



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Avaliação da suscetibilidade de estirpes de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* a diferentes péptidos antimicrobianos (AMPs)

Alice Costa Correia

Orientador(es) | Carla Marisa Varanda
Maria do Rosário Félix

Évora 2025





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Avaliação da suscetibilidade de estirpes de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* a diferentes péptidos antimicrobianos (AMPs)

Alice Costa Correia

Orientador(es) | Carla Marisa Varanda
Maria do Rosário Félix

Évora 2025





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Vasco Fitas da Cruz (Universidade de Évora)

Vogais | André Filipe Barreto Albuquerque (MED-Instituto Mediterrâneo para Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento) (Arguente)
Maria do Rosário Félix (Universidade de Évora) (Orientador)

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Maria do Rosário Félix, o meu mais sincero agradecimento pela dedicação, apoio, paciência, incentivo e conhecimento partilhados e, principalmente, pela amizade e bondade sempre demonstrada e por me fazer acreditar em mim e nas minhas capacidades.

À minha orientadora, Professora Carla Marisa Reis Varanda, pela dedicação, incentivo, amabilidade e conhecimento partilhados, sobretudo na realização do isolamento bacteriano e da amplificação do DNA.

A toda a equipa do Laboratório de Virologia Vegetal, que esteve sempre disponível a ajudar e incentivar na elaboração deste trabalho, a todos os olivicultores que generosamente cederam ramos de oliveira com galhas, ao Laboratório de Biotecnologia que gentilmente cedeu jovens plantas de oliveira para realização do estudo de patogenicidade, ao Laboratório de Microbiologia do Solo que disponibilizou a utilização do seu equipamento laboratorial, à Roukaya Ben Gaied e à Professora Marta Laranjo por toda a disponibilidade e conhecimento transmitido.

A todos os professores, colegas e pessoal não docente que se cruzaram comigo ao longo deste meu percurso. De uma forma muito especial aos meus colegas e amigos, André Borralho e Ricardo Pedro, por toda a paciência, incentivo, atenção, descontração e cuidado que tiveram comigo nestes longos anos, por serem “Casa” e, principalmente, pela vossa Amizade.

À minha grande amiga, Catarina Almeida, que foi conselheira, abrigo, generosidade e conforto sempre.

Aos meus patrões e amigos, Engenheiro Fábio Agostinho e Engenheiro João Graça, à minha colega e amiga, Marília Meira, pela confiança, paciência, disponibilidade, resiliência e conhecimento transmitido.

Por fim, mas não menos importante, o meu enorme agradecimento à minha família, aos meus pais, António e Benvinda, às minhas irmãs, Mariana e Margarida e aos meus avós, por todo o carinho, incentivo nos momentos mais difíceis e paciência que tiveram comigo, sem vocês não teria sido possível.

A todos os que direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração deste trabalho, o meu grande e sincero agradecimento!

Resumo

A oliveira é uma cultura de especial importância económica em Portugal e no mundo, a qual é muito afetada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) que causa galhas nos ramos, devido à hiperplasia e hipertrofia dos tecidos. Neste estudo foram isoladas de ramos de oliveira 86 colónias puras, pertencendo maioritariamente ao género *Pantoea*. Foram ainda obtidos isolados de *Pseudomonas* e de outras bactérias constituintes do microbioma bacteriano. Não se verificou qualquer relação entre a proximidade filogenética dos isolados e a cultivar, o local e o modo de cultivo. Os testes de patogenicidade realizados permitiram verificar que apenas Pss tem a capacidade de formar galhas e que a presença de *Pantoea agglomerans* provoca sintomatologia mais tardia e de menor dimensão. Já os testes de sensibilidade aos AMPs ThsA2 e PMAP-23 para controlo da Pss e *Pantoea agglomerans*, revelaram eficácia no controlo bacteriano, mostrando o AMP ThsA2 maior eficácia na concentração $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$.

Palavras-chave: controlo biotecnológico; bacteriose; oliveira; proteção de plantas; tuberculose.

Evaluation of the susceptibility of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains to different antimicrobial peptides (AMPs)

Abstract

The olive tree is a crop of special economic importance in Portugal and around the world, which is greatly affected by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), which causes knots on the branches, due to hyperplasia and hypertrophy of the tissues. In this study, 86 pure colonies were isolated from olive branches, mostly belonging to the *Pantoea* genus. Isolates of *Pseudomonas* and another bacterial microbiome was also obtained. There was no relationship between the phylogenetic proximity of the isolates and the cultivar, location or cultivation method. The pathogenicity tests carried out showed that only Pss has the ability to form knots and that the presence of *Pantoea agglomerans* causes later and smaller symptoms. The sensitivity tests to the AMPs ThsA2 and PMAP-23 for the control of Pss and *Pantoea agglomerans* revealed efficacy in bacterial control, with the AMP ThsA2 showing greater efficacy at a concentration of $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$.

Keywords: biotechnological control; bacteriosis; olive tree; plant protection; knot olive disease

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	ii
Abstract	iii
Índice.....	iv
Índice de Quadros	vi
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1. Classificação Taxonómica da Oliveira	5
2.2. Morfologia e Fisiologia da Oliveira.....	6
2.3. Ciclo de Vida.....	7
2.4. Exigências Edafoclimáticas.....	8
2.5. Evolução Tecnológica e Sistemas de Produção	8
2.6. Principais Doenças da Oliveira	9
2.7. Tuberculose.....	11
2.8. Métodos de Diagnóstico	13
2.9. Atuais Metodologias de Controlo da Tuberculose da Oliveira	15
2.10. Novas Metodologias de Controlo da Tuberculose da Oliveira	15
2.11. Péptidos Antimicrobianos.....	16
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1. Origem do Material Vegetal.....	21
3.2. Isolamento Bacteriano	25
3.3. Extração de DNA Bacteriano	28
3.4. Amplificação de DNA Bacteriano por PCR	28
3.5. Purificação dos Produtos de Amplificação.....	30
3.6. Sequenciação de DNA e Análise Bioinformática.....	30
3.7. Testagem da Virulência dos Isolados Bacterianos	31
3.7.1. Escolha dos Isolados	31
3.7.2. Isolamento da Estirpe em Placa	31
3.7.3. Escolha das Plantas	32

3.7.4. Inoculação Bacteriana das Plantas	32
3.8. Seleção de AMPs	33
3.9. Testes de Sensibilidade	33
4. Resultados	36
4.1. Culturas Bacterianas Puras	37
4.2. Amplificação por PCR	37
4.3. Análise das Sequências	38
4.4. Análise Filogenética	45
4.5. Testes de Patogenicidade em Oliveira	48
4.6. Testes com AMPs	50
4.6.1. Teste com ThsA2 em Pss	48
4.6.2. Teste com PMAP-23 em Pss	50
4.6.3. Teste com ThsA2 em Pantoea agglomerans	52
4.6.4. Teste com PMAP-23 em Pantoea agglomerans	54
5. Discussão	61
6. Conclusões e Perspetivas Futuras	70
7. Referências Bibliográficas	72
8. Apêndices	83

Índice de Quadros

Quadro 2.1 Classificação taxonómica da espécie <i>Olea europaea</i>	5
Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo.	21
Quadro 3.2 Sequências dos 'primers' Y1, Y3, IAALF, IAALN1 e IAALN2.	29
Quadro 3.3 Esquema da placa de microtitulação com identificação das concentrações do AMP em PDB para a bactéria <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	34
Quadro 3.4 Esquema da placa de microtitulação com identificação das concentrações do AMP em PDB para a bactéria <i>Pantoea agglomerans</i>	34
Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra.	38
Quadro 4.2 Verificação de sintomas por planta inoculada.	49
Quadro 4.3 Diâmetro médio das galhas por planta ao longo do tempo em que decorreu o ensaio.	49
Quadro 4.4 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	50
Quadro 4.5 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ao longo do tempo.	51
Quadro 4.6 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> para as diferentes concentrações de estudo.	52
Quadro 4.7 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	53
Quadro 4.8 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ao longo do tempo.	53
Quadro 4.9 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> para as diferentes concentrações de estudo.	54
Quadro 4.10 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pantoea agglomerans</i>	55
Quadro 4.11 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pantoea agglomerans</i> ao longo do tempo.	56
Quadro 4.12 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em <i>Pantoea agglomerans</i> para as diferentes concentrações de estudo.	57

Quadro 4.13 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pantoea agglomerans</i>	58
Quadro 4.14 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de comparações múltiplas do teste de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pantoea agglomerans</i> ao longo do tempo.....	58
Quadro 4.15 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de comparações múltiplas do teste de sensibilidade com PMAP-23 em <i>Pantoea agglomerans</i> para as diferentes concentrações de estudo.....	59

Índice de Figuras

Figura 2.1 Distribuição da oliveira na Bacia Mediterrânica.	8
Figura 2.2 Triângulo da doença.....	10
Figura 2.3 Sintomatologia de Olho-de-Pavão em folhas de oliveira.....	10
Figura 2.4 Sintomatologia de Antracnose em azeitona.....	11
Figura 2.5 Bactérias <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	12
Figura 2.6 Galhas de Tuberculose em ramos de oliveira.	13
Figura 2.7 Reação de amplificação de DNA por PCR com identificação das três etapas que a constituem; 1: Desnaturação, 2: Hibridização, e 3: Amplificação.....	14
Figura 2.8 Diferentes estruturas dos AMPs. A - péptidos lineares α -hélice, B - péptidos folha- β , C – péptidos de estrutura linear, D - péptidos α -hélice e folha- β	17
Figura 2.9 Modelos de ação dos AMPs. Legenda: A - Modelo de tapete, B - Modelo de poro de barril, C - Modelo de poro toroidal.	18
Figura 3.1 Sequência de desinfeção das amostras.	26
Figura 3.2 Realização de 'prints' em placa de Petri.	27
Figura 3.3 Repicagens de microrganismos para placa de Petri.	27
Figura 3.4 Reação de amplificação de DNA por PCR com os 'primers' Y1 e Y3.	29
Figura 3.5 Reação de amplificação de DNA por PCR com os 'primers' IAALF, IAALR, IAALN1 e IAALN2.....	30
Figura 4.1 Crescimento de microrganismos em placa de Petri. 1- Evidências de crescimento bacteriano e fúngico; 2 - Riscado de colónia bacteriana pura.	37
Figura 4.2 Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação dos isolados. Amostras 1A, 2D, 3C, 3D, 4A e 4B, M - '1kb plus DNA Ladder'; CN - Controlo negativo de PCR.....	38
Figura 4.3 Identificação de microrganismos após pesquisa de homologia na base de dados BLAST N do NCBI.	44
Figura 4.4 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Kimura 2-parameter e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> str.	

HZP14, <i>Pantoea agglomerans</i> str. SC1 e <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'	46
Figura 4.5 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Jukes-Cantor e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' <i>Pantoea agglomerans</i> str. SC1 e <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.	47
Figura 4.6 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Hasegawa-Kishino-Yano e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' <i>Pantoea agglomerans</i> str. SC1 e <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.	48
Figura 4.7 Galhas em ramos de oliveiras inoculadas.	48
Figura 4.8 Crescimento das galhas nas plantas inoculadas com identificação de sintomatologia.	50
Figura 4.9 Teste de sensibilidade da <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3).....	51
Figura 4.10 Teste de sensibilidade da <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.....	52
Figura 4.11 Teste de sensibilidade da <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.....	54
Figura 4.12 Teste de sensibilidade da <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.....	55

Figura 4.13 Teste de sensibilidade da <i>Pantoea agglomerans</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas ANOVA.	56
Figura 4.14 Teste de sensibilidade da <i>Pantoea agglomerans</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.	57
Figura 4.15 Teste de sensibilidade da <i>Pantoea agglomerans</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.	59
Figura 4.16 Teste de sensibilidade da <i>Pantoea agglomerans</i> com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.	60

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

‰: Percentagem

(v/v): Volume por volume

µl: Microlitro

µm: Micrómetro

AMPs: Péptidos antimicrobianos

ANOVA: Análise de variância

atm: Atmosfera

BLAST N: 'Basic Local Alignment Search Tools'

cm: Centímetro

CTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamonio

DAS-ELISA: 'Double antibody sandwich – Enzyme linked immunosorbent assay'

DBAASP: 'Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptide'

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EU: União Europeia

EUA: Estados Unidos da América

g: Grama

h: Hora

ha: Hectares

HCl: Ácido clorídrico

IAA: Ácido indolacético

KCl: Cloreto de Potássio

kg/ha: Quilogramas por hectare

m: Metros

M: Molar

mg/mL: Miligramas por mililitro

mg/µL: Miligramas por microlitro

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

min: Minuto

ml: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

NaCl: Cloreto de Sódio
NCBI: 'National Center for Biotechnology Information'
nm: Nanometro
°C: Graus Celsius
OD: Densidade ótica
P. agglomerans: *Pantoea agglomerans*
pb: Pares de bases
PCB: 'Polychlorinated biphenyl'
PCR: 'Polymerase Chain Reaction'
PDA: 'Potato Dextrose Agar'
PDB: 'Potato Dextrose Broth'
PMAP-23: 'Porcine myeloid antimicrobial peptide-23'
Psa: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*
Pss: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*
pv.: Variante patogénica
PVP: Polivinilpirrolidona
qPCR: 'Real-time quantitative polymerase chain reaction'
RNA: Ácido ribonucleico
rpm: Rotações por minuto
rRNA: Ácido ribonucleico ribossómico
s: Segundo
sp.: Espécie
spp.: Espécies
str.: Estirpe
TBE: Tris-Borate-EDTA
ThsA2: 'Thusin A2'
ton/ha: tonelada por hectare
U: Unidade
UFC: Unidade formadora de colónia
V: Volt

1. Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma cultura com importância económica crescente a nível nacional e internacional.

A produção de azeite em Portugal nas últimas décadas duplicou, o que foi proporcionado pela instalação de novos olivais, maioritariamente super-intensivos, na região do Alentejo, pela adoção de novas tecnologias nos sistemas de produção, pelo reconhecimento da qualidade do produto e pelas políticas de apoio ao investimento e à produção (Sales et al., 2022).

A nível mundial o mercado do azeite teve um comportamento idêntico, causado principalmente pela instalação de novos olivais na Bacia do Mediterrâneo e pelo aumento do consumo deste produto em países tradicionalmente não produtores, como sejam o Brasil, EUA, Japão, o qual está associado ao reconhecimento das qualidades nutricionais e benefícios para a saúde humana (*Azeite - Comissão Europeia*, sem data).

Embora se venha a verificar a expansão da produção de olival no mundo, as produções da oliveira têm sido cada vez mais afetadas pelas alterações climáticas, que são um imperativo na atualidade, mas também pelas doenças que afetam a planta.

A Tuberculose da oliveira, causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), é uma das principais doenças do olival, a qual se caracteriza pela formação de galhas nos ramos, sendo estas locais de hipertrofia e hiperplasia, o que leva a uma desorganização celular, já que a bactéria contém no seu plasmídeo genes que codificam a síntese de hormonas indutoras do crescimento, causando a morte dos ramos num estado avançado da doença dado que não se verifica uma continuidade dos feixes vasculares. Esta doença tem demonstrado um grande impacto nos olivais super-intensivos, os quais são altamente mecanizados, facilitando a disseminação da doença de árvores infetadas para árvores saudáveis através de feridas (causadas pela queda das folhas, por fatores climáticos, pela poda, colheita ou por insetos) (Quesada et al., 2010). Atualmente, não existem meios de controlo eficientes para a Tuberculose, sendo este realizado com recurso a podas seletivas e produtos cúpricos que apenas inibem a multiplicação da bactéria temporariamente. Porém, o aumento da resistência a estas substâncias e as limitações impostas ao uso destes produtos, levam à necessidade de encontrar meios alternativos para controlo da doença.

Desta forma, para o tratamento de infeções em plantas tem vindo a surgir a utilização de péptidos antimicrobianos (AMPs), como alternativa aos antibióticos convencionais, embora não permitidos para uso agronómico, já que não são tóxicos para plantas e animais.

Os AMPs são pequenas sequências de aminoácidos que interagem diretamente com as membranas dos organismos alvo, apresentando um largo espetro de atividade microbiana. Apesar de estas sequências serem muito idênticas entre si, as suas atividades e os seus alvos

diferem, pelo que é necessária a testagem *in vitro* e *in vivo*, não sendo suficiente a análise das sequências dos AMPs (Tang et al., 2023).

Assim, o objetivo deste trabalho é isolar e identificar quais as estirpes de Pss maioritariamente presentes em olivais das regiões do Alentejo e Algarve e testar a capacidade que diferentes AMPs têm no controlo do crescimento dessas mesmas estirpes, para que seja possível a adoção de novas técnicas de controlo da Tuberculose em futuros olivais.

2. Revisão da Literatura

A oliveira é uma das árvores cultivadas mais antigas, pensa-se que teve origem na Ásia Menor, tendo-se disseminado pelo Mediterrâneo através da civilização grega e posteriormente para outros países de clima mediterrânico pelos romanos. Esta cultura ganhou uma grande importância económica, social e ambiental, por ser um símbolo de paz e vitória, devido à produção de azeitona e de azeite, utilizados não só para a alimentação, mas também como combustível e como base medicinal (Breton et al., 2009).

Atualmente os 7 principais países produtores são: Espanha, Itália, Turquia, Portugal, Tunísia, Marrocos e Egipto, sendo Portugal, atualmente o 4º país produtor do mundo (FAOSTAT, sem data).

2.1. Classificação Taxonómica da Oliveira

A oliveira pertence à família *Oleaceae* e ao género *Olea*. Embora esta família seja monofilética, apresenta uma grande diversidade morfológica e anatómica. Conhecem-se mais de 600 espécies pertencentes ao género *Olea*, das quais se destaca a *Olea europaea* (Quadro 2.1). Esta espécie inclui as subespécies *Olea europaea sativa* à qual pertence a oliveira na forma cultivada e *Olea europaea sylvestris* que corresponde à oliveira silvestre, vulgarmente chamada de zambujeiro. (*Flora-On | Flora de Portugal*, sem data).

Quadro 2.1 Classificação taxonómica da espécie *Olea europaea*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Oleales
Família	Oleaceae
Género	<i>Olea</i>
Espécie	<i>Olea europaea</i> L.

Fonte: Adaptado de Böhm, 2013

É ainda de considerar que a subespécie *Olea europaea sativa* apresenta uma grande diversidade, dando lugar às diferentes cultivares que existem. Como principais cultivares endógenas utilizadas em Portugal destacam-se a Galega, Cobrançosa, Cordovil, Verdeal Transmontana, Carrasquenha, Lentrisca e Madural (Fraga et al., 2020). Destas, as que apresentam maior suscetibilidade ao estabelecimento de infeções de *Pseudomonas savastanoi*

pv. *savastanoi* são, por ordem decrescente de suscetibilidade, a Galega, a Verdeal Transmontana, a Cobrançosa e a Cordovil (Gomes, 2018; Koščák et al., 2023; Wiesman, 2009).

2.2. Morfologia e Fisiologia da Oliveira

Morfologicamente a oliveira é uma cultura perene lenhificada, que se propaga vegetativamente (Böhm, 2013). A oliveira é uma árvore polimórfica, ou seja, apresenta duas fases de desenvolvimento: uma fase juvenil e uma fase adulta, perenifólia, de crescimento lento e de grande longevidade.

Por norma, a oliveira tem um tamanho médio, entre 4 e 8m de altura, no entanto pode atingir os 15m ou mais (Rodrigues & Correia, 2009).

Apresenta um sistema radicular fasciculado, o qual se estende em profundidade ou lateralmente de acordo com as condições edáficas e a disponibilidade de água no solo.

O tronco é grosso, retorcido e de cor verde acinzentada, sendo considerado o ramo principal que confere a estrutura à planta, sob o qual se desenvolvem os ramos secundários que formam a copa da árvore (Rodrigues & Correia, 2009).

As folhas são simples, inteiras, sem estípulas, com um pecíolo curto e têm uma disposição oposto-cruzada entre elas. Apesar da sua forma variar de acordo com a cultivar, podem ser desde ovais a lanceoladas e de cor verde-escura na página superior e cinzento prateado na página inferior. As folhas apresentam várias características específicas, como a presença de tricomas, um posicionamento vertical (para-heliotropismo), pequena dimensão (3 a 8cm de comprimento e 1 a 2cm de largura), que revelam a adaptação xerófila da oliveira (*Flora-On | Flora de Portugal*, sem data).

A inflorescência é uma panícula, axilar, ereto-patente, composta por 10 a 40 flores de cor esbranquiçada, dependendo das condições climatéricas e da própria cultivar em questão. A oliveira é andromonoica, apresentando flores hermafroditas e flores masculinas (as quais não dão origem a fruto).

O fruto é uma drupa, constituída por endocarpo (caroço), mesocarpo (polpa, onde é armazenada a gordura) e exocarpo (epiderme). A cor da azeitona varia entre o verde e preto, de acordo com a cultivar e estado de maturação, tal como o seu peso que varia entre 1 a 20g (Rodrigues & Correia, 2009).

2.3. Ciclo de Vida

O ciclo de vida da oliveira pode ser dividido em 5 fases principais: dormência, indução floral, floração, frutificação e maturação (Inês et al., 2022).

A dormência, também conhecida por repouso invernal, ocorre durante 1 a 3 meses e corresponde ao período em que a planta acumula fotoassimilados para o novo ciclo produtivo.

Segue-se a indução floral, a qual ocorre durante um curto período (aproximadamente, 20 dias), que se caracteriza pela diferenciação dos gomos, em gomos florais ou vegetativos. Esta dá origem à floração, a qual ocorre em meados de março, com o aparecimento dos botões florais (*How Do Olives Grow (With Pictures Of Olive Growth Cycle) | Oliviada*, sem data).

Posteriormente verifica-se o desenvolvimento do fruto, inicialmente com a formação do caroço e só depois da polpa. Ao longo dos meses o fruto desenvolve-se e cresce, atingindo a maturação, estando desta forma reunidas as condições para se iniciar a colheita (*How Do Olives Grow (With Pictures Of Olive Growth Cycle) | Oliviada*, sem data).

A oliveira, tal como muitas outras fruteiras, apresenta uma particularidade ao nível dos hábitos de frutificação, a qual acentua a alternância, vulgarmente conhecida por safra e contra-safra, ou seja, a um ano de elevada produção segue-se um ano de menor produção. No caso da oliveira esta problemática é acentuada porque os ramos produtivos, onde nascem as flores, têm um ano de idade, já que são os ramos que se desenvolveram no ano anterior. Desta forma, a indução da floração do ano seguinte ocorre simultaneamente ao desenvolvimento do fruto do ano presente, pelo que se a frutificação for elevada são mobilizados todos os fotoassimilados para o fruto, inibindo a mobilização dos mesmos para a indução floral. O mesmo ocorre na diferenciação floral, se a quantidade de frutos no ano antecedente foi elevada, então as reservas de recursos energéticos são menores e as flores serão de pior qualidade. Por fim, considera-se que a fase que mais determina a produção é o vingamento do fruto, pois após a floração verifica-se uma grande queda de flores e frutos, sendo esta regulada pelas reservas energéticas da árvore (Rodrigues & Correia, 2009).

Embora a alternância seja um processo natural da oliveira, em que as reservas nutricionais da planta são limitadas pela produção do ano anterior, a intervenção do homem pode minimizar as suas consequências, através de técnicas culturais adequadas, como a realização de regas no período estival, podas e fertilizações ponderadas e colheita com poucas vibrações e interferências nos ramos (Rodrigues & Correia, 2009).

2.4. Exigências Edafoclimáticas

Sendo a oliveira proveniente de um clima mediterrânico (Figura 2.1), as suas condições favoráveis de desenvolvimento são características do mesmo, nomeadamente a existência de uma estação fria (<12,5°C) e húmida e uma outra estação quente e seca (>30°C). A estação fria e húmida é fundamental para a indução da dormência, que permite a acumulação de recursos energéticos garantindo uma floração adequada, já a estação quente e seca permite interromper a dormência invernal e iniciar o processo de floração (Taipa C. et al., 2003). Desta forma, podem-se considerar como condições climatéricas favoráveis para a oliveira temperaturas de 15 a 20°C e precipitações 650 a 900mm/ano (Hussain et al., 2021).

No que diz respeito às condições edáficas, a oliveira apresenta um amplo espectro de adaptação, sendo pouco seletiva, no entanto a profundidade e salinidade são os fatores que mais se destacam como limitativos (Ozalp & Akinci, 2023).



Figura 2.1 Distribuição da oliveira na Bacia Mediterrânica.

Fonte: Böhm, 2013

2.5. Evolução Tecnológica e Sistemas de Produção

A oliveira começou por ser cultivada de forma arcaica, para autoconsumo em pequenos quintais de forma dispersa ou na bordadura a delimitar parcelas. Posteriormente passou a ser plantada de forma ordenada em linhas com longos compassos, ou seja, com uma baixa densidade de plantas. As operações culturais limitavam-se à colheita manual e a podas intensas esporadicamente, sem que fosse considerada a fertilização, a rega e os tratamentos fitossanitários. Todos estes fatores combinados e o facto de muitas vezes ser uma agricultura de subsistência, com produtividades de 2000kg/ha, levaram a que a cultura se tornasse pouco

rentável para o agricultor e, por vezes, até ao abandono da mesma. Atualmente, as árvores centenárias deste tipo de olivais, deixaram de ter um cariz agrícola, o qual passou a ser ornamental, sendo utilizadas em jardins para fins decorativos (Böhm, 2013).

Com a necessidade de rentabilizar a cultura e a área ocupada pela mesma, em detrimento dos olivais tradicionais, surgiram os olivais intensivos, com uma maior densidade de plantas (200 a 999 plantas/ha) e com a introdução de sistemas de rega gota-a-gota. As operações passaram a ser mecanizadas, a colheita com vibradores de tronco (exigindo entrelinhas com 2 a 3m para circulação das máquinas agrícolas), a poda anual para aumentar a exposição da copa à luz solar e a realização de tratamentos fitossanitários. Esta evolução do modo de produção permitiu um aumento da produtividade, podendo esta alcançar as 7 a 9 ton/ha (Böhm, 2013).

O grande incremento do olival em Portugal verificou-se recentemente com a instalação de olivais super-intensivos de cultivares pouco vigorosas, como sejam a Arbequina e a Arbosana, e a utilização da máquina de colheita cavalgadora (já utilizada na vinha), a qual vibra lateralmente a copa promovendo o destacamento do fruto. Neste tipo de sistemas as copas das árvores tocam-se, formando uma sebe contínua, tal como as raízes, já que são utilizadas densidades de, aproximadamente, 1000 a 2000 plantas/ha, o que permite encurtar o período de juvenilidade e entrar em produção cruzeiro precocemente. Este tipo de sistemas mostra-se assim mais produtivo, atingindo produtividades de 12 ton/ha (Böhm, 2013).

No entanto, embora os olivais super-intensivos sejam mais produtivos quando comparados com os intensivos, tem se verificado uma preferência pelos segundos dada a rentabilidade da cultura quando considerados lucros vs. custos. Para além da rentabilidade da cultura, os olivais super-intensivos apresentam também como desvantagens a necessidade de utilização de cultivares de baixo vigor e um aumento da disseminação de doenças, uma vez que árvores saudáveis e doentes são intervencionadas de igual forma e a transmissão de pragas e doenças é facilitada pelo modo de condução utilizado (Böhm, 2013).

2.6. Principais Doenças da Oliveira

Com a intensificação dos sistemas de produção e a conseqüente alteração das práticas culturais, verificou-se que o surgimento e a intensificação de pragas e doenças nos olivais foi favorecido. Desta forma, quando se verifica o cumprimento do triângulo da doença, ou seja, quando o agente patogénico está presente e as condições climatéricas são favoráveis, a infeção é estabelecida, provocando a doença na planta (Figura 2.2).

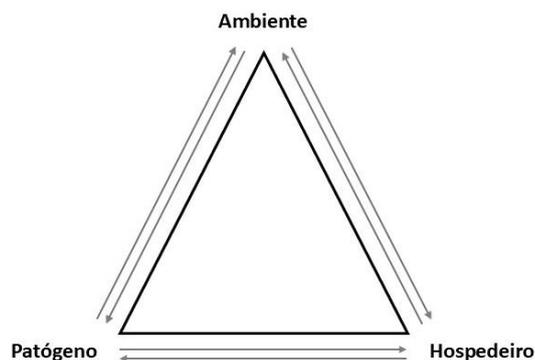


Figura 2.2 Triângulo da doença.

Como principais doenças do olival, podem-se considerar o Olho-de-Pavão, a Antracnose, ambas doenças causadas por fungos e a Tuberculose, uma doença bacteriana (Rodrigues & Correia, 2009).

O Olho-de-Pavão, a doença mais comum nos olivais, tem como agente causal a *Venturia oleagina*. Normalmente surge em zonas húmidas, mal drenadas, copas pouco arejadas e em anos chuvosos, uma vez que a disseminação do fungo é feita através da água, apresentando como principal sintomatologia uma mancha circular de cor castanha a preta nas folhas (Figura 2.3). Em olivais infetados verifica-se uma grande perda de produção, devido à intensa desfoliação causada pelo fungo, diminuindo desta forma a fotossíntese e, conseqüentemente a acumulação de fotoassimilados. Os danos são mais intensos na parte inferior da copa da árvore, uma vez que é a zona menos arejada e onde há uma maior acumulação de água e humidade. Desta forma, aquando da instalação de olivais devem ser evitados solos de zonas baixas e mal drenados, sendo de considerar a realização de podas que promovam o arejamento da copa, de forma a diminuir a humidade no interior da mesma. É ainda de considerar a realização de fertilizações ponderadas, já que o excesso de azoto e o défice de potássio favorecem o desenvolvimento da doença, por ser promovido um rápido crescimento celular, mas paredes celulares ténues (Rodrigues & Correia, 2009; Viruega et al., 2013).



Figura 2.3 Sintomatologia de Olho-de-Pavão em folhas de oliveira.

Fonte: *Doenças das Oliveiras: Olho de Pavão*, sem data

A Antracnose causada por *Colletotrichum* spp., apresenta como principal sintoma da doença a podridão e mumificação dos frutos, iniciando-se com manchas arredondadas de cor castanha e com a depressão da polpa (Figura 2.4), surgindo durante a maturação (quando ocorre a mudança de cor do fruto). Embora a infecção possa ocorrer em qualquer parte do fruto e até mesmo nos ramos e folhas, é mais frequente no ápice do fruto, uma vez que é o local onde há maior acumulação de água (proveniente da chuva, geadas, orvalho, etc.) durante um maior período, dado que é necessária uma humidade relativa elevada ($\geq 90\%$) para que ocorra a esporulação do fungo. Este tem a capacidade de estabelecer a infecção penetrando a epiderme, no entanto, a presença de feridas ajuda o processo de infecção, pelo que a Antracnose surge muitas vezes associada a ataques de mosca-da-azeitona (*Bactrocera oleae*). Os principais estragos traduzem-se na qualidade e quantidade de produção, ou seja, a produção é menor pois o fruto fica desidratado e a queda é prematura e o azeite obtido apresenta características depreciativas (acidez alta e organoleticamente mau). Assim, na instalação de novos olivais deve-se optar por cultivares menos suscetíveis e nos olivais já instalados deve ser considerada uma poda adequada para promoção do arejamento da copa e uma colheita precoce (Talhinhas et al., 2018).



Figura 2.4 Sintomatologia de Antracnose em azeitona.

Fonte: Amostragem e caracterização de estirpes *Colletotrichum* na azeitona - *InnovPlantProtect*, sem data

2.7. Tuberculose

A Tuberculose da oliveira apresenta como agente causal a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), esta é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, em forma de bastonete com 0,4 a 1,0 x 1,0 a 4,0 μ m (Figura 2.5) e com um ou mais flagelos que lhe conferem mobilidade (Agrios, 2008; Ramos et al., 2012). Quando cultivada em meio de Ágar apresenta colónias de cor branca a creme (Harmon et al., 2018).

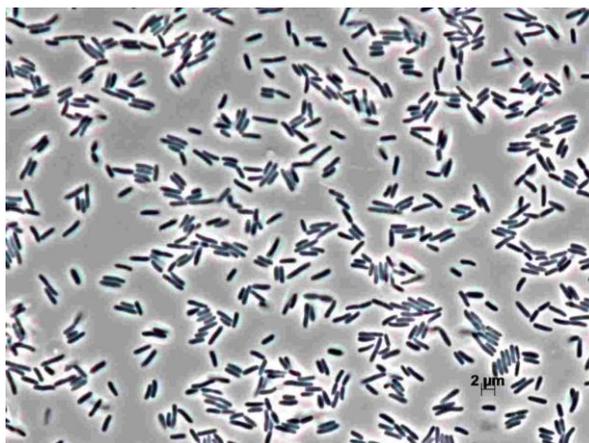


Figura 2.5 Bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Fonte: *Leibniz Institute DSMZ: Details*, sem data

A bactéria reproduz-se através do processo de cissiparidade, sendo este um processo de reprodução assexuada, pelo que a descendência tem exatamente a mesma informação genética do que o organismo que lhe deu origem, exceto quando durante o processo de divisão celular ocorrem mutações. O processo de cissiparidade inicia-se com a cópia do DNA por enzimas de replicação, seguida da divisão do citoplasma e da formação do septo o qual divide as duas novas células (Agrios, 2008).

Embora atualmente se considere que a Pss é o único agente causal da Tuberculose da oliveira, vários estudos mais recentes sobre sinergias e microbiomas apontam para a existência de interações mutualistas entre a Pss e outras bactérias, como as bactérias pertencentes aos géneros *Pectobacterium*, *Erwinia*, *Curtobacterium* e *Pantoea* (Moretti et al., 2021; Zucchini et al., 2023). Destas bactérias mutualistas, destaca-se a *Pantoea* que segundo Moretti (2021) não é patogénica, porém tem a capacidade de potenciar a virulência da Pss, uma vez que as defesas da planta são diminuídas (Selak et al., 2022).

As condições favoráveis para a propagação da doença são muito amplas, desde os 4°C até aos 38°C, sendo a temperatura ótima de 23 a 24°C, o que normalmente corresponde aos períodos de primavera e outono. A disseminação da bactéria pode-se dar pela ação das chuvas ou da humidade relativa elevada (>80%), quando a gota da água toca numa galha e escorre para feridas ou pela ação do homem ao utilizar equipamento contaminado (maquinaria de colheita e/ou poda) e material de propagação vegetativa infetado (Godena et al., 2009).

A sintomatologia associada à Tuberculose da oliveira é o aparecimento de galhas nos ramos (Figura 2.6), devido à hipertrofia e hiperplasia dos tecidos celulares provocadas pelo DNA plasmídeo da bactéria que contém hormonas indutoras de crescimento, como a auxinas e citocininas. Estas alterações ao nível celular, provocam uma disfunção do xilema na translocação

da água e dos nutrientes, interferindo no movimento ascendente da água através do xilema. Desta forma o crescimento e a produção das plantas são comprometidos (Agrios, 2008).



Figura 2.6 Galhas de Tuberculose em ramos de oliveira.

2.8. Métodos de Diagnóstico

Sendo a Tuberculose uma das doenças que causa mais prejuízos nos olivais, as metodologias de diagnóstico têm-se tornado cada vez mais importantes, principalmente na seleção de cultivares menos suscetíveis a esta doença. Para tal, tem-se recorrido a métodos microbiológicos, serológicos e/ou moleculares de diagnóstico (Bertolini et al., 2003).

Como métodos microbiológicos podem considerar-se a observação microscópica ou à lupa das galhas causadas pela bactéria ou o crescimento da Pss através do ‘print’ de galhas em placa de Petri com meio de Ágar (o qual é pouco seletivo e permite o crescimento de diferentes microrganismos) ou meio seletivo para crescimento de bactérias. Embora sejam métodos de rápida realização, apresentam como principais desvantagens o facto de não ser possível verificar se o surgimento das galhas se deve à infeção da bactéria em causa, não garante que a bactéria que cresce na placa de Petri seja a Pss e não um outro microrganismo e não permite a deteção de infeções latentes (Fang & Ramasamy, 2015).

Podem também ser realizados testes serológicos, tal como o teste DAS-ELISA (‘Double antibody sandwich – Enzyme linked immunosorbent assay’), comumente utilizado na deteção de patógenos microbianos. Este teste baseia-se na identificação de doenças através da utilização de anticorpos específicos e de uma enzima, a qual tem a capacidade de tornar um substrato incolor em colorido de forma proporcional à quantidade presente do antígeno-alvo. Este tipo de teste tem sido utilizado no diagnóstico de bactérias em plantas, embora apresente baixa sensibilidade uma vez que não é possível a identificação da doença antes do surgimento de sintomas e a probabilidade de os resultados serem falsos-positivos é elevada (Fang & Ramasamy, 2015).

Para a caracterização molecular dos organismos presentes, deve-se recorrer a técnicas de PCR ('Polymerase Chain Reaction'), que consiste em três fases principais: desnaturação, hibridização e amplificação (Figura 2.7). Na desnaturação as temperaturas elevadas, de aproximadamente 95°C, quebram as ligações por pontes de hidrogénio e separa o DNA em cadeias simples (desnaturação da cadeia dupla de DNA); segue-se a hibridização em que a amostra é arrefecida com a descida da temperatura para 30°C a 70°C de acordo com os 'primers' utilizados, permitindo que estes e a enzima DNA polimerase se liguem às cadeias simples de DNA (anteriormente separadas), ou seja, os nucleótidos da solução ligam-se às cadeias simples de DNA; por fim na extensão verifica-se a formação de duas moléculas de DNA de cadeia dupla (Khehra et al., 2024).

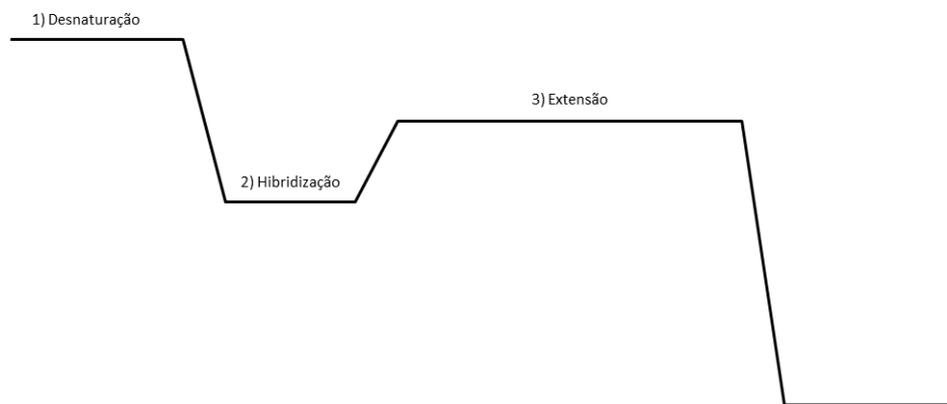


Figura 2.7 Reação de amplificação de DNA por PCR com identificação das três etapas que a constituem; 1: Desnaturação, 2: Hibridização, e 3: Amplificação.

Atualmente são utilizadas duas técnicas distintas: o PCR digital e o PCR quantitativo ou “em tempo real” (qPCR: ‘real-time quantitative polymerase chain reaction’).

O qPCR permite a deteção e quantificação do DNA alvo em tempo real, ou seja, de acordo com a progressão da reação. Tal é permitido dada a utilização de corante fluorescente que se liga ao DNA, correlacionando a concentração de produto PCR com a fluorescência, ou seja, quanto maior a fluorescência, maior é a concentração de DNA alvo. Importa salientar que na utilização desta técnica devem ser selecionados ‘primers’ específicos para o microrganismo a identificar (Jalali et al., 2017).

Assim, pode-se considerar que a qPCR é a técnica mais aconselhada, dado que é muito específica e sensível, permitindo a deteção e quantificação do DNA alvo de acordo com a progressão da reação, uma vez que a amplificação, deteção e quantificação podem ocorrer em simultâneo. Para além disso, permite quantificar com precisão o DNA presente na amostra, sem que haja a necessidade de manipulação do produto PCR em eletroforese (Jalali et al., 2017).

2.9. Atuais Metodologias de Controlo da Tuberculose da Oliveira

Atualmente são utilizados dois meios de controlo da Tuberculose, o controlo cultural e o controlo químico. O controlo cultural corresponde à remoção dos ramos que apresentam galhas e posterior destruição da lenha da poda, com o objetivo de diminuir a fonte de inóculo para o ano seguinte; utilização de variedades menos suscetíveis; desinfeção de todos os equipamentos de corte e colheita entre árvores, entre olivais ou zonas infetadas; intervenções de corte iniciadas preferencialmente pelas árvores sãs e com o tempo seco. Como controlo químico, apesar de não existirem produtos curativos, pode-se recorrer a tratamentos cúpricos para prevenção, dado o cobre ser uma substância bacteriostática nas plantas, devendo estes ser realizados imediatamente após a realização de qualquer operação cultural que cause feridas. No entanto, segundo o Regulamento (EU) 2018/1981 da Comissão Europeia, são impostos limites de utilização de cobre nos solos agrícolas (*Copper in topsoils - ESDAC - European Commission*, sem data).

2.10. Recentes Metodologias de Controlo da Tuberculose da Oliveira

Nas mais recentes metodologias de controlo de doenças tem-se mostrado relevante a utilização de bioestimulantes, que são produtos/substâncias que estimulam os processos naturais de defesa das plantas através da indução de processos fotossintéticos, ativação e expressões génicas e melhoria nos processos metabólicos naturais, dado que a bioestimulação tem um efeito 'priming' nas plantas. O efeito 'priming' caracteriza-se pela ocorrência de um estímulo ao qual há uma resposta sistémica, provocando alterações fisiológicas (adaptações da membrana, síntese de proteínas, resistência a 'stresses', etc.), sendo promovido um processo metabólico de produção de hidratos de carbono, para que a planta reaja ao meio ambiente e reforce os tecidos, sem que haja um maior gasto energético, mitigando o impacto das condições adversas. Desta forma, conseguem-se obter plantas mais saudáveis e, por isso, menos suscetíveis a doenças (Cocetta et al., 2022).

Segundo Jardim (2015), os bioestimulantes podem ser classificados em: ácidos húmicos e fúlvicos, algas e extratos botânicos, proteínas hidrolisadas, aminoácidos, compostos inorgânicos e microrganismos (bactérias e fungos benéficos).

No olival verifica-se a utilização maioritária de bioestimulantes compostos por aminoácidos e extratos de algas. Os aminoácidos, dos quais se destacam a metionina, lisina, glicina e ácido glutâmico por serem os predominantes da composição das proteínas vegetais,

permitem à planta após um período de stress abiótico recuperar o seu normal desenvolvimento e vigor reduzindo o seu gasto energético; formação de tecidos vegetais através da estabilização de proteínas após um stress térmico; neutralização de espécies reativas de oxigénio produzidas pela planta durante ocorrências de stress abiótico, apresentando um papel antioxidante; estímulo da síntese de clorofila e o desenvolvimento de folhas jovens, favorecendo também o desenvolvimento radicular; função osmorreguladora; aumento da estabilidade das membranas celulares em condições de temperaturas inferiores às ótimas. Dos diferentes extratos de algas marinhas, destacam-se os provenientes de *Ascophyllum nodosum*, que para além de representarem um grande 'input' de nutrientes orgânicos, têm na sua composição componentes que promovem o crescimento e a tolerância a fatores adversos.

2.11. Péptidos Antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos (AMPs) são constituídos por um pequeno número de aminoácidos, no máximo, 50 a 100, pelo que são considerados péptidos curtos, normalmente, com carga positiva e com características hidrofóbicas e hidrofílicas em regiões distintas (Li et al., 2021). Os AMPs existem na natureza e apresentam um amplo espectro de ação, tendo a capacidade de controlar doenças causadas, por exemplo, por bactérias, fungos e vírus, sendo eficaz a sua utilização a baixas concentrações e com pouca tendência de serem criadas resistências à sua utilização, sendo por isso uma excelente alternativa apresentada ao uso de antibióticos, aos quais têm sido criadas inúmeras resistências, colocando em causa a sua eficácia, e os quais não é permitida a sua utilização na produção agrícola (Li et al., 2021; Li et al., 2022).

Para além da sua atividade antimicrobiana, tem se verificado que os AMPs permitem aumentar a resistência das plantas a pragas e doenças e que atuam na promoção de um melhor crescimento e desenvolvimento, uma vez que a sua atividade é translinear a todo o ciclo de vida da planta e a sua produção e acumulação é regulada pelas hormonas vegetais (Li et al., 2021).

Os AMPs podem ser classificados de acordo com a sua origem, atividade, características estruturais e tipo de aminoácidos predominantes. Estes existem na natureza, podendo ser provenientes de mamíferos, anfíbios, microrganismos e insetos. A classificação em relação à sua atividade diz respeito à finalidade com que o AMP é utilizado, ou seja, qual o agente patogénico que se pretende controlar. Desta forma, existem inúmeras categorias, como antiviral, antifúngico e antibacteriano (Huan et al., 2020).

Em termos estruturais os AMPs podem ser divididos em quatro categorias: péptidos lineares α -hélice, péptidos folha- β , péptidos de estrutura linear e péptidos α -hélice e folha- β (Figura 2.8).

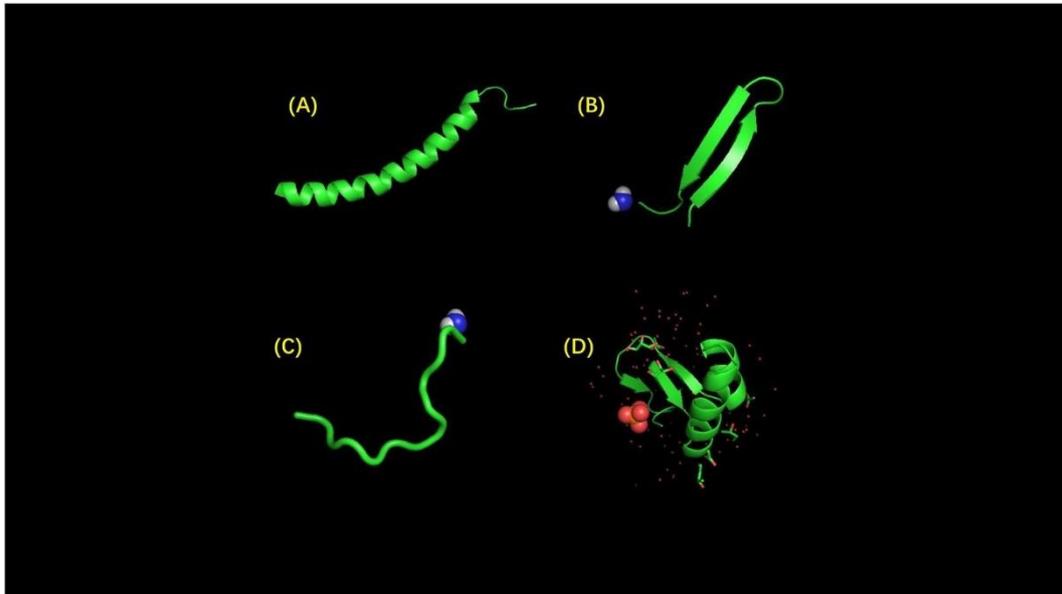


Figura 2.8 Diferentes estruturas dos AMPs. A - péptidos lineares α -hélice, B - péptidos folha- β , C – péptidos de estrutura linear, D - péptidos α -hélice e folha- β .

Fonte: Huan et al., 2020

Por fim, os AMPs podem ainda ser classificados de acordo com os aminoácidos predominantes, desta forma existem também 4 classificações, quando o peptídeo é rico em prolina, triptofano e arginina, histidina e glicina, verificando-se como principal diferença o mecanismo de ação na morte celular (Huan et al., 2020).

Os mecanismos de ação dos AMPs na interação com as células, quando existe um direcionamento para a membrana, têm sido descritos através de três diferentes modelos: o modelo de tapete, o modelo de poro toroidal e o modelo de poro de barril (Figura 2.9) (Huan et al., 2020).

No modelo de tapete há uma adsorção dos AMPs paralelamente à superfície da membrana celular e a degradação da mesma é feita na forma de “detergente”. No caso do modelo do poro toroidal, os AMPs acumulam-se e de forma vertical, são inseridos na membrana celular, formando um orifício em forma de anel. Já o modelo do poro de barril, os AMPs unem-se e inserem-se na bicamada da membrana celular na forma de multímeros, organizando-se de forma paralela aos fosfolípidos, o que leva à formação de um canal/poro (Huan et al., 2020).

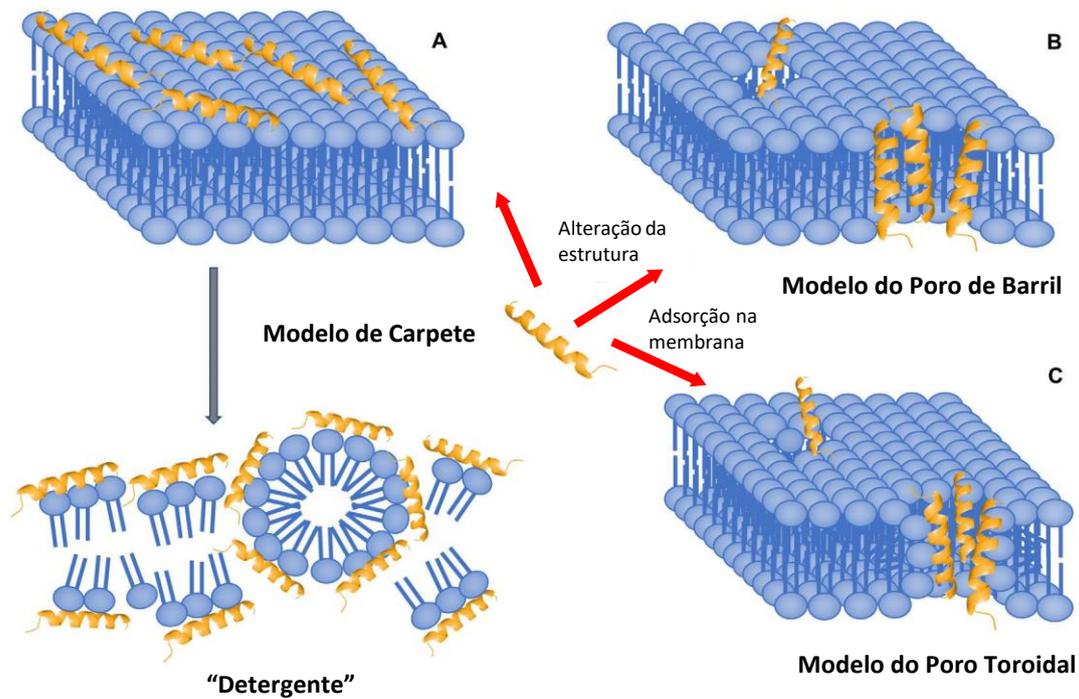


Figura 2.9 Modelos de ação dos AMPs. Legenda: A - Modelo de carpete, B - Modelo de poro de barril, C - Modelo de poro toroidal.

Fonte: Huan et al., 2020

No entanto, o modo de ação do AMP com a célula, pode não ser direcionado para a membrana celular, mas sim através da endocitose ou da penetração direta do AMP na célula. Quando o AMP está no citoplasma atua no alvo a que se destina, porém de acordo com o mesmo os AMPs podem ser divididos em categorias. Ou seja, o AMP pode inibir a biossíntese de proteínas (afetando a transcrição e a tradução), a biossíntese de ácidos nucleicos (inibindo ou degradando as moléculas de ácidos nucleicos), a atividade da protease ou até mesmo a divisão celular (inibindo a replicação de DNA) (Huan et al., 2020).

O AMP 'Thusin A2' (ThsA2), com a sequência de aminoácidos GXPAXXAIXAIIAATAQSPCTXACSKSCNK é um péptido ribossomal de cadeia polipeptídica, isolado da bactéria *Bacillus thuringiensis* BGSC 4BT1, apresenta como grupo-alvo, bactérias Gram+ e Gram- interagindo com a bicamada lipídica, nomeadamente *Sphingobacterium* sp., *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas psychrophila*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacie*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae* (Pirtskhalava et al., 2021).

Já o AMP 'Myeloid antibacterial peptide 23' (PMAP-23), de sequência de aminoácidos RIIDLWRVRRPQKPKFVTWVVR, é também um péptido ribossomal de cadeia polipeptídica, isolado de *Sus scrofa*, tem ação bactericida, interagindo com a bicamada lipídica e com o DNA ou RNA. Dos diferentes microrganismos nos quais tem atividade antagonista, destacam-se: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (Pirtskhalava et al., 2021).

Embora o recurso a AMPs como método de controlo de doenças seja uma tecnologia recente e pouco estudada, existem alguns casos de sucesso que mostram que de facto os AMPs são excelentes alternativas aos meios de controlo atualmente utilizados. Em 2014, Bundó et al. verificaram que a cecropina A bioativa quando acumulada no endoesperma do arroz permite adquirir resistência ao *Fusarium verticillioides* e ao *Dickeya dadantii*. Já Colombo et. al (2020) percebeu que a utilização do péptido NoPv1 permite inibir o desenvolvimento do tubo germinativo da *Plasmopara viticola*, agente causal do míldio da videira, controlando desta forma uma das doenças com maior impacto na cultura da videira e responsável por 75% das perdas de produção. Este mesmo AMP tem ainda a capacidade de interferir no crescimento da *Phytophthora infestans*, responsável pelas infeções de míldio na cultura do tomateiro e batateira (Colombo et al., 2020).

A *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) é responsável pelo cancro bacteriano do kiwi, em 2023 Zhang e co-autores testaram a utilização do AMP Jelleine-Ic o qual demonstrou capacidade bactericida *in vitro* e *in vivo* para controlo da doença.

A utilização de AMPs para controlo de doenças na oliveira é ainda pouco comum. Em 2021, Moll e co-autores verificaram que a utilização dos AMPs 1036 e RIJK2, ambos com atividade bactericida e antibiofilme, foram de entre os utilizados no estudo os que desempenharam uma melhor atividade de controlo da doença causada por *Xylella fastidiosa* com uma toxicidade baixa-moderada, doença para a qual não existe atualmente nenhum meio curativo. No entanto, a utilização de AMPs para controlo da Tuberculose da oliveira nunca foi testada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Origem do Material Vegetal

Foram recolhidos aleatoriamente ramos de oliveira sintomáticos de Tuberculose (com presença de galhas) em olivais das regiões do Alentejo e do Algarve, com recurso a uma tesoura de poda, devidamente desinfetada entre recolhas para evitar contaminações. Depois de recolhidas, as amostras foram identificadas por número sequencial de 1 a 30, colocadas em sacos e conservadas a 4°C até serem processados. Os ramos recolhidos pertencem às cultivares Arbequina, Arbosana, Azeiteira, Cobrançosa, Cordovil, Cordovil de Serpa, Galega, Koroneiki, Maçanilha, Ojiblanca, Picual e Verdeal Alentejana, cultivadas em modo de produção integrada, biológico ou convencional (Quadro 3.1).

Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo.

Oliveira	Nº	Cultivar	Local	Tipo de produção	Regadio/ sequeiro	Modo de Produção
	1	Cordovil de Serpa	Serpa	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	2	Picual	Pedrógão	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	3	Picual	Pedrógão	Tradicional	Regadio	Convencional
	4	Galega	São Vicente e Ventosa	Intensivo	Regadio	Integrada
	5	Arbosana	Monforte	Super-intensivo	Regadio	Integrada

Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo (continuação).

Oliveira	Nº	Cultivar	Local	Tipo de produção	Regadio/ sequeiro	Modo de Produção
	6	Cordovil de Serpa	A-do-Pinto	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	7	Cordovil de Serpa	Serpa	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	8	Arbosana	Monforte	Super-intensivo	Regadio	Integrada
	9	Picual	Pedrógão	Tradicional	Regadio	Convencional
	10	Galega	Torrão	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	11	Cobrançosa	Torrão	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	12	Cobrançosa	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional

Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo (continuação).

Oliveira	Nº	Cultivar	Local	Tipo de produção	Regadio/ sequeiro	Modo de Produção
	13	Azeiteira	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	14	Galega	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	15	Galega	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	16	Galega	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	17	Galega	Sousel	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	18	Picual	Torrão	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	19	Galega	Beja	Tradicional	Sequeiro	Biológico

Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo (continuação).

Oliveira	Nº	Cultivar	Local	Tipo de produção	Regadio/ sequeiro	Modo de Produção
	20	Maçanilha	Martinlongo	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	21	Galega	Martinlongo	Tradicional	Sequeiro	Convencional
	22	Verdeal Alentejana	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada
	23	Picual	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada
	24	Ojiblanca	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada
	25	Galega	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada

Quadro 3.1 Material vegetal utilizado no estudo (continuação).

Oliveira	Nº	Cultivar	Local	Tipo de produção	Regadio/ sequeiro	Modo de Produção
	26	Galega	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada
	27	Arbequina	Avis	Intensivo	Regadio	Integrada
	28	Cordovil	Pias	Intensivo	Regadio	Integrada
	29	Arbosana	Avis	Intensivo	Regadio	Integrada
	30	Koroneiki	Avis	Intensivo	Regadio	Integrada

3.2. Isolamento Bacteriano

Para realizar todas as operações de isolamento bacteriano, no laboratório, em assepsia e diminuir o risco de contaminação, foram desinfetadas as bancadas com álcool 96% (v/v) e efetuaram-se as operações junto à chama do bico de Bunsen. É também de realçar que todo o material utilizado foi autoclavado a uma temperatura de 120°C e pressão de 1atm, durante 20 min.

Procedeu-se à realização de uma sequência de desinfecções exteriores do material vegetal, com o objetivo de diminuir eventuais contaminações externas. Os ramos foram cortados, para individualizar as galhas, com recurso a uma tesoura de poda previamente

desinfetada com álcool 96% (v/v), tendo a sequência de desinfecções iniciando-se com a submersão do material vegetal durante 2 min em etanol 96% (v/v), seguida de 2 min em peróxido de hidrogénio 3% (v/v), posteriormente, durante 2 min em etanol 70% (v/v) e, por fim, 3 min em água ultrapura, para remover o excesso de desinfetantes (Figura 3.1). Após retirados da água, os fragmentos de ramos com galhas foram secos em papel absorvente, para remover o excesso de humidade.

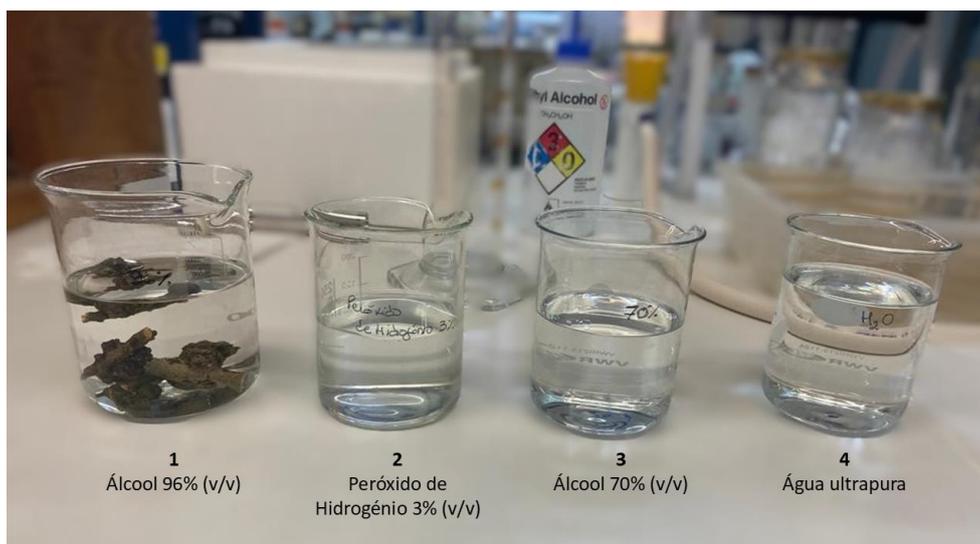


Figura 3.1 Sequência de desinfecção das amostras.

As galhas foram depois cortadas transversalmente, mais uma vez com uma tesoura de poda desinfetada, e foram realizados 'prints' em placas de Petri de 90mm com o meio de cultura PDA ('Potato dextrose agar') (VWR Internacional) (Figura 3.2), preparado segundo as instruções do fabricante.

Todas as placas foram identificadas com o número da amostra e colocadas a incubar a 24°C, durante o tempo necessário para que ocorresse o crescimento dos microrganismos presentes na amostra em questão, o que variava entre 2 e 4 dias.

Posteriormente, os diferentes microrganismos foram repicados para placas de Petri de 60mm com meio PDA. Estas foram também incubadas a 24°C até ao total preenchimento da placa, tendo sido depois agrupadas, segundo as suas características visuais (cor, forma da colónia e viscosidade). Foram realizadas tantas repicagens para placas de Petri com meio PDA quanto necessárias para a obtenção de cultura pura (Figura 3.3).

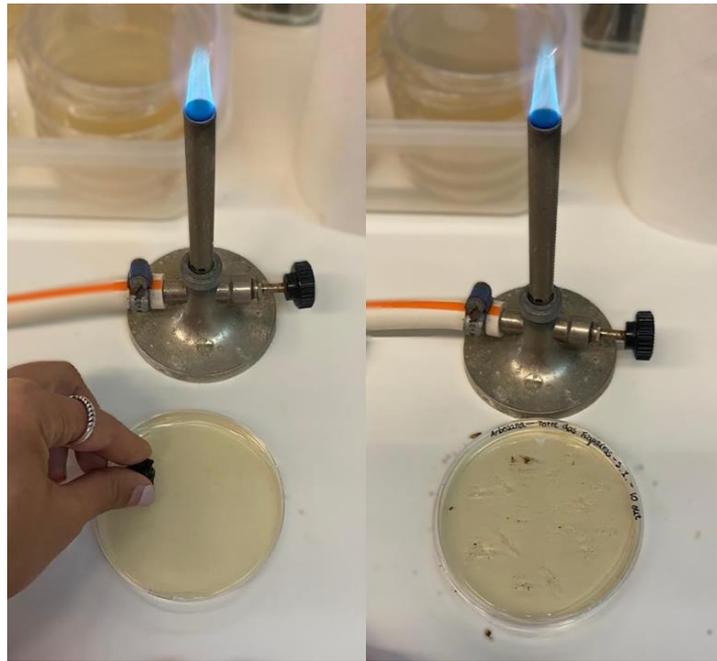


Figura 3.2 Realização de 'prints' em placa de Petri.



Figura 3.3 Repicagens de microrganismos para placa de Petri.

As culturas puras foram preservadas, adicionando em microtubos de 1,5mL as colónias bacterianas a 500 μ L de glicerol (40%) e 500 μ L de PDB ('Potato Dextrose Broth') (VWR Internacional), preparado de acordo com as instruções do fabricante, na câmara de fluxo laminar. Posteriormente, as amostras foram conservadas a -80°C.

3.3. Extração de DNA Bacteriano

Após a obtenção de culturas puras, procedeu-se à extração de DNA bacteriano. Para tal, em ambiente estéril e com o auxílio de um bisturi desinfetado com álcool a 70% (v/v) e à chama do bico de Bunsen procedeu-se à raspagem de todo o crescimento bacteriano de uma placa para um microtubo.

A extração do DNA bacteriano foi realizada segundo o método CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamonio), descrito por Doyle (1987) com algumas adaptações. Ao crescimento bacteriano retirado de uma placa de cultura pura adicionaram-se 600µL de tampão de extração CTAB 2% (CTAB 1X: 20mM EDTA, 0,1M Tris HCl pH 8, 1,4M NaCl, 2% de CTAB, 4% PVP, 0,1% de β-mercaptoetanol, adicionados imediatamente antes da sua utilização, e 0,5% de Proteinase K).

A suspensão foi incubada a 55°C durante 90 min e misturada, por inversão, a cada 15 min. Terminada a incubação, foram adicionados 600µL de clorofórmio-álcool isoamílico (21:1), tendo sido os microtubos posteriormente agitados durante 10 min. Procedeu-se de seguida à centrifugação dos microtubos durante 10 min a 12000rpm (Centrifuga 5415R, 'Eppendorf'), o sobrenadante foi recuperado para novos microtubos, aos quais se adicionaram 2,5 volumes de etanol absoluto frio (800µL). De seguida, homogeneizaram-se as amostras por inversão e centrifugaram-se a 13000rpm durante 20 min. Descartou-se o sobrenadante e o 'pellet' foi lavado com 500µL de etanol a 70% com o objetivo de retirar eventuais sais que tenham aderido ao DNA. Voltou-se a centrifugar a 13000rpm durante 15 min e o sobrenadante foi descartado. O 'pellet' foi a secar na centrifuga 'speed vacuum' (CentriVsp micro IR, Labconco) a 55°C para promover a evaporação do etanol na totalidade. Para terminar, ao 'pellet' já seco foram adicionados 30µL de água ultrapura e o DNA foi conservado a -20°C.

3.4. Amplificação de DNA Bacteriano por PCR

O DNA bacteriano extraído foi sujeito a PCR para amplificação de uma porção de 1300 pb de rRNA 16S, utilizando os 'primers' Y1 e Y3 (Laranjo et al., 2004), os quais são específicos para amplificação bacteriana e os 'primers' IAALF, IAALR, IAALN1 e IAALN2 específicos para a *Pseudomonas savastanoi* que amplificam um fragmento de 338pb (Bertolini et al., 2003; Penyalver et al., 2000) (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 Sequências dos 'primers' Y1, Y3, IAALF, IAALN1 e IAALN2.

'Primer'	Sequência	Tamanho do 'primer' (pb)	Tamanho do amplificação (pb)
Y1	5' TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC 3'	24	1300
Y3	5' TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC 3'	26	
IAALF	5' GGCACCAGCGGCAACATCAA 3'	20	338
IAALR	5' CGCCCTCGGAACTGCCATAC 3'	20	
IAALN1	5' CTCCCTCTCCAACGTCTTC 3'	19	
IAALN2	5' GCCTGATTTCTTCTG 3'	18	

Outra metodologia de amplificação testada foi a realização das reações de amplificação, em que em vez de DNA bacteriano extraído, estas foram realizadas com a picagem de uma colônia bacteriana com ansa esterilizada. As reações, em ambos os casos, para um volume final de 50µL foram compostas por: 10µM Tris HCl (pH 8,6), 50µM KCl, 1,25µM MgCl₂, 0,2µM dNTPs (Thermo Scientific), 0,32µM de cada 'primer' e 1,25U de DreamTaq DNA polimerase (Thermo Scientific).

A amplificação com os 'primers' Y1 e Y3 foi realizada recorrendo a um termociclador MyCycler (Bio-Rad) a 95°C durante 3 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 60°C durante 1 min e 72°C durante 2 min e a extensão final a 72°C durante 10 min (Figura 3.4).

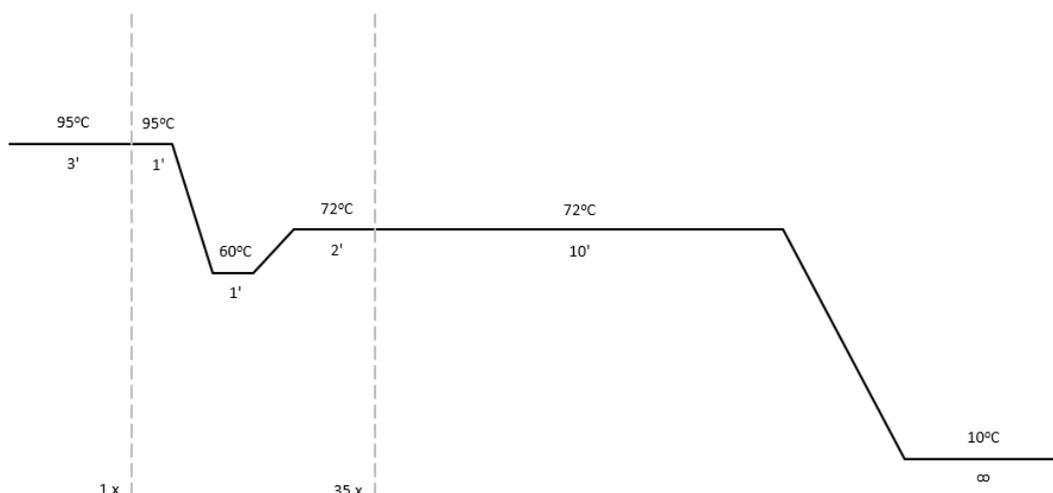


Figura 3.4 Reação de amplificação de DNA por PCR com os 'primers' Y1 e Y3.

Quando utilizados os 'primers' IAALF, IAALR, IAALN1 e IAALN2, a amplificação foi realizada a 95°C durante 3 min, seguidos de 25 ciclos de 95°C durante 30 s, 62°C durante 30 s e 72°C durante 30 s, seguiram-se 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 50°C durante 30 s e 72°C durante 30 s e a extensão final a 72°C durante 10 min (Figura 3.5).

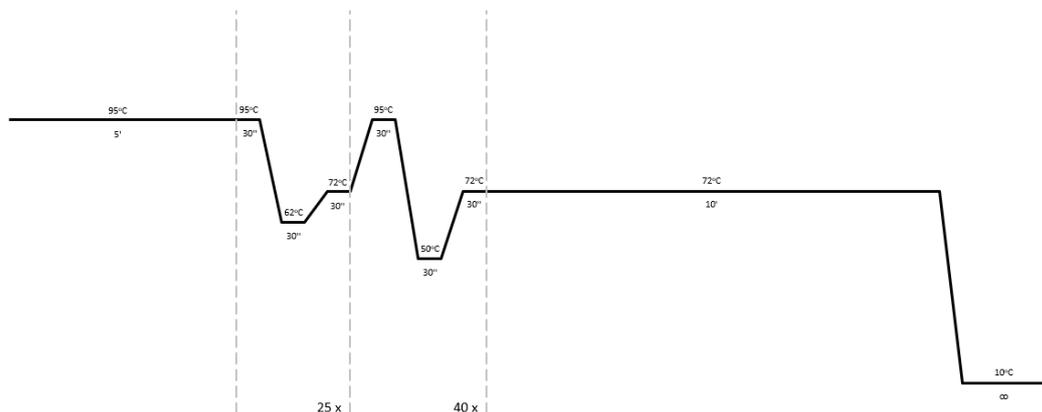


Figura 3.5 Reação de amplificação de DNA por PCR com os 'primers' IAALF, IAALR, IAALN1 e IAALN2.

Os produtos resultantes da amplificação foram analisados através da electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (0,5X: 1,1M Tris; 900mM Borate; 25mM EDTA; pH 8,3) com uma voltagem constante de 80V, durante aproximadamente 1 h. Para posterior análise, utilizou-se como referência o marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) e os géis foram visualizados num aparelho de digitalização de imagem SMART 5 (VWR).

3.5. Purificação dos Produtos de Amplificação

Os produtos de PCR depois de analisados em gel de agarose foram purificados, utilizando o kit DNA Clean & Concentrator (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante, exceto nas quantidades aplicadas de 'Binding Buffer' e 'Elution Buffer', as quais foram, respetivamente, 300 µL e 30 µL.

De seguida as amostras purificadas foram enviadas para sequenciação na empresa Macrogen (Espanha).

3.6. Sequenciação de DNA e Análise Bioinformática

Os resultados da sequenciação foram analisados com o programa MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11 (Tamura et al., 2021).

A pesquisa de seqüências homólogas foi realizada utilizando a base de dados "Basic Local Alignment Search Tools" (BLAST N) do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). Sempre que possível as seqüências foram identificadas até à espécie ou mesmo até à estirpe e com um grau de semelhança o mais próximo possível dos 100% (entre os 90% e os 100%).

Após o alinhamento das sequências e a realização dos testes para perceber qual o modelo mais adequado, com um suporte de 'bootstraps' de 1000 replicações, foram realizadas árvores filogenéticas com o objetivo de verificar a existência de variabilidade genética e de que forma as características da amostra, nomeadamente, cultivar, local, tipo e modo de produção e regadio ou sequeiro, poderiam estar diretamente relacionadas. Para tal recorreu-se às funcionalidades do programa MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11 (Tamura et al., 2021) foram utilizadas como 'outgroup' 3 sequências da base de dados BAST N da região 16S: *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 (nº de acesso: NR 102804) (*Escherichia Coli Str. K-12 Substr. MG1655 Strain K-12 16S Ribosomal RNA, Complete Sequence*, 2015) e duas outras sequências isoladas de plantas de oliveira, Pss str. HZP14 (nº de acesso: MW730650) (*Pseudomonas Savastanoi Pv. Savastanoi Strain HZP14 16S Ribosomal RNA Gene, Partial Sequence*, 2021) e *Pantoea agglomerans* str. SC1 (nº de acesso: DQ307454) (Koščák et al., 2023).

As sequências obtidas dos isolados dos géneros *Pseudomonas* e *Pantoea* foram posteriormente submetidas no NCBI, tendo sido desta forma atribuído um número de acesso a cada uma.

3.7. Testagem da Patogenicidade dos Isolados Bacterianos

O processo de testagem da virulência dos isolados bacterianos foi realizado em quatro etapas: a escolha do isolado, o isolamento da estirpe em placa, a escolha das plantas e a inoculação das mesmas.

3.7.1. Escolha dos Isolados

Para a escolha do isolado foi tida em consideração a maior predominância e o grau de semelhança com as sequências presentes no NCBI, de uma determinada estirpe de *Pseudomonas* e de *Pantoea* de acordo com a análise bioinformática, pelo que de entre os vários isolados bacterianos obtidos, foram selecionadas as amostras 4CI de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e 1E de *Pantoea agglomerans*.

3.7.2. Isolamento da Estirpe em Placa

O isolamento da estirpe foi realizado em ambiente de assepsia e junto à área de influência da chama do Bico de Bunsen. Foram inoculadas 4 placas de Petri com PDA por amostra, de modo a se obterem quantidades suficientes de bactéria para as suspensões

bacterianas com a concentração adequada, tendo sido essas placas incubadas a 24°C durante 24 h.

Foi realizada a suspensão dos microrganismos em tubos Falcon de 50mL com PDB com a raspagem de todo o crescimento bacteriano obtido das 4 placas de Petri. Uma vez que foram utilizadas duas amostras de microrganismos diferentes, para garantir que a concentração das mesmas era idêntica, procedeu-se à leitura da densidade ótica das suspensões bacterianas com recurso a um leitor de placas Bio-Med Mod 680 a 655nm.

Segundo Rutten et al. (2019) uma unidade formadora de colónia (UFC) corresponde a uma absorvância de 0.1 de densidade ótica (OD) a 600nm, pressupondo que uma célula bacteriana dará origem a 1 colónia.

3.7.3. Escolha das Plantas

Como material vegetal para a inoculação foram utilizadas 12 plantas com 6 meses, da cultivar Galega vulgar, já aclimatizadas e provenientes de cultura *in vitro*, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Évora/MED. Das 12 plantas, 3 foram utilizadas como controlo negativo, 3 inoculadas com *Pantoea agglomerans* (amostra 1E), 3 inoculadas com *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (amostra 4CI) e 3 inoculadas de forma conjunta com *Pantoea agglomerans* e com *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (amostras 1E e 4CI, respetivamente).

3.7.4. Inoculação Bacteriana das Plantas

Foram realizadas em cada uma das 12 plantas, 3 cortes em ramos e uma abscisão foliar. A inoculação das plantas foi realizada com 10µL de suspensão bacteriana acertada a 1.3 OD, o que corresponde a 13 UFC (Young et al., 2004).

Do total das 12 plantas, 3 foram inoculadas com meio de cultura PDB, sendo as plantas controlo, 3 foram inoculadas com a suspensão de meio de cultura PDB e *Pantoea agglomerans*, 3 foram inoculadas com a suspensão de meio de cultura PDB e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e, por fim, outras 3 foram inoculadas com a suspensão de meio de cultura PDB, *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Para identificação das plantas em estudo, foi utilizada a seguinte terminologia: C – plantas controlo, P - plantas inoculadas com PDB e *Pantoea agglomerans*, Pss – plantas inoculadas com PDB e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e P+Pss – plantas inoculadas com

Pantoea agglomerans e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, seguido do número sequencial de 1 a 3.

Durante 3 meses, as plantas foram mantidas em ambiente controlado a 25°C e fotoperíodo de 12 h, tendo sido analisado o crescimento de galhas e registada a sua dimensão (diâmetro) com recurso a uma craveira (com uma incerteza de 0,05cm). Nas plantas em que se identificou a sua presença como sintoma de Tuberculose, as galhas foram identificadas com numeração romana sequencial no sentido da raiz para as folhas.

3.8. Seleção de AMPs

A seleção dos AMPs utilizados foi realizada de acordo com o tipo de ação antagonista consultando diretamente a base de dados DBAASP ('Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptide') (Pirtskhalava et al., 2021) . Desta forma, foram selecionados os AMPs PMAP-23 e ThsA2, uma vez que ambos apresentam atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas* spp. (Pirtskhalava et al., 2021).

3.9. Testes de Sensibilidade

Para os testes de sensibilidade foram utilizadas as mesmas amostras da testagem da patogenicidade dos isolados bacterianos, 1E e 4Cl, *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, respetivamente.

Para proceder ao crescimento bacteriano e serem utilizadas colónias jovens, foram realizadas repicagens para 3 placas de Petri por amostra, e foram incubadas a 24°C durante 24 h.

Em câmara de fluxo foram adicionados 15 mL de meio PDB em 6 tubos Falcon de 50mL (3 por amostra). De seguida, em ambiente de assepsia e junto à área de influência da chama do bico de Bunsen foram retiradas colónias das placas de Petri, com o auxílio de palitos esterilizados, e adicionadas aos tubos de Falcon com meio (1 palito por Falcon).

Procedeu-se à sua incubação a 27°C e 160rpm (Ramos et al., 2012), com recurso à incubadora IKA KS 400 ic (VWR) à qual estava acoplado o refrigerador RC-10 Digital Chiller (VWR), tendo sido lida a absorvância com o espectrofotómetro CECIL CE1021 1000 Series de 4 em 4 h para estabelecer a concentração de 0.3 OD.

Os AMPs encontravam-se liofilizados pelo que foram ressuspensos em água ultrapura para obtenção de uma concentração de 10mg/mL (Wu et al., 2014).

Para a testagem de sensibilidade das bactérias aos AMPs foram utilizadas 5 concentrações distintas, 1×10^{-2} mg/μL, $2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL, $6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL, $1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL e $3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL, tendo sido realizadas 3 réplicas por teste.

Foram utilizadas placas de microtitulação de fundo plano Nunc de 96 poços, tendo sido colocado em cada poço 200 μL das amostras em teste, de acordo com os Quadros 3.3 e 3.4.

Quadro 3.3 Esquema da placa de microtitulação com identificação das concentrações do AMP em PDB para a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

	Meio PDB + <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Meio PDB + <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> + AMP ThsA2					Meio PDB	Meio PDB + AMP ThsA2				
		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
	Meio PDB + <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Meio PDB + <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> + AMP PMAP-23					Meio PDB	Meio PDB + AMP PMAP-23				
		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E												
F												
G												
H												

Quadro 3.4 Esquema da placa de microtitulação com identificação das concentrações do AMP em PDB para a bactéria *Pantoea agglomerans*.

	Meio PDB + <i>Pantoea agglomerans</i>	Meio PDB + <i>Pantoea agglomerans</i> + AMP ThsA2					Meio PDB	Meio PDB + AMP ThsA2				
		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
	Meio PDB + <i>Pantoea agglomerans</i>	Meio PDB + <i>Pantoea agglomerans</i> + AMP PMAP-23					Meio PDB	Meio PDB + AMP PMAP-23				
		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL		1×10^{-2} mg/μL	$2,5 \times 10^{-3}$ mg/μL	$6,25 \times 10^{-4}$ mg/μL	$1,56 \times 10^{-4}$ mg/μL	$3,9 \times 10^{-5}$ mg/μL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E												
F												
G												
H												

A leitura da absorvância foi realizada no espectrofotômetro CECIL CE1021 1000 Series. As primeiras três leituras foram realizadas com intervalos de 4 h, a quarta leitura foi feita 12 h após a terceira leitura, a quinta e sexta leituras foram também realizadas com 4 h de diferença.

De forma a interpretar as leituras de absorvância ao longo do tempo, foram calculadas as taxas de crescimento bacteriano ao longo do tempo para as diferentes concentrações de estudo de AMP e realizadas análises estatísticas com recurso ao software IBM SPSS Statistics for

Windows (2011). Inicialmente foi verificada a homogeneidade de variâncias através do Teste de Levene para $p\text{-value} < 0.05$ e testes de comparações múltiplas, recorrendo à ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis, de acordo com os resultados do Teste de Levene, com o objetivo de perceber as interações entre os fatores tempo e concentração, e principalmente perceber qual a concentração mais adequada ao controle do crescimento bacteriano.

4. Resultados

4.1. Culturas Bacterianas Puras

Neste trabalho foram obtidas 30 placas de Petri com diversas culturas bacterianas de diferentes olivais, o que permitiu obter uma diversidade de microrganismos morfológicamente distintos.

Das 30 culturas foi realizada uma seleção de acordo com a cor e morfologia do crescimento das colónias bacterianas, tendo sido atribuído um código de identificação da amostra constituído por: número da amostra (1 a 30), letra sequencial de acordo com as repicagens realizadas (A a Z) e número romano no caso se terem sido realizadas repicagens duas vezes (I a X), o que resultou em 86 colónias puras (Figura 4.1).

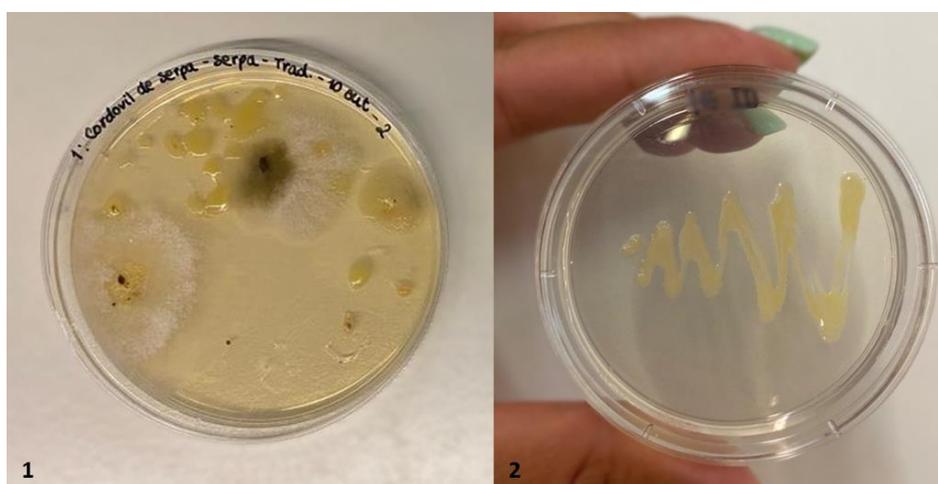


Figura 4.1 Crescimento de microrganismos em placa de Petri. 1- Evidências de crescimento bacteriano e fúngico; 2 - Riscado de colónia bacteriana pura.

4.2. Amplificação por PCR

A amplificação por PCR foi realizada com dois métodos distintos, um com extração de DNA e um outro sem recurso a extração, apenas com uma picagem diretamente da colónia bacteriana.

Das amplificações por PCR realizadas com DNA extraído pelo método CTAB não se obteve amplificação, desta forma optou-se pelo recurso ao método sem extração de DNA.

Os PCRs realizados com os 'primers' Y1 e Y3 originaram produtos de amplificação com o tamanho esperado de 1300pb (Figura 4.2), no entanto nem todas as colónias testadas amplificaram, pelo que estas foram posteriormente sujeitas a PCR com utilização dos 'primers' específicos para a *Pseudomonas* spp., uma vez que o objetivo era a identificação e seleção deste género bacteriano.

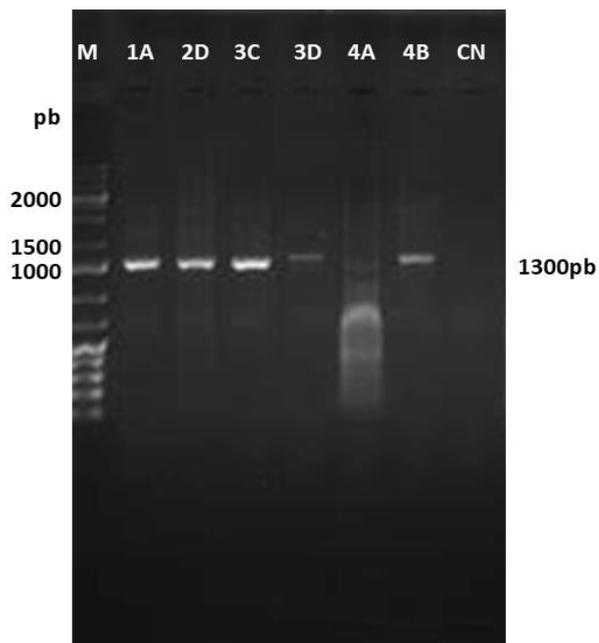


Figura 4.2 Análise dos produtos amplificados por PCR, para identificação dos isolados. Amostras 1A, 2D, 3C, 3D, 4A e 4B, M - '1kb plus DNA Ladder'; CN - Controlo negativo de PCR.

4.3. Análise das Sequências

Os produtos de PCR depois de amplificados e purificados foram sequenciados e analisados com o MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11, tendo-se obtido o resultado apresentado no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra.

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Cordovil de Serpa	1A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442030.1
		1B	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442031.1
		1E	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442032.1
		1F	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra (continuação).

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Picual	2A	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		2C	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	PQ441878.1
		2D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442033.1
		2E	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Picual	3AI	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441836.1
		3AII	<i>Pantoea</i> sp.	PQ441838.1
		3B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441840.1
		3C	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441877.1
		3D	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Galega	4A	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		4B	<i>Kosakonia</i> sp.	Não aplicável
		4CI	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	PQ441879.1
	Arbosana	5	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Cordovil de Serpa	6A	<i>Luteibacter</i> sp.	Não aplicável
		6B	<i>Luteibacter</i> sp.	Não aplicável
		6C	<i>Luteibacter</i> sp.	Não aplicável
	Cordovil de Serpa	7A	<i>Priestia aryabhattai</i>	Não aplicável
		7B	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		7D	<i>Bacillus aryabhattai</i>	Não aplicável

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra (continuação).

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Arbosana	8A	<i>Bacillus safensis</i>	Não aplicável
	Picual	9A	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		9B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441837.1
		9BI	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441839.1
		9C	<i>kosakonia</i> sp.	Não aplicável
	Galega	10H	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442034.1
	Cobrançosa	11	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Cobrançosa	12A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442035.1
		12D	<i>Priestia aryabhatai</i>	Não aplicável
		12E	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442036.1
		12EI	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442037.1
		12F	<i>Pantoea vagans</i>	PQ442038.1
	Azeiteira	13D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442039.1

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra (continuação).

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Galega	14A	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		14B	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Galega	15C	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442040.1
		15D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442041.1
	Galega	16	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Galega	17A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442042.1
		17B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442043.1
		17C	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442044.1
		17D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442045.1
	Picual	18A	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442046.1
		18B	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		18C	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442047.1
		18E	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		18F	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
			Galega	19A
19C	Não identificado por ausência de homologia			Não aplicável
19D	<i>Pantoea agglomerans</i>			PQ442049.1

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra (continuação).

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Maçanilha	20A	<i>Priestia aryabhatai</i>	Não aplicável
		20B	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442050.1
	Galega	21A	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		21B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442051.1
		21D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442052.1
	Verdeal Alentejana	22A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442053.1
		22C	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
		22E	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441842.1
	Picual	23A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442054.1
		23B	<i>Pantoea</i> sp.	PQ441843.1
	Ojiblanca	24A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442055.1
		24B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442056.1
		24E	<i>Pseudomonas</i> sp.	PQ441880.1
	Galega	25A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442057.1
		25B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442058.1
		25C	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441844.1
		25D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442059.1
	Galega	26A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442060.1
		26B	<i>Pantoea</i> sp.	PQ441881.1
		26D	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442061.1

Quadro 4.1 Microrganismo identificado por amostra (continuação).

Oliveira	Cultivar	Nº	Microrganismo Identificado	Nº de Acesso ao NCBI
	Arbequina	27A	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442062.1
		27B	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	PQ441882.1
		27C	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442063.1
		27D	<i>Pantoea</i> sp.	PQ442064.1
	Cordovil	28B	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442065.1
		28C	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442066.1
		28D	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ442067.1
		28E	<i>Pantoea agglomerans</i>	PQ441841.1
	Arbosana	29A	<i>Priestia megaterium</i>	Não aplicável
		29B	Não identificado por ausência de homologia	Não aplicável
	Koroneiki	30B	<i>Priestia</i> sp.	Não aplicável
		30C	<i>Priestia megaterium</i>	Não aplicável
		30D	<i>Priestia megaterium</i>	Não aplicável

Desta forma, das 86 sequências analisadas, referentes às 86 colônias isoladas, identificaram-se 4 *Pseudomonas* sp., 49 *Pantoea* spp., 7 *Priestia* sp., 3 *Luteibacter* sp., 2 *Bacillus* sp., 2 *Kosakonia* sp. e nas restantes amostras não foi possível a identificação de qualquer microrganismo por ausência de homologia com as sequências disponíveis no NCBI (Figura 4.3).

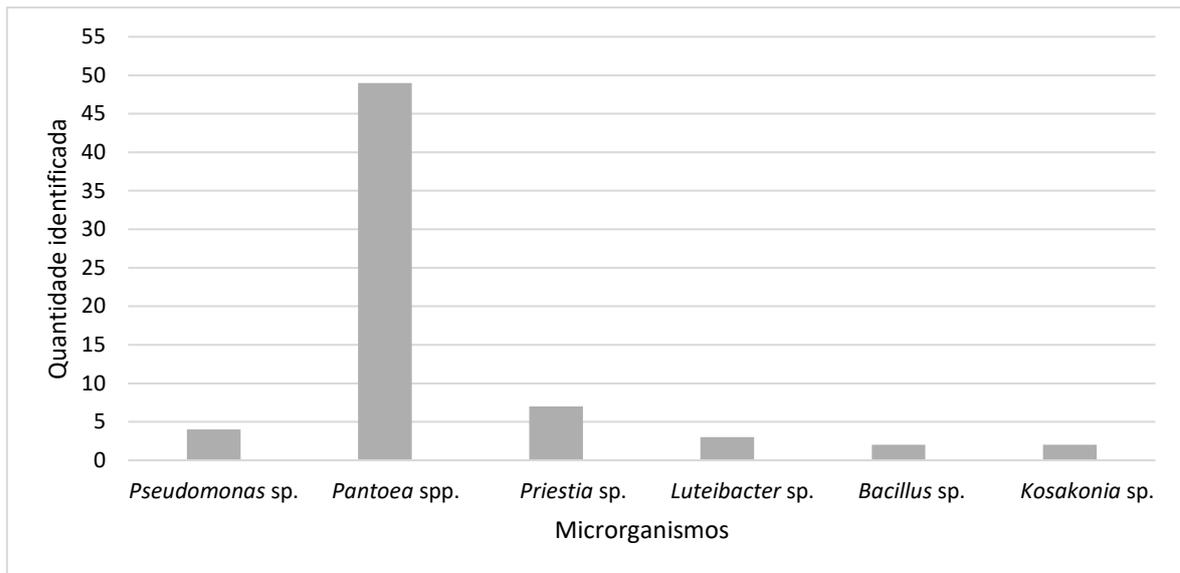


Figura 4.3 Identificação de microrganismos após pesquisa de homologia na base de dados BLAST N do NCBI.

Pantoea spp. é uma bactéria gram-negativa, de cor amarela, em forma de bastonete, com flagelos que lhe conferem mobilidade e anaeróbia facultativa (Morin, 2014). Das bactérias *Pantoea* sp. identificadas mais de 70% pertencem à espécie *Pantoea agglomerans*, a qual surge comumente associada à Tuberculose da oliveira, como espécie não patogénica, epifítica e endofítica, coexistindo com a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Estudos indicam que a *Pantoea agglomerans* enquanto espécie endofítica da oliveira estabelece um consórcio bacteriano estável com a Pss, o qual aumenta a gravidade da doença, uma vez que o ácido indolacético (IAA) e as citocininas produzidas pela espécie não patogénica induzem o aumento do tamanho das galhas. Nesta relação benéfica mútua, o crescimento da *Pantoea agglomerans* é apoiado pelo crescimento ativo da Pss (Selak et al., 2019).

Priestia sp. é uma bactéria em forma de bastonete, gram-positiva, maioritariamente presente no solo, apresentando um papel biorregulador da salinidade do solo (Biedendieck et al., 2021). Esta bactéria aparece relacionada com atividades bioquímicas promotoras do crescimento das plantas, nomeadamente na produção de auxinas, na solubilização de fosfato, na ação biológica contra agentes patogénicos e stress abiótico (Ortega-Urquieta et al., 2022).

Luteibacter sp. é uma proteobactéria gram-negativa, de cor amarela, em forma de bastonete e aeróbica (Friedrich et al., 2023). Tal como *Priestia* sp. esta bactéria encontra-se no solo, tendo a capacidade de degradar contaminantes ambientais (como os PCB-‘polychlorinated biphenyl’), solubilizar fosfatos e induzir o crescimento das plantas (Aamot et al., 2017).

Bacillus sp. é uma bactéria gram-positiva, de cor branca, facultativa anaeróbica. Atua como biorreguladora contra o stress causado pela salinidade do solo, tem a capacidade de

promover o crescimento das plantas através da produção de hormonas e promover a absorção de nutrientes por parte das plantas (Chebotar et al., 2023). Esta bactéria é encontrada nas comunidades endofíticas da oliveira, apresentando uma notável diminuição da presença de Pss, podendo desta forma ser considerada um bioregulador da Tuberculose da oliveira (Gharsallah et al., 2023).

Kosakonia sp. é uma bactéria gram-negativa, de cor bege, em forma de bastonete e anaeróbica facultativa, sendo as suas espécies maioritariamente isoladas do solo ou de plantas, podendo agir como promotoras do crescimento das plantas (Niu et al., 2019), incluindo a fixação de azoto, solubilização de fosfato, auxinas e processos biomoleculares (Quintas-Nunes et al., 2022).

4.4. Análise Filogenética

Dado que da sequenciação 5'-3' e 3'-5' dos isolados nem sempre foram obtidas sequências válidas, foram realizadas 3 árvores filogenéticas distintas, uma com as amostras sequenciadas no sentido 5'-3' (Apêndice I), uma outra com as amostras sequenciadas no sentido 3'-5' (Apêndice II) e uma outra com os 'contig' (quando da sequenciação em ambos os sentidos se obtiveram sequências completas) (Apêndice III). Na árvore filogenética representada na Figura 4.4, a Pss 4CI está filogeneticamente muito próxima da da estirpe 27B e 2C e mais distante da 24E, sendo esta última a mais próxima da estirpe HZP14 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* da base de dados. A *Pantoea agglomerans* 3C encontra-se no mesmo braço que a estirpe SC1 da base de dados e mais distante da estirpe 26B de *Pantoea* sp..

Na Figura 4.5, onde se encontra representada a árvore filogenética, verifica-se que a estirpe 27D de *Pantoea* sp. é filogeneticamente muito próxima da estirpe 28B de *Pantoea agglomerans*, mas mais distante das estirpes 17D, 17B, 17A, 15D, 1E e 15C. Já as estirpes 10H e 17C de *Pantoea agglomerans* são filogeneticamente muito próximas, o mesmo acontece com a estirpe 18A de *Pantoea* sp. e a estirpe 21D de *Pantoea agglomerans*. A estirpe SC1 de *Pantoea agglomerans* da base de dados é filogeneticamente mais próxima da estirpe 27A, mas mais distante da 28D. As estirpes 23A e 24B são muito próximas, mas mais distantes da 25D de *Pantoea agglomerans*. A estirpe 12F de *Pantoea vagans* é filogeneticamente mais afastada das estirpes 24A e 26A de *Pantoea agglomerans*, as quais são muito próximas. Já as estirpes 12E, 12EI e 21B de *Pantoea agglomerans* e 18C e 26D de *Pantoea* sp. são muito próximas filogeneticamente, mas distantes da estirpe 25B de *Pantoea agglomerans*. São também muito próximas as estirpes 12A, 13D e 28C de *Pantoea agglomerans*, mas mais distantes da 19A de *Pantoea* sp.. São ainda muito próximas as estirpes 22A e 25A de *Pantoea agglomerans* e 20B de

Pantoea sp, mas mais distantes das 1A, 2D, 19D de *Pantoea agglomerans* e 1B e 27C de *Pantoea* sp..

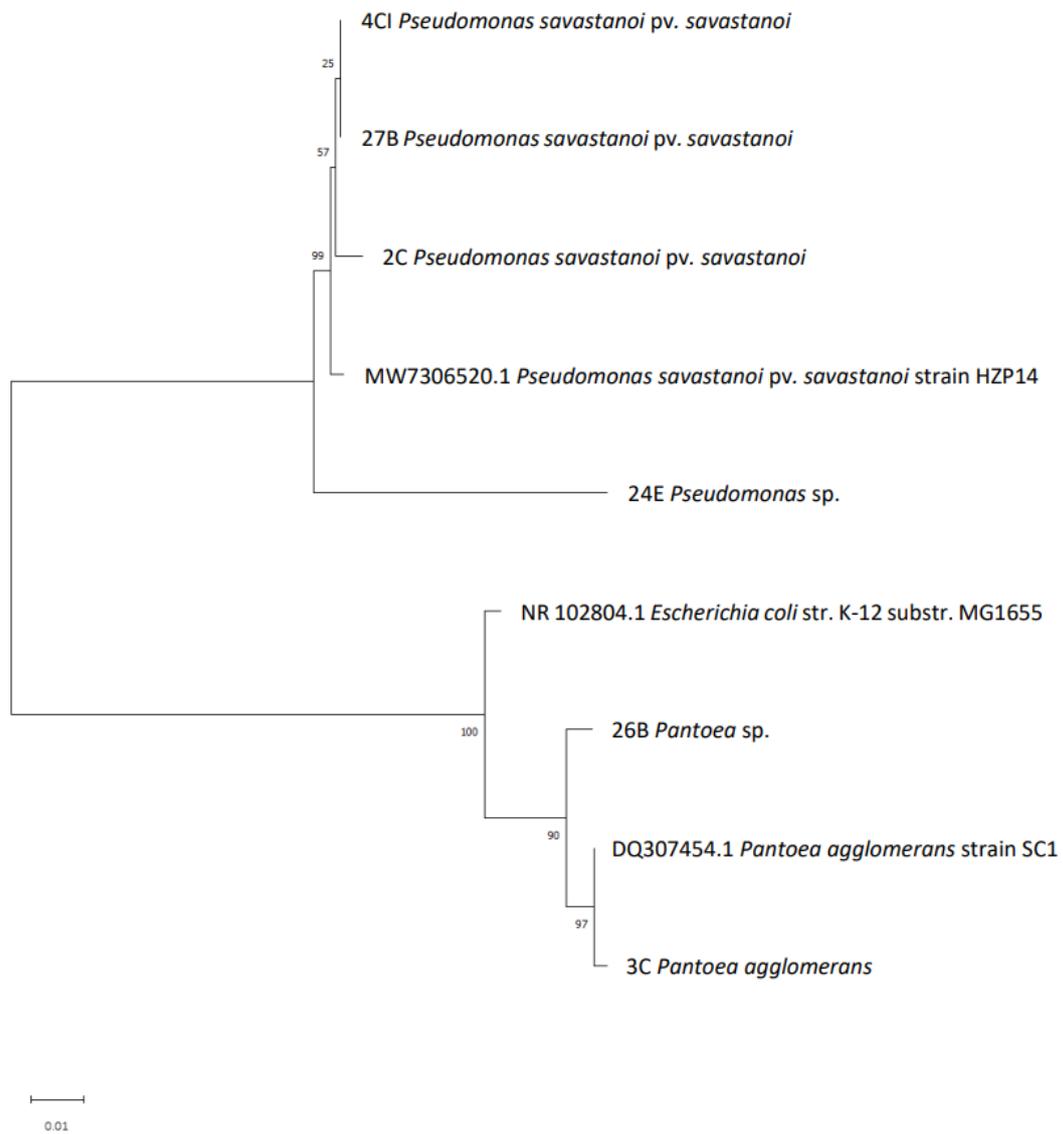


Figura 4.4 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Kimura 2-parameter e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* str. HZP14, *Pantoea agglomerans* str. SC1 e *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

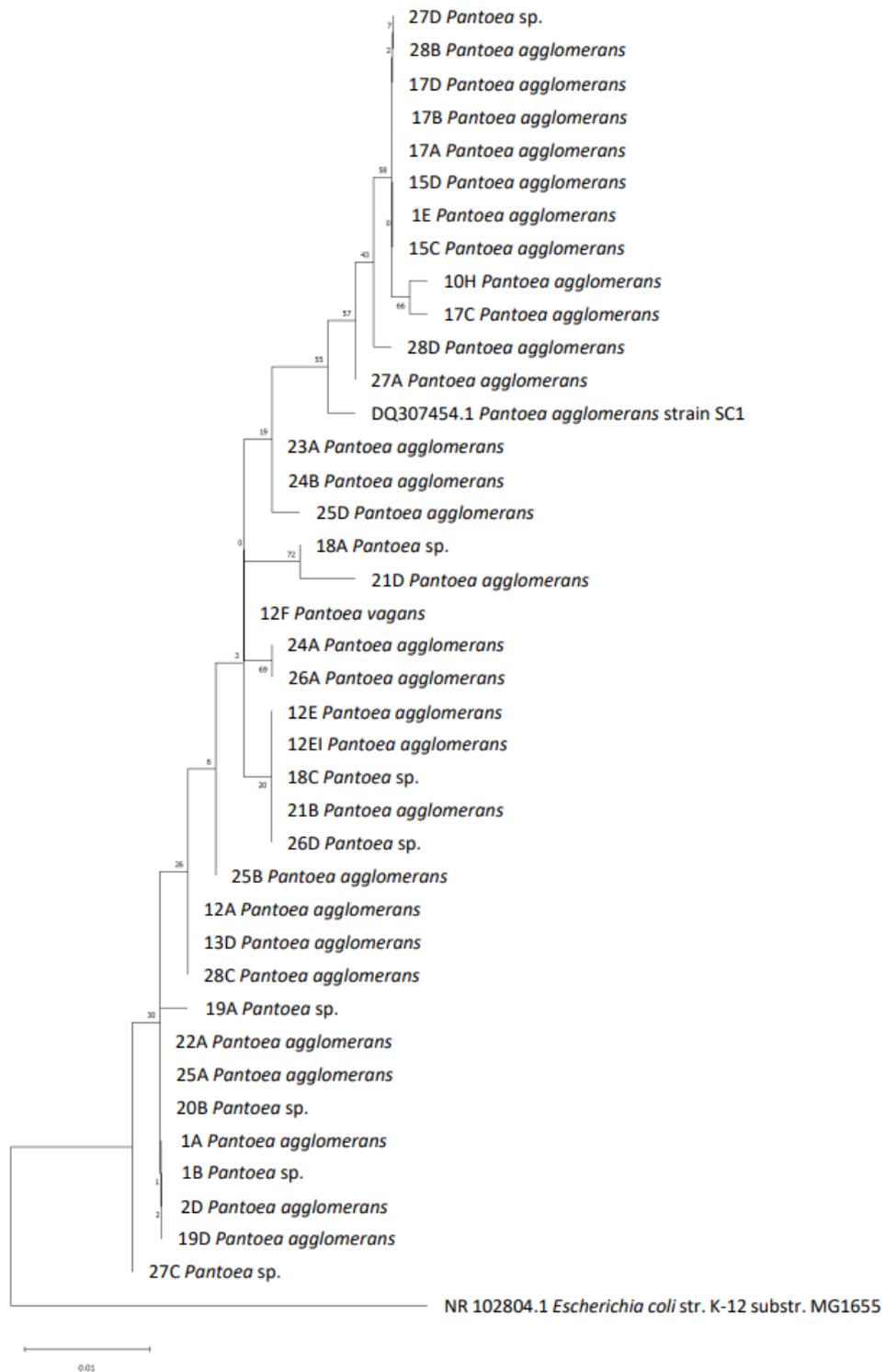


Figura 4.5 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Jukes-Cantor e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' *Pantoea agglomerans* str. SC1 e *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

Na árvore filogenética da Figura 4.6 verifica-se que a estirpe 3All de *Pantoea* sp. e a estirpe 9BI de *Pantoea agglomerans* são filogeneticamente próximas. O mesmo acontece com as estirpes 3B e 28E e 9B e 25C de *Pantoea agglomerans*. Estas são filogeneticamente mais

distantes das estirpes SC1 (da base de dados), 3AI e 22E de *Pantoea agglomerans* e 23B de *Pantoea* sp..

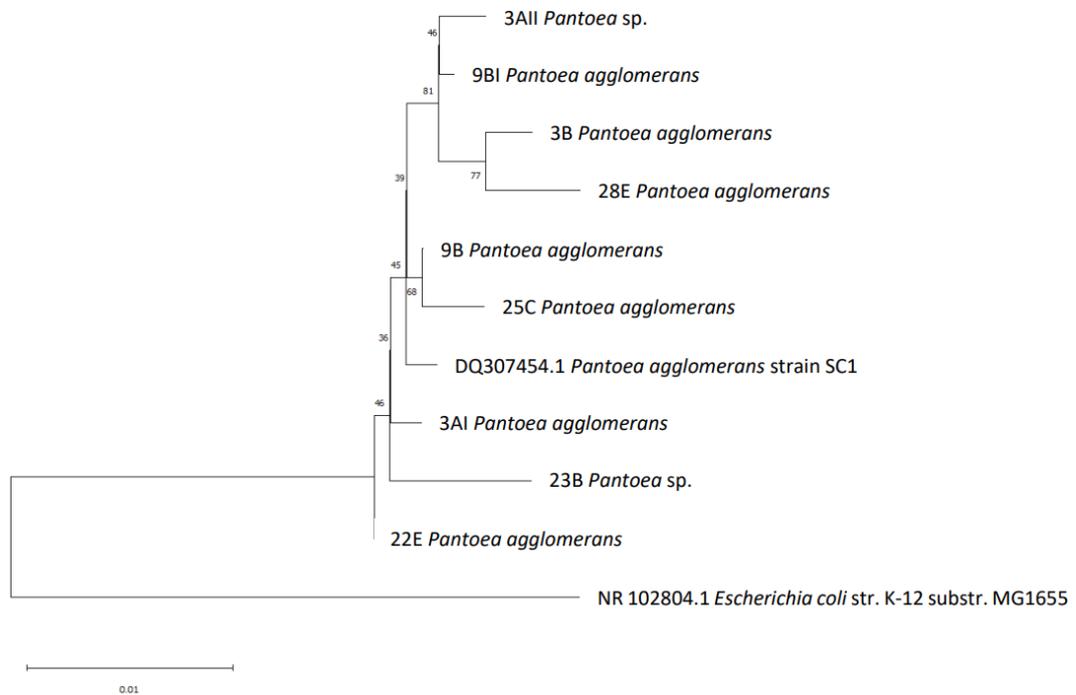


Figura 4.6 Árvore filogenética obtida por aplicação do método de substituição de DNA Hasegawa-Kishino-Yano e pelo método de reconstrução filogenética Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências com os 'outgroup' *Pantoea agglomerans* str. SC1 e *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

4.5. Testes de Patogenicidade em Oliveira

Em parte das plantas inoculadas surgiram sintomas sugestivos de Tuberculose, nomeadamente galhas, verificando-se em todas as plantas inoculadas com Pss (identificadas como Pss1, Pss2 e Pss3) e em uma das plantas inoculadas com *Pantoea agglomerans* e Pss (identificada como P+Pss3). Nas plantas utilizadas como controlo negativo e nas inoculadas apenas com *Pantoea* não se verificou a presença de qualquer sintoma (Figura 4.7 e Quadro 4.2).



Figura 4.7 Galhas em ramos de oliveiras inoculadas.

Quadro 4.2 Verificação de sintomas por planta inoculada.

Inoculação	Planta	Identificação	Sintomas	Nº de galhas
Controlo	1	C1	Não	-
	2	C2	Não	-
	3	C3	Não	-
Inoculadas com <i>Pantoea</i>	1	P1	Não	-
	2	P2	Não	-
	3	P3	Não	-
Inoculadas com Pss	1	Pss1	Sim	3
	2	Pss2	Sim	1
	3	Pss3	Sim	4
Inoculadas com <i>Pantoea</i> e Pss	1	P+Pss1	Não	-
	2	P+Pss2	Não	-
	3	P+Pss3	Sim	2

No Quadro 4.3 e na Figura 4.8 apresentam-se os diâmetros médios das galhas em cada planta, medidos ao longo do estudo.

Quadro 4.3 Diâmetro médio das galhas por planta ao longo do tempo em que decorreu o ensaio.

		05/10/2023	28/10/2023	13/12/2023	03/01/2024
Planta	Galha	Diâmetro médio (cm)			
Pss1	I	0,4	0,7	0,8	1,0
	II	0,3	0,5	0,6	0,7
	III	0,4	0,6	0,7	0,7
Pss2	I	0,0	0,2	0,4	0,6
Pss3	I	0,4	0,7	0,9	1,0
	II	0,5	0,7	0,9	0,9
	III	0,4	0,5	0,6	0,6
	IV	0,4	0,7	0,7	0,8
P+Pss3	I	0,0	0,4	0,4	0,4
	II	0,0	0,0	0,4	0,4

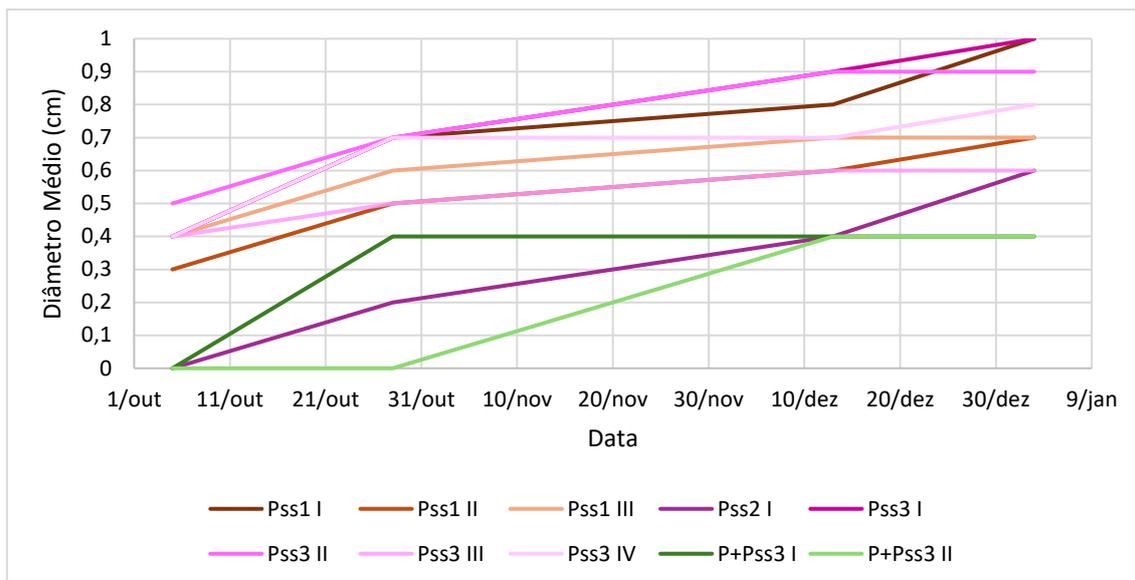


Figura 4.8 Crescimento das galhas nas plantas inoculadas com identificação de sintomatologia.

As galhas Pss1 I, II e III, Pss3 I, II, III e IV apresentaram um crescimento exponencial ao longo do tempo, atingindo maiores dimensões. Já as galhas Pss2 I, P+Pss3 I e P+Pss3 II tiveram um crescimento mais lento, verificando-se uma estabilização muito inicial do crescimento da P+Pss3I.

4.6. Testes com AMPs

4.6.1. Teste com ThsA2 em Pss

As taxas de crescimento de Pss obtidas quando utilizado o AMP ThsA2 foram as apresentadas no Quadro 4.4.

Quadro 4.4 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com ThsA2 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tempo	$1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{l}$	$2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{l}$	$6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{l}$	$1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{l}$	$3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{l}$
0	-0,51%	-4,04%	0,98%	0,58%	5,20%
1	0,55%	-6,71%	1,47%	0,87%	3,16%
2	0,13%	-6,50%	0,57%	1,55%	0,14%
3	-1,93%	-9,07%	2,75%	1,13%	-2,50%
4	3,54%	-13,94%	2,95%	1,72%	-2,81%

Nos testes com o AMP ThsA2 para controlo da Pss, obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 4.9. De acordo com o Quadro 4.5, as variâncias não são homogêneas, pelo que a análise de variância foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis, o qual permitiu

perceber que o tempo não afeta significativamente o crescimento bacteriano com as diferentes concentrações do AMP ThsA2.

Quadro 4.5 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ao longo do tempo.

Tempo	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
0 h	0.008	0.182
1 h	0.002	0.325
2 h	0.001	0.723
3 h	0.002	0.104
4 h	0.001	0.154

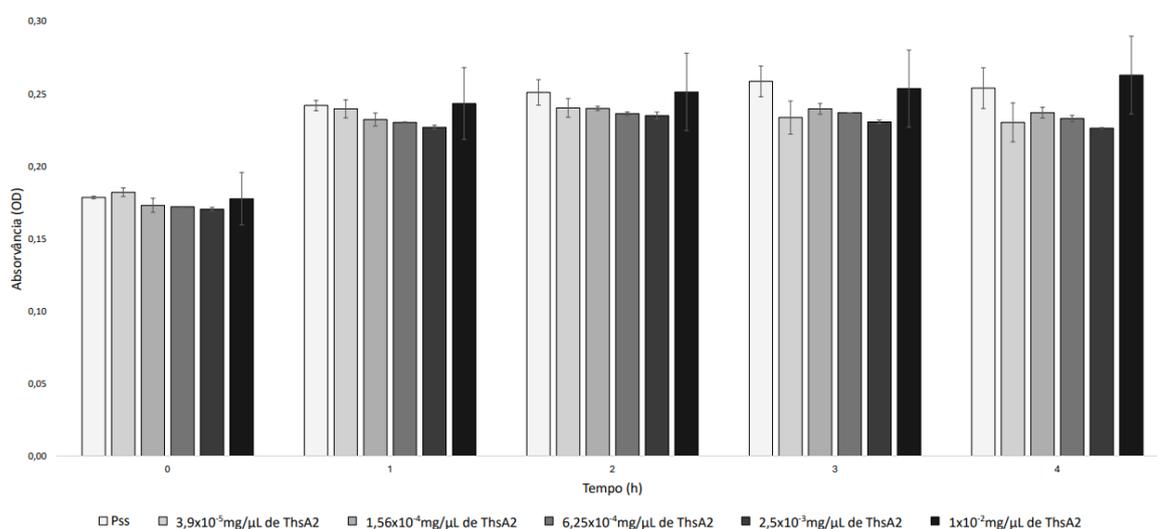


Figura 4.9 Teste de sensibilidade da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3).

Tal como anteriormente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, tendo-se verificado que existem diferenças significativas na forma como as concentrações $1,56 \times 10^{-4}$ mg/ μ L, $6,25 \times 10^{-4}$ mg/ μ L e $2,5 \times 10^{-3}$ mg/ μ L de ThsA2 afetam o crescimento da Pss ao longo do tempo do ensaio (Quadro 4.6).

A concentração $1,56 \times 10^{-4}$ mg/ μ L afetou significativamente o crescimento bacteriano ao longo do tempo, embora as diferenças não sejam significativas quando a análise é feita a cada comparação. Para a concentração $6,25 \times 10^{-4}$ mg/ μ L verificou-se que as diferenças são significativas para as 0 e 3 h (p-value=0.024) e na concentração $2,5 \times 10^{-3}$ mg/ μ L as diferenças são significativas para as 0 e 2 h (p-value=0.010). Desta forma, na Figura 4.10 estão identificados os grupos de significância para as concentrações referidas anteriormente.

Quadro 4.6 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* para as diferentes concentrações de estudo.

Concentração	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
Pss	0.027	0.109
$3,9 \times 10^{-5}$ mg/ μ L de ThsA2	0.350	0.098
$1,56 \times 10^{-4}$ mg/ μ L de ThsA2	0.635	0.042
$6,25 \times 10^{-4}$ mg/ μ L de ThsA2	0.007	0.015
$2,5 \times 10^{-3}$ mg/ μ L de ThsA2	0.400	0.012
1×10^{-2} mg/ μ L de ThsA2	0.878	0.083

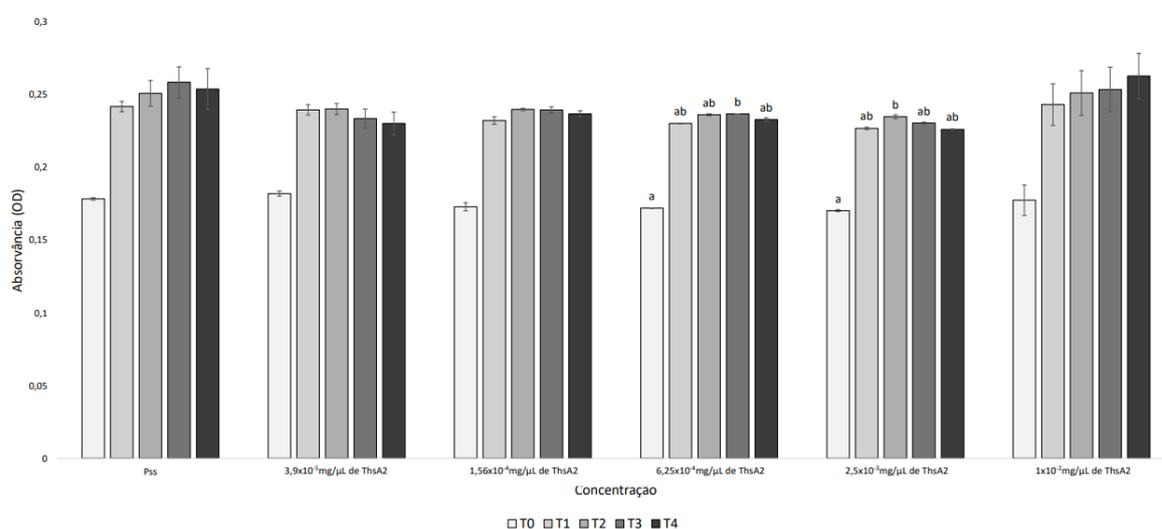


Figura 4.10 Teste de sensibilidade da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.6.2. Teste com PMAP-23 em Pss

Quando utilizado o PMAP-23 foram obtidas as taxas de crescimento bacteriano apresentadas no Quadro 4.7.

Quadro 4.7 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com PMAP-23 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Tempo	1x10 ⁻² mg/μl	2,5x10 ⁻³ mg/μl	6,25x10 ⁻⁴ mg/μl	1,56x10 ⁻⁴ mg/μl	3,9x10 ⁻⁵ mg/μl
0	-11,07%	4,23%	3,10%	-0,79%	-1,68%
1	-10,73%	6,39%	1,43%	-1,83%	-1,01%
2	-8,42%	9,04%	2,81%	0,00%	-0,41%
3	-7,93%	12,28%	0,00%	-1,56%	-0,14%
4	-9,64%	13,41%	-3,56%	-5,17%	1,25%

Através do teste de Kruskal-Wallis (Quadro 4.8) verificou-se que as diferenças são significativas para as 0 e 1 h (p<0.05).

Tal como representado na Figura 4.11, em ambas as leituras (0 e 1 h) o crescimento bacteriano apenas de Pss é significativamente maior quando comparado com o crescimento de Pss com 3,9x10⁻⁵mg/μL de PMAP-23, uma vez que para as 0 h o p-value=0.020 e para a 1 h p-value=0.008.

Quadro 4.8 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com PMAP-23 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ao longo do tempo.

Tempo	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
0 h	0.370	0.033
1 h	0.022	0.011
2 h	0.019	0.215
3 h	0.056	0.191
4 h	0.037	0.407

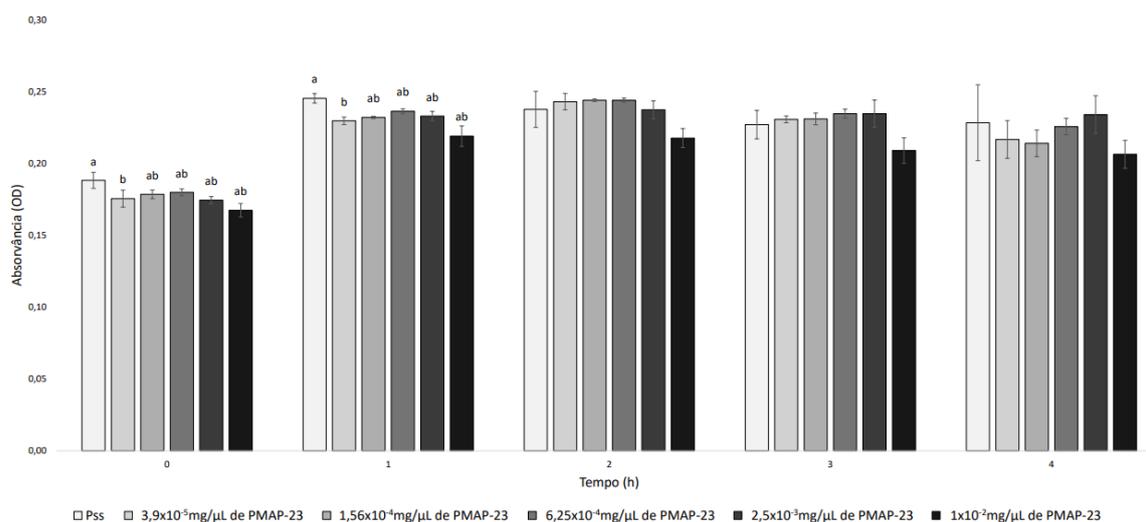


Figura 4.11 Teste de sensibilidade da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

No que diz respeito ao crescimento bacteriano ao longo do tempo para as diferentes concentrações de PMAP-23, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (Quadro 4.9) e tal como representado na Figura 4.12 verificou-se que para as concentrações $3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$, $1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23 as absorvâncias medidas são significativamente diferentes com o tempo ($p\text{-value}=0.010$).

Quadro 4.9 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com PMAP-23 em *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* para as diferentes concentrações de estudo.

Concentração	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
Pss	0.009	0.098
$3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23	0.031	0.026
$1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23	0.10	0.014
$6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23	0.216	0.014
$2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23	0.047	0.118
$1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23	0.649	0.074

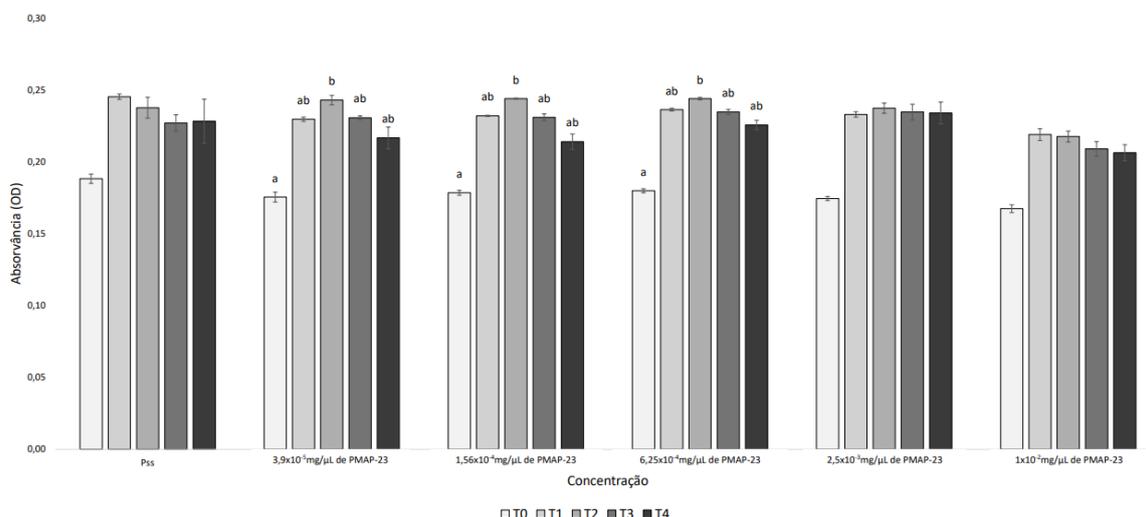


Figura 4.12 Teste de sensibilidade da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.6.3. Teste com ThsA2 em *Pantoea agglomerans*

As taxas de crescimento bacteriano obtidas quando utilizado o ThsA2 são as apresentadas no Quadro 4.10.

Quadro 4.10 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com ThsA2 em *Pantoea agglomerans*.

Tempo	1x10 ⁻² mg/μl	2,5x10 ⁻³ mg/μl	6,25x10 ⁻⁴ mg/μl	1,56x10 ⁻⁴ mg/μl	3,9x10 ⁻⁵ mg/μl
0	-20,93%	18,38%	5,84%	-7,27%	-3,63%
1	-26,21%	17,10%	10,05%	-0,25%	-2,37%
2	-22,64%	20,99%	5,11%	-7,12%	5,16%
3	-16,77%	18,04%	7,13%	0,06%	0,32%
4	-18,92%	11,66%	6,20%	-1,77%	-0,93%

À exceção dos testes de homogeneidade de variâncias apresentados anteriormente, neste caso as variâncias são homogêneas, pelo que foi utilizada a ANOVA (Quadro 4.11).

Quadro 4.11 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em *Pantoea agglomerans* ao longo do tempo.

Tempo	Teste de Levene	ANOVA
	p-value	FDR
0 h	0.661	0.000
1 h	0.127	0.000
2 h	0.195	0.000
3 h	0.501	0.003
4 h	0.136	0.000

Nas 0 h a absorvância medida de *Pantoea* e da bactéria com $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 é estatisticamente maior quando utilizado $3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2.

Passado 1 h, as diferenças são significativas entre a *Pantoea*, a utilização de $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2.

No tempo 2, verificou-se que a absorvância medida de *Pantoea* e da bactéria com $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 é estatisticamente maior quando utilizado $1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2.

Para as 3h, verificou-se que o crescimento bacteriano de *Pantoea* e da bactéria com $3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$, $1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 é estatisticamente maior quando foi utilizada a maior concentração.

Já nas 4 h o crescimento bacteriano da *Pantoea* é significativamente maior do que quando utilizadas as duas maiores concentrações de AMP (Figura 4.13).

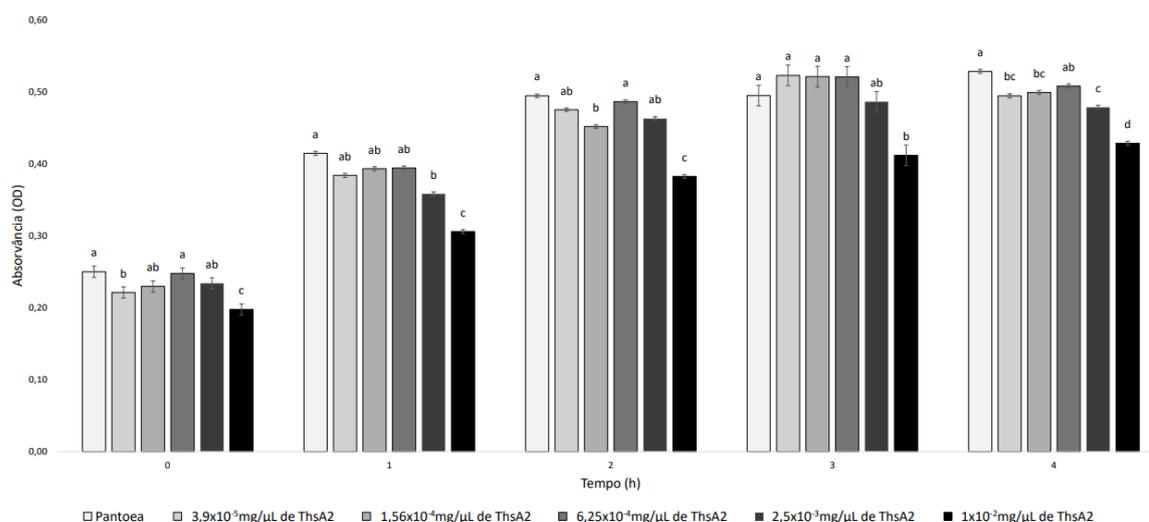


Figura 4.13 Teste de sensibilidade da *Pantoea agglomerans* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância ± erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas ANOVA.

De acordo com o resultado do teste de Kruskal-Wallis (Quadro 4.12) existem diferenças significativas na utilização das diferentes concentrações de PMPA-23 ao longo do tempo.

Quadro 4.12 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de análise de variância do teste de sensibilidade com ThsA2 em *Pantoea agglomerans* para as diferentes concentrações de estudo.

Concentração	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
Pantoea	0.011	0.012
3,9x10⁻⁵mg/μL de ThsA2	0.061	0.02
1,56x10⁻⁴mg/μL de ThsA2	0.017	0.012
6,25x10⁻⁴mg/μL de ThsA2	0.141	0.014
2,5x10⁻³mg/μL de ThsA2	0.310	0.019
1x10⁻²mg/μL de ThsA2	0.261	0.013

Na amostra apenas com *Pantoea* como com 1x10⁻²mg/μL de ThsA2 percebeu-se que o crescimento bacteriano era significativamente maior quando comparadas as absorvâncias para as 0 e 4 h (p-value=0.01 e p-value=0.019, respetivamente). Para as restantes concentrações as diferenças foram significativas entre as 0 e 3 h (p-value=0.046, p-value=0.026, p-value=0.034, p-value=0.035, por ordem crescente da concentração). Estas diferenças estão representadas na Figura 4.14.

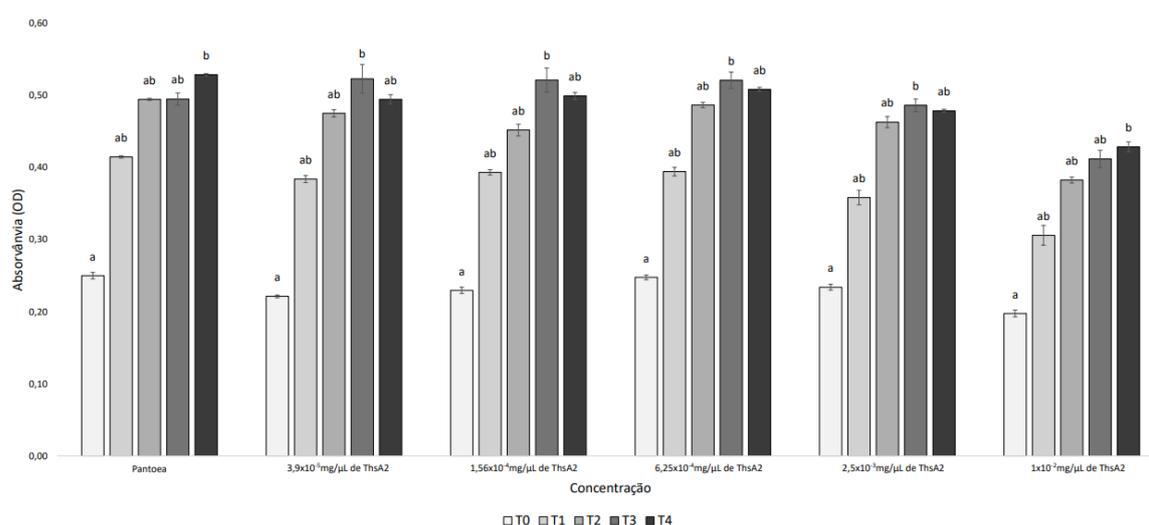


Figura 4.14 Teste de sensibilidade da *Pantoea agglomerans* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de ThsA2. As barras representam valores médios de absorvância ± erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (p<0.05), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

4.6.4. Teste com PMAP-23 em *Pantoea agglomerans*

As taxas de crescimento de *Pantoea agglomerans* obtidas quando utilizado o PMAP-23 são as apresentadas no Quadro 4.13.

Quadro 4.13 Taxas de crescimento bacteriano obtidas nos testes de sensibilidade com PMAP-23 em *Pantoea agglomerans*.

Tempo	$1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{l}$	$2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{l}$	$6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{l}$	$1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{l}$	$3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{l}$
0	-14,63%	5,03%	6,14%	0,28%	-2,67%
1	-35,73%	25,91%	17,00%	-2,31%	-0,85%
2	-40,04%	41,69%	6,47%	-0,54%	-4,08%
3	-34,32%	38,82%	11,51%	1,01%	0,88%
4	-26,42%	28,86%	10,57%	0,87%	-3,18%

Quando utilizado o PMAP-23 para controlo da *Pantoea agglomerans*, verificou-se que para as 0, 1 e 2 h a absorvância de *Pantoea* é significativamente maior do que quando comparada com a presença de $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de PMAP-23 (Quadro 4.14 e Figura 4.15).

Quadro 4.14 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de comparações múltiplas do teste de sensibilidade com PMAP-23 em *Pantoea agglomerans* ao longo do tempo.

Tempo	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
0 h	0.106	0.027
1 h	0.011	0.013
2 h	0.733	0.014
3 h	0.356	0.031
4 h	0.019	0.038

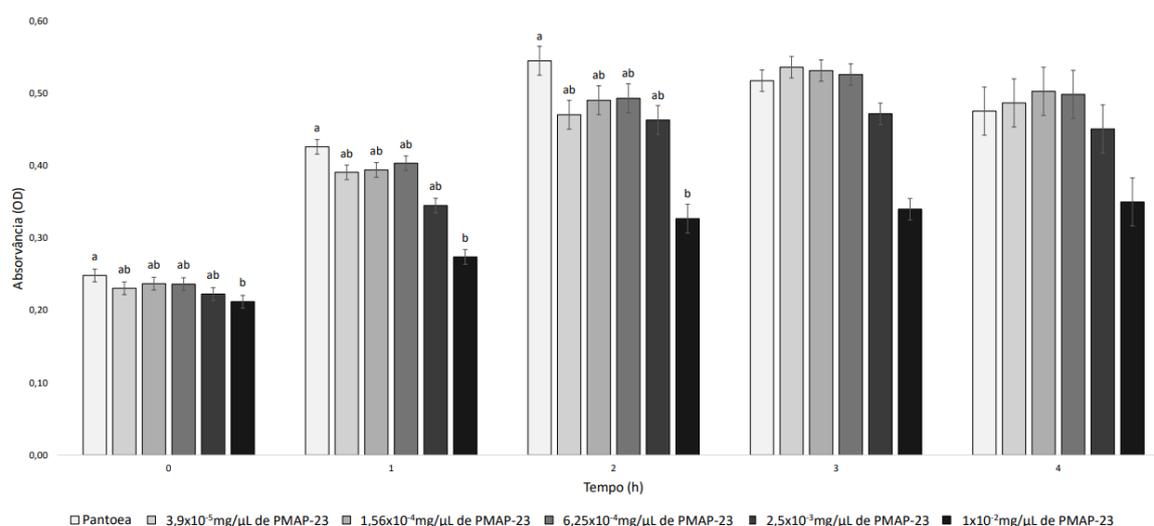


Figura 4.15 Teste de sensibilidade da *Pantoea agglomerans* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

Ao nível da *Pantoea* a absorvância medida é significativamente menor para as 0 h quando comparadas com as 2 h ($p\text{-value}=0.014$).

Quando utilizado o AMP PMAP-23 nas diferentes concentrações de estudo, exceto para $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$, as diferenças são significativas entre as 0 e 3 h.

Para a concentração de $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ as diferenças são significativas entre as 0 e 4 h ($p\text{-value}=0.022$) (Quadro 4.15 e Figura 4.16).

Quadro 4.15 Teste de homogeneidade das variâncias e teste de comparações múltiplas do teste de sensibilidade com PMAP-23 em *Pantoea agglomerans* para as diferentes concentrações de estudo.

Concentração	Teste de Levene	Teste de Kruskal-Wallis
	p-value	p-value
Pantoea	0.215	0.015
3,9x10 ⁻⁵ mg/μL de PMAP-23	0.408	0.011
1,56x10 ⁻⁴ mg/μL de PMAP-23	0.024	0.017
6,25x10 ⁻⁴ mg/μL de PMAP-23	0.068	0.014
2,5x10 ⁻³ mg/μL de PMAP-23	0.043	0.020
1x10 ⁻² mg/μL de PMAP-23	0.988	0.014

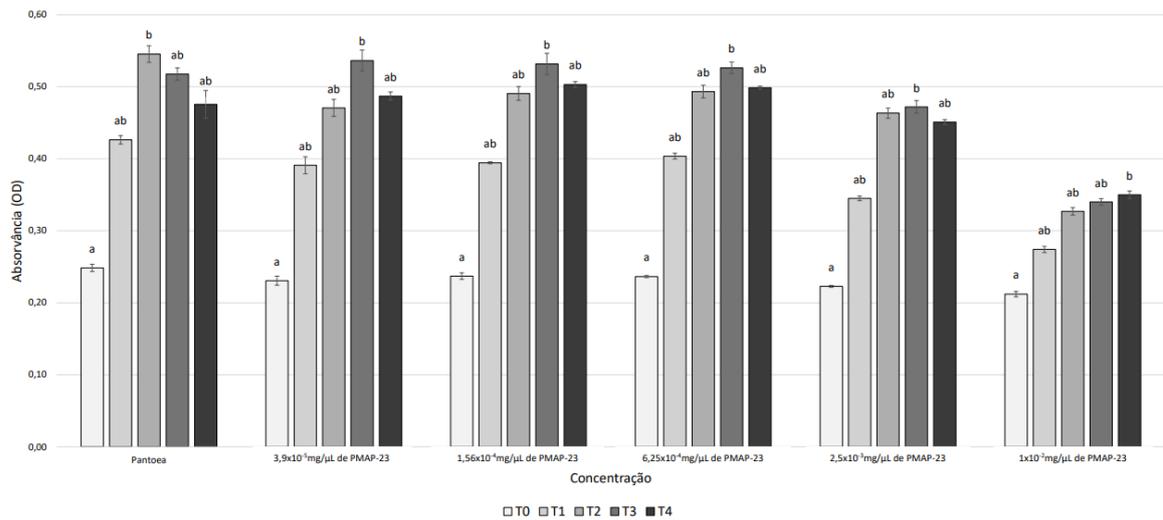


Figura 4.16 Teste de sensibilidade da *Pantoea agglomerans* com análise da absorvância ao longo do tempo para diferentes concentrações de PMAP-23. As barras representam valores médios de absorvância \pm erro padrão da média (n=3). Barras com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$), de acordo com o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis.

5. Discussão

A Tuberculose da oliveira, causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, é uma das principais doenças que afeta os olivais na região mediterrânica. A doença manifesta-se pelo aparecimento de galhas nos ramos, colocando em causa o crescimento e a produtividade da planta.

Ao longo dos anos a Tuberculose tem se tornado uma das doenças mais importantes na olivicultura nacional, por provocar prejuízos económicos elevados devido à redução da produção, à depreciação do produto (azeites com sabor a ranço e travo amargo) e aos custos de cultura serem mais elevados por haver uma maior necessidade de realização de tratamentos fitossanitários e podas manuais para retirar ramos mortos e infetados, o que compromete a rentabilidade do olival.

Na atualidade como medidas de controlo são utilizados apenas tratamentos preventivos, como as podas para remoção de ramos infetados, tratamentos cúpricos para diminuição da severidade da doença, com a inibição da replicação bacteriana e prevenção do estabelecimento da infeção e a utilização de variedades menos suscetíveis à doença.

No entanto, estas medidas não se têm mostrado suficientes para o controlo da Tuberculose em olivais intensivos e super-intensivos, os quais representam a maioria da superfície agrícola ocupada com olival em Portugal. Nestes olivais de grande densidade de plantas por hectare, as operações culturais são maioritariamente mecânicas e realizadas de igual modo em toda a área, o que facilita a disseminação da bactéria entre plantas infetadas e plantas saudáveis. Por este motivo, e não existindo tratamento curativo para a Tuberculose, para mitigação dos danos da doença são realizados apenas tratamentos fitossanitários à base de cobre. No entanto, a União Europeia, devido à crescente preocupação com a sustentabilidade ambiental, tem estabelecido restrições à utilização de substâncias químicas na agricultura, nas quais se inclui a utilização de cobre, com um limite máximo de 28 kg/ha ao longo de 7 anos (*Regulamento de Execução (UE) 2018/ 1981 da Comissão*, 2018), visto que esta substância pode apresentar vários impactos ambientais negativos, como sejam, a acumulação de cobre no solo que vai comprometer a vida microbiana e a contaminação de cursos de água naturais.

Assim, percebe-se que as medidas utilizadas atualmente para controlo da Tuberculose não são suficientes nem eficazes, havendo necessidade de encontrar alternativas como sejam a utilização de plantas resistentes à doença através da utilização de péptidos antimicrobianos (AMPs).

Os AMPs são pequenas moléculas que existem na natureza em plantas, animais e microrganismos, com um largo espetro de ação, um rápido modo de ação e alta especificidade. Têm a capacidade de conferir à planta resistência a agentes patogénicos, sem que estes adquiram resistências como acontece com as substâncias que compõem os produtos

fitofarmacêuticos (Li et al., 2022; Tang et al., 2023; Zhang et al., 2023). Esta é uma tecnologia que tem merecido estudos nas últimas décadas, no entanto a sua aplicação na agricultura e, em particular, no tratamento da Tuberculose da oliveira é muito recente, pelo que o estudo realizado é inovador.

Desta forma, a diversidade dos isolados foi estudada com o objetivo de perceber se o único agente causal da Tuberculose é a Pss, se a severidade da doença pode ser influenciada por relações mutualistas entre a Pss e outros microorganismos e de que forma a presença de diferentes microorganismos pode estar associada à cultivar, local, tipo de produção, regadio ou sequeiro e modo de produção do olival.

No crescimento dos microorganismos em placa de Petri obteve-se uma grande diversidade, de acordo com as suas características morfológicas, dado que foi utilizado o meio PDA, no qual crescem microorganismos de diferentes naturezas (fungos, bactérias, leveduras, etc.), pelo que em estudos futuros seria relevante a utilização de um meio de cultura seletivo para *Pseudomonas* spp., como os meios de cultura Cetrimide agar ou M-PA-C Agar (Pisani et al., 2007).

Para distinguir os isolados, foram utilizados inicialmente os ‘primers’ Y1 e Y3 os quais foram desenhados para identificação de bactérias em geral (Laranjo et al., 2004), no entanto, em parte dos isolados não se obtiveram produtos de amplificação, o que se poderá ter devido ao facto de existirem diferenças na zona de ligação do ‘primer’ à molécula-alvo, não sendo estabelecida a ligação entre ambos. Desta forma, como alternativa foram utilizados ‘primers’ específicos para *Pseudomonas*, IAALF, IAALR, IAALN1 e IAALN2, para a seleção desta bactéria caso fosse a presente (Bertolini et al., 2003; Penyalver et al., 2000).

Com a obtenção de diferentes bactérias na análise dos produtos de amplificação, a utilização de um meio seletivo para crescimento dos microorganismos foi reforçada, já que foram identificados microorganismos dos géneros *Pantoea*, *Luteibacter*, *Priestia*, *Bacillus* e *Kosakonia*, para além de *Pseudomonas* spp. este facto revelou-se, no entanto, importante porque permitiu perceber que associadas às galhas se podem encontrar diferentes espécies bacterianas e permitiu perceber algumas das interações entre elas.

Sendo a Pss o agente causal da Tuberculose da oliveira, era de esperar a sua identificação, uma vez que as amostras do estudo foram recolhidas de galhas típicas da ação desta bactéria nos ramos de oliveira. A identificação de outras bactérias não era de uma forma tão evidente o esperado, no entanto, a presença das mesmas pode ser justificada pelas comunidades bacterianas que normalmente surgem associadas à Tuberculose da oliveira, as quais são constituídas por microorganismo epifíticos e endofíticos, maioritariamente pertencentes aos géneros *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Erwinia* e *Curtobacterium*, que interagem

entre si (Buonaurio et al., 2015), podendo afetar a severidade, a virulência e a resposta da planta à doença. Embora estes sejam os géneros maioritariamente identificados nos estudos realizados até ao momento, a composição da comunidade microbiana pode ser afetada por diferentes fatores como: cultivar, condições ambientais, região, modo de condução e produção, estado da doença, entre outros (Zucchini et al., 2023).

Da totalidade das amostras estudadas, a identificação de *Pantoea* spp. foi a mais abundante, sendo este consórcio bacteriano dos mais estudados, nomeadamente as bactérias da espécie *P. agglomerans*. A bactéria só por si não provoca sintomas na oliveira (Moretti et al., 2021), no entanto Selak et al. (2022) verificaram que a severidade da Tuberculose poderá aumentar por haver uma supressão das defesas da planta, no entanto este aspeto não foi corroborado por não ter sido realizado este tipo de ensaio. Já Moretti et al. (2021) verificaram que embora se verifique um aumento da severidade, há uma diminuição do tamanho da galha, não por haver uma redução da população bacteriana, mas sim por uma menor produção de ácido indolacético (IAA), uma hormona promotora do crescimento vegetal, devido à interação bactéria-bactéria. O facto de *Pantoea* spp. ser a bactéria identificada em mais amostras, poderá ainda ser justificado por esta apresentar uma taxa de crescimento maior do que quando comparado com a *Pss*, ou seja, ambas as bactérias poderiam estar presentes na galha no entanto o rápido crescimento da *Pantoea* spp. tornou-a dominante em detrimento de *Pss* (Marchi et al., 2006).

As restantes bactérias identificadas, pertencentes aos géneros *Luteibacter*, *Priestia*, *Bacillus* e *Kosakonia*, todas elas são referidas pela bibliografia como promotoras de crescimento celular, pela biossíntese de auxinas que intervêm na organogénese vegetal, como sejam o IAA. O facto de as auxinas interferirem em vários processos fisiológicos das plantas, como o seu crescimento e desenvolvimento, poderá justificar a sua identificação destas bactérias nas galhas das amostras estudadas, visto que as galhas são regiões de hipertrofia e hiperplasia celular (Zhang et al., 2022).

Estes microrganismos identificados podem ser veículo de biocontrolo da Tuberculose da oliveira, visto apresentarem características de defesa de stress biótico e serem substâncias naturalmente presentes no microbioma da oliveira, não apresentando impacto ambiental como os produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes de síntese química, que representam a grande maioria dos 'inputs' das produções agrícolas atualmente (Aamot et al., 2017; Chebotar et al., 2023; Niu et al., 2019; Ortega-Urquieta et al., 2022; Quintas-Nunes et al., 2022).

Através dos estudos filogenéticos é possível fazer uma análise da variabilidade genética dos isolados e relacioná-la com as características dos olivais a que pertencem e tirar percepções

de como a variedade, o local, o modo e tipo de produção e a forma de exploração influenciam a diversidade genética verificada.

Todas as *Pseudomonas* spp. identificadas, à exceção da amostra 2C, foram isoladas de ramos de olivais intensivos, regados e em modo de produção integrada. É de considerar que neste tipo de olivais são realizadas fertilizações regularmente, com a aplicação de elevadas unidades de nutrientes por área, são realizadas regas com elevadas dotações, promovendo um rápido crescimento das plantas. No entanto, este não é acompanhado pelo desenvolvimento celular, nomeadamente, na formação das paredes celulares, sendo estas normalmente mais ténues, o que facilita a entrada de microrganismos. A acrescentar a isto, deve-se considerar que as operações culturais são maioritariamente mecanizadas, especialmente a poda, não havendo uma desinfeção dos utensílios da poda entre plantas o que promove a disseminação da bactéria entre plantas infetadas e plantas saudáveis. Os isolados 4CI e 27B de Pss, apresentam maior proximidade filogenética, tendo em comum, para além das características anteriormente referidas, a região de onde provém, Alto Alentejo. Já as amostras 26B e 3C, as quais se identificaram como pertencentes ao género *Pantoea* partilham apenas a região do Baixo Alentejo e o facto de serem de olivais regados.

Como já foi referido, bactérias do género *Pantoea* foram as mais abundantes nos isolados estudados, o que sugere que a bactéria está adaptada a diferentes condições de cultivo e cultivares de oliveira. Tendo-se verificado através das árvores filogenéticas, que há uma grande diversidade de *Pantoea*. As amostras 27D e 28B embora pertençam a locais distintos da região do Alentejo (Avis e Pias, respetivamente) ambas foram isoladas de olivais intensivos, regados e em modo de produção integrada. Já as amostras 10H e 17C são da cultivar Galega, provenientes do Alto Alentejo, de olivais tradicionais, de sequeiro e em modo de produção convencional. As amostras 23A e 24B, embora de cultivares distintas (Picual e Ojiblanca, respetivamente), são exatamente do mesmo local (Pias) e pertencem a olivais intensivos, regados e em modo de produção integrada. Filogeneticamente as amostras 18A e 21D são muito próximas, embora a primeira seja proveniente do Torrão (Alto Alentejo) e a segunda de Martinlongo (Algarve), ambas são de olivais tradicionais, de sequeiro e em modo de produção convencional. As amostras 24A e 26A, são de cultivares distintas, mas do mesmo local e mesmo tipo de olival, o mesmo acontece com 22A e 25A. Os isolados 12E e 12EI, provenientes da mesma amostra, apresentam proximidade filogenética. A proximidade filogenética entre as amostras 21B e 26D deve-se provavelmente ao facto de serem da cultivar Galega, sendo a única característica que apresentam em comum. Já as amostras 13D e 28C, embora sejam filogeneticamente próximas não apresentam nenhuma característica da sua proveniência em comum. As amostras 2D e 19D provém ambas do Baixo Alentejo, são de olivais tradicionais de

sequeiro, no entanto a primeira é de modo de produção convencional e a segunda de modo de produção biológico, sugerindo que os microrganismos presentes em olivais em modo de produção convencional e biológico são geneticamente semelhantes.

As amostras 3AI e 9BI, próximas filogeneticamente, provém de olivais semelhantes, ambos em Pedrógão, tradicionais de regadio e em modo de produção convencional. As amostras 3B e 28E, tal como a 9B e 25C apenas apresentam em comum o facto de serem de olivais de regadio.

Desta forma, não se pode inferir que os diferentes isolados estejam relacionados filogeneticamente com base em algum fator do modo de cultivo ou da região onde se encontram, embora se verifique proximidade filogenética entre alguns dos isolados com características iguais, mas não um padrão entre elas. Os estudos realizados até à data pouco se têm debruçado sobre esta temática, sendo maioritariamente estudada a suscetibilidade das diferentes cultivares à Tuberculose.

Os testes de patogenidade em plantas de oliveira, foram realizados com o objetivo de perceber se para além da Pss também a *P. agglomerans* teria a capacidade de formar galhas em oliveira e de que forma o consórcio bacteriano entre ambas poderia influenciar a severidade e a virulência da doença. Para tal foram utilizadas plantas da cultivar Galega por esta apresentar grande suscetibilidade à Tuberculose da oliveira (Gomes, 2018) e os isolados 4CI e 1E por terem sido identificados como Pss e *P. agglomerans*, respetivamente, e por, de entre os vários isolados, serem os que apresentavam uma maior percentagem de semelhança com a sequência da base dados, o que é avaliado através dos parâmetros 'query-cover' e 'percent identity' do BLAST N (quanto mais próximos de 100%, maior a semelhança entre as sequências).

Nas plantas utilizadas como controlo negativo não foi identificada a presença de galhas, o que era esperado dado que não foram inoculadas com nenhum dos dois microrganismos.

O facto de o microrganismo mais abundante na análise de sequências ter sido do género *Pantoea* suscitou algumas suspeitas em relação à sua capacidade de induzir a formação de galhas nos ramos de oliveira e, por isso, ser um agente patogénico. No entanto, nenhuma das 3 plantas inoculadas com *P. agglomerans* apresentou galhas, refutando a hipótese da sua patogenidade, tal como verificado por Selak et al. (2022) num estudo idêntico onde foi utilizado *Pantoea paga*, também isolada de galhas de oliveira.

Em todas as plantas inoculadas com Pss foi identificada a presença de galhas, confirmando que a bactéria provoca a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos. O crescimento da galha é exponencial nas primeiras semanas, verificando-se praticamente uma duplicação do diâmetro médio, seguido de uma estabilização do mesmo, a qual se deve à possível paragem da multiplicação da bactéria devido à morte celular dos tecidos onde a bactéria cresce.

Já as plantas inoculadas com a mistura de Pss e *P. agglomerans*, apenas numa delas foi identificada a presença de uma única galha, com dimensões menores do que as identificadas nas plantas inoculadas com Pss isoladamente, tendo surgido numa fase mais avançada do estudo (aproximadamente 2 meses depois). Desta forma, pode-se afirmar que a presença de *P. agglomerans* em simultâneo com Pss, leva a uma manifestação de sintomatologia mais tardia e que as galhas que surgem são de menores dimensões, associado a uma menor produção de IAA e possivelmente pelos genes antimicrobianos envolvidos na biossíntese de microcina (peptídeo antibacteriano que inibe a DNA-girase) característicos da *Pantoea*, contrariamente ao verificado por Selak et al. (2019) e Buonauro et al. (2015) mas refutado por Moretti et al. (2021) (Selak et al., 2022).

Foram realizados testes com os AMPs ThsA2 e PMAP-23 nos isolados 1E e 4CI, de Pss e *P. agglomerans*, respetivamente, com o objetivo de avaliar a suscetibilidade destas bactérias aos AMPs em estudo como possível medida inovadora no controlo da Tuberculose da oliveira. O uso de AMPs tem se mostrado uma alternativa viável à utilização de produtos fitofarmacêuticos no controlo de doenças, por os microrganismos alvo não adquirirem resistências (devido ao modo de ação multifacetado do AMP), por não apresentarem impacto ambiental (uma vez que muitos existem na natureza em plantas, animais e microrganismos), não causarem alterações ao nível da microbiota do solo e das plantas e por serem uma medida curativa da doença, até ao momento não tratável, e não apenas preventiva como os fitofármacos utilizados atualmente no controlo da Tuberculose. No entanto, a utilização de AMPs apresenta ainda algumas desvantagens, nomeadamente os elevados custos de produção, a estabilidade dos AMPs e a regulamentação associada à utilização destas substâncias na agricultura.

Os isolados utilizados foram os mesmos que nos testes de patogenicidade, 1E e 4CI, por serem os mais semelhantes às sequências existentes na base de dados e para que, se possível, relacionar os resultados obtidos nos testes de patogenicidade e nos testes de suscetibilidade aos AMPs.

Selecionaram-se os AMPs ThsA2 e PMAP-23 por ambos apresentarem atividade antagonista em estirpes de *Pseudomonas* spp. (Pirtskhalava et al., 2021).

Nos testes de sensibilidade de Pss a ThsA2 verifica-se que a absorvância lida para a Pss e para a mistura entre Pss e as diferentes concentrações de ThsA2 tem um comportamento idêntico ao longo do tempo, dado que o tempo não influencia significativamente o crescimento bacteriano com as diferentes concentrações de ThsA2. No entanto para a concentração de $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ verificou-se que houve um aumento significativo da absorvância lida entre o início do teste e passadas 3 h, o que se pode dever a um crescimento bacteriano significativo

durante este período. O mesmo se verificou para a concentração $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ entre o início do estudo e a leitura efetuada passadas 2 h. Desta forma, pode-se considerar que a concentração de ThsA2 ideal para o controlo de Pss, é $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ por ser à concentração a que se verifica que há uma menor percentagem de crescimento bacteriano comparado com a Pss isoladamente.

Quando utilizado PMAP-23 para avaliar a sensibilidade da Pss, verificou-se que a absorvância medida no início do estudo e passado 1 h é significativamente menor entre a amostra com Pss e a mistura de Pss com $3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$. Para as três misturas com menor concentração de PMAP-23 verificou-se um aumento significativo da absorvância lida às 0 e 2 h, pelo que se pode considerar que estas são as concentrações de PMAP-23 menos indicadas para o controlo da Pss. Já a mistura mais concentrada ($1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$) foi a que apresentou uma menor percentagem de crescimento bacteriano quando comparado com a Pss, logo no início do estudo, pelo que poderá ser a concentração mais indicada para controlar a Pss.

Nos testes de sensibilidade de *P. agglomerans* com ThsA2 verificaram-se diferenças significativas ao longo das 4 h em que foram realizadas leituras. No início do estudo a absorvância de *P. agglomerans* era estatisticamente igual à da mistura da bactéria com $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2, mas significativamente maiores do que quando comparadas com as absorvâncias da bactéria com $3,9 \times 10^{-5} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$, sendo mais indicada para o controlo da *Pantoea agglomerans* a concentração de $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 e menos indicada a de $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$. Para as 1 e 4 h verificou-se estatisticamente que a absorvância de *P. agglomerans* é significativamente maior do que a absorvância para as misturas de bactéria com $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2, sendo novamente recomendada a concentração de $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ ThsA2 como a mais indicada para o controlo bacteriano. Para as 2 h verificaram-se semelhanças estatísticas entre a *P. agglomerans* e a mistura de bactéria com $6,25 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2, reforçando a não eficiência desta concentração para o controlo bacteriano. Mas diferenças estatisticamente significativas com a mistura de $1,56 \times 10^{-4} \text{mg}/\mu\text{L}$ e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2, destacando-se mais uma vez a maior concentração como mais indicada para o controlo da *P. agglomerans*. Já nas leituras realizadas após 3 h não se verificaram diferenças significativas entre *P. agglomerans* e as 3 concentrações menores, mas sim entre a concentração mais alta. Para *P. agglomerans* verificaram-se diferenças estatisticamente maiores entre as 0 e 4 h, tal como para a concentração e $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ ThsA2, enquanto para a restantes concentrações as diferenças foram mais significativas entre as 0 e 3 h. Desta forma, pode-se afirmar que para o controlo da *P. agglomerans* seria mais indicada a concentração de $1 \times 10^{-2} \text{mg}/\mu\text{L}$ de ThsA2 e que ao longo do tempo o controlo é acentuado.

Nos testes de sensibilidade da *P. agglomerans* ao PMAP-23 no início do teste, e nas primeiras 2 leituras, a absorvância de *P. agglomerans* é significativamente superior à da mistura com 1×10^{-2} mg/ μ L de PMAP-23, sugerindo que esta seria a concentração ideal de controlo bacteriano passadas 2 h de teste. O crescimento de *P. agglomerans* foi significativo maior nas primeiras 2 h do estudo, verificou-se ainda um aumento da absorvância nas primeiras 3 h do estudo para as concentrações menores de AMP e nas primeiras 4 h para a concentração mais elevada. Assim, aponta-se a concentração mais alta como a mais indicada para o controlo da *P. agglomerans* dado que foi a que apresentou uma menor percentagem de crescimento, no entanto o estudo deveria ser prolongado no tempo, de forma a perceber qual o tempo necessário para se verificar uma diminuição ou estabilização da absorvância e, por isso, do crescimento da bactéria. É ainda de realçar que até então em nenhum outro estudo tinha sido verificada a atividade antagonista do AMP PMAP-23 em *P. agglomerans*, pelo que este microrganismo não é referido na base de dados DBAASP, sendo este é um estudo promissor.

Desta forma, verifica-se que ambos os AMPs têm potencial de controlo contra Tuberculose da oliveira, devendo-se optar pelo AMP ThsA2 já que exige uma menor concentração para controlar esta bactéria, $2,5 \times 10^{-3}$ mg/ μ L. No que diz respeito ao controlo da *P. agglomerans*, os AMPs apresentaram uma concentração ideal de utilização igual, 1×10^{-2} mg/ μ L, sugerindo que ambos são eficazes no controlo da bactéria, no entanto como se verificou a necessidade de prolongar o teste de sensibilidade com o PMAP-23 ao longo do tempo para compreender melhor o comportamento de crescimento da bactéria, pode-se apontar como AMP ideal do controlo da *P. agglomerans* o ThsA2. Assim, para o controlo da Tuberculose da oliveira sugere-se a utilização do AMP ThsA2 a uma concentração de $2,5 \times 10^{-3}$ mg/ μ L, de forma a inibir o crescimento de galhas nas plantas de oliveira.

O estudo realizado neste trabalho contribui para um melhor conhecimento da Tuberculose da oliveira, nomeadamente das metodologias inovadoras do controlo da doença. Permitiu confirmar que o agente causal da Tuberculose da oliveira é a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e que associada à bactéria existe um microbioma muito diverso que aumenta a severidade da doença e diminui a dimensão das galhas, destacando-se o consórcio bacteriano entre a Pss e a *Pantoea agglomerans*. Foi ainda testada pela primeira vez a eficácia da utilização de dois péptidos antimicrobianos, ThsA2 e PMAP-23, em duas estirpes isoladas de ramos de oliveira de Pss e *P. agglomerans*, verificando-se que o ThsA2 é dos dois o AMP mais indicado para o controlo da doença.

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Este trabalho incidiu sobre uma estratégia inovadora, promissora de proteção da oliveira contra a Tuberculose através da utilização de AMPs, dado que se trata de uma doença não tratável na atualidade.

Conseguiram-se isolar e identificar bactérias de dois géneros distintos associadas à Tuberculose da oliveira, *Pseudomonas* e *Pantoea*. Através da sequenciação da região 16S foram identificadas 4 estirpes de *Pseudomonas* sp. e 49 de *Pantoea* spp., tal como identificado por Selak et al. (2022) e Marchi et al. (2006), associadas à Tuberculose da oliveira. No entanto, a proximidade filogenética das diferentes estirpes destes dois géneros de bactéria não apresentou ter qualquer relação com a cultivar, a região ou o modo e tipo de cultivo.

A comprovar a infecciosidade das estirpes mais prevalentes destas bactérias foram inoculadas jovens plantas de oliveira da cultivar Galega com a estirpe 1E e 4CI, de Pss e *P. agglomerans*, respetivamente, verificando-se que apenas Pss tem a capacidade de formar galhas nos ramos de oliveira e que o consórcio bacteriano com *P. agglomerans* leva a uma manifestação do sintoma mais tardio e a uma diminuição do diâmetro médio das galhas, devido a uma inibição da produção de IAA, tal como verificado por Moretti (2021) refutando os estudos de Buonauro et al. (2015) e Selak et al. (2019).

De forma a avaliar a possibilidade da utilização de novas metodologias de controlo da Tuberculose da oliveira, foram realizados testes de sensibilidade aos AMPs ThsA2 e PMAP-23 em Pss e *P. agglomerans*, com a utilização das duas estirpes isoladas, 1E e 4CI, respetivamente, tendo-se verificado a eficácia da utilização do AMP ThsA2 a $2,5 \times 10^{-3} \text{mg}/\mu\text{L}$ no controlo da Tuberculose da oliveira, contribuindo para a inovação e o conhecimento do controlo desta doença que se tem manifestado de grande importância na olivicultura de Portugal.

De forma a aprofundar o estudo e a obter conclusões mais concretas, sugere-se a realização da amplificação com outros 'primers' que permitam a obtenção de produto de amplificação de outros genes bacterianos; a verificação da possibilidade de o consórcio bacteriano entre Pss e outros microrganismos poder ser estudado como um método de biocontrolo da doença; a realização de estudos genéticos para aprofundar os conhecimentos da possível relação entre a proximidade filogenética das diferentes estirpes de Pss e *P. agglomerans* e a cultivar, região e modo de cultivo dos olivais onde foram identificados e a utilização do ThsA2 num vetor viral que se expresse em plantas de oliveira de forma a conferir-lhe resistência à Tuberculose.

7. Referências Bibliográficas

- Aamot, H. U., Hofgaard, I. S., & Lysøe, E. (2017). Complete genome sequence of *Luteibacter rhizovicinus* strain LJ96T, isolated from the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L.) in Denmark. *Genomics Data*, 11, 104–105. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.12.012>
- Agrios, G. N. (2008). *Plant pathology* (5th ed., [3rd print]). Elsevier Academic Press.
- Amostragem e caracterização de estirpes *Colletotrichum* na azeitona—*InnovPlantProtect*. (sem data). Obtido 10 de julho de 2024, de <https://iplantprotect.pt/2022/11/amostragem-e-caracterizacao-de-estirpes-colletotrichum-na-azeitona/>
- Azeite—*Comissão Europeia*. (sem data). Obtido 11 de outubro de 2024, de https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/olive-oil_pt
- Bertolini, E., Penyalver, R., García, A., Olmos, A., Quesada, J. M., & López, M. M. (2003). *Highly sensitive detection of Pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube* (Vol. 52). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016770120200163X?via%3Dihub>
- Biedendieck, R., Knuuti, T., Moore, S. J., & Jahn, D. (2021). The “beauty in the beast”—The multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14–15), 5719–5737. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11424-6>
- Böhm, J. (2013). *O grande livro da Oliveira e do azeite Portugal Oleícola*. Dinalivro editora.
- Breton, C., Terral, J.-F., Pinatel, C., Médail, F., Bonhomme, F., & Bervillé, A. (2009). The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biologies*, 332(12), 1059–1064. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.08.001>
- Bundó, M., Montesinos, L., Izquierdo, E., Campo, S., Mieulet, D., Guiderdoni, E., Rossignol, M., Badosa, E., Montesinos, E., San Segundo, B., & Coca, M. (2014). Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biology*, 14(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-102>

- Buonaurio, R., Moretti, C., Da Silva, D. P., Cortese, C., Ramos, C., & Venturi, V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00434>
- Chebotar, V. K., Zaplatkin, A. N., Chizhevskaya, E. P., Gancheva, M. S., Voshol, G. P., Malfanova, N. V., Baganova, M. E., Khomyakov, Y. V., & Pishchik, V. N. (2023). Phytohormone Production by the Endophyte *Bacillus safensis* TS3 Increases Plant Yield and Alleviates Salt Stress. *Plants*, 13(1), 75. <https://doi.org/10.3390/plants13010075>
- Cocetta, G., Landoni, M., Pilu, R., Repiso, C., Nolasco, J., Alajarin, M., Ugena, L., Levy, C. C. B., Scatolino, G., Villa, D., & Ferrante, A. (2022). Priming Treatments with Biostimulants to Cope the Short-Term Heat Stress Response: A Transcriptomic Profile Evaluation. *Plants*, 11(9), 1130. <https://doi.org/10.3390/plants11091130>
- Colombo, M., Masiero, S., Rosa, S., Caporali, E., Toffolatti, S. L., Mizzotti, C., Tadini, L., Rossi, F., Pellegrino, S., Musetti, R., Velasco, R., Perazzolli, M., Vezzulli, S., & Pesaresi, P. (2020). NoPv1: A synthetic antimicrobial peptide aptamer targeting the causal agents of grapevine downy mildew and potato late blight. *Scientific Reports*, 10(1), 17574. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73027-x>
- Copper in topsoils—ESDAC - European Commission*. (sem data). Obtido 16 de julho de 2024, de <https://esdac.jrc.ec.europa.eu/themes/copper-topsoils>
- Doenças das Oliveiras: Olho de Pavão*. (sem data). Obtido 10 de julho de 2024, de <https://olivapedia.com/doencas-das-oliveiras-olho-de-pavao-cicloconio-spilocaea-oleaginea/>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). *Phytochemical Bulletin. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue*. (Vol. 19).
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>

- Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 strain K-12 16S ribosomal RNA, complete sequence (507147997). (2015). [Dataset]. NCBI Nucleotide Database. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_102804.1
- Fang, Y., & Ramasamy, R. (2015). Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors*, 5(3), 537–561. <https://doi.org/10.3390/bios5030537>
- FAOSTAT. (sem data). Obtido 19 de fevereiro de 2025, de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Flora-On | Flora de Portugal. (sem data). Obtido 7 de abril de 2024, de <https://flora-on.pt/>
- Fraga, H., Moriondo, M., Leolini, L., & Santos, J. A. (2020). Mediterranean Olive Orchards under Climate Change: A Review of Future Impacts and Adaptation Strategies. *Agronomy*, 11(1), 56. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010056>
- Friedrich, I., Kuritsyn, A., Hertel, R., & Daniel, R. (2023). Luteibacter flocculans sp. Nov., Isolated from a Eutrophic Pond and Isolation and Characterization of Luteibacter Phage vB_LfIM-Pluto. *Microorganisms*, 11(2), 307. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020307>
- Gharsallah, H., Ksentini, I., Frikha-Gargouri, O., Hadj Taieb, K., Ben Gharsa, H., Schuster, C., Chatti-kolsi, A., Triki, M. A., Ksantini, M., & Leclerque, A. (2023). Exploring Bacterial and Fungal Biodiversity in Eight Mediterranean Olive Orchards (*Olea europaea* L.) in Tunisia. *Microorganisms*, 11(4), 1086. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041086>
- Godena, S., Dminić, I., Edyta, Đ., & Ilak Peršurić, A. (2009). *The occurrence of olive knot disease caused by Pseudomonas savastanoi in the northwest region of Istrian Peninsula.*
- Gomes, T. (2018). *Role of olive tree phyllosphere microorganisms in the biological control of olive leaf spot and olive knot* [Universidade do Minho]. <https://repositorium.uminho.pt/bitstream/1822/59025/1/Teresa%20Maria%20da%20Cruz%20Gomes.pdf>
- Harmon, C. L., Timilsina, S., Bonkowski, J., Jones, D. D., Sun, X., Vallad, G. E., Sepulveda, L. R., Bull, C., & Jones, J. B. (2018). Bacterial Gall of *Loropetalum chinense* caused by

- Pseudomonas amygdali* pv. *Loropetali* pv. Nov. *Plant Disease*, 102(4), 799–806.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0505-RE>
- How Do Olives Grow (With Pictures Of Olive Growth Cycle) | Oliviada*. (sem data). Obtido 26 de setembro de 2024, de https://www.oliviadaolive.com/how-do-olives-grow-planting-repotting-pruning-care-diseases-pests-olive-tree/?utm_content=cmp-true
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. A. (2021). Olive (*Olea europaea* L.)—Morphology, Taxonomy, Composition and Health Benefits. Em S. Z. Hussain, B. Naseer, T. Qadri, T. Fatima, & T. A. Bhat, *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas* (pp. 117–129). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-75502-7_9
- IBM Corp. (2011). *IBM SPSS Statistics for Windows* (Versão 20.0) [Software].
- Inês, C., Campos, J., Lima, C., Pragana, J., & Cordeiro, A. M. (2022, outubro 14). *Os ritmos do ciclo reprodutivo em variedades de oliveira—Vida Rural*. <https://www.vidarural.pt/premium/ciclo-reprodutivo-variedades-oliveira/>
- Jalali, M., Zaborowska, J., & Jalali, M. (2017). Chapter 1 - The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. Em *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 1–18). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00001-1>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2024). Polymerase Chain Reaction (PCR). Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Košćak, L., Lamovšek, J., Đermić, E., Tegli, S., Gruntar, I., & Godena, S. (2023). Identification and Characterisation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* as the Causal Agent of Olive

- Knot Disease in Croatian, Slovenian and Portuguese Olive (*Olea europaea* L.) Orchards. *Plants*, 12(2), 307. <https://doi.org/10.3390/plants12020307>
- Laranjo, M., Machado, J., Young, J. P. W., & Oliveira, S. (2004). High diversity of chickpea Mesorhizobium species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.015>
- Leibniz Institute DSMZ: Details. (sem data). Obtido 2 de outubro de 2024, de <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-50267>
- Li, J., Hu, S., Jian, W., Xie, C., & Yang, X. (2021). Plant antimicrobial peptides: Structures, functions, and applications. *Botanical Studies*, 62(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40529-021-00312-x>
- Li, X., Zuo, S., Wang, B., Zhang, K., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9), 2675. <https://doi.org/10.3390/molecules27092675>
- Marchi, G., Sisto, A., Cimmino, A., Andolfi, A., Cipriani, M. G., Evidente, A., & Surico, G. (2006). Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*, 55(5), 614–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01449.x>
- Moll, L., Badosa, E., Planas, M., Feliu, L., Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2021). Antimicrobial Peptides With Antibiofilm Activity Against *Xylella fastidiosa*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 753874. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.753874>
- Moretti, C., Rezzonico, F., Orfei, B., Cortese, C., Moreno-Pérez, A., van den Burg, H. A., Onofri, A., Firrao, G., Ramos, C., Smits, T. H. M., & Buonauro, R. (2021). Synergistic interaction between the type III secretion system of the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* DAPP-PG 734 and the virulence of the causal agent of olive knot *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* DAPP-PG 722. *Molecular Plant Pathology*, 22(10), 1209–1225. <https://doi.org/10.1111/mpp.13105>

- Morin, A. (2014). Pantoea. Em C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 1028–1032). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00245-7>
- Niu, S., Ma, W., Jin, M., Chen, J., Li, S., & Zou, X. (2019). Complete Genome Sequence of Kosakonia sp. Strain CCTCC M2018092, a Fucose-Rich Exopolysaccharide Producer. *Microbiology Resource Announcements*, 8(30), 10.1128/mra.00567-19.
<https://doi.org/10.1128/mra.00567-19>
- Ortega-Urquieta, M. E., Valenzuela-Ruíz, V., Mitra, D., Hyder, S., Elsheery, N. I., Kumar Das Mohapatra, P., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2022). Draft Genome Sequence of Priestia sp. Strain TSO9, a Plant Growth-Promoting Bacterium Associated with Wheat (*Triticum turgidum* subsp. *Durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *Plants*, 11(17), 2231. <https://doi.org/10.3390/plants11172231>
- Ozalp, A. Y., & Akinci, H. (2023). Evaluation of Land Suitability for Olive (*Olea europaea* L.) Cultivation Using the Random Forest Algorithm. *Agriculture*, 13(6), 1208.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13061208>
- Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., & López, M. M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in Olive Plants by Enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2673–2677.
- Pirtskhalava, M., Amstrong, A. A., Grigolava, M., Chubinidze, M., Alimbarashvili, E., Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., & Tartakovsky, M. (2021). DBAASP v3: Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D288–D297.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- Pisani, B., Prandi, M. A. G., Martini, M. H., Chiarini, P. F. T., & Martinez, E. Z. (2007). Eficácia de meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em

- amostras de água mineral. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), 35–39.
<https://doi.org/10.53393/rial.2007.66.32846>
- Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* strain HZP14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (2003263595). (2021). [Dataset]. NCBI Nucleotide Database.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW730650.1>
- Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. I., Carbonell, E. A., & López, M. M. (2010). Comparação de tratamentos químicos para redução de *Pseudomonas savastanoi* epífita pv. *Savastanoi* e para melhorar o controle subsequente da doença das galhas da oliveira. *Crop Protection*, 29(12), 1413–1420.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.024>
- Quintas-Nunes, F., Rossi, M. J., & Nascimento, F. X. (2022). Insights genômicos sobre o estilo de vida associado a plantas de *Kosakonia radicincitans* MUSA4, uma bactéria diazotrófica promotora de crescimento de plantas. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(2), 126303. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126303>
- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012a). *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998–1009.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x>
- Ramos, C., Matas, I. M., Bardaji, L., Aragón, I. M., & Murillo, J. (2012b). *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*: Some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13(9), 998–1009.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00816.x>
- Regulamento de Execução (UE) 2018/ 1981 da Comissão*. (2018, dezembro 13).
- Rodrigues, M. Â., & Correia, C. M. (2009). *Manual da Safra e Contra Safra do Olival*. Instituto Politécnico de Bragança.
- Rutten, P., Tennant, R., Beal, J., Workman, C., Haddock-Angelli, T., Farny, N., & Selvarajah, V. (2019). *Calibration Protocol—Conversion of OD600 to Colony Forming Units (CFUs)*.

<https://www.protocols.io/view/calibration-protocol-conversion-of-od600-to-colony-5g3un>

- Sales, H., Figueiredo, F., Vaz Patto, M. C., & Nunes, J. (2022). Assessing the environmental sustainability of Portuguese olive growing practices from a life cycle assessment perspective. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131692. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131692>
- Selak, G. V., Božiković, M. R., Abrouk, D., Bolčić, M., Žanić, K., Perica, S., Normand, P., & Pujic, P. (2022). Pseudomonas ST1 and Pantoea Paga Strains Cohabit in Olive Knots. *Microorganisms*, 10(8), 1529. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081529>
- Taipá C., F., Astorga P., M., Ibacache G., A., Martínez B., L., Sierra B., C., Quiroz E., C., Larraín S., P., & Riveros B., F. (2003). *Manual del cultivo del olivo*.
- Talhinhas, P., Loureiro, A., & Oliveira, H. (2018). Olive anthracnose: A yield- and oil quality-degrading disease caused by several species of *Colletotrichum* that differ in virulence, host preference and geographical distribution. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 1797–1807. <https://doi.org/10.1111/mpp.12676>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Versão 11) [Software]*.
- Tang, R., Tan, H., Dai, Y., Li, L., Huang, Y., Yao, H., Cai, Y., & Yu, G. (2023a). Application of antimicrobial peptides in plant protection: Making use of the overlooked merits. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1139539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1139539>
- Tang, R., Tan, H., Dai, Y., Li, L., Huang, Y., Yao, H., Cai, Y., & Yu, G. (2023b). Application of antimicrobial peptides in plant protection: Making use of the overlooked merits. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1139539. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1139539>
- Viruega, J. R., Moral, J., Roca, L. F., Navarro, N., & Trapero, A. (2013). *Spilocaea oleagina* in Olive Groves of Southern Spain: Survival, Inoculum Production, and Dispersal. *Plant Disease*, 97(12), 1549–1556. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1206-RE>

- Vuletin Selak, G., Raboteg Božiković, M., Abrouk, D., Bolčić, M., Žanić, K., Perica, S., Normand, P., & Pujic, P. (2022). *Pseudomonas* ST1 and *Pantoea* Paga Strains Cohabit in Olive Knots. *Microorganisms*, *10*(8), 1529. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081529>
- Vuletin Selak, G., Raboteg, M., Dubost, A., Abrouk, D., Žanić, K., Normand, P., & Pujic, P. (2019). Whole-Genome Sequence of a *Pantoea* sp. Strain Isolated from an Olive (*Olea europaea* L.) Knot. *Microbiology Resource Announcements*, *8*(42), 10.1128/mra.00978-19. <https://doi.org/10.1128/mra.00978-19>
- Wiesman, Z. (2009). Chapter 7—Desert-suitable genetic material. In Z. Wiesman (Ed.), *Desert Olive Oil Cultivation* (pp. 135–183). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374257-5.00007-5>
- Wu, X., Wang, Z., Li, X., Fan, Y., He, G., Wan, Y., Yu, C., Tang, J., Li, M., Zhang, X., Zhang, H., Xiang, R., Pan, Y., Liu, Y., Lu, L., & Yang, L. (2014). *In Vitro* and *In Vivo* Activities of Antimicrobial Peptides Developed Using an Amino Acid-Based Activity Prediction Method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(9), 5342–5349. <https://doi.org/10.1128/AAC.02823-14>
- Young, J. M., Wilkie, J. P., Fletcher, M. J., Park, D.-C., Pennycook, S. R., Triggs, C. M., & Watson, D. R. W. (2004). Relative tolerance of nine olive cultivars to *Pseudomonas savastanoi* causing bacterial knot disease. *Phytopathologia Mediterranea*, *43*, 395–402.
- Zhang, M., Wang, L., Tang, W., Xing, Y., Liu, P., & Dang, X. (2023). Antibacterial mechanism of the novel antimicrobial peptide Jelleine-Ic and its efficacy in controlling *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* in kiwifruit. *Pest Management Science*, *79*(10), 3681–3692. <https://doi.org/10.1002/ps.7548>
- Zhang, Q., Gong, M., Xu, X., Li, H., & Deng, W. (2022). Roles of Auxin in the Growth, Development, and Stress Tolerance of Horticultural Plants. *Cells*, *11*(17), 2761. <https://doi.org/10.3390/cells11172761>

Zhang, Y.-M., Ye, D.-X., Liu, Y., Zhang, X.-Y., Zhou, Y.-L., Zhang, L., & Yang, X.-L. (2023). Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture. *Advanced Agrochem*, 2(1), 58–78. <https://doi.org/10.1016/j.aac.2023.01.003>

Zucchini, M., Maoloni, A., Lodolini, E. M., Ferrocino, I., Aquilanti, L., & Neri, D. (2023). Knot formation and spread along the shoot stem in 13 olive cultivars inoculated with an indigenous pathobiome of 7 species of *Pseudomonas* including *Pseudomonas savastanoi*. *PLOS ONE*, 18(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289875>

8. Apêndices

Apêndice I. Alinhamento de sequências geradas pelo produto de sequenciação obtido com o 'primer' Y1. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.

	5	15	25	35	45	55
MW730650.1	CCGCGGGTAA	TACAGAGGGT	GCA-GCGTTA	ATCGGAAATT	ACTGGGCGTA	AAGCGCGCGT
DQ307454.1	CCGCGG-TAA	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCACGC
NR102804.1	CCGCGG-TAA	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCACGC
2C	CCGCGG-TAA	TACAGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCGCGT
3C	CCGCGG-TAA	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCACGC
4CI	CCGCGG-TAA	TACAGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCGCGT
24E	CCGCGG-TAA	TACAGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCGCGT
26B	CCGCGG-TAA	TACGGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCACGC
27B	CCGCGG-TAA	TACAGAGGGT	GCAAGCGTTA	ATCGGAA-TT	ACTGGGCGTA	AAGCGCGCGT

	65	75	85	95	105	115
MW730650.1	AGGTGGTTTG	TTAAGTGGGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTCA	ACCTGGGAAC	CTGCATCCAA
DQ307454.1	AGGCGGTCTG	TTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTTA	ACCTGGGAAC	-TGCATTTGA
NR102804.1	AGGCGGTTTG	TTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTCA	ACCTGGGAAC	-TGCATCTGA
2C	AGGTGGTTTG	TTAAGTTGGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTCA	ACCTGGGAAC	-TGCATCCAA
3C	AGGCGGTCTG	TTAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTTA	ACCTGGGAAC	-TGCATTTGA
4CI	AGGTGGTTTG	TTAAGTTGGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTCA	ACCTGGGAAC	-TGCATCCAA
24E	AGGTGGTTTG	TTAAATTGAA	TGTGAAATCC	CCC GGCTCA	ACCTGGGAAC	-TGCATCCAA
26B	AGGCGGTCTG	TCAAGTCAGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTTA	ACCTGGGAAC	-TGCATTTGA
27B	AGGTGGTTTG	TTAAGTTGGA	TGTGAAATCC	CC-GGGCTCA	ACCTGGGAAC	-TGCATCCAA

	125	135	145	155	165	175
MW730650.1	AACTGGCAAG	CTAGAGTATG	GTAGA--GGG	TGGTGGAAATT	-CCT--GTGT	AGCGGT-GAA
DQ307454.1	AACTGGCAGG	CTTGAGTCTT	GTAGA--GGG	GGGTAGAATT	--CCAGGTGT	AGCGGT-GAA
NR102804.1	TACTGGCAAG	CTTGAGTCTC	GTAGA--GGG	GGGTAGAATT	--CCAGGTGT	AGCGGT-GAA
2C	AACTGGCAAG	CTAGAGTATG	GTAGA--GGG	TGGTGGAAATT	TCCT--GTGT	AGCGGT-GAA
3C	AACTGGCAGG	CTTGAGTCTT	GTAGA--GGG	GGGTAGAATT	--CCAGGTGT	AGCGGT-GAA
4CI	AACTGGCAAG	CTAGAGTATG	GTAGA--GGG	TGGTGGAAATT	TCCT--GTGT	AGCGGT-GAA
24E	A-CTGGCAAG	CTAGAGTAGG	GCAGAAGGGG	GGGGGGAATT	TTCTTGGGGT	AGCGGTTGAG
26B	AACTGGCAGG	CTAGAGTCTT	GTAGA--GGG	GGGTAGAATT	--CCAGGTGT	AGCGGT-GAA
27B	AACTGGCAAG	CTAGAGTATG	GTAGA--GGG	TGGTGGAAATT	TCCT--GTGT	AGCGGT-GAA

	185	195	205	215	225	235
MW730650.1	ATGCG-TAGA	TATA--GGAA	GGAAC--ACC	AGTGG--CGA	AGGCGAC-CA	CCTGG--ACT
DQ307454.1	ATGCG-TAGA	GATC--TGGA	GGAAT--ACC	GGTGG--CGA	AGGCGGC-CC	CCTGG--ACA
NR102804.1	ATGCG-TAGA	GATC--TGGA	GGAAT--ACC	GGTGG--CGA	AGGCGGC-CC	CCTGG--ACG
2C	ATGCG-TAGA	TATA--GGAA	GGAAC--ACC	AGTGG--CGA	AGGCGAC-CA	CCTGG--ACT
3C	ATGCG-TAGA	GATC--TGGA	GGAAT--ACC	GGTGG--CGA	AGGCGGC-CC	CCTGG--ACA
4CI	ATGCG-TAGA	TATA--GGAA	GGAAC--ACC	AGTGG--CGA	AGGCGAC-CA	CCTGG--ACT
24E	ATGCGGTAGA	TATTATGGAA	GGAGACAACC	AGTGGGCCGA	AAGCGACACA	CCCTGTGGCT
26B	ATGCG-TAGA	GATC--TGGA	GGAAT--ACC	GGTGG--CGA	AGGCGGC-CC	CCTGG--ACA
27B	ATGCG-TAGA	TATA--GGAA	GGAAC--ACC	AGTGG--CGA	AGGCGAC-CA	CCTGG--ACT

	245	255	265	275	285	295
MW730650.1	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
DQ307454.1	AAGACTGACG	CTCAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
NR102804.1	AAGACTGACG	CTCAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
2C	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
3C	AAGACTGACG	CTCAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
4CI	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
24E	CATACTGACA	CTGAGGTGCG	AAAGCGTTGG	GGAGCAAACA	GGATATAGAT	ACCCTGGGTA
26B	AAGACTGACG	CTCAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA
27B	GATACTGACA	CTGAGGTGCG	AAAGCGT-GG	GGAGCAAACA	GGAT-TAGAT	ACCCTGG-TA

	305	315	325	335	345	355
MW730650.1	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CAACTAGCCG	TTGGGAG-CC	TTGAGCTCTT	AGTGGCGCAG
DQ307454.1	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CGACTTGGAG	GTTGTTC-CC	TTGAGGAGTG	GCTTCCGGAG
NR102804.1	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CGACTTGGAG	GTTGTGC-CC	TTGAGGCGTG	GCTTCCGGAG
2C	GTCCACGCCG	TAGACGATGT	CAACTAGCCG	TTGGGAG-CC	TTGAGCTCTT	AGTGGCGCAG
3C	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CGACTTGGAG	GTTGTTC-CC	TTGAGGAGTG	GCTTCCGGAG
4CI	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CAACTAGCCG	TTGGGAG-CC	TTGAGCTCTT	AGTGGCGCAG
24E	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CAACTAGCCG	TTGGGAGTCC	TTGAGATTTT	AGTGGCGCAG
26B	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CGACTTGGAG	GTTGTGC-CC	TTGAGGCGTG	GCTTCCGGAG
27B	GTCCACGCCG	TAAACGATGT	CAACTAGCCG	TTGGGAG-CC	TTGAGCTCTT	AGTGGCGCAG

	365	375	385	395	405	415
MW730650.1	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT
DQ307454.1	CTAACGCGTT	AAGTCGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT
NR102804.1	CTAACGCGTT	AAGTCGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT
2C	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAGAC	TCAAATGAAT
3C	CTAACGCGTT	AAGTCGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCACATGAAT
4CI	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT
24E	CTA-CGCAT-	AAGTTGACCG	CCTGGGGGAG	TACGGCCGCA	AGTT--AAAC	TCAA-TGAAT
26B	CTAACGCGTT	AAGTCGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT
27B	CTAACGCATT	AAGTTGACCG	CCTGGGG-AG	TACGGCCGCA	AGGTTAAAAC	TCAAATGAAT

...

MW730650.1	TGA
DQ307454.1	TGA
NR102804.1	TGA
2C	TGA
3C	TGA
4CI	TGA
24E	TGA
26B	TGA
27B	TGA

Apêndice II. Alinhamento de sequências geradas pelo produto de sequenciação obtido com o

'primer' Y3. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.

	5	15	25	35	45	55	
NR102804.1	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
DQ307454.1	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
1A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
1B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
1E	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
2D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
10H	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
12A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
12E	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
12EI	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
12F	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
13D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
15C	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
15D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
17A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
17B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
17C	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
17D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
18A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
18C	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
19A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
19D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
20B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
21B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
21D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
22A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
23A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
24A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
24B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
25A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
25B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
25D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
26A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
26D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
27A	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
27C	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
27D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
28B	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
28C	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	
28D	TAACGCGTTA	AGTCGACCGC	CTGGGGAGTA	CGGCCGCAAG	GTTAAAACCTC	AAATGAATTG	

	65	75	85	95	105	115	
NR102804.1	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
DQ307454.1	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
1A	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
1B	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
1E	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
2D	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
10H	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
12A	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
12E	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
12EI	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
12F	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
13D	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
15C	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
15D	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
17A	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	
17B	ACGGGGGCC	GCACAAGCGG	TGGAGCATGT	GGTTTAATTC	GATGCAACGC	GAAGAACCTT	

25B	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
25D	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
26A	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
26D	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
27A	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
27C	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
27D	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
28B	TCACAAACTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
28C	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG
28D	TCACAAAGTG	CGTCGTAGTC	CGGATCGGAG	TCTG

Apêndice III. Alinhamento de sequências ‘Contig’ entre sequência iniciada com o ‘primer’ Y1 e sequência iniciada com o ‘primer’ Y3. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 11.

	5	15	25	35	45	55
DQ307454.1	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
NR102804.1	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGAAACTGCC	TGATGGAGGG	GGATAACTAC
3AI	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
3AII	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
3B	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
9B	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
9BI	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
22E	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
23B	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
25C	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC
28E	GACGAGTGGC	GGACGGGTGA	GTAATGTCTG	GGGATCTGCC	CGATAGAGGG	GGATAACCAC

	65	75	85	95	105	115
DQ307454.1	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCAAGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
NR102804.1	TGGAAACGGT	AGCTAATACC	GCATAACGTC	GCAAGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
3AI	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCAAGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
3AII	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCACGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
3B	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCACGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
9B	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCA-GACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
9BI	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCACGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
22E	TGGAAACGGT	GGCTAA-ACC	GCA-AACGTC	GCA-GACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
23B	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCACGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
25C	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCATAACGTC	GCAAGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT
28E	TGGAAACGGT	GGCTAATACC	GCACAACGTC	GCACGACCAA	AGAGGGGGAC	CTTCGGGCCT

	125	135	145	155	165	175
DQ307454.1	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
NR102804.1	CTTGCCATCG	GATGTGCCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGT	GGGGTAACGG	CTCACCTAGG
3AI	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
3AII	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
3B	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
9B	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
9BI	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
22E	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
23B	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
25C	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG
28E	CTCACTATCG	GATGAACCCA	GATGGGATTA	GCTAGTAGGC	GGGGTAATGG	CCCACCTAGG

	185	195	205	215	225	235
DQ307454.1	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
NR102804.1	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
3AI	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
3AII	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
3B	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
9B	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
9BI	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
22E	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
23B	CGACAATACC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
25C	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA
28E	CGACGATCCC	TAGCTGGTCT	GAGAGGATGA	CCAGCCACAC	TGGAACTGAG	ACACGGTCCA

	245	255	265	275	285	295
DQ307454.1	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC

NR102804.1 GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 3AI GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 3AII GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 3B GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 9B GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 9BI GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 22E GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 23B GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 25C GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC
 28E GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCC

....|....||....||....||....||....||....|
 305 315 325 335 345 355

DQ307454.1 ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 NR102804.1 ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGGA
 3AI ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 3AII ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 3B ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 9B ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 9BI ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 22E ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 23B ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 25C ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG
 28E ATGCCGCGTG TATGAAGAAG GCCTTCGGGT TGTAAGTAC TTTCAGCGGG GAGGAAGGCG

....|....||....||....||....||....||....|
 365 375 385 395 405 415

DQ307454.1 ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 NR102804.1 GTAAAGTTAA TACCTTGTCT CATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 3AI ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 3AII ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 3B ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 9B ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 9BI ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 22E ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 23B ACAGGGTTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 25C ACGGGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT
 28E ACGAGGTAA TAACCCTGTC GATTGACGTT ACCCGCAGAA GAAGCACCGG CTAACTCCGT

....|....||....||....||....||....||....|
 425 435 445 455 465 475

DQ307454.1 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 NR102804.1 GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 3AI GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 3AII GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 3B GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 9B GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 9BI GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 22E GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 23B GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 25C GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC
 28E GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GGAGGGTGCA AGCGTAAATC GGAATTACTG GGCGTAAAGC

....|....||....||....||....||....||....|
 485 495 505 515 525 535

DQ307454.1 GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 NR102804.1 GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 3AI GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 3AII GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 3B GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 9B GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 9BI GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 22E GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 23B GCACGCACGG CGGTCT-GTT AAGTCAGATA TGAATCCCC CGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 25C GCACGCA-GG CGGTCTGTGTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG
 28E GCACGCA-GG CGGTCT-GTT AAGTCAGATG TGAATCCCC GGG-CTTAAC CTGGGAACTG

....|....||....||....||....||....||....|

	545	555	565	575	585	595
DQ307454.1	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
NR102804.1	CATCTGATAC	TGGCAAGCTT	GAGTCTCGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
3AI	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
3AII	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGGGT	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
3B	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGGGT	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
9B	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
9BI	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
22E	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGGGT	AGAATTTCCA	GGTGTAGCGG
23B	CATTTGAAAC	CGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
25C	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG
28E	CATTTGAAAC	TGGCAGGCTT	GAGTCTTGTA	GAGGGGGG-T	AGAATT-CCA	GGTGTAGCGG

	605	615	625	635	645	655
DQ307454.1	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
NR102804.1	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
3AI	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
3AII	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
3B	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	AAGGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
9B	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
9BI	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
22E	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
23B	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
25C	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC
28E	TGAAATGCGT	AGAGATCTGG	A-GGAATACC	GGTGGCGAAG	GCGGCCCCCT	GGACAAAAGAC

	665	675	685	695	705	715
DQ307454.1	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
NR102804.1	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
3AI	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
3AII	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
3B	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
9B	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
9BI	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
22E	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
23B	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
25C	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC
28E	TGACGCTCAG	GTGCGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC

	725	735	745	755	765	775
DQ307454.1	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
NR102804.1	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTGC	CCTTGAGGCG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
3AI	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
3AII	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	AAGGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
3B	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
9B	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
9BI	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	AAGGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
22E	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
23B	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
25C	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG
28E	CGTAAACGAT	GTCGACTTGG	A-GGTTGTTC	CCTTGAGGAG	TGGCTTCCGG	AGCTAACCGG

	785	795	805	815	825	835
DQ307454.1	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
NR102804.1	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
3AI	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
3AII	TTAAGTCGAC	CGCCCGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
3B	TTAAGTCGAC	CGCCCGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
9B	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
9BI	TTAAGTCGAC	CGCCCGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
22E	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
23B	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
25C	TTAAGTCGAC	CGCCTGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG
28E	TTAAGTCGAC	CGCCCGGGG-	AGTACGGCCG	CAAGGTAAAA	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG

	845	855	865	875	885	895
DQ307454.1	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
NR102804.1	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
3AI	GCCCCGCCCA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
3AII	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-AGGGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
3B	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-GGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
9B	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
9BI	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-AGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
22E	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
23B	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
25C	GCCC-GCACA	AGCGGTGGAG	CA-TGTGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT
28E	GCCC-GCACA	AGCGGGGGAG	CAAGGGGGTT	TAATTCGATG	CAACGCGAAG	AACCTTACCT

	905	915	925	935	945	955
DQ307454.1	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCTTTAGT	GCCTTCGGGA	ACGCTGAGAC
NR102804.1	GGTCTTGACA	TCCACAGAA-	CTTTCCAGAG	ATGGATTGGT	GCCTTCGGGA	ACTGTGAGAC
3AI	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
3AII	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
3B	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
9B	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
9BI	ACTCTCGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
22E	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
23B	ACTCTTGACA	TCCAGGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
25C	ACTCTTGACA	TCCACGGAAC	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC
28E	ACTCTTGACA	TCCACGGAA-	TTTGGCAGAG	ATGCCTTAGT	GCCTTCGGGA	ACCGTGAGAC

	965	975	985	995	1005	1015
DQ307454.1	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
NR102804.1	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
3AI	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
3AII	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
3B	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CACCTCCGTG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
9B	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
9BI	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
22E	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
23B	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
25C	AAGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CAGCTCG-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCACAACG
28E	AGGTGCTGCA	TGGCTGTCGT	CACCTCC-TG	TTGTGAAATG	TTGGGTTAAG	TCCCCAACG

	1025	1035	1045	1055	1065	1075
DQ307454.1	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
NR102804.1	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGG	TCCGGCCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCAG
3AI	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
3AII	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
3B	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
9B	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
9BI	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
22E	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
23B	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
25C	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCACCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG
28E	AGCGCAACCC	TTATCCTTTG	TTGCCAGCGA	TTCGGTTCGGG	AACTCAAAGG	AGACTGCCGG

	1085	1095	1105	1115	1125	1135
DQ307454.1	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
NR102804.1	TGATAAACTG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GACCAGGGCT
3AI	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
3AII	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
3B	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
9B	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
9BI	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
22E	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
23B	TGATAAACC	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT

25C	TGATAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT
28E	TGATAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCATCA	TGGCCCTTAC	GAGTAGGGCT

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
DQ307454.1	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
NR102804.1	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
3AI	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
3AII	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
3B	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
9B	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
9BI	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
22E	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
23B	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
25C	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC
28E	ACACACGTGC	TACAATGGCG	CATACAAAGA	GAAGCGACCT	CGCGAGAGCA	AGCGGACCTC

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
DQ307454.1	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
NR102804.1	ATAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATTGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCATGAAG	TCGGAATCGC
3AI	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
3AII	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
3B	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
9B	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
9BI	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
22E	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
23B	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
25C	ACAAAGTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC
28E	ACAAATTGCG	TCGTAGTCCG	GATCGGAGTC	TGCAACTCGA	CTCCGTGAAG	TCGGAATCGC

	1265	1275	1285	1295	1305	1315
DQ307454.1	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
NR102804.1	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
3AI	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
3AII	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
3B	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
9B	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
9BI	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
22E	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
23B	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
25C	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
28E	TAGTAATCGT	GGATCAGAAT	GCCACGGTGA	ATACGTTCCC	GGGCCTTGTA	CACACCGCCC
				
	1325	1335				
DQ307454.1	GTCACACCAT	GGGAG				
NR102804.1	GTCACACCAT	GGGAG				
3AI	GTCACACCAT	GGGAG				
3AII	GTCACACCAT	GGGAG				
3B	GTCACACCAT	GGGAG				
9B	GTCACACCAT	GGGAG				
9BI	GTCACACCAT	GGGAG				
22E	GTCACACCAT	GGGAG				
23B	GTCACACCAT	GGGAG				
25C	GTCACACCAT	GGGAG				
28E	GTCACACCAT	GGGAG				