da sua publicação oficial. As regras relativas a essa referência serão adoptadas pelos Estados-membros.

2. Os Estados-membros comunicarão à Comissão o texto das principais disposições de direito interno que adoptem no domínio regido pela presente directiva.

Artigo 11º

Os Estados-membros são os destinatários da presente directiva.

Feito em Bruxelas, em 23 de Junho de 1993.

Pela Comissão René STEICHEN Membro da Comissão

(1) JO no L 157 de 10. 6. 1992, p. 10.

(2) JO no L 26 de 31. 1. 1977, p. 20.

(3) JO no L 4 de 8. 1. 1993, p. 22.

ANEXO /* Quadros: ver JO */