

Universidade de Évora

**Caracterização biomolecular de *Olive latent virus 1*
isolado de *Olea europaea* L.**

Maria do Rosário Fernandes Félix

Dissertação apresentada à Universidade de Évora
para a obtenção do Grau de Doutor em Agronomia

Orientadora: Professora Doutora Maria Ivone Esteves da Clara

Co-Orientadora: Professora Doutora Isabel Solange Martins de Oliveira

Évora

2007

**UE
166
326**

Universidade de Évora

**Caracterização biomolecular de *Olive latent virus 1*
isolado de *Olea europaea* L.**

Maria do Rosário Fernandes Félix

Dissertação apresentada à Universidade de Évora
para a obtenção do Grau de Doutor em Agronomia



Orientadora: Professora Doutora Maria Ivone Esteves da Clara

166 326

Co-Orientadora: Professora Doutora Isabel Solange Martins de Oliveira

Esta tese não inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri

Évora

2007

Índice

	Página
Índice	i
Índice de Figuras	v
Índice de Quadros	ix
Abreviaturas gerais utilizadas	xi
Abreviaturas dos nomes dos vírus	xv
Abreviaturas dos códigos simples dos aminoácidos	xvii
Agradecimentos	xix
Publicações originais dos resultados referidos na tese	xxi
Resumo	xxiii
Abstract	xxvii
I. Introdução	1
II. Revisão bibliográfica	3
1. Os vírus na cultura da oliveira	3
2. Importância económica	6
3. Epidemiologia	7
4. Propriedades gerais dos vírus que infectam a oliveira	8
4.1. Género <i>Nepovirus</i>	8
4.1.1. Strawberry latent ringspot virus	8
4.1.2. <i>Arabis mosaic virus</i>	9
4.1.3. <i>Cherry leafroll virus</i>	9
4.1.4. <i>Olive latent ringspot virus</i>	10
4.2. Género <i>Cucumovirus</i>	11
4.2.1. <i>Cucumber mosaic virus</i>	11
4.3. Género <i>Oleavirus</i>	11
4.3.1. <i>Olive latent virus 2</i>	11
4.4. Género <i>Necrovirus</i>	13
4.4.1. <i>Olive latent virus 1</i>	13
4.4.2. Tobacco necrosis virus	14
4.4.3. Olive mild mosaic virus	15
4.5. Género <i>Potexvirus</i>	16
4.5.1. Olive vein yellowing-associated virus	16

	Página
4.6. Género <i>Tobamovirus</i>	16
4.6.1. <i>Tobacco mosaic virus</i>	16
4.7. Vírus não incluídos em géneros conhecidos	17
4.7.1. Olive yellow mottling and decline associated virus	17
4.7.2. Olive semi-latent virus	17
4.7.3. Olive leaf yellowing-associated virus	17
5. Métodos de diagnóstico viral aplicados à oliveira	18
5.1. Testes biológicos	18
5.2. Testes serológicos	19
5.3. Análise das cadeias duplas de RNA	19
5.4. Testes de RT-PCR	21
5.5. Hibridação 'dot blot'	23
6. Meios de luta	24
III. Materiais e métodos	25
1. Origem dos isolados virais	25
2. Material vegetal	26
3. Inoculação mecânica	26
4. Purificação viral	27
5. Observação das partículas virais	28
6. Análise da proteína da cápside viral	28
6.1. Preparação do gel de poliacrilamida	29
6.2. Preparação das amostras	29
6.3. Electroforese e estimativa da massa molecular do péptido da cápside viral	30
7. Extracção e análise dos ácidos nucleicos	30
7.1. Extracção do ácido nucleico viral por fenol e SDS	30
7.1.1. Tratamento com Ribonuclease A	31
7.2. Extracção do ácido nucleico viral e do RNA total pela aplicação do 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen)	31
7.3. Determinação da massa molecular do ácido nucleico viral	31
7.4. Extracção e análise das cadeias duplas de RNA (dsRNA)	32
7.4.1. Extracção da fracção das dsRNA	32
7.4.2. Tratamento enzimático	33
7.4.3. Análise das dsRNA	33

	Página
8. Aplicação do teste DAS-ELISA	34
8.1. Amostras testadas	34
8.2. Realização do teste DAS-ELISA	34
9. Amplificação do genoma viral por RT-PCR	36
9.1. Isolamento do RNA das amostras a analisar	36
9.2. Optimização do protocolo de RT-PCR para diagnóstico de OLV-1	36
9.3. Detecção de OLV-1 por RT-PCR 'single-step'	37
9.4. Detecção simultânea de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR 'single-step multiplex'	38
10. Análise da transmissão do isolado GM6 pelo solo	38
11. Análise do polimorfismo da conformação da cadeia simples ('single strand conformation polymorphism' - SSCP)	39
12. Sequenciação do RNA genómico do isolado GM6	40
12.1. Síntese do DNA complementar (cDNA)	41
12.2. Amplificação por PCR	41
12.3. Clonagem	42
12.3.1. Vector plasmídico	42
12.3.2. Restrição do vector de clonagem e do fragmento a clonar	43
12.3.3. Ligação	43
12.3.4. Transformação de <i>E. coli</i>	44
12.3.5. Análise das colónias de bactérias com o DNA recombinante	44
12.4. Sequenciação	45
12.5. Amplificação, clonagem e sequenciação das extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6	46
12.5.1. Síntese do cDNA	46
12.5.2. Amplificação por PCR	48
12.5.3. Amplificação por um segundo PCR	49
12.5.4. Clonagem	50
12.5.5. Sequenciação	50
12.6. Análise bioinformática	50
IV. Resultados	51
1. Caracterização serológica e molecular de isolados virais	51
1.1. Aplicação do teste DAS-ELISA	51
1.2. Testes de RT-PCR	51
1.3. Análise de SSCP de diferentes isolados portugueses de OLV-1	53

	Página
2. Caracterização bioquímica e molecular do isolado viral GM6	54
2.1. Gama de hospedeiros	54
2.2. Purificação viral	56
2.3. Morfologia das partículas virais	57
2.4. Análise da proteína da cápside viral	57
2.5. Análise do ácido nucleico viral	58
2.6. Análise das dsRNA nos tecidos infectados	59
2.7. Caracterização molecular do isolado GM6	59
2.7.1. Sequência nucleotídica do RNA genómico do isolado GM6	59
2.7.2. Organização do genoma	63
2.7.3. Proteínas hipotéticas codificadas no genoma e identidade com as de outros vírus de plantas	64
2.7.3.1. Proteína p82	64
2.7.3.2. Proteína p30	66
2.7.3.3. Proteínas p8 e p6	69
2.8. Transmissão do isolado viral GM6 pelo solo	72
3. Técnicas para a detecção de OLV-1 e de TNV-D e/ou OMMV directamente em tecidos de oliveira	73
3.1. Análise das dsRNA	73
3.2. Reacção de amplificação por RT-PCR	73
3.2.1. Detecção de OLV-1	73
3.2.2. Detecção de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR 'single-step multiplex'	74
3.2.3. RT-PCR usando dsRNA	75
V. Discussão	77
1. Caracterização do isolado GM6 e de outros isolados de OLV-1 obtidos de oliveira	77
2. Epidemiologia de OLV-1	82
3. Diagnóstico de OLV-1, TNV-D e/ou OMMV directamente de tecidos de oliveira	83
4. Perspectivas futuras	85
VI. Bibliografia	87
VII. Anexos	101

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Organização do genoma do RNA 2 do OLRV. A caixa representa uma poliproteína que, por clivagem, origina as proteínas virais MP - proteína de movimento e CP - cápside proteica.	10
Figura 2. Estrutura das 4 maiores moléculas de RNA do genoma do OLV-2. As caixas correspondem às principais ORFs. p1a - contém as 'assinaturas' da metiltransferase e da helicase; p2a - contém o domínio da polimerase viral; p36 e p20 correspondem provavelmente à proteína de movimento (MP) e à cápside proteica (CP), respectivamente.	12
Figura 3. Organização do genoma do isolado de citrino de OLV-1. As caixas representam as ORFs, que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30. Rt - 'read through', RdRp - RNA polimerase dependente de RNA, CP - cápside proteica.	14
Figura 4. Organização do genoma do OMMV. As caixas representam as ORFs, que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30. Rt - 'read through', RdRp - RNA polimerase dependente de RNA, CP - cápside proteica.	15
Figura 5. Esquema da extremidade 3' do genoma do OLV-1. CP corresponde à região do gene da cápside proteica; a azul, está marcada a região amplificada pelos 'primers' A e B.	40
Figura 6. Esquema da estratégia de amplificação, clonagem e sequenciação do genoma viral.	41
Figura 7. Localização no genoma, dos locais de complementaridade dos 'primers' utilizados para amplificar cada um dos fragmentos A, B, C e AB.	41
Figura 8. Esquema do vector pZErO TM -2 utilizado para clonar os vários fragmentos do genoma viral do isolado GM6.	43
Figura 9. Localização no genoma, dos 'primers' utilizados para completar a sequenciação e sequenciar em cadeia dupla cada um dos fragmentos A, B, C.	45
Figura 10. Esquema de amplificação da extremidade 5' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.	47
Figura 11. Esquema de amplificação da extremidade 3' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.	48
Figura 12. Análise dos produtos amplificados por RT-PCR 'single-step', para identificação de isolados de OLV-1. A: 1 - G2A, 2 - G5A, 3 - V4PB, 4 - V6A, 5 - A4P2; B: 6 - G1S, 7 - G3S, 8 - G8M, 9 - C1VM, 10 - N, 11 - G1PB, 12 - A1P2; C: 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 15 - G1A, 16 - C7, 17 - V10A. M - DNA Ladder 1kb plus (GIBCOBRL), CN - Controlo negativo de PCR. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (750 pb).	53

- Figura 13. a) Perfis de SSCP obtidos após electroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de RT-PCR desnaturados. A: Amostras – 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 8 - G8M, 6 - G1S, 7 - G3S, 15 - G1A, 1 - G2A, 2 - G5A, 10 - N; B: Amostras – 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 16 - C7, 9 - C1VM, 3 - V4PB, 4 - V6A, 17 - V10, 11 - G1PB. b) A, B, C, D e E: Tipos de padrões de SSCP diferentes, obtidos dos vários isolados de OLV-1. 54
- Figura 14. Sintomas observados em alguns dos hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral GM6: A e B: lesões locais em *N. benthamiana*; C: lesões locais em *C. murale*; D: lesões locais em *C. quinoa*; E: lesões locais em *V. unguiculata* e F: lesões locais em *G. globosa*. 56
- Figura 15. A: Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de GM6. B: Fotografia do isolado viral GM6, observado ao microscópio electrónico de transmissão (Barra=100 nm). 57
- Figura 16. Análise da proteína da cápside do isolado GM6 por electroforese em gel descontínuo de SDS-poliacrilamida; M: Sigmamarker Low range (SIGMA); 1: péptido constituinte da cápside viral. 58
- Figura 17. Análise electroforética em gel de 1% de agarose do ácido nucleico viral extraído de preparações purificadas de vírus. A - M: 'RNA Markers, 0.28-6.58 kb' (Promega), 1: Ácido nucleico viral extraído com fenol e SDS; B - 1: Ácido nucleico viral extraído com o 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen); M: 'RNA Ladder, High Range' (Fermentas). A seta indica a posição RNA viral, com cerca de 3700 bases. 59
- Figura 18. Análise electroforética em gel de 0,8% de agarose dos ácidos ribonucleicos de cadeia dupla isolados de plantas de *N. benthamiana* infectadas. M - 'DNA Ladder 1kb plus' (GIBCOBRL); 1 - Bandas correspondentes às formas replicativas do isolado GM6. As setas indicam a posição de cada uma das 3 bandas obtidas. 60
- Figura 19. Sequência completa de bases do genoma do isolado viral GM6. A sequência de aminoácidos deduzida para as proteínas codificadas pelo RNA viral é apresentada na parte inferior da sequência, com diferentes cores para cada provável proteína. Os asteriscos (*) correspondem ao codão stop. 63
- Figura 20. Organização do genoma do isolado viral GM6. As caixas sombreadas representam as proteínas codificadas por cada uma das ORFs: p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. Rt - leitura continua ('read through'), RdRp - RNA polimerase dependente de RNA-, CP - cápside proteica. 64
- Figura 21. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining após o alinhamento das sequências de aminoácidos da RdRp do isolado GM6 com as de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'. 66

- Figura 22. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências de aminoácidos da CP de GM6 com as de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'. 67
- Figura 23. Alinhamento da sequência de aminoácidos da CP do isolado GM6, com as de OLV-1tulipa (BAB55656), OLV-1citrino (NP_043911), TNV-A (NP_056828), TNV-D (BAA00790), e OMMV (YP_224020). Os resíduos idênticos estão a negrito. Os traços indicam espaços introduzidos para maximizar o alinhamento. A região sublinhada corresponde ao domínio S da cápside proteica, os resíduos a cinzento correspondem ao padrão de consenso do domínio S e a seta indica o aminoácido leucina na 17ª posição deste consenso. Os locais de ligação ao cálcio (Ca^{2+}) estão indicados abaixo das sequências, junto dos aminoácidos que favorecem essa ligação. 68
- Figura 24. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 de GM6 com pequenas proteínas codificadas pelo genoma de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'. 70
- Figura 25. Árvores filogenéticas obtidas por aplicação do método de Neighbour-Joining a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas p8 (A) e p6 (B), de GM6, com outras pequenas proteínas localizadas em zonas idênticas do genoma, de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'. 71
- Figura 26. **A** – Planta de *N. benthamiana* revelando extensas necroses, após ter sido inoculada com raízes de *N. benthamiana* cultivada em solo contaminado com GM6. **B** – Análise electroforética em gel de agarose, em que se observam os produtos de amplificação resultantes de RT-PCR usando RNA total extraído de raízes (1) e folhas (2) de plantas de *N. benthamiana*. C+ - Controlo positivo; C- - Controlo negativo; M – 'RNA Ladder, High Range' (Fermentas). 72
- Figura 27. Detecção do vírus OLV-1 por RT-PCR usando RNA total extraído de *N. benthamiana* previamente inoculada com OLV-1 (C+), de ramos e de frutos de oliveiras da cultivar Galega vulgar árvore 1 (1R) e (1F), e árvore 2 (2R) e (2F). Controlo negativo da reacção de amplificação (C-), Marcador 1kb Plus DNA Ladder (GIBCOBRL) (M). A seta indica a posição do produto de amplificação esperado para OLV-1 com cerca de 750 pb. 74

Figura 28. Detecção simultânea dos vírus OLV-1 e TNV-D por RT-PCR num passo. A - Gel de agarose onde se observa o resultado da reacção de amplificação obtida a partir do RNA total extraído de plantas de *N. benthamiana*. M – ‘Marcador 1kb Plus DNA Ladder’ (GIBCOBRL); 1 - *N. benthamiana* previamente inoculada com TNV-D; 2 - *N. benthamiana* infectada com OLV-1; 3 - *N. benthamiana* infectada com TNV-D e com OLV-1; C- - Controlo negativo do PCR. B - Gel de agarose onde se observa o resultado de uma reacção de amplificação em que se utilizou o RNA total extraído de ramos (R) de oliveira. M – ‘Marcador 1kb Plus DNA Ladder’ (GIBCOBRL); C+ - *N. benthamiana* infectada com TNV-D e com OLV-1; 1 - Galega vulgar, árvore 1 da Herdade da Abóbada; 2 - Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada; 3 - Verdeal alentejana, árvore 10 da Herdade da Abóbada; 4 - Galega vulgar, árvore 5 da Herdade da Abóbada; 5 - Verdeal alentejana, árvore 4 da Herdade da Abóbada; 6 - Verdeal alentejana, árvore 8 da Herdade da Abóbada, C- - controlo negativo do PCR. As setas indicam as bandas referentes aos produtos de amplificação de cerca de 750 pb (seta superior) e cerca de 360 pb (seta inferior).

75

Figura 29. Detecção do vírus OLV-1 por RT-PCR usando dsRNA previamente desnaturado. 1 - dsRNA extraído de *N. benthamiana* infectada com OLV-1; 2 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 1 da Herdade da Abóbada; 3 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada; 4 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 5 da Herdade da Abóbada; 5 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Verdeal Alentejana, árvore 10 da Herdade da Abóbada; 6 - Controlo negativo da reacção de amplificação; M – ‘Marcador 1kb Plus DNA Ladder’ (GIBCOBRL) (M). A seta indica o produto de amplificação esperado de cerca de 750 pb.

76

Índice de Quadros

	Página
Quadro I. Doenças da oliveira transmitidas por enxertia, mas não transmissíveis mecanicamente	3
Quadro II. Vírus detectados em <i>Olea europaea</i> L., sua distribuição mundial e classificação taxonómica	5
Quadro III. Isolados virais utilizados neste trabalho	25
Quadro IV. Plantas herbáceas indicadoras utilizadas	26
Quadro V. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar os fragmentos A, B, C e AB do genoma do isolado GM6	42
Quadro VI. Sequências dos 'primers' utilizados para sequenciar os fragmentos A, B e C do genoma do isolado GM6	45
Quadro VII. Sequências dos 'primers' utilizados para a síntese do cDNA da extremidade 5' e 3' do RNA do isolado GM6	47
Quadro VIII. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6	49
Quadro IX. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar por um segundo PCR as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6	50
Quadro X. Reacções obtidas em teste DAS-ELISA em que se usaram anticorpos específicos para OLV-1 (G1A) e para TNV ('Broad range') para identificação dos isolados virais purificados, obtidos de oliveiras portuguesas	52
Quadro XI. Sintomas observados em plantas herbáceas indicadoras inoculadas com o isolado viral GM6	55
Quadro XII. Quantidade de vírus obtida em 4 experiências de purificação usando dois protocolos	56
Quadro XIII. Percentagem de identidade das duas maiores proteínas (RdRP e CP) codificadas pelo genoma do isolado GM6 com as de outros membros da família <i>Tombusviridae</i>	65
Quadro XIV. Percentagem de identidade das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 codificadas pelo genoma do isolado GM6, com outras pequenas proteínas de outros membros da família <i>Tombusviridae</i>	69
Quadro XV. Valores das absorvâncias a 405 nm dos produtos da reacção do teste DAS-ELISA, para diagnóstico de OLV-1 (isolado G1A), aplicado a folhas e raízes de <i>N. benthamiana</i> cultivada em solo contaminado com GM6	72

Abreviaturas gerais utilizadas

aa – aminoácido

B – abreviatura associada à partícula viral com taxa de sedimentação mais elevada (Bottom).

BSA – albumina de soro de bovino

°C – grau centígrado

ca. – *circa*

cDNA – DNA complementar

CP – cápside proteica

cv. – cultivar

Da – Dalton

dATP – deoxiadenosina trifosfato

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

DEPC – dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxiribonucleico

DNase – desoxiribonuclease

dNTPs – deoxinucleótidos trifosfatados

D.O. – densidade óptica

dsRNA – cadeias duplas de RNA

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético

g – grama

g – aceleração da gravidade

h – hora

HSP70 – Proteína de choque térmico 70 ('Heat shock protein' 70)

HSP90 – Proteína de choque térmico 90 ('Heat shock protein' 90)

IC/RT-PCR – imunocaptura / transcrição reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase

ICR – Regiões inter-cistrónicas ('Inter cistronic regions')

IgG – imunoglobulina G

kb – kilobases

kDa – kiloDalton

kbp – kilopares de bases

kV – kiloVolt

M – Middle (abreviatura associada à partícula viral com taxa de sedimentação intermédia entre os componentes 'Top' e 'Bottom')

M – molar (quando antecedida de um valor numérico)

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitros

mM – milimolar

M-MLV – Moloney Murine Leukemia Virus

MP – proteína de movimento

M_r – massa molecular relativa

NCR – região não codificante ('Non coding region')

nm – nanómetro

nt – nucleótido

nts – nucleótidos

ORF – Grelha de leitura aberta ('Open reading frame')

PAGE – electroforese em gel de poliacrilamida

PCR – Reacção em cadeia da polimerase ('Polymerase chain reaction')

PEG – polietilenoglicol

PVP – polivinil pirrolidone

p/v – peso/volume

RACE – 'rapid amplification of cDNA ends'

RdRp – RNA polimerase dependente de RNA

rpm – rotações por minuto

RNA – ácido ribonucleico

RNase – ribonuclease

RT – transcrição reversa

RT-n-PCR – transcrição reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase 'nested'

RT-PCR – transcrição reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase

S – coeficiente de sedimentação

SDS – sulfato dodecil de sódio

SDS – PAGE – gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio

seg – segundo

SSC – Tampão Cloreto de sódio/Citrato de sódio

SSCP – polimorfismo da conformação da cadeia simples

ssRNA – ácido ribonucleico de cadeia simples

STE – Tampão Sódio/Tris/EDTA

T – abreviatura associada à partícula viral com taxa de sedimentação menor (Top)

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tampão Tris/ácido bórico/EDTA

TE – Tampão Tris/ EDTA

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

TdT – Terminal deoxinucleotido Transferase

TNA – ácido nucleico total

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

U – unidades

V – volt

v/v – volume/volume

fg – fentograma

ng – nanograma

μL – microlitro

μg – micrograma

pg – picograma

Bases nucleotídicas

A – Adenina

C – Citosina

G – Guanina

T – Timina

U – Uracilo

Abreviaturas dos nomes dos vírus

AIMV – *Alfalfa mosaic virus*

ArMV – *Arabidopsis mosaic virus*

BBSV – *Beet black scorch virus*

CarMV – *Carnation mottle virus*

CLRV – *Cherry leaf roll virus*

CMV – *Cucumber mosaic virus*

CymRSV – *Cymbidium ringspot virus*

GaMV – *Galinsoga mosaic virus*

LWSV – *Leek white streak virus*

MNSV – *Melon necrotic spot virus*

OLRSV – *Olive latent ringspot virus*

OLV-2 – *Olive latent virus 2*

OLV-1 – *Olive latent virus 1*

OLYaV – *Olive leaf yellowing-associated virus*

OMMV – *Olive mild mosaic virus*

OSLV – *Olive semi latent virus*

OYYaV – *Olive vein yellowing-associated virus*

OYMDaV – *Olive yellow mottling and decline associated virus*

PDV – *Prune dwarf virus*

SLRSV – *Strawberry latent ringspot virus*

TBSV – *Tomato bushy stunt virus*

TCV – *Turnip crinkle virus*

TMV – *Tobacco mosaic virus*

TNV-A – *Tobacco necrosis virus A*

TNV-D – *Tobacco necrosis virus D*

Abreviaturas dos códigos simples dos aminoácidos

- A – Alanina
- C – Cisteína
- D – Ácido aspártico
- E – Ácido glutâmico
- F – Fenilalanina
- G – Glicina
- H – Histidina
- I – Isoleucina
- K – Lisina
- L – Leucina
- M – Metionina
- N – Asparagina
- P – Prolina
- Q – Glutamina
- R – Arginina
- S – Serina
- T – Trionina
- V – Valina
- Y – Tirosina
- W – Triptofano

Agradecimentos

Este trabalho realizou-se no Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM) e do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, o qual me proporcionou todas as condições para a realização do trabalho experimental.

Agradeço também à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) que financiou o Projecto POCTI/AGR/36230/2000, ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (INIAP) que financiou o Projecto AGRO 186, Projectos estes que permitiram a realização de grande parte deste trabalho e à Mediterranean Phytopathological Union (MPU) pelo Prémio “Antonio Ciccarone” que me permitiu realizar uma parte deste trabalho no “Laboratório de Virologia” da Universidade de Bari em Itália.

Contudo, este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e incentivo de algumas pessoas a quem quero transmitir o meu enorme agradecimento:

À minha Orientadora, Professora Maria Ivone Clara, por tudo aquilo que me ensinou, não só cientificamente, como pessoalmente e também por todo o apoio, incentivo e sobretudo pela grande amizade e enorme generosidade que sempre demonstrou e que me fizeram acreditar muito mais em mim.

À minha Co-Orientadora, Professora Solange Oliveira, por toda a ajuda, amizade e pelo pronto sorriso com que sempre esclareceu todas as minhas questões, sobretudo pelo grande apoio na realização da parte molecular deste trabalho.

Ao Professor Giovanni P. Martelli da “Università degli Studi di Bari”, por me ter recebido no seu Laboratório de Virologia e por ter disponibilizado todos os meios necessários para o trabalho aí realizado.

À D. Maria Mário Azedo, Técnica do Laboratório de Virologia Vegetal por toda a ajuda na realização deste e de outros trabalhos, desde o meu primeiro dia no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade de Évora. Sobretudo pela grande amizade e simpatia que sempre demonstrou.

Aos Engenheiros Fausto Leitão e José Fernandes Serrano, pela enorme simpatia, amizade e enorme ajuda na recolha de material vegetal para a realização deste trabalho e sobretudo pelo que me ensinaram da realidade olivícola nacional.

À Joana Cardoso pela amizade, pela enorme ajuda na realização da parte molecular deste trabalho e pela companhia e partilha do desespero frente a centenas de bactérias teimosamente 'não recombinantes'.

À Marta Laranjo pela amizade e grande apoio científico e não só, demonstrado ao longo dos últimos anos e que partilhou comigo muitos momentos de grande improviso laboratorial.

Às minhas queridas amigas e colegas, Matilde Piteira, Carla Varanda, Ana Alexandre e Elsa Lamy por todo o apoio e amizade e sobretudo pelo sorriso sempre pronto, o que tornou o trabalho no laboratório sempre um prazer.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia da Universidade de Bari, principalmente à Maria Saponari, Angelantonio Minafra, Pascoal Saldarelli, Sérgio Murolo, Giuliana Loconsole e Camilla Turturo por tudo o que me ensinaram e pela amizade e simpatia com que me receberam e que muito contribuiu para que desde o primeiro momento me sentisse 'em casa'.

Por fim o meu enorme agradecimento ao meu marido por todo o apoio e incentivo nas horas em que me senti menos motivada e também pela ajuda não só neste trabalho como noutros em que me substituiu para que este pudesse ser concluído mais rapidamente. Também à minha mãe que sempre me apoiou e me deu a maior força principalmente em alturas de maior desânimo e cansaço e ao meu filho cujo sorriso faz em mim os maiores milagres!

Publicações originais dos resultados referidos na tese

Esta tese é em parte baseada nas seguintes publicações originais, aqui citadas por ordem cronológica:

Félix, M.R., Cardoso, J.M.S., Oliveira, S., Clara, M.I.E. (2003) "Detection of *Tobacco necrosis virus* and *Olive latent virus 1* in *Olea europaea* L. by multiplex RT-PCR" *Phytopathologia Mediterranea* 42 (3): 298.

Félix, M.R., Varanda, C., Cardoso, J.M.S., Clara, M.I.E. (2004) "Soil transmission of an olive isolate of *Olive latent virus 1*" *Plant Protection towards the 21st century, Proceedings of the 15th International Plant Protection Congress*: 447.

Félix, M.R., Cardoso, J.M.S., Oliveira, S., Clara, M.I.E. (2005) "Viral properties, primary structure and phylogenetic analysis of the coat protein of *Olive latent virus 1* isolate from *Olea europaea* L." *Virus Research* 108: 195-198.

Félix, M.R., Cardoso, J.M.S., Varanda, C.M.R., Oliveira, S., Clara, M.I.E. (2005) "Complete nucleotide sequence of an *Olive latent virus 1* isolate from olive trees" *Archives of Virology* 150: 2403-2406.

Félix, M.R., Cardoso, J.M.S., Clara, M.I.E. (2006) "Single Strand Conformation Polymorphism analysis of *Olive latent virus 1* isolates from *Olea europaea* L." *Proceedings of the Olivebioteq 2006- Second International Seminar "Biotechnology and Quality of Olive Tree Products around the Mediterranean Basin"*. Vol.II: 243-246.

Félix, M.R., Clara, M.I.E. (2007). "Characterization and Diagnosis of Viruses Occuring on *Olea europaea* L." In: *Techniques in Diagnosis of Plant Viruses*. Eds: Govind P. Rao, Rodrigo A. Valverde and Chrisostomos I. Dovas. Studium Press LLC, Texas, USA. pp. 189-226.

Félix, M.R., Cardoso, J.M.S., Oliveira, S., Clara, M.I.E. "Biological and molecular characterization of *Olive latent virus 1*". *Plant Viruses (Aceite para publicação)*.

Resumo

Este trabalho incidiu sobre o estudo de isolados de OLV-1 obtidos de *Olea europaea* L. cultivada em Portugal e em especial sobre o isolado GM6. Estudaram-se as propriedades de natureza biológica e molecular e realizou-se pela primeira vez a sequenciação do genoma completo de um isolado de OLV-1 de oliveira, procedeu-se à identificação serológica e molecular de 17 isolados e à análise da variabilidade genómica destes, e compararam-se vários métodos de diagnóstico de OLV-1 aplicáveis à cultura da oliveira.

O isolado GM6 transmitiu-se mecanicamente a vários hospedeiros herbáceos nos quais produziu unicamente necroses locais. As partículas virais com cerca de 30 nm de diâmetro, têm um coeficiente de sedimentação de 111 S, a cápside proteica é constituída por péptidos com 32 kDa e rodeiam uma molécula de RNA genómico de cadeia simples e de sentido positivo com 3,7 kb. Estas propriedades são semelhantes às do OLV-1 isolado italiano, de oliveira, com o qual é serologicamente relacionado.

O RNA viral é constituído por 3702 nts e está organizado em 5 ORFs, tem capacidade para codificar 5 péptidos e apresenta duas regiões não traduzidas de 60 nts e 258 nts próximas das extremidades 5' e 3', respectivamente e ainda duas regiões intercistrónicas, uma de 5 nts entre a ORF 3 e a ORF 4 e outra de 24 nts entre a ORF 4 e a ORF 5. A ORF 1 situada na extremidade 5', codifica uma proteína com M_r estimada em 23004 (p23), e a leitura continua do codão stop 'amber', origina uma proteína parcialmente idêntica à anterior com uma M_r estimada em 82484 (p82) codificada pela ORF 2. Esta proteína foi identificada como a replicase viral (RdRP), com base na elevada identidade, superior a 90%, com as RdRp de outros necrovirus. Filogeneticamente, esta proteína encontra-se no mesmo ramo filogenético que a RdRp do OLV-1 isolado de citrino. As ORF 3 e ORF 4 codificam polipéptidos com uma M_r estimada de 8051 (p8) e 6268 (p6), respectivamente. Admite-se que estes polipéptidos estejam envolvidos no movimento das partículas virais de célula para célula, com base na elevada identidade com as p8 e p6 do isolado de citrino de OLV-1, 93,2% e 100%, respectivamente, que possuem a função de facilitar o movimento viral. Na extremidade 3' do genoma está localizada a ORF 5 que codifica a proteína da cápside viral e que tem uma M_r estimada de 29853 (p30) e mostra uma identidade de 98,5% e de 87,7%, com as homólogas relativas aos isolados de tília e de citrino, respectivamente. A pesquisa de regiões conservadas na proteína da cápside revelou a localização do domínio S (Shell), situado entre os aminoácidos 53 e 270 e também a respectiva região de consenso deste domínio. Nesta região, que é constituída por 26 aminoácidos entre os resíduos 135 e 160,

observou-se o aminoácido leucina, na 17^a posição, à semelhança do que se verifica nos outros isolados de OLV-1, mas que não se observa nos outros vírus isométricos de plantas com genoma de RNA. Para além desta sequência, foram ainda identificados quatro resíduos de ligação ao Ca²⁺, dois resíduos de ácido aspártico, um de lisina e um de leucina, responsáveis pela estabilidade da estrutura quaternária da cápside proteica.

O isolado viral GM6 revelou a capacidade de ser transmitido através do solo a plantas de *N. benthamiana*, na ausência de vectores biológicos. Nestas circunstâncias a infecção do vírus restringiu-se à parte radical, não infectando a parte aérea da planta, como se demonstrou por testes de inoculação mecânica, DAS-ELISA e RT-PCR.

Neste trabalho caracterizou-se parcialmente um grupo de 23 isolados virais obtidos de oliveira, que apresentaram características de necrovirus. Uma primeira análise por DAS-ELISA permitiu identificar 17 isolados como OLV-1 e 8 como TNV (*lato sensu*) e/ou OMMV, não tendo sido possível distinguir entre estas espécies virais por o antisoro usado em ELISA ser de muito largo espectro e por o OMMV ser serologicamente muito semelhante ao TNV-D. Estes testes permitiram também verificar a ocorrência de infecções mistas numa mesma árvore, facto que pode proporcionar a recombinação genómica e originar vírus com características comuns às espécies OLV-1 e TNV-D, como é o caso já conhecido do necrovirus OMMV. Os isolados de OLV-1 identificados por DAS-ELISA foram submetidos a testes de RT-PCR com 'primers' específicos para o OLV-1, tendo-se verificado que dois desses isolados não geraram o produto amplificado esperado, não se confirmando assim a identificação serológica inicial. Esta discrepância poderá dever-se, por exemplo, a prováveis mutações na sequência nucleotídica na zona de hibridação dos 'primers' impedindo o seu emparelhamento.

Os produtos de amplificação obtidos por RT-PCR aplicados a 15 dos 17 isolados de OLV-1 de oliveira, foram sujeitos a análise de SSCP. Os padrões obtidos em gel revelaram a presença de 5 padrões electroforéticos distintos, com uma, duas ou três conformações estáveis correspondendo à presença de diferentes variantes na mesma árvore.

Neste trabalho foram ainda avaliados vários métodos para o diagnóstico viral, principalmente de OLV-1, directamente de tecidos de oliveira. A análise das dsRNA não constituiu, nas nossas condições, um método eficaz, pois os resultados obtidos foram sempre negativos, apesar de se saber, por outras vias (por exemplo, inoculação mecânica seguida de purificação e caracterização viral), que algumas das árvores analisadas estavam infectadas. No entanto, a utilização destas mesmas preparações de dsRNA como molde em reacções de RT-PCR, utilizando 'primers' específicos para o OLV-1, originaram resultados positivos demonstrando que os testes de RT-PCR possuem uma maior sensibilidade. A detecção de OLV-1 foi eficaz tanto aplicada a amostras

provenientes de ramos como de frutos, embora o produto final da reacção de amplificação fosse menos concentrado nas amostras obtidas de frutos do que de ramos.

Os testes de RT-PCR 'single-step' possibilitaram a detecção de OLV-1 em plantas de *N. benthamiana* infectadas e o RT-PCR 'single-step multiplex' foi optimizado para possibilitar a detecção simultânea dos 3 necrovirus que infectam a oliveira. Esta modalidade tem a vantagem de reduzir o tempo necessário para o diagnóstico e o custo em reagentes e permitiu-nos diagnosticar infecções mistas e simples dos necrovirus que infectam a oliveira em Portugal.

O elevado nível de infecções virais que ocorrem nos olivais Portugueses, já verificada em outros estudos, e por outro lado a elevada sensibilidade e especificidade dos RT-PCR multiplex, demonstram claramente a importância destes e considera-se imprescindível a sua aplicação em Programas nacionais de melhoramento, de selecção e de certificação sanitária da oliveira, como exigido por legislação da União Europeia Directiva 93/48 de 23-06-93, *Conformitas Agraria Communitatis (CAC)*.

Palavras-chave: OLV-1, necrovirus, sequenciação genómica, oliveira, vírus da oliveira, SSCP, RT-PCR, RT-PCR 'single-step', RT-PCR 'single-step multiplex', diagnóstico de OLV-1, dsRNA, epidemiologia de OLV-1.

Abstract

This work involves the study of OLV-1 isolates obtained from *Olea europaea* L. growing in Portugal, in particular the GM6 isolate. The biological and molecular properties were studied and the genome of an OLV-1 olive isolate was fully sequenced for the first time. Additionally, 17 different OLV-1 isolates were serological and molecularly identified and the genomic variability among them was analysed. Different methods for OLV-1 diagnosis applied to olive crop were compared and optimized for practical purposes.

The GM6 isolate was mechanically transmitted to several herbaceous hosts where it produced only local necrotic lesions. Virus particles with about 30 nm in diameter, sedimented as a single component with 111 S, the coat protein is made up 32 kDa peptide subunits that surrounded a positive single strand molecule of genomic RNA with ca. 3.7 kb. The properties of this isolate are identical to that of an Italian OLV-1 isolate obtained from the Italian olives with which it is serologically related.

The viral RNA is 3702 nucleotides long, is organized in 5 ORFs with the coding capacity for 5 peptides, shows two non coding regions with 60 and 258 nts in the 3' and 5' ends, respectively, and also two small inter cistronic regions, one with 5 nts between ORF 3 and ORF 4 and another with 24 nts between ORF 4 and ORF 5. The ORF 1 located in the 5' end encodes a peptide with an estimated M_r of 23004 (p23), the read through of its amber termination codon allows the translation of the ORF 2 that encodes a protein with an estimated M_r of 82484 (p82). This protein was identified as the viral replicase (RdRp) based on the high identity, over 90%, with that of other necrovirus and the phylogenetic analysis showed that it is in the same branch as that of OLV-1 citrus isolate. ORF 3 and ORF 4 encoded polypeptides with an estimated M_r of 8051 (p8) and 6268 (p6), respectively, are likely to be involved in the cell-to-cell movement of virus particles. These polypeptides share a high percentage of identity with those of OLV-1 citrus isolate, 93.2% and 100%, respectively. In the 3' end of viral genome is located the ORF 5, that encodes the viral coat protein with an estimated M_r of 29853 (p30), showing an identity of 98.5% and 87.7% with that of the tulip and citrus isolates. A domain search of the coat protein sequence revealed the S domain located between the 53 and 270 amino acid residue as well as the consensus pattern of that domain. In this consensus pattern constituted by the 26 amino acids located between the 135 and 160 residues, is the amino acid leucine at position 17th, which had not been considered in the described pattern. This leucine is conserved in all OLV-1 isolates in the 17th position of that sequence, but is not found in the consensus pattern of the other small icosahedral plant viruses so far compared. In the S domain were also found four sites (two for aspartic acid, one for lysine and one for

asparagine) likely to be involved in Ca²⁺ binding, that confer the stability of the protein quaternary structure.

The GM6 isolate showed the ability to be transmitted through the soil to *N. benthamiana* plants in the absence of biological vectors. The virus infection was limited to the plant root system, as demonstrated by mechanical transmission, DAS-ELISA and RT-PCR tests.

Additionally, in this work 23 viral isolates obtained from olive, showing necrovirus properties were partially characterized. Application of DAS-ELISA test were identified 17 isolates as OLV-1 and 8 as TNV (*lato sensu*) and/or OMMV. It was not possible to distinguish between these species because the antiserum used was of broad range and because OMMV is serologically very close to TNV-D. This test detected mixed infections in the same tree, which permits the occurrence of the genomic recombination and thus originating new viral species with characteristics of the both OLV-1 and TNV-D, as is the case of OMMV. The OLV-1 isolates identified by ELISA tests were further analysed by RT-PCR with primers specific for OLV-1. Reactions involving two of those isolates did not show the expected amplified product not confirming the previously serological identification. Such discrepancy may be due, for example, to mutations in the viral genomic sequence where the primers hybridize, thus preventing further amplification.

The amplified products obtained from RT-PCR application to 15 OLV-1 isolates were subjected to SSCP analysis. The resulting electrophoretic profiles, revealed the presence of 5 different patterns, with one, two or three different conformations.

In this work several methods for viral diagnosis, mainly OLV-1, using olive tissues were evaluated. The dsRNA analysis, in our experimental conditions, did not an efficient method for olive virus diagnosis. The results obtained were always negative, although it was known, that some trees tested by other methods (for example, by mechanical transmission, followed by purification and viral characterization) were infected. However, the use of the same dsRNA preparations as template in RT-PCR reactions with the OLV-1 diagnostic primers showed positive results thus revealing the high sensitivity of the RT-PCR tests. The OLV-1 detection was efficient in stems as well as in fruits, but the reaction final amplified product was less concentrated when working with fruit samples than with stems.

The RT-PCR single-step tests detected OLV-1 in *N. benthamiana* infected plants very easily but preference was given to optimizing the RT-PCR single-step multiplex to allow the simultaneous detection of the 3 necroviruses. This method saves time and reagent costs and allows the detection of mixed and simple infections in olive trees.

The high level of viral infections that occurs in Portuguese olive orchards observed in previous studies, and the high specificity and sensitivity of the RT-PCR multiplex, show

the great importance of these tests and clearly show the relevance of their implementation in national Programmes for breeding, selection and sanitary certification of olive cultivars, as required by European Union legislation, as Directive 93/48 from 23-06-93, *Conformitas Agraria Comunitatis (CAC)*.

Keywords: OLV-1, necrovirus, genome sequencing, olive tree, olive viruses, SSCP, RT-PCR, RT-PCR 'single-step', RT-PCR 'single-step multiplex', OLV-1 diagnosis, dsRNA, OLV-1 epidemiology.

I. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é a cultura frutícola mais cultivada no mundo, tendo a área cultivada triplicado nos últimos 40 anos, passando de 2,6 para 8,5 milhões de hectares (FAO, 2006). Nas últimas décadas esta cultura estendeu-se a países sem tradição olivícola, como a Argentina, Austrália, China e Índia. Estes países constituem actualmente os grandes mercados importadores de material vegetativo, exigindo em regra que o material seja certificado e isento de doenças, nomeadamente vírus. Também a Directiva Europeia 93/48 de 23-06-93, *Conformitas Agraria Communitatis* (CAC), impõe a obrigação da produção e comercialização de material propagativo de oliveira isento de “todos os vírus e organismos semelhantes a vírus”.

A oliveira é uma planta susceptível ao ataque de diversas pragas e doenças, de onde se destacam os 14 vírus isolados até ao momento deste hospedeiro (Alkowni, 2000; Cardoso *et al.*, 2005). Estes têm merecido uma atenção crescente por parte dos fitopatologistas e melhoradores, tendo em conta a relevância económica desta cultura em muitos países da Europa, Norte de África e Médio Oriente e porque não se conhecem técnicas eficazes para eliminar vírus de material vegetal de oliveira (Martelli, 1999). Principalmente, nas últimas duas décadas, muitos trabalhos têm sido conduzidos de modo a aprofundar o conhecimento sobre os vírus que infectam esta cultura. Os trabalhos que inicialmente se realizaram baseados em experimentação de transmissão por enxertia e por inoculação mecânica em hospedeiros herbáceos, foram evoluindo, tendo-se isolado as partículas virais que foram caracterizadas bioquímica e serologicamente. Mais recentemente, com o desenvolvimento de metodologias moleculares, realizaram-se estudos detalhados dos genomas, conhecendo-se actualmente em pormenor os genes que compõem alguns destes vírus. No entanto, dos 14 vírus isolados de oliveira, apenas cinco desses vírus têm o seu genoma total ou parcialmente sequenciado.

O conhecimento da sequenciação genómica dos vírus, no todo ou em parte é crucial para a concepção de métodos de diagnóstico de elevada sensibilidade como as baseadas na transcrição reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase (‘Reverse transcription - polymerase chain reaction’ / RT-PCR), muito úteis em programas de melhoramento e de certificação de material vegetal. As técnicas moleculares estão continuamente a ser melhoradas, de modo a aumentar ainda mais a sensibilidade e o número de vírus detectados em apenas um teste, tornando-os assim mais económicos (Grieco *et al.*, 2000b; Bertolini *et al.*, 2001; 2003).

Estudos anteriores realizados no âmbito de Projectos Nacionais (PAMAF, SAPIENS e AGRO), em que se aplicaram diferentes métodos de diagnóstico, revelaram elevadas taxas de infecção em oliveira, por vezes atingindo os 100% das árvores testadas (Félix *et al.*, 2002; Varanda, 2005). Este facto, associado à crescente necessidade de obtenção de material vegetal de oliveira isento de vírus para usar no estabelecimento de novos olivais e eventual exportação de estacas enraizadas, vem demonstrar a grande importância e urgência que tem o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico sensíveis e práticas, que possam ser implementadas em larga escala, de modo a garantir a competitividade da indústria olivícola nacional.

Em Portugal foram detectados até ao momento oito vírus: Strawberry latent ringspot virus (SLRSV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Cherry leafroll virus* (CLRV), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Olive latent virus 1* (OLV-1), Olive mild mosaic virus (OMMV) e Tobacco necrosis virus *lato sensu* (TNV *l.s.*). No entanto, os que se têm encontrado mais disseminados nos olivais nacionais são os três necrovirus OLV-1, TNV-D e/ou OMMV.

Este estudo teve como principal objectivo a caracterização biomolecular de um isolado de OLV-1 de oliveira, o GM6 e a sua comparação com os outros dois isolados de OLV-1 conhecidos, de citrino e de túlipa, e também com outros vírus membros da família *Tombusviridae* a que pertencem. Um outro objectivo consistiu no desenvolvimento e optimização de testes de diagnóstico aplicáveis directamente a tecidos de oliveira, nomeadamente testes de RT-PCR e RT-PCR 'single-step' para a detecção de OLV-1 e RT-PCR 'single-step multiplex', para o diagnóstico em simultâneo dos três necrovirus que infectam a oliveira. Adicionalmente caracterizaram-se parcialmente 23 isolados virais obtidos de azeitonas.

Este trabalho contribui para um melhor conhecimento dos vírus que infectam a oliveira em Portugal e disponibiliza um meio de diagnóstico que ajude a fazer uma selecção sanitária mais eficaz de material vegetal de oliveira.

II. Revisão bibliográfica*

1. Os vírus na cultura da oliveira

A oliveira é afectada por um elevado número de agentes patogénicos, onde se incluem os vírus. A primeira vez que alterações morfológicas na oliveira foram sugeridas como tendo origem viral, foi em 1938, por Pesante. Este autor descreveu uma sintomatologia caracterizada por anomalias foliares e necrose do floema por vezes acompanhada por um declínio progressivo da árvore (Martelli, 1999). Na época, não foi realizado nenhum teste que comprovasse a causa viral. No entanto, material com sintomas idênticos aos referidos por Pesante foi testado por Fogliani em 1953 para a presença de vírus, tendo este obtido resultados negativos. Estudos posteriores demonstraram que aquela sintomatologia estava relacionada com a leptonecrose, uma carência de boro (Martelli, 1998).

A partir de 1950 voltou a haver referências a várias doenças de possível origem viral (Quadro I), uma vez que elas eram transmitidas por enxertia. Contudo, nunca foi possível a transmissão a plantas herbáceas indicadoras, nem se observaram partículas semelhantes a vírus (Martelli, 1998 e 1999).

Quadro I. Doenças da oliveira transmitidas por enxertia, mas não transmissíveis mecanicamente¹

Doença	País	Referência
Paralisia parcial ('Partial paralysis')	Argentina	Nicolini e Traversi, 1950
Folha fauciforme ('Sickle leaf')	EUA, Chile, Portugal	Thomas, 1958
Amarelo Infeccioso ('Infectious yellows')	Itália	Ribaldi, 1959
Deformação foliar ('Foliar deformation')	Itália	Corte <i>et al.</i> , 1961
'Spherosis'	Israel	Lavee e Tanne, 1984

¹ Adaptado de Martelli (1999).

* Parte desta Revisão bibliográfica está contida no capítulo "Characterization and Diagnosis of Viruses Occurring on *Olea europaea* L." em publicação no livro intitulado "Techniques in Diagnosis of Plant Viruses". Eds: Govind P. Rao, Rodrigo A. Valverde and Chrisostomos I. Dovas. Studium Press LLC, Texas, USA.

A presença de partículas virais em tecidos de oliveira foi detectada casualmente mais tarde, aquando da observação ao microscópio electrónico de secções ultrafinas de grãos de pólen de oliveira da cv. Corregiolo (Pacini e Cresti, 1977). Desde então, já foram isoladas e identificadas 14 espécies de vírus pertencentes a 7 géneros diferentes (Alkowni, 2000; Cardoso *et al.*, 2005), com uma distribuição mundial praticamente coincidente com a da cultura da oliveira (Quadro II).

Os primeiros vírus a serem identificados foram o Strawberry latent ringspot virus (SLRSV) e o *Arabid mosaic virus* (ArMV) (Savino *et al.*, 1979). O SLRSV foi repetidamente isolado de árvores da cultivar italiana Ascolana tenera, as quais apresentavam folhas deformadas, frutos rugosos e com saliências, bem como ramos com entre-nós curtos (Marte *et al.*, 1986). Os mesmos sintomas foram também encontrados em Portugal, na cv. Negrinha de Freixo, e também eles associados ao SLRSV (Henriques *et al.*, 1992). Este vírus foi também detectado em árvores que não exibiam qualquer tipo de sintomatologia, em Itália (Savino *et al.*, 1979), Portugal (Henriques, 1994; Félix *et al.*, 2002) e Espanha (Bertollini *et al.*, 1998). Sabe-se actualmente que a presença de sintomas associados a isolados de SLRSV é variável com o tipo de cultivar de oliveira infectada (Faggioli *et al.*, 2002).

Os vírus ArMV (Savino *et al.*, 1979), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) (Di Franco *et al.*, 1983) e Tobacco necrosis virus (TNV *lato sensu*) (Félix e Clara, 2002) foram detectados em árvores enfraquecidas e com desfoliação, enquanto que o *Cherry leaf roll virus* (CLRV) (Savino e Gallitelli, 1981), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Savino e Gallitelli, 1983) e *Olive latent virus 2* (OLV-2) (Castellano *et al.*, 1987), foram obtidos de oliveiras sem sintomas. O OLV-2 foi também mais recentemente detectado em plantas de rícino (*Ricinus communis*), na Grécia (Grieco *et al.*, 2002).

O *Olive latent virus 1* (OLV-1) foi isolado pela primeira vez no sul de Itália, em oliveiras assintomáticas, por Gallitelli e Savino (1985). Este vírus voltou a ser isolado de árvores sem sintomas na Jordânia (Martelli *et al.*, 1995) e em Portugal (Félix e Clara, 1998), mas também de oliveiras com acentuado amarelecimento (Savino *et al.*, 1996). Este vírus foi também encontrado em associação com a doença da clorose ananicante dos citrinos ('Citrus chlorosis dwarf') na Turquia e em Itália, onde afecta diferentes variedades de citrinos, como clementina, limoeiro, toranjeira e laranjeira doce (Martelli *et al.*, 1996). Mais recentemente, o OLV-1 foi detectado em túlipas, no Japão, as quais apresentavam sintomas de mosaico foliar e listas amarelas (Kanematsu *et al.*, 2001).

Triolo *et al.* (1996) detectaram uma estirpe de *Tobacco mosaic virus* (TMV) designada por TMV-OVB, numa oliveira da cv. Leccino, na zona centro de Itália. A oliveira apresentava sintomas de declínio e as folhas tinham nervuras com bandas verdes claras ou amarelo brilhante. De acordo com estes autores, e apesar do vírus ter sido

Quadro II. Vírus detectados em *Olea europaea* L., sua distribuição mundial e classificação taxonómica¹

Vírus	Classificação taxonómica		Primeira referência	Distribuição geográfica
	Família	Género		
Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	Comoviridae	Nepovirus	1979	Itália, Portugal, Espanha, Egipto, EUA, Líbano, Síria
Arabis mosaic virus (ArMV)			1979	Itália, Portugal, Egipto, EUA, Líbano, Síria
Cherry leafroll virus (CLRV)			1981	Itália, Portugal, Espanha, Egipto, EUA, Líbano, Síria
Olive latent ringspot virus (OLRSV)			1983	Itália, Portugal, Síria
Cucumber mosaic virus (CMV)	Bromoviridae	Cucumovirus	1983	Itália, Portugal, Espanha, Síria
Olive latent virus 2 (OLV-2)			1987	Itália, Líbano, Síria
Olive latent virus 1 (OLV-1)	Tombusviridae	Necrovirus	1985	Itália, Jordânia, Turquia, Japão, Portugal, Líbano, Síria
Tobacco necrosis virus (TNV) (espécie não identificada)			2002	Portugal
Olive mild mosaic virus (OMMV)			2005	Portugal
Olive vein yellowing-associated virus (OVYaV)			1995	Itália
Olive yellow mottling and decline associated virus (OYMDaV)			1996	Itália
Tobacco mosaic virus (TMV)			1996	Itália
Olive semi-latent virus (OSLV)		Não determinado	1996	Itália
Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)	Closteroviridae	Não determinado	1999	Itália, Israel, Líbano, Egipto, EUA, Síria

¹ Adaptado de Grieco et al. (2000b), Al Abdullah et al. (2005), Cardoso et al. (2005) e Fadel et al. (2005).

transmitido por enxertia a outras oliveiras e posteriormente re-isolado, não se pode concluir que a sintomatologia inicialmente observada fosse provocada pela presença daquele agente.

O Olive semi latent virus (OSLV) foi isolado de plantas jovens da cv. Frantoio, que apresentavam folhas com nervuras claras (Materazzi *et al.*, 1996).

Três vírus diferentes foram obtidos a partir de oliveiras que mostravam diferentes tipos de cloroses constituindo o complexo das doenças das folhas amarelas (Martelli, 1999). O Olive vein yellowing-associated virus (OVYaV) foi isolado de oliveiras situadas na zona centro e sul de Itália e que apresentavam as folhas amarelas (Faggioli e Barba, 1995). Um outro vírus, Olive yellow mottling and decline-associated (OYMDaV) foi obtido de uma oliveira na Sicília, que mostrava uma coloração amarela foliar, progressivamente passando a necrótica, seguida de uma intensa desfoliação (Savino *et al.*, 1996). Por fim, Sabanadzovic *et al.* (1999) detectaram cadeias duplas de RNA ('double stranded' RNA / dsRNA) com cerca de 15 kbp, indicativo de infecção viral, por análise de tecidos foliares de oliveiras com uma coloração amarela muito intensa. Subsequentemente detectaram uma sequência nucleotídica com elevada homologia com o gene da Proteína de choque térmico 70 ('Heat shock protein' 70 / HSP70) dos closterovirus e concluíram que a infecção estava associada a um novo vírus da família *Closteroviridae*, não transmissível mecanicamente e distinto dos outros já descritos, que designaram por Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV).

O vírus de oliveira mais recentemente identificado, o Olive mild mosaic virus (OMMV), foi obtido de uma árvore da cv. Galega vulgar, em Portugal, que apresentava mosaico suave nas folhas (Cardoso *et al.*, 2005).

2. Importância económica

O impacto das infecções virais na indústria olivícola é ainda desconhecido (Saponari *et al.*, 2002c). De entre os vírus que afectam a oliveira, os ArMV, CLRV, SLRSV, TNV *l. s.*, TMV e CMV são polípagos e de grande importância económica para outras culturas. Os restantes, têm até ao momento, uma gama de hospedeiros restritos à oliveira, excepto o OLV-1, que foi também isolado em citrinos e em túlipas, e o OLV-2 em rícino. Alguns destes vírus estão classificados como "organismos de quarentena" e certos países importadores de jovens plantas de oliveira como a Austrália, a Argentina e a China exigem certificados de isenção daqueles vírus e também dos OLRSV e OLYaV (Grieco *et al.*, 2000a). No caso concreto do SLRSV, as perdas económicas relacionadas com a

deformação e baixa qualidade dos frutos são apreciáveis, porque afectam a homogeneidade e calibre da azeitona com aptidão para conserva e azeitona de mesa, como é o caso das cvs. Ascolana tenera (Marte *et al.*, 1986) e Negrinha de Freixo (Henriques *et al.*, 1992).

Estudos preliminares especialmente concebidos para avaliar a importância das infecções virais na capacidade de enraizamento de cinco cultivares revelaram que as estacas provenientes de oliveiras infectadas apresentavam percentagens de enraizamento inferiores às provenientes de oliveiras sem vírus (Serrano *et al.*, 1995).

As perdas devidas a infecções virais são certamente maiores do que aquelas que geralmente se reconhecem. Na realidade, estudos referidos por Waterworth e Hadidi (1998) apontam situações em que os ganhos de produção obtidos por plantas isentas de vírus podem atingir o dobro ou mais do que os obtidos por plantas infectadas.

3. Epidemiologia

Em Portugal, como em outros países, detectaram-se elevados níveis de infecções virais em oliveira, chegando nalguns casos aos 100% de amostras infectadas provenientes do mesmo olival, o que sugere a existência de meios de disseminação muito eficazes (Félix *et al.*, 2002; Saponari *et al.*, 2002b).

A transmissão de vírus por semente foi uma possibilidade que surgiu quando Pacini e Cresti (1977) encontraram partículas virais isométricas sugestivas de serem nepovirus, dentro de túbulos membranosos nas células de grãos de pólen, mas não foi confirmada, uma vez que não foram encontradas partículas virais nos grãos de pólen maduros. Estudos mais recentes revelaram que o CLRV e o OLV-1 foram detectados por RT-PCR em flores e apenas o CLRV em pólen de oliveira. O CLRV, foi detectado na cultivar Italiana Oliva rossa (Saponari *et al.*, 2002b) e OLV-1 na cultivar Portuguesa Verdeal Alentejana (Lobão *et al.*, 2002). Estudos efectuados por Saponari *et al.* (2002b), na cv. Oliva rossa infectada simultaneamente com os vírus CLRV e OLV-1, mostraram que o CLRV estava presente em 90% das sementes e em 82% das plântulas, ao passo que o OLV-1 estava presente em 41 e 36%, respectivamente.

A transmissão do OLV-1, isolado de citrino através do solo, na ausência de vectores biológicos, foi demonstrada por Martelli *et al.* (1996). Nessa experiência, foi colocada uma suspensão viral, num solo esterilizado onde cresciam plantas de *Vigna unguiculata* Walp. O vírus infectou as raízes das plantas, mas não se disseminou para além da zona radical da planta. Também o fungo de solo *Olpidium brassicae* (Wor.)

Dang., conhecido como sendo um vector do vírus TNV *l. s.* (Teakle, 1962; Adams, 1991) tem sido encontrado frequentemente em solos onde crescem oliveiras infectadas com este vírus (Félix e Clara, 2001). Uma experiência, realizada por estes últimos autores, em que se utilizaram plantas de alface para captar *O. brassicae* de solos onde cresciam oliveiras infectadas com TNV *l. s.*, permitiu não só recuperar esporos do fungo, como também partículas virais que infectaram as plantas de alface. Estes resultados sugerem a possibilidade do vírus ser transmitido pelo fungo na cultura da oliveira.

Apesar de haver vírus que infectam a oliveira que podem ser transmitidos por insectos, como é o caso do CMV (Martelli, 1999), apenas há referência a este meio de transmissão para o OLYaV. Sabanadzovic *et al.* (1999) detectaram uma sequência de RNA específica de OLYaV em *Euphyllura olivina* e em *Pseudococcus* sp. que se encontravam em plantas infectadas com este vírus. Contudo, estes autores não retiraram conclusões definitivas quanto ao papel destes insectos na transmissão do OLYaV.

4. Propriedades gerais dos vírus que infectam a oliveira

A informação disponível sobre as propriedades de cada uma das 14 espécies de vírus isolados de oliveira, não é comparável, pois alguns destes foram só muito sumariamente caracterizados, enquanto que para outros, como OLRSV, OLV-2, OLV-1, OMMV e OLYaV, a sequenciação genómica foi feita na sua totalidade ou em parte.

4.1. Género *Nepovirus*

Este género agrupa quatro dos vírus conhecidos de oliveira. Estes apresentam partículas isométricas, com cerca de 28-30 nm de diâmetro, têm um genoma de RNA de sentido positivo e cadeia simples e são multicomponentes (van Regenmortel *et al.*, 2000).

4.1.1. Strawberry latent ringspot virus

Os dois isolados de SLRSV encontrados em Itália, são serologicamente distintos entre si e também distintos da estirpe tipo de SLRSV. Estes isolados são facilmente transmissíveis mecanicamente a partir de flores de oliveira e originam cloroses locais e mosaico sistémico em *Chenopodium quinoa* Willd, *Chenopodium amaranticolor* Coste e Reyn e *Cucumis sativus* L.. Em *Phaseolus aureus* Roxb produzem apenas pontuações

avermelhadas locais. As partículas virais dos isolados de SLRSV obtidos de oliveira sedimentam em três componentes com 62 S, 99 S e 135 S, que correspondem aos componentes de sedimentação 'Top' (T), 'Middle' (M) e 'Bottom' (B), respectivamente. A componente M tem um conteúdo de RNA de 22%, correspondente a uma molécula de RNA de cadeia simples com uma massa molecular de $1,6 \times 10^6$ Da, e a componente B, tem um conteúdo de RNA de 37%, correspondente a duas moléculas de RNA de cadeia simples com massa molecular de $1,6 \times 10^6$ e $2,6 \times 10^6$ Da. A cápside proteica é constituída por dois polipéptidos com massa molecular de 29 e 44 kDa (Savino *et al.*, 1979).

4.1.2. *Arabid mosaic virus*

Os isolados Italianos de oliveira de ArMV são serologicamente, relacionados entre si e também com a estirpe tipo. São transmissíveis mecanicamente a partir de flores, folhas e frutos de oliveira e têm uma larga gama de hospedeiros, os quais apresentam sintomas variados, como cloroses locais e mosaico sistémico em *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Nicotiana benthamiana* Domin e *Phaseolus vulgaris* L., pontuações avermelhadas locais e mosaico e deformações sistémicas em *Chenopodium ambrosoides* L., pontuações avermelhadas locais e mosaico sistémico em *Gomphrena globosa* L., mosaico sistémico em *V. unguiculata* e pontuações avermelhadas locais em *P. aureus*. Estes isolados ficam latentes em *Beta vulgaris* L., *Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley e em *Nicotiana rustica* L.. Os isolados de ArMV obtidos de oliveira, apresentam três componentes de sedimentação: 50 S (T), 91 S (M) e 126 S (B). A componente M tem um conteúdo em RNA de 29% e corresponde a uma molécula de cadeia simples com massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da e a componente B, tem um conteúdo em RNA de 43% que corresponde a duas moléculas de cadeia simples com massa molecular de $1,4 \times 10^6$ e $2,4 \times 10^6$ Da. A cápside proteica é constituída por um único peptídeo, com massa molecular de 54 kDa (Savino *et al.*, 1979).

4.1.3. *Cherry leafroll virus*

A transmissão mecânica de CLRV isolado de oliveira foi feita a partir de flores inteiras para plantas indicadoras herbáceas, nas quais produziu necroses locais e sistémicas em *C. quinoa*, mosaico sistémico em *C. amaranticolor*, *Petunia hybrida* Vilm. e *P. vulgaris* e manchas em anel em *N. tabacum* cv. White Burley. No entanto, este vírus permanece latente em *Nicotiana glutinosa*, *G. globosa*, *C. sativus* e *Cucurbita pepo* L.. O

CLRV é constituído por dois componentes, M e B, com taxas de sedimentação de 112 S e 124 S, respectivamente (Savino e Gallitelli, 1981).

4.1.4. Olive latent ringspot virus

OLRSV não é serologicamente relacionado com nenhum dos 26 diferentes vírus isométricos de plantas incluindo 17 nepovirus (Savino *et al.*, 1983). A transmissão mecânica foi feita a partir de flores de oliveira para diferentes plantas indicadoras induzindo mosaico sistémico em *Nicotiana clevelandii* Gray. e *P. hybrida*, lesões cloróticas locais e mosaico sistémico em *C. sativus* e *P. vulgaris* e lesões locais necróticas e mosaico sistémico em *C. quinoa* e *C. amaranticolor*. Este vírus apresenta três componentes 52 S (T), 97 S (M) e 132 S (B). O componente T não tem ácido nucleico e os componentes M e B têm um conteúdo em ácido nucleico de 30% e 43%, respectivamente. As partículas virais contêm duas espécies de RNA de cadeia simples, com massa molecular de $2,65 \times 10^6$ (RNA 1) e $1,4 \times 10^6$ Da (RNA 2), sendo ambas necessárias para a infecciosidade. A cápside proteica é constituída por um polipéptido com massa molecular de 57,6 kDa (Savino *et al.*, 1983).

Das duas moléculas de RNA genómico, apenas a do RNA 2 foi sequenciada, apresentando a organização típica dos nepovirus (Figura 1). É uma molécula monocistrónica, com 3969 nucleótidos (nts), tendo a extremidade 5' uma região não codificante ('Non coding region' / NCR) constituída por 138 nts e um conteúdo em A+U de 63,5%, e a extremidade 3' apresenta uma NCR com 393 nts e uma cauda poliadenilada (poliA) terminal. Este RNA tem uma única grelha de leitura aberta ('Open reading frame' / ORF) com 3448 nts, localizada entre os nucleótidos 139 (AUG) e 3574 (UAG) e codifica para um polipéptido com uma massa molecular de 126044 Da. A cápside proteica (CP), localizada na região C-terminal do polipéptido, tem 523 aminoácidos (aa) e uma massa molecular estimada em 57916 Da. Na região N-terminal localiza-se uma provável proteína de movimento (MP) (Figura 1). Nesta molécula de RNA, foi também identificado o local proteolítico de clivagem K/A, localizado entre os nucleótidos 622 e 623 (Alkowni *et al.*, 2001).

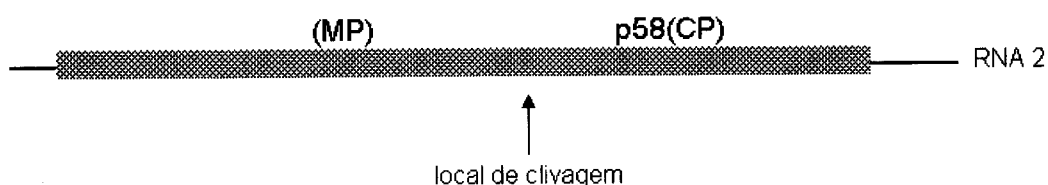


Figura 1. Organização do genoma do RNA 2 do OLRV. A caixa representa uma poliproteína que, por clivagem, origina as proteínas virais MP - proteína de movimento e CP - cápside proteica.

4.2. Género *Cucumovirus*

4.2.1. *Cucumber mosaic virus*

A transmissão mecânica do isolado de CMV obteve-se a partir de flores de oliveira, para plantas de *V. unguiculata*, onde produziu necroses locais. As partículas virais do isolado de CMV são multicomponentes e isométricas, com cerca de 28 nm de diâmetro. O genoma é multipartido, constituído por quatro cadeias simples de RNA, com as seguintes massas moleculares: $1,2 \times 10^6$ (RNA 1), $1,07 \times 10^6$ (RNA 2), $0,78 \times 10^6$ (RNA 3), $0,39 \times 10^6$ (RNA 4). Em alguns casos foi isolada também uma outra molécula com $0,15 \times 10^6$ Da que foi considerada equivalente ao RNA satélite do CMV, conhecido por CARNA-5 ('cucumovirus associated' RNA) (Savino e Gallitelli, 1983).

4.3. Género *Oleavirus*

4.3.1. *Olive latent virus 2*

O OLV-2 assemelha-se morfologicamente e na massa molecular da cápside proteica ao *Alfalfa mosaic virus* (AIMV), mas não são serologicamente relacionados. Difere também na gama de hospedeiros, nos sintomas produzidos em algumas plantas indicadoras (Grieco *et al.*, 1992) e na ultraestrutura das células infectadas (Castellano *et al.*, 1987). Este vírus obtido de oliveira tem uma gama de hospedeiros experimentais variada, que apresenta sintomas de mosaico clorótico sistémico em plantas de *N. benthamiana*, lesões cloróticas e necróticas sistémicas em *N. clevelandii* e *Nicotiana occidentalis*, anéis cloróticos transitórios em *N. tabacum* cv. White Burley e *Nicotiana megalosiphon*, lesões necróticas locais e deformação das folhas terminais em *N. glutinosa* e necroses locais em *C. quinoa*, necrose apical sistémica e morte da planta em *P. aureus*, lesões locais avermelhadas e mosaico e deformação sistémica em *G. globosa* e mosaico das folhas terminais em *P. hybrida* (Grieco *et al.*, 1992). O OLV-2 é um vírus com propriedades muito particulares, que levaram a que fosse criado um novo género taxonómico para o incluir, o *Oleavirus* (Martelli e Grieco, 1997). É multicomponente e constituído por partículas com cinco formas distintas, que vão das quase esféricas às baciliformes, com os seguintes tamanhos: 18 x 18 nm, 37 x 18 nm, 43 x 18 nm, 48 x 18 nm e 55 x 18 nm. Estas partículas encapsidam sete moléculas de RNA, estando a infecciosidade associada ao conjunto das moléculas RNA 1, RNA 2 e RNA 3 (Grieco *et al.*, 1992).

Das sete moléculas de RNA que as partículas virais do OLV-2 encapsidam, apenas as quatro maiores (RNAs 1, 2, 3 e 4) foram sequenciadas e caracterizadas (Figura 2) (Grieco *et al.*, 1995 e 1996a).

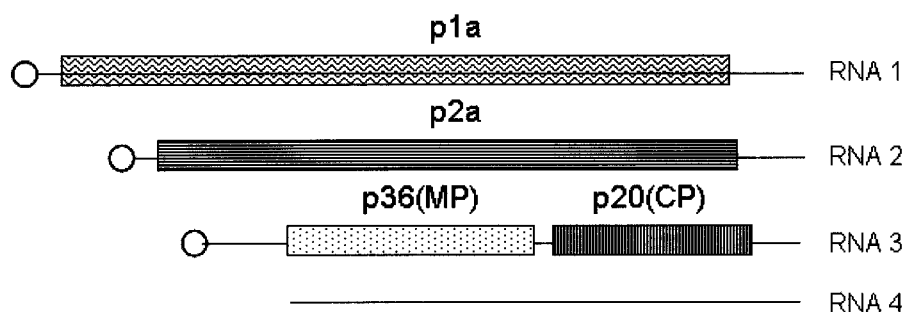


Figura 2. Estrutura das quatro maiores moléculas de RNA do genoma do OLV-2. As caixas correspondem às principais ORFs. p1a – contém as ‘assinaturas’ da metiltransferase e da helicase; p2a – contém o domínio da polimerase viral; p36 e p20 correspondem provavelmente à proteína de movimento (MP) e à cápside proteica (CP), respectivamente.

O RNA 1, com 3126 nts, é monocistrónico, apresentando uma NCR 5' de 101 nts e a NCR 3' de 298 nts. Este RNA tem apenas uma ORF, a qual começa no primeiro codão AUG na posição 102 e termina no codão stop UGA, na posição 2828. O polipéptido p1a é constituído por 908 aa, tem uma massa molecular de 102689 Da e contém as ‘assinaturas’ dos domínios das enzimas metiltransferase e helicase. O RNA 2 é também monocistrónico, com 2734 nts, sendo neste caso a NCR 5' de 112 nts e a NCR 3' de 258 nts. A única ORF deste RNA situa-se entre o primeiro codão AUG na posição 113 e o codão stop UGA na posição 2476. O polipéptido p2a inclui o domínio da polimerase (Grieco *et al.*, 1996a). O RNA 3 é uma molécula bicistrónica, com 2438 nts e com a NCR 5' e a NCR 3' com 359 e 445 nts, respectivamente. A ORF 1 deste RNA tem início no primeiro codão AUG na posição 360 e termina no codão stop UAA na posição 1371. Por seu lado, a ORF 2 localiza-se entre o codão AUG na posição 1445 e o codão stop na posição 1991. A ORF 1 codifica uma proteína com 337 aa e uma massa molecular de 36471 Da, provavelmente uma proteína de movimento (MP). A ORF 2 do RNA 3 codifica uma proteína com 182 aa, sendo a massa molecular correspondente de 19481 Da, a qual foi identificada como sendo provavelmente a proteína da cápside. Por fim, o RNA 4 é sintetizado em quantidades consideráveis nos tecidos infectados e é também encapsidado. No entanto, o seu papel biológico ainda não é conhecido. Esta molécula de 2078 nts é co-terminal do RNA 3, não sendo no entanto considerada sub-genómica (Grieco *et al.*, 1995).

4.4. Género *Necrovirus*

Dentro deste género, foram identificados três espécies de vírus dos quais o OLV-1 e OMMV foram caracterizados molecularmente (Gallitelli e Savino, 1985; Grieco *et al.*, 1996b; Cardoso *et al.*, 2005) enquanto que TNV *l. s.* foi apenas identificado por meio de testes serológicos (Félix e Clara, 2002), estando a sua caracterização em curso. Os necrovirus apresentam partículas isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro, contendo uma molécula de RNA de cadeia simples e sentido positivo (van Regenmortel *et al.*, 2000).

4.4.1. *Olive latent virus 1*

Este vírus, não é serologicamente relacionado com pelo menos 26 diferentes vírus isométricos de plantas, incluindo 17 nepovirus. A transmissão mecânica foi feita a partir de flores de oliveira e induz apenas necroses locais nos hospedeiros *Celosia cristata* L., *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. sativus*, *C. pepo*, *G. globosa*, *Momordica balsamica*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. tabacum* cvs. Samsun, Xanthi e White Burley, *P. aureus*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. Este vírus provoca lesões locais e sistêmicas em plantas de *N. benthamiana*, sendo esta a espécie mais utilizada para a sua propagação. As partículas virais têm um coeficiente de sedimentação de 111 S e um conteúdo em ácido nucleico de cerca de 17% (Gallitelli e Savino, 1985).

Apesar do OLV-1 ter sido detectado e estudado pela primeira vez em oliveira (Gallitelli e Savino, 1985; Castellano *et al.*, 1987), o primeiro genoma do vírus a ser sequenciado, foi o de um isolado de citrino (Grieco *et al.*, 1996b). O genoma completo deste isolado tem 3699 nts, em que estão codificadas cinco ORFs (Figura 3). A ORF 1 começa no primeiro codão AUG na posição 61 e termina no codão stop UAG na posição 666. Esta sequência codifica um polipéptido com 201 aa e com uma massa molecular estimada de 22712 Da (p23). A ORF 2 resulta da leitura contínua ('read through') do codão stop 'amber' da ORF 1, que termina com o codão stop UGA na posição 2232, originando assim um polipéptido com 724 aa e correspondente massa molecular estimada de 82037 Da (p82). A seguir à ORF 2 aparecem duas ORFs pequenas, a ORF 3 e a ORF 4. A ORF 3 situa-se entre os nucleótidos 2216 e 2437 e codifica um polipeptídeo com 74 aa e uma massa molecular estimada de 8383 Da (p8). A ORF 4 está entre os nucleótidos 2443 e 2613 e codifica um polipéptido constituído por 56 aa com uma massa molecular estimada de 6264 Da (p6). A ORF 5 começa no nucleótido 2635 e termina no codão stop 'ochre' (UAA) na posição 3447, codificando um polipéptido com 270 aa e tem uma massa molecular estimada de 29918 Da (p30). A NCR 5' tem 60 nts e

um teor de A+U de 58,4% (A 35%, C 20%, G 21,6%, U 23,4%). As regiões inter-cistrónicas ('intercistronic regions' / ICR) do genoma do OLV-1 são muito pequenas, a segunda e a terceira ORF sobrepõem-se em 17 nts, a ORF 3 e ORF 4 estão separadas por 2 nts e as ORF 4 e ORF 5 distam em 21 nts (Grieco *et al.*, 1996b).

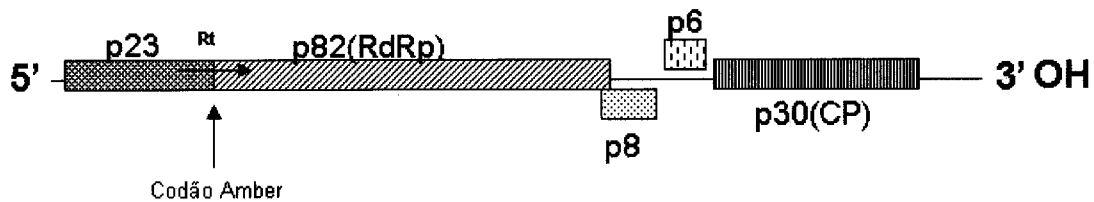


Figura 3. Organização do genoma do isolado de citrino de OLV-1. As caixas representam as ORFs, que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30. Rt - 'read through', RdRp - RNA polimerase dependente de RNA, CP - cápside proteica.

A proteína p82 é provavelmente uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), pois possui o motivo altamente conservado constituído por uma sequência de três aminoácidos GDD (uma glicina e dois ácidos aspárticos) e outras sequências típicas das polimerases (Grieco *et al.*, 1996b). As proteínas p23 e p82 são expressas directamente pelo RNA genómico e ambos os polipéptidos são necessários para a replicação viral. Os polipéptidos p8 e p6 são expressos por um RNA subgenómico (sg1) bicistrónico com 1519 nts e estão envolvidos no movimento do vírus de célula para célula. A proteína p30 corresponde à cápside proteica e é expressa por um RNA subgenómico (sg2) com 1237 nts, estando também relacionada com o movimento a longa distância das partículas virais (Pantaleo *et al.*, 1999).

4.4.2. Tobacco necrosis virus

O TNV *l. s.* foi identificado de entre vários isolados mecanicamente transmissíveis de oliveira com base em testes serológicos aplicados a preparações de vírus purificado, usando um antisoro de largo espectro (TNV 'broad range' da Loewe Phytodiagnostic, Alemanha) (Félix e Clara, 2002). Este antisoro comercial consiste numa mistura artificial de antisoros contra cada um dos seguintes antigénios: TNV-A (Kassanis), PV 180; TNV-A type (tomato); TNV (apple); TNV (bell pepper), PV 197; TNV (cherry); TNV Grogan, PV 198; TNV-D (Kassanis), PV 192; TNV-D (soil, Germany), PV 219; TNV-E (Aschersleben); TNV (Paul), PV 218 e TNV (tulip), PV 44.

4.4.3. Olive mild mosaic virus

O OMMV é um novo necrovirus, caracterizado por Cardoso *et al.* (2005). Inicialmente foi identificado como TNV *l. s.* por reacções serológicas (Louro, 2004) e como TNV-D pela sequenciação do gene da cápside proteica viral (Cardoso *et al.*, 2004). No entanto, após a sequenciação do restante genoma, revelou-se diferente do TNV, tendo sido proposto como uma espécie diferente das já conhecidas (Cardoso *et al.*, 2005). Este vírus tem uma gama de hospedeiros muito semelhante à do OLV-1.

O OMMV tem um RNA genómico com 3683 nts, e 5 ORFs (Figura 4). A ORF 1 tem início no codão AUG na posição 60, termina no codão stop UAG na posição 666 e codifica um polipéptido com 202 aa e uma massa molecular de 22853 Da (p23). A ORF 2 resulta da leitura contínua do codão stop da ORF 1 até ao codão stop UGA seguinte, na posição 2232 codificando um polipéptido com massa molecular de 82187 Da (p82). Na zona central do genoma encontram-se as ORF 3 e ORF 4. A primeira sobrepõe-se à ORF 2 em 17 nts e situa-se entre os nucleótidos 2218 e 2439, codificando um polipéptido com 73 aa e massa molecular de 7940 Da (p8). A segunda está entre os nucleótidos 2443 e 2613, com capacidade para codificar um polipéptido com 56 aa e massa molecular de 6268 Da (p6) (Cardoso *et al.*, 2005). A ORF 5, situada entre os nucleótidos 2636 e 3443, próximo da extremidade 3' do RNA viral, codifica um polipéptido com 269 aa e massa molecular de 29105 Da (p29), identificado como a proteína da cápside viral (Cardoso *et al.*, 2004).

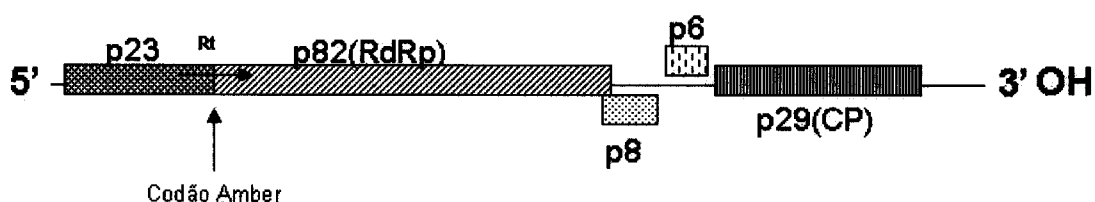


Figura 4. Organização do genoma do OMMV. As caixas representam as ORFs, que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30. Rt - 'read through', RdRp - RNA polimerase dependente de RNA, CP - cápside proteica.

A proteína p82 corresponde a uma RdRp e tem uma identidade da sequência de 91,2% com o OLV-1, de 90,7% com o TNV-A e de 34,5% com o TNV-D^H. As duas proteínas, p8 e p6, estão provavelmente envolvidas na função do movimento de célula para célula pois têm uma elevada identidade com as do OLV-1 e com as do TNV-A (Cardoso *et al.*, 2005). A p29 correspondente à cápside proteica, tem uma elevada identidade com a de TNV-D^H (86,2%) (Cardoso *et al.*, 2004). Devido a estas características, este vírus foi proposto como uma nova espécie pertencente ao género

Necrovirus, com características semelhantes a OLV-1 (ou a TNV-A) na zona correspondente à RdRp, e características semelhantes a TNV-D na zona da cápside proteica. Estas propriedades sugerem uma origem recombinante do genoma de OMMV (Cardoso *et al.*, 2005).

4.5. Género *Potexvirus*

4.5.1. Olive vein yellowing-associated virus

O OYVaV é um provável potexvirus, com partículas filamentosas com ca. 520 x 12 nm. O péptido que constitui a cápside proteica tem a massa molecular de 29,5 kDa. O OYVaV é serologicamente relacionado com *Papaya mosaic virus*, *Potato virus X* e Babaco yellow mosaic vírus, mas difere destes, por ter uma gama de hospedeiros muito limitada, provocando cloroses das nervuras em *C. quinoa* e permanecendo latente em *N. clevelandii* (Faggioli e Barba, 1995).

4.6. Género *Tobamovirus*

4.6.1. *Tobacco mosaic virus*

O isolado TMV de oliveira (TMV-OVB) reage positivamente com os antisoros para TMV e *Tomato mosaic virus*, embora a reacção seja mais intensa com TMV. A transmissão para hospedeiros herbáceos quando se utilizaram extractos de folhas sintomáticas e de tecidos corticais foi muito baixa, apenas produzindo ocasionalmente mosqueado e mosaico sistémico em *N. tabacum* cv. Turkish, ou necroses locais em *N. glutinosa* e *N. tabacum* cv. Xanthi-nc. Pelo contrário, ao inocular um extracto parcialmente purificado de folhas de oliveira sintomáticas, obtiveram-se sintomas virais evidentes: lesões necróticas locais em *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, *N. glutinosa* e *P. vulgaris* cv. Pinto, mosqueado e mosaico sistémico em *N. tabacum* cvs. Samsun, Turkish e White Burley, em *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Marmade, e em *N. benthamiana*, o mosqueado sistémico é seguido de atrofia severa e necrose dos novos rebentos. O TMV-OVB é composto por partículas alongadas e rígidas com 302 x 11 nm, tem uma cápside proteica constituída por péptidos com a massa molecular de 20 kDa e a análise das dsRNA isoladas de tecidos infectados, mostrou um único tipo de moléculas com massa molecular de $4,3 \times 10^6$ Da (Triolo *et al.*, 1996).

4.7. Vírus não incluídos em géneros conhecidos

Existem três vírus isolados de oliveira que ainda não foram taxonomicamente classificados pelo facto da sua caracterização estar incompleta, que são: OYMDaV, OSLV e OLYaV.

4.7.1. Olive yellow motling and decline associated virus

A morfologia deste vírus sugere que ele possa ser uma espécie pertencente ao género *Trichovirus* ou *Capillovirus* (Savino *et al.*, 1996). No entanto, os testes com antisoros específicos para vírus destes géneros, deram resultados negativos (Mohamed, 1996). Este vírus tem uma gama de hospedeiros com sintomatologia diversa, provoca; lesões necróticas locais em *G. globosa*, lesões sistémicas em *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, e *N. tabacum* cvs. Samsun, White Burley e Xanthi e infecção sistémica latente em *V. unguiculata* e *N. benthamiana*. O OYMDaV apresenta partículas filamentosas com 650 x 12 nm e os péptidos da cápside têm uma massa molecular de 27 kDa. O genoma é constituído por três moléculas de RNA, com cerca de 6000 nts, 2400 nts e 1800 nts, respectivamente (Mohamed, 1996).

4.7.2. Olive semi-latent virus

OSLV é constituído por partículas isométricas com 28 nm de diâmetro. As dsRNA extraídas de plantas de tabaco infectadas com este vírus têm tamanhos compreendidos entre os $0,7 \times 10^6$ Da e $4,8 \times 10^6$ Da e o padrão observado não se mostrou semelhante a nenhum outro padrão de dsRNA extraídas de tecidos de plantas infectadas com vírus da oliveira. Este vírus não é serologicamente relacionado com nenhum outro com tamanho similar e a *N. benthamiana* é o único hospedeiro experimental (Materazzi *et al.*, 1996).

4.7.3. Olive leaf yellowing-associated virus

OLYaV surgiu como sendo um novo vírus de oliveira após terem sido analisadas por dsRNA árvores com folhas cloróticas. As dsRNA obtidas apresentavam várias moléculas, tendo a mais pesada cerca de 15 kbp, um tamanho muito semelhante ao encontrado em plantas infectadas por closterovirus (Sabanadzovic *et al.*, 1999). Os mesmos autores, usando estas preparações de dsRNA como molde e 'primers' degenerados correspondentes ao gene da HSP70, em reacções de RT-PCR, obtiveram um produto com cerca de 611 nts. Depois de analisada, esta sequência mostrou uma

similaridade de cerca de 30%, com as HSP70 de vários closterovirus e crinivirus. A observação ao microscópio electrónico de preparações obtidas a partir da maceração de pecíolos provenientes de árvores infectadas, revelou partículas filamentosas com cerca de 2000 nm de comprimento semelhantes às partículas virais dos closterovirus (Saponari, 2001; El Beaino *et al.*, 2005).

Deste vírus, apenas foram sequenciados até ao momento 5459 nts do seu genoma. Nesta sequência nucleotídica incluem-se a sequência completa dos genes da polimerase e da HSP70 e uma parte do gene da HSP90. Os estudos realizados sobre este vírus tornam evidente que este é um membro da família *Closteroviridae*. No entanto, ele mantém-se como uma espécie não incluída em nenhum género, apesar da recente análise filogenética dos genes sequenciados confirmar que ele está posicionado entre os géneros *Closterovirus* e *Crinivirus* (El Beaino *et al.*, 2005).

A variabilidade genética da sequência do gene da HSP70 de isolados de OLYaV obtidos no Líbano e em Itália foi verificada pela análise do polimorfismo da conformação da cadeia simples de ácido nucleico ('single strand conformation polymorphism' - SSCP) (Fadel *et al.*, 2005). Estes autores verificaram uma elevada variabilidade, uma vez que a comparação dos perfis electroforéticos relativos aos 19 isolados em estudo revelou 9 padrões diferentes. Este facto veio sugerir a natureza de *quasispecies* deste vírus.

5. Métodos de diagnóstico viral aplicados à oliveira

O diagnóstico viral tem-se revelado de extrema importância para vários fins, nomeadamente em programas de selecção clonal e sanitária da oliveira de modo a seleccionar e produzir plantas isentas de vírus. Também nos últimos anos, com a aplicação da Directiva da União Europeia CAC, que determina que o material vegetal de oliveira deve estar isento de um conjunto de organismos prejudiciais onde se incluem "...todos os vírus e similares", o diagnóstico viral se tem tornado obrigatório, principalmente quando o material vegetal se destina a ser comercializado internacionalmente.

5.1. Testes biológicos

O único teste biológico utilizado para avaliar material vegetal de oliveira, é o de inoculação mecânica em hospedeiros herbáceos, uma vez que até ao momento não

foram encontrados indicadores lenhosos que possam ser utilizados na detecção de vírus da oliveira (Martelli, 1999; Grieco *et al.*, 2000b). A inoculação mecânica é utilizada para recuperar isolados virais a partir de árvores de campo e como uma técnica complementar no trabalho de selecção sanitária de oliveiras (Grieco *et al.*, 2000a; Félix *et al.*, 2002).

Os frutos, flores, folhas e raízes jovens, bem como os ramos de oliveira são uma boa fonte de vírus (Henriques, 1994; Grieco *et al.*, 2000b). As plantas herbáceas mais utilizadas como indicadoras, pela sua sensibilidade, são *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. pepo*, *G. globosa*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. langsdorffii*, *N. occidentalis*, *N. tabacum* e *V. unguiculata*.

A inoculação mecânica apresenta como vantagens ser um teste fácil de realizar e pouco dispendioso. No entanto, tem importantes desvantagens, como a morosidade e baixa sensibilidade quando comparada com outros testes recentemente desenvolvidos, e o facto dos tecidos de oliveira conterem inibidores que podem conduzir à obtenção de resultados inconsistentes (Clara *et al.*, 1997).

5.2. Testes serológicos

O teste DAS-ELISA ('Double antibody sandwich - Enzyme linked immunosorbent assay') (Clark e Adams, 1977) aplicado a frutos e folhas, e ocasionalmente a folhas jovens e raízes, tem sido utilizado no diagnóstico de alguns vírus (Henriques *et al.*, 1992; Rei *et al.*, 1993; Félix *et al.*, 2001; Félix e Clara, 2002; Félix *et al.*, 2002). Também Triolo *et al.* (1996) aplicaram com sucesso a técnica DAS-ELISA para o diagnóstico de TMV em extractos parcialmente concentrados de folhas de oliveira.

Os testes ELISA apresentam uma razoável sensibilidade, mas têm algumas limitações, quando utilizados no diagnóstico de vírus da oliveira. De facto, a baixa concentração e a irregular distribuição de vírus no hospedeiro, bem como a presença neste último de substâncias inibidoras e capazes de interferir com as reacções antígeno-anticorpo, levam por vezes a resultados inconsistentes (Martelli, 1999).

5.3. Análise das cadeias duplas de RNA

A técnica de isolamento e análise das dsRNA é baseada na propriedade de os vírus de RNA produzirem cadeias duplas de RNA durante a sua replicação nas células hospedeiras. Pelo menos um tipo de molécula de dsRNA pode ser encontrado em células infectadas, consistindo em duas cadeias inteiras, uma idêntica ao genoma viral e outra complementar desta. Estas duas cadeias constituem a forma replicativa (RF) viral, com massa molecular dupla da do genoma viral. As células infectadas podem acumular mais

do que um tipo de moléculas de dsRNA. Tal depende do genoma do vírus ser ou não multipartido ou de um genoma monopartido originar RNAs subgenómicos. Em ambos os casos, são produzidos na célula hospedeira dsRNAs específicas para cada RNA genómico ou RNA subgenómico (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1990).

A análise das dsRNA por electroforese em gel é uma técnica versátil, pois permite detectar e também caracterizar agentes virais que não possam ser estudados por outros meios, como por exemplo os vírus não transmissíveis mecanicamente. A técnica experimental descrita por Morris e Dodds (1979), foi adaptada com sucesso para a extracção de dsRNA de tecidos de oliveira por Rei (1995), Grieco *et al.* (2000a) e Saponari *et al.* (2001). O isolamento e a análise das fracções das dsRNA é uma técnica sensível, que não é afectada pelos componentes normalmente presentes nos tecidos da oliveira, como compostos fenólicos (De Nino *et al.*, 1997) e óleos. Esta é uma clara vantagem deste método quando comparado com outros como a inoculação mecânica e os testes serológicos.

A extracção das dsRNA pode ser feita a partir de ramos de dois anos ou frutos, colhidos preferencialmente na Primavera ou no Outono (Grieco *et al.*, 2000a; Varanda, 2005). Esta técnica tem sido utilizada em Itália, Portugal e Jordânia, com diversos objectivos: i) avaliar o estado sanitário de diversas cultivares de oliveira, com vista a seleccionar clones isentos de vírus (Martelli *et al.*, 1995; Saponari *et al.*, 2002a) e ii) estudar árvores de campo que não apresentem um aspecto normal (Martelli *et al.*, 1995; Rei, 1995; Savino *et al.*, 1996; Sabanadzovic *et al.*, 1999). O tamanho e o padrão das dsRNA observadas em gel após electroforese dão uma valiosa indicação acerca da eventual natureza viral de uma determinada doença (Martelli, 1999). No entanto, a interpretação dos perfis das dsRNA pode apresentar algumas dificuldades, pelas várias dsRNA de RNAs subgenómicos que podem estar presentes nos tecidos, ou quando as infecções são devidas a mais do que um vírus. Tais dificuldades também se verificam quando as amostras de plantas estão contaminadas com artrópodes (Gunasinhe e German, 1988) ou com fungos (Tooley *et al.*, 1989; Nuss, 1990), que estejam infectados pelos seus próprios vírus de RNA. Os perfis das dsRNA obtidos de amostras de oliveira podem ser complexos, variados e difíceis de correlacionar com uma infecção viral em particular, dando um conhecimento insuficiente sobre a espécie de vírus presente na oliveira infectada. Mas a sua presença pode ser indicativa de infecção por novas espécies de vírus ainda não identificados (Martelli *et al.*, 1995; Savino *et al.*, 1996; Sabanadzovic *et al.*, 1999).

A aplicação da técnica de análise das dsRNA, tem mostrado elevadas taxas de infecção das oliveiras analisadas, como por exemplo de 63% na Palestina, 76% em Itália,

80% em Marrocos e 100% na Tunísia. Estes resultados foram obtidos testando diferentes números de árvores provenientes de vários países (Saponari *et al.*, 2002a).

5.4. Testes de RT-PCR

A amplificação *in vitro* por PCR de porções de DNA, tornou-se uma técnica fundamental no diagnóstico de vírus de plantas (Hull, 2002). Como a maioria dos vírus de plantas e todos os vírus de oliveira conhecidos até ao momento têm genoma do tipo RNA, torna-se necessário proceder à transcrição reversa (RT) desse RNA por acção de uma enzima transcriptase, de modo a convertê-lo em DNA complementar (cDNA). Uma dada região deste cDNA pode então ser amplificado por uma reacção de PCR, com a utilização de uma polimerase de DNA e de 'primers' específicos, complementares de certos locais do genoma. O produto de amplificação é depois observado em gel após electroforese ou por hibridação.

O material vegetal de oliveira contém elevadas quantidades de óleo, polissacáridos, fenóis e outras substâncias consideradas inibidoras das reacções de RT-PCR (De Nino *et al.*, 1997; Wilson, 1997). Por esta razão, Grieco *et al.* (2000a e 2000b) testaram vários substratos a utilizar nas reacções de RT-PCR: extractos de tecidos de oliveira, ácidos nucleicos totais (TNA) extraídos dos tecidos vegetais com o recurso a 'kits' comerciais ou pelo método descrito por Foissac *et al.* (2001), ou fracções de dsRNA desnaturadas antes da reacção de RT. Estes autores verificaram que apenas os vírus OLV-1 e OLYaV eram detectáveis directamente a partir de extractos de tecidos de oliveira macerados.

Até ao momento foram utilizados vários formatos de testes baseados em RT-PCR no diagnóstico de vírus da oliveira: RT-PCR monoespecífico e RT-PCR multiplex, consoante se detecta apenas um vírus ou vários em simultâneo; as reacções de RT e de PCR em separado (RT-PCR convencional) ou no mesmo tubo (RT-PCR 'single-step') e também o 'nested' PCR, quando o produto de amplificação obtido numa primeira reacção de PCR é amplificado numa segunda reacção de PCR, com recurso a um segundo par de 'primers' internos à primeira sequência amplificada.

Estes testes só são possíveis de realizar para os vírus dos quais se conhece a sequência dos respectivos genomas, permitindo que se desenhem 'primers' específicos a usar nas reacções de RT-PCR (Anexos I, II e III).

Testes de RT-PCR monoespecíficos foram já utilizados para o diagnóstico dos vírus ArMV, CLRV, SLRSV, OLRV, OLYaV, CMV, OLV-1, OLV-2, TNV-D e / ou OMMV (Grieco *et al.*, 2000a e 2000b; Cardoso *et al.*, 2004; Varanda, 2005). De salientar que os 'primers' que têm sido utilizados para diagnosticar TNV-D (Anexo I) por RT-PCR

detectam também o OMMV, uma vez que permitem amplificar uma sequência localizada no gene da cápside proteica, o qual tem elevada similaridade nos dois vírus (Cardoso *et al.*, 2004 e 2005). Estes testes monoespecíficos mostram uma elevada sensibilidade, detectando quantidades de vírus tão baixas como 100 fg de SLRSV, ArMV, OLRSV e CLRV, e cerca de 10 fg de OLV-1, OLV-2, CMV e OLYaV (Grieco *et al.*, 2000b).

O RT-PCR 'single-step' foi otimizado e adoptado por Faggioli *et al.* (2002 e 2005) para a detecção de ArMV, CLRV, CMV, OLYaV, OLRSV, OLV-1, OLV-2 e SLRSV. Neste caso, foi desenhado um par de 'primers' específico diferente do referido anteriormente (Anexo I), para o diagnóstico de SLRSV e que foi utilizado em larga escala para analisar folhas deformadas de oliveiras, numa tentativa de correlacionar esta sintomatologia com a presença do vírus. No entanto, apenas 15% das amostras de folhas revelaram a presença de SLRSV (Faggioli *et al.*, 2002).

A técnica RT-'nested'-PCR (RT-n-PCR) veio incrementar a sensibilidade dos testes de RT-PCR, atenuando o efeito negativo de alguns factores como por exemplo a irregular distribuição e concentração dos vírus na oliveira. Esta técnica permitiu a detecção de vírus em amostras que se tinham revelado negativas por RT-PCR (Pantaleo *et al.*, 2001). Os testes Rt-n-PCR têm sido utilizados com sucesso na detecção de OLV-1, OLV-2, OLRSV, ArMV, SLRSV e CLRV, a partir de preparações de TNA extraídos de tecidos de oliveira naturalmente infectados. No entanto, este método não apresentou bons resultados quando se utilizaram extractos vegetais macerados (Pantaleo *et al.*, 2001). Apesar dos bons resultados obtidos com RT-n-PCR, este teste apresenta elevadas possibilidades de contaminação, podendo levar à ocorrência de falsos resultados (Bertolini *et al.*, 2003). Para o evitar, estes autores desenvolveram a técnica descrita por Olmos *et al.* (1999), que consiste na utilização de um microtubo com uma ponta plástica no seu interior. Nesse tubo são colocados os reagentes e a amostra a sujeitar a RT-PCR, e dentro da ponta são colocados os reagentes para a segunda reacção de amplificação. Após a primeira reacção de RT-PCR, faz-se uma baixa centrifugação de modo a libertar os reagentes que estão dentro da ponta plástica e procede-se à segunda reacção de RT-PCR. Esta técnica foi utilizada com sucesso no diagnóstico dos vírus CMV, SLRSV, CLRV e ARMV, por Bertolini *et al.* (2003).

Os testes de RT-PCR monoespecíficos anteriormente descritos apresentam um elevado consumo de tempo e de reagentes, especialmente quando utilizados em programas de rotina para a certificação sanitária de material vegetal relativamente a vários vírus (Bertolini *et al.*, 2001 e 2003). Para tentar minorar estes inconvenientes, Bertolini *et al.* (2001) desenvolveram um teste de RT-PCR 'single-step multiplex' para o diagnóstico simultâneo de seis vírus (CMV, CLRV, SRLSV, ArMV, OLV-1 e OLV-2). Desenharam 'primers' específicos (Anexo III) de modo a serem compatíveis entre si, isto

é, que não hibridassem uns com os outros e não competissem pelos mesmos locais nos genomas dos vírus. Os produtos amplificados são detectados por sondas específicas e revelados colorimetricamente. Posteriormente, Bertolini *et al.* (2003) desenvolveram um RT-n-PCR 'single-step multiplex', para o diagnóstico de CMV, CLRV, SLRSV e ARMV e da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, em material vegetal de oliveira. Este teste mostrou ser 100 vezes mais sensível que o RT-PCR 'single-step multiplex', o que reforça as afirmações de Pantaleo *et al.* (2001) sobre a importância destes testes no diagnóstico de vírus da oliveira.

É importante notar que, a aplicação prática e repetida deste teste veio de novo demonstrar que uma árvore infectada com determinado vírus não apresenta sempre o mesmo resultado em todas as amostras colhidas ao redor da copa (Bertolini *et al.*, 2003).

5.5. Hibridação 'dot blot'

Esta técnica baseia-se na hibridação do ácido nucleico viral, imobilizado numa matriz sólida, com uma sonda de ácido nucleico complementar marcada radioactivamente ou com marcação não radioactiva (Hull, 2002).

A hibridação molecular com a utilização de sondas específicas não radioactivas marcadas com digoxigenina foi introduzida em Itália, nos programas de certificação de material vegetal de oliveira (Grieco *et al.*, 2000b) e foram utilizadas em testes de hibridação 'dot blot' para detectar os vírus ArMV, CLRV, SLRSV, OLRV, OLYaV, CMV, OLV-1 e OLV-2 em substratos de tecidos corticais de ramos de 2 anos, TNA da planta e fracções das dsRNA. Os resultados mais consistentes e reprodutíveis foram obtidos pelo uso de fracções das dsRNA. Esta técnica de diagnóstico mostra uma elevada sensibilidade, sendo possível detectar 1 pg de RNA viral (Grieco *et al.*, 2000a e 2000b).

Também em Espanha, Bertolini *et al.* (2001) desenvolveram uma variante da técnica para detectar ArMV, CLRV, SLRSV, CMV, OLV-1 e OLV-2. Basicamente, os autores utilizaram produtos de amplificação obtidos por RT-PCR, os quais foram fixados em membranas e desnaturados, ao que se seguiu uma reacção de hibridação interna com sondas específicas marcadas com digoxigenina e complementares aos produtos de amplificação (Anexo III). As moléculas que hibridaram foram reveladas com anticorpos anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina seguida de incubação com o substrato para esta enzima. Segundo os autores, esta técnica mostrou-se cerca de 10 vezes mais sensível do que a visualização dos produtos obtidos por RT-PCR em gel, após a electroforese. Para além disto, permite evitar o contacto com o brometo de etídio e possibilita a clara discriminação de cada um dos produtos de amplificação obtidos, facilitando bastante a interpretação dos resultados.

6. Meios de luta

Apesar de não se conhecer a verdadeira extensão dos problemas causados pelos vírus em oliveira, estes não podem ser negligenciados (Martelli, 1999). As infecções virais estão largamente disseminadas pelas árvores de campo que na maioria dos casos não apresentam sintomas e assim podem originar material vegetal para propagação infectado com vírus (Grieco *et al.*, 2000b). Tal material não é aceitável para comercialização tendo em conta as exigências dos mercados internacionais, que pretendem material vegetal com certificação sanitária, e também as normas europeias CAC no que se refere à comercialização de material vegetal propagativo (Grieco *et al.*, 2000b; Alkowni, 2000).

Para a oliveira não existem referências sobre a utilização de métodos de eliminação de vírus, nomeadamente, cultura de meristemas, termoterapia, ou micro-enxertia, como existem para outras culturas lenhosas (Martelli, 1999). Contudo, algumas cultivares de oliveira podem actualmente ser propagadas *in vitro* e regeneradas por organogénese e embriogénese somática (Rugini, 1997), podendo estas técnicas constituir eventualmente vias de eliminação de vírus de uma determinada cultivar.

A importância dos vectores na transmissão de vírus da oliveira ainda não está provada, não podendo no entanto ser posta de parte. As infecções que possam ocorrer nas estufas e viveiros de multiplicação, bem como a utilização de material propagativo infectado, podem representar o meio mais importante de disseminação dos vírus da oliveira (Martelli, 1999).

O meio mais eficaz para o controlo dos vírus da oliveira é a implementação de medidas preventivas, cujo pilar fundamental é a selecção sanitária (Martelli, 1999). No entanto, a selecção feita com base na observação visual é insuficiente, devido ao facto de as infecções virais serem frequentemente latentes. A observação de campo deve ser sempre acompanhada de testes de laboratório, de modo a possibilitar a selecção de material vegetal de oliveira isento de vírus (Henriques, 1994). A detecção das dsRNA tem-se mostrado um método importante para diagnosticar vírus eventualmente desconhecidos, não detectados pelos métodos mais tradicionais (Martelli, 1999). No entanto, o diagnóstico molecular específico é que apresenta maiores garantias de sucesso na avaliação do estado sanitário do material vegetal de oliveira (Bertolini *et al.*, 1998).

III. Materiais e Métodos

1. Origem dos isolados virais

Os isolados virais utilizados neste trabalho foram obtidos por inoculação de extractos de azeitonas de 5 cultivares nacionais de oliveira, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Verdeal Alentejana, Negrinha de Freixo e Santulhana (Quadro III). Estes isolados foram mantidos em plantas de *N. benthamiana*, numa sala com a temperatura controlada (22-25°C) e com um regime de luz de 14 h. Neste trabalho foi também utilizado um isolado de *Olive latent virus 1* (OLV-1i) obtido de oliveiras em Itália, cedido pelo Prof. G.P. Martelli da Universidade de Bari (Itália).

Quadro III. Isolados virais utilizados neste trabalho

Região	Cultivar de oliveira	Localização	Nº da árvore	Abreviatura do isolado	
Alentejo	Cordovil de Serpa	Vale de Mós	1	C1VM	
		Carrapatelo	7	C7	
	Galega vulgar	Herdade da Abóbada		1	G1A
				2	G2A
				5	G5A
		Herdade da Mota		6	GM6
				8	GM8
		Herdade de Sampaio		1	G1S
				3	G3S
		Herdade de Pinta Barris		1	G1PB
	Quinta do Leão		1131	GP	
	Verdeal Alentejana	Herdade da Abóbada		4	V4A
				6	V6A
				8	V8A
				10	V10A
		Herdade de Pinta Barris	4	V4PB	
Trás-os-Montes e Alto Douro	Negrinha de Freixo	Quinta Cachões	Desconhecida	N	
	Santulhana	Parcela 2		1	A1P2
				4	A4P2
				5	A5P2
				10	A10P2
		Parcela 5		4	A4P5
				6	A6P5

2. Material vegetal

Para a realização dos diferentes testes executados ao longo deste trabalho foram utilizadas plantas herbáceas indicadoras, pertencentes a várias famílias botânicas (Quadro IV), bem como ramos e frutos de oliveira.

Quadro IV. Plantas herbáceas indicadoras utilizadas

Família botânica	Espécies
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste e Reyn <i>Chenopodium murale</i> L. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L.
Leguminosaeae	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.
Solanaceae	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin <i>Nicotiana occidentalis</i> H.-M. Wheeler <i>Nicotiana rustica</i> L. <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. White burley

3. Inoculação mecânica

Para determinar quais os hospedeiros herbáceos mais susceptíveis ao isolado viral GM6, que foi seleccionado para ser caracterizado, e que planta iria ser utilizada como espécie de manutenção, realizaram-se testes de inoculação mecânica em plantas das espécies presentes no Quadro IV.

Folhas de plantas de *N. benthamiana* previamente inoculadas com o isolado viral e que apresentavam necroses locais, foram esmagadas na presença de tampão 0,05 M fosfato de sódio, pH 6,0, e do abrasivo carborundo. O extracto resultante foi inoculado mecanicamente nas folhas de plantas indicadoras. Estas foram mantidas durante 3 semanas numa sala com as condições referidas no ponto 1. e as sintomatologias foram sendo regularmente registadas. As folhas que não apresentaram sintomas sistémicos foram inoculadas em plantas de *N. benthamiana*, seguindo o procedimento acima descrito, para determinar se existiriam infecções latentes.

4. Purificação viral

A purificação do isolado viral GM6 foi feita seguindo dois protocolos diferentes, de modo a determinar o mais eficaz em termos de quantidade de vírus obtido.

Ambos os protocolos tiveram uma primeira parte comum. Utilizaram-se 100 g de tecidos congelados de plantas de *N. benthamiana*, previamente inoculadas com o isolado GM6, e que apresentavam um elevado número de necroses locais. Estes tecidos foram homogeneizados na presença de tampão 0,1 M fosfato de sódio e 1% de ascorbato de sódio, pH 6,0, na proporção 1:3 (p/v). Este homogenado foi emulsionado com 10% de uma mistura de butanol-clorofórmio 1:1 (v/v) por agitação durante 30 min em banho de gelo e depois clarificado por centrifugação a 10000 g durante 20 min a 4°C (Merciega *et al.*, 1996). O sobrenadante obtido foi dividido em duas partes iguais e cada uma delas foi submetida a um procedimento experimental diferente, mas todas as fases decorreram a 4°C.

Protocolo 1: Ao sobrenadante adicionou-se 10% de polietilenoglicol (PEG) e 1% de cloreto de sódio. A mistura foi agitada em banho de gelo, tendo posteriormente sido colocada a 4°C durante a noite, de modo a permitir a ligação das partículas virais ao PEG. Esta suspensão foi depois centrifugada a 12000 g durante 40 min, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0 e mantido a 4°C durante pelo menos 4 h. A suspensão foi depois centrifugada a 12000 g durante 30 min e o sobrenadante resultante foi ultracentrifugado a 186000 g durante 2 h. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0 e conservado no frigorífico.

Protocolo 2: O sobrenadante foi ultracentrifugado a 186000 g durante 2 h a 4°C e o precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0 e mantido no mínimo durante 4 h a 4°C. A ressuspensão foi posteriormente centrifugada a 12000 g durante 20 min e o sobrenadante novamente ultracentrifugado a 186000 g durante 2 h. O precipitado resultante foi ressuspenso em 300 µL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0 e deixado durante a noite no frigorífico.

A partir deste ponto os procedimentos de ambos os protocolos foram idênticos. A ressuspensão final foi sujeita a uma centrifugação a 13000 rpm (Micro centrifuga Sanyo MSE) durante 5 min, seguindo-se uma ultracentrifugação a 150000 g durante 40 min em

gradientes de densidade de sacarose (10% a 40% de sacarose em tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0). A banda de dispersão de luz correspondente à zona de sedimentação de vírus foi visualizada sob um foco de iluminação e retirada lateralmente por perfuração com uma agulha e seringa. Por fim, as partículas virais foram concentradas por ultracentrifugação a 186000 g durante 4 h e ressuspensas em 300 µL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0.

A quantificação do vírus foi feita num espectrofotómetro Life Science UV/Vis DU®530 (Beckman) tendo-se aplicado a relação referida por Babos e Kassanis (1963) em que 1mg/mL de vírus apresenta uma absorvância entre 5,0 e 5,5 D.O., no comprimento de onda de 260 nm.

Para a purificação de outros isolados virais utilizados neste trabalho, seguiu-se o Protocolo 1.

5. Observação das partículas virais

A observação da morfologia das partículas do isolado GM6 foi feita ao microscópio electrónico de transmissão. Sobre uma grelha de microscopia electrónica, previamente coberta com uma membrana de formvar, colocou-se durante 1 a 2 min uma gota de preparação de vírus purificado, que depois se retirou por absorção com papel de filtro. Seguidamente, a preparação foi contrastada durante 30 seg com uma gota de solução aquosa de acetato de uranilo a 2%, que depois foi igualmente absorvida com papel de filtro. A observação das partículas foi feita num microscópio electrónico JEOL 200 operando a 100 kV.

6. Análise da proteína da cápside viral

A massa molecular da proteína da cápside viral do isolado GM6 foi determinada por electroforese em gel descontínuo de poliácridamida em presença de SDS (técnica SDS-PAGE), com o gel de concentração a 4% e o gel de separação a 12,5%, como descrito por Laemmli (1970), com as modificações referidas em 6.1..

6.1. Preparação do gel de poliacrilamida

Para a obtenção de 10 mL de gel separador, procedeu-se do seguinte modo: num copo colocaram-se 2,3 mL de água desionizada, 4,2 mL de uma solução aquosa de poliacrilamida a 30% (29% de acrilamida e 1% de N,N'-metilendiácridamida), 2,5 mL de 1,5 M Tris, pH 8,8, 100 μ L de SDS a 10% (p/v), 100 μ L de persulfato de amónio a 10% (p/v) e 10 μ L de N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). Esta mistura foi ligeiramente agitada para homogeneização dos seus componentes e colocada de imediato entre as placas de vidro montadas num suporte. No topo deste gel, colocou-se uma camada de 1 mL de butanol saturado com água, para permitir a formação de uma superfície horizontal e plana. Após polimerização removeu-se o butanol, lavou-se várias vezes a superfície do gel separador com água desionizada e secou-se com papel de filtro antes de colocar o gel concentrador.

O gel concentrador foi preparado juntando num copo 6,0 mL de água desionizada, 1,3 mL de uma solução de poliacrilamida a 30%, 2,5 mL de tampão 0,5 M Tris, pH 6,8, 100 μ L de SDS a 10% (p/v), 100 μ L de persulfato de amónio a 10% (p/v) e 10 μ L de TEMED. Esta mistura foi ligeiramente agitada e colocada sobre o gel separador até ao topo das placas de vidro. De seguida colocou-se o pente, para a formação dos poços onde seriam colocadas as amostras. Após a polimerização deste gel o pente foi retirado e as placas de vidro colocadas no aparelho de electroforese vertical Mini-Protean® (BIO-RAD) e o reservatório preenchido com o tampão Tris-glicina (1x: 25 mM Tris base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

6.2. Preparação das amostras

A amostra constituída por 15 μ L de preparação viral e o marcador de massa molecular 'Sigmamarker Low range' (SIGMA) constituído por 5 μ L de uma mistura de proteínas (albumina de bovino, 66 kDa; albumina de ovo, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbónica, 29 kDa; tripsinogénio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa e α -lactalbumina, 14,2 kDa) e 10 μ L de água desionizada, foram colocados separadamente em microtubos em presença de 5 μ L de 4x tampão da amostra (1x: 0,125 M Tris base, pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol, 0,25% SDS, 10% glicerol, 0,25% azul de bromofenol) e incubados em banho-maria a 100°C durante cerca de 3 min. Após este tratamento que permitiu a desnaturação dos péptidos e lhes conferiu carga negativa, os microtubos foram colocadas em gelo até à colocação das amostras no gel.

6.3. Electroforese e estimativa da massa molecular do péptido da cápside viral

As amostras e os marcadores foram colocados nos respectivos poços do gel. A tina de electroforese foi ligada a uma fonte de alimentação modelo PS 3002 (GIBCOBRL Life Technologies) e a electroforese decorreu à voltagem constante de 120 V durante cerca de 1 h.

Após a electroforese, retirou-se o gel das placas de vidro e colocou-se numa tina com solução corante (40% metanol, 0.025% azul de Coomassie R-225, 7% ácido acético) onde permaneceu durante cerca de 4 h. Para descorar, o gel foi mergulhado numa solução descorante (5% metanol, 7% ácido acético) a qual foi sendo sucessivamente renovada até que o gel ficou praticamente transparente à excepção das bandas correspondentes aos péptidos. Por fim, o gel foi analisado com o programa 'Kodak Digital Science 1D' (versão 2.0.3) (Eastman Kodak Company) de modo a estimar a massa molecular dos péptidos virais.

7. Extracção e análise dos ácidos nucleicos

O ácido nucleico viral do isolado GM6 foi extraído seguindo dois métodos diferentes: um, em que se tratou a preparação viral com fenol e SDS, e outro, utilizando o 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen).

7.1. Extracção do ácido nucleico viral por fenol e SDS

O método descrito por Diener e Schneider (1968) foi utilizado com ligeiras alterações. Assim, a 400 μ l de preparação viral em tampão TE (1x: 1 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) foram adicionados 40 μ L de uma solução de SDS a 10% mantendo-se sob agitação durante 15 min à temperatura ambiente. A este volume (440 μ L) juntou-se igual volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v), agitou-se manualmente durante cerca de 1 min e depois em vortex mais 1 min. A mistura foi centrifugada a 7500 g durante 10 min a 4°C, após o que se retirou a fase aquosa. Esta fase colocou-se num novo microtubo no qual foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio, tendo-se repetido o procedimento acima referido. A fase aquosa final foi lavada duas vezes com 1 volume de clorofórmio e centrifugada a 7500 g durante 10 min a 4°C. Por fim, retirou-se a fase aquosa contendo o ácido nucleico viral, o qual foi precipitado na presença de 2,5 volumes de etanol absoluto

frio e 1/10 de volume de 3 M acetato de sódio, pH 5,5, durante a noite a -20°C. O precipitado foi depois centrifugado a 12000 g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70%. Após nova centrifugação a 12000 g durante 30 min a 4°C, o precipitado foi seco em vácuo e ressuspenso em 30 µL de água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

7.1.1. Tratamento com Ribonuclease A

A uma amostra de 15 µL de ácido nucleico viral extraído como indicado em 7.1., adicionou-se 1 µg/mL de Ribonuclease A (Fermentas) durante 30 min a 37°C, para avaliar a natureza deste ácido nucleico. Após arrefecimento em gelo, a preparação foi inoculada em plantas de *N. benthamiana* para determinar a sua infecciosidade.

7.2. Extração do ácido nucleico viral e do RNA total pela aplicação do 'RNeasy Plant Mini Kit'

A extração do RNA viral a partir de preparações virais purificadas, foi feita com a utilização das colunas do 'RNeasy Plant mini kit' e seguiu-se o protocolo da Qiagen. Para a obtenção do RNA total de plantas infectadas, esmagaram-se 100 mg de material vegetal em azoto líquido e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante do kit. No final, utilizaram-se 30 µL de água isenta da enzima RNase para eluição do RNA viral e do RNA total das células vegetais, respectivamente.

7.3. Determinação da massa molecular do ácido nucleico viral

A descontaminação das tinas de electroforese para remover a eventual presença de RNases, foi feita com 3% de peróxido de hidrogénio durante 10 min e posterior lavagem com água tratada com DEPC (Sambrook *et al.*, 1989).

Cinco µL de amostra de ácido nucleico viral obtidos pelos métodos acima referidos, foram analisados num mini-gel de 1% de agarose preparado em tampão TBE 0,5x (1x: 1M Tris-HCl, 0,83 M ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 7,5) feito com água tratada com DEPC e como referência, utilizaram-se marcadores de RNA, 'RNA Ladder high range' (Fermentas) e 'RNA Markers 0.28-6.58 kb' (Promega). A electroforese decorreu à voltagem constante de 80 V, durante 1 h e 30 min. Para a visualização das bandas correspondentes aos ácidos nucleicos, o gel foi corado por imersão numa solução de 0,5

$\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio (Sambrook *et al.*, 1989) e depois observado num transiluminador com lâmpadas UV SXT-20.M (Uvitec).

7.4. Extracção e análise das cadeias duplas de RNA (dsRNA)

O isolamento e análise das dsRNA de material vegetal tiveram vários objectivos: i) determinar a estratégia de replicação de isolados virais; ii) avaliar a sua aplicação para diagnóstico de vírus de RNA genómico; iii) utilizar em reacções de RT-PCR (ponto 9.1.) para o diagnóstico de necrovirus; e iv) utilizar para a sequenciação de uma parte do genoma viral (ponto 12.5.1.).

7.4.1. Extracção da fracção das dsRNA

As dsRNA foram extraídas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral GM6, de ramos e frutos de oliveira das cultivares Galega vulgar (G1A, G2A e G5A) e Verdeal Alentejana V10A e depois fraccionados por cromatografia em colunas de celulose, seguindo o protocolo de Morris e Dodds (1979), com as modificações que a seguir se descrevem.

No caso de plantas herbáceas utilizaram-se 10 g de tecido vegetal infectado e 20 g no caso do material de oliveira, que foram macerados em azoto líquido. O pó resultante da maceração foi homogeneizado em tampão de extracção arrefecido a 4°C, constituído por 30 mL STE 2x (1x: 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris, 1 mM Na₂EDTA, pH 7,5), 17 mL de solução SDS a 10%, 1 mL de suspensão de bentonite (40 mg de bentonite em 1 mL de KH₂PO₄), 1 mL de 2-mercaptoetanol, 12 mL de fenol saturado com água contendo 0,1% de 8-hidroxiquinolina (o fenol foi previamente neutralizado com 0,1 mL de NH₄OH por cada 25 mL) e 12 mL de clorofórmio. Agitou-se esta mistura durante 45 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 10000 g durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido e ajustado a 17% de etanol absoluto, ao qual se juntou celulose CF 11 (Whatman), na proporção de 1 g por 10 g de tecido vegetal, e agitou-se lentamente durante pelo menos 1 h à temperatura ambiente. Esta suspensão foi depois transferida para uma seringa de plástico descartável, no fundo da qual se colocou uma rodela de entretela para evitar o escoamento da celulose. A coluna de celulose foi lavada com 12 volumes de tampão STE-17% de etanol, para permitir a eluição do DNA e das cadeias simples de RNA ('single stranded' RNA/ssRNA). Esta eluição foi feita à temperatura ambiente, para evitar que algumas cadeias de ssRNA celulares pudessem ficar adsorvidas à celulose (Dodds *et al.*, 1984). A coluna de celulose foi então lavada com 2 mL de tampão STE para remoção do etanol remanescente na celulose. A eluição da

fracção contendo as dsRNA foi feita com 4 volumes de tampão STE, e o eluído recolhido foi precipitado como descrito em 7.1.. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 8000 g durante 20 min e depois lavado com 500 μ L de etanol a 70%. Fez-se uma nova centrifugação a 13000 rpm (Micro centrifuga Sanyo MSE) durante 20 min e o precipitado contendo dsRNA foi ressuspensão em 100 μ L de água miliQ.

7.4.2. Tratamento enzimático

Com o objectivo de eliminar possíveis moléculas contaminantes de DNA, de ssRNA e de proteína, fez-se o tratamento da fracção das dsRNA com Desoxiribonuclease I (DNase I), Ribonuclease A (RNase A) e Proteinase K, segundo o protocolo de Saldarelli *et al.* (1994) modificado como a seguir se descreve.

A 98 μ L das dsRNA juntou-se 1 μ L de 1M cloreto de magnésio e 60 μ g/mL de DNase I (Fermentas) que se incubou durante 30 min a 37°C. Após este tratamento juntaram-se 15 μ L de tampão SSC 20x (1x: 0,15 M de cloreto de sódio, 0,015 M de citrato trissódico, pH 7,0), 32 μ L de água miliQ e 0,5 μ g/mL de RNase A (Fermentas), incubou-se durante 30 min a 37°C e por fim juntou-se 100 μ g/mL de Proteinase K (Fermentas) e incubou-se novamente durante 30 min a 37°C.

Após o tratamento enzimático, as dsRNA foram extraídas da mistura pela adição de 1 volume de fenol/clorofórmio 1:1 (v/v) com agitação durante 1 min, seguida de vortex durante mais 1 min e centrifugação a 7500 g durante 10 min a 4°C. Este procedimento foi repetido 2 vezes e a precipitação das dsRNA foi feita como referido em 7.1.. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 12000 g durante 40 min e a 4°C, seco em vácuo e depois ressuspensão em 30 μ L de água miliQ.

7.4.3. Análise das dsRNA

A fracção correspondente às amostra das dsRNA (15 μ L) foi analisada por electroforese em gel de agarose 0,8% preparado em tampão TBE 0,5x. Para estimativa da massa molecular, foi utilizado como marcador o 'DNA Ladder 1kb plus' (GIBCOBRL). A electroforese correu a 80 V durante 1 h e 45 min. Após esse tempo o gel foi corado e observado como referido em 7.3..

8. Aplicação do teste DAS-ELISA

Após terem sido inoculadas com extractos de azeitonas de várias cultivares de oliveira, algumas plantas de *N. benthamiana* apresentaram sintomas sugestivos da presença de vírus, nomeadamente necroses locais e sistémicas e cloroses sistémicas. Estas plantas foram testadas para a presença de OLV-1 e de TNV (*l. s.*) através da técnica serológica DAS-ELISA com antisoros policlonais. Os antisoros utilizados foram o antisoro para o OLV-1, produzido no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade de Évora, para o qual se utilizou o isolado viral G1A como antigénio e que fora identificado anteriormente como isolado de OLV-1 (Félix, 1998), e o antisoro para o TNV ('Broad range') da Loewe-Phyodiagnostica. Este antisoro reage positivamente para 11 antigénios que são os seguintes: TNV-A (Kassanis), PV 180; TNV-A type (tomato); TNV (apple); TNV (bell pepper), PV 197; TNV (cherry); TNV Grogan, PV 198; TNV-D (Kassanis), PV 192; TNV-D (soil, Germany), PV 219; TNV-E (Aschersleben); TNV (Paul), PV 218 e TNV (tulip), PV 44. Por este motivo, optou-se por designar os antigénios virais detectados por este antisoro como TNV (*l. s.*).

8.1. Amostras testadas

As amostras testadas foram plantas de *N. benthamiana* inoculadas com frutos provenientes de 23 árvores de 5 cultivares de oliveira, Cordovil de Serpa, Galega vulgar, Verdeal Alentejana, Negrinha de Freixo e Santulhana (Quadro III). Como controlos utilizaram-se, a amostra G1A (OLV-1, isolado Português) e o OLV-1i (isolado Italiano), e usou-se a amostra GP, inicialmente identificado serologicamente como um isolado de TNV-D e posteriormente identificado como um novo necrovirus, designado OMMV (Cardoso *et al.*, 2005).

8.2. Realização do teste DAS-ELISA

Para a realização do teste DAS-ELISA, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 alvéolos e de fundo plano (BIOREBA).

O procedimento experimental foi o indicado pela empresa Loewe-Phyodiagnostica e todas as amostras foram duplicadas na placa, incluindo os controlos positivos e negativos, de modo a obter-se uma maior fiabilidade dos resultados.

Para a cobertura das placas, colocaram-se em cada um dos alvéolos 200 μL de uma solução de IgG simples diluída em tampão de cobertura (0,015 M de Na_2CO_3 , 0,035 M de NaHCO_3 , pH 9,6) na proporção 1:1000, no caso do antisoro do OLV-1 e de 1:200 para o caso do antisoro do TNV. Após a cobertura, as placas foram colocadas numa caixa plástica com o fundo revestido por papel absorvente humedecido com água destilada e cobertas com uma tampa, para evitar a evaporação do conteúdo dos alvéolos e incubaram-se durante 4 h a 37°C.

Após a incubação, as placas foram sacudidas de modo a retirar todo o conteúdo dos alvéolos, tendo sido estes depois cheios com tampão de lavagem (0,137 M NaCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl e 0,05% Tween 20, pH 7,4) durante 3 minutos. Esta operação foi repetida 3 vezes. No final de cada lavagem a placa foi sacudida de modo a eliminar todo o tampão e por fim foi seca sobre papel absorvente.

Para a preparação das amostras retirou-se 1 g de tecido vegetal (folhas ou raízes) de plantas de *N. benthamiana* sintomáticas macerou-se em presença de tampão de extracção (2% PVP MW 40.000 e 2% BSA em tampão de lavagem, pH 7,4) e centrifugou-se a 8000 g para clarificação do extracto. Após a centrifugação foram colocados 190 μL de cada amostra nos respectivos alvéolos, tendo depois as placas ficado a incubar toda a noite a 4°C, dentro de caixas de plástico. Após a incubação, foram realizadas 5 lavagens de 3 minutos como descrito anteriormente. Quando se utilizaram amostras de preparações de vírus purificadas, adicionaram-se 5 μL dessas preparações virais a 185 μL de tampão de extracção.

Seguidamente, colocou-se em cada alvéolo 190 μL de IgG conjugada com a enzima fosfatase alcalina diluída em tampão do conjugado (o mesmo que foi utilizado como tampão da amostra) na proporção 1:800 para o antisoro conjugado para o OLV-1 e 1:200 para o antisoro conjugado para o TNV. De seguida as placas foram a incubar durante 4 h a 37°C dentro de caixas como descrito anteriormente. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos como descrito anteriormente.

Para a revelação, colocaram-se em cada alvéolo, 190 μL de substracto enzimático p-nitrofenilfosfato (SIGMA), diluído em tampão do substracto (9,7% dietanolamina, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 9,8) na proporção de 1 mg/mL e incubou-se durante 1 a 2 h à temperatura ambiente. A leitura da reacção final foi feita visualmente e num leitor de microplacas Modelo 680 (BIO-RAD), a funcionar num comprimento de onda de 405 nm. Foram consideradas infectadas todas as amostras que apresentaram valores de absorvância iguais ou superiores a 2 vezes a média dos valores dos controlos negativos.

9. Amplificação do genoma viral por RT-PCR

Os testes de RT-PCR para o diagnóstico de OLV-1 foram baseados no descrito por Martelli *et al.* (1996). No entanto, foram feitas algumas modificações de modo a otimizar este teste para a detecção de OLV-1 em tecidos de oliveira (Cardoso *et al.*, não publicado).

Inicialmente, para a optimização dos testes foram utilizadas plantas de *N. benthamiana* infectadas com os vários isolados virais, obtidos a partir de azeitonas obtidas de oliveiras referidas no quadro III e posteriormente utilizaram-se tecidos de oliveira, ramos e frutos.

9.1. Isolamento do RNA das amostras a analisar

Os RNAs utilizados foram extraídos com referido nos pontos 7.2. e 7.4.1.. As dsRNA, foram desnaturadas antes da sua utilização. Para tal, 10 μ L desta preparação foram aquecidos durante 5 min a 90°C e depois incubados durante 5 min em gelo.

9.2. Optimização do protocolo de RT-PCR para diagnóstico de OLV-1

O protocolo utilizado inicialmente (Martelli *et al.*, 1996) não permitiu resultados satisfatórios nas nossas condições e por isso optimizou-se um procedimento experimental diferente para a detecção de OLV-1 a partir de plantas indicadoras herbáceas, e aplicado a tecidos de oliveira, ramos e frutos. Este procedimento foi o seguinte: a 1 μ L de RNA total juntou-se 150 μ g de 'random hexamers' (Promega), desnaturou-se durante 10 min a 70°C e depois incubou-se 15 min em gelo. A reacção de RT foi feita na presença de 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs e 200 U da enzima Transcriptase Reversa, Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MLV) (Invitrogen), num volume total de 20 μ L, durante 1 h a 42°C.

A reacção de amplificação (PCR) foi realizada num termociclador Personal Cycler (Biometra), em que foram utilizados 3 μ L da preparação de cDNA, obtida na reacção de RT anterior, juntamente com 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M 'primer' A, (complementar à região entre os nucleotídeos 3448 e 3466) e 0,2 μ M 'primer' B (complementar à região entre os nucleotídeos 2720 e 2738), específicos para o diagnóstico de OLV-1 (Martelli *et al.*, 1996) e 2,5 U da enzima *Taq*

DNA polymerase (Invitrogen), num volume total de 50 μ L. A amplificação decorreu com 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 2 min a 72°C, tendo a extensão final sido feita durante 10 min a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos a electroforese num gel de 1% de agarose e posteriormente corados e observados como descrito em 7.3..

Este protocolo resultou da optimização prévia de vários parâmetros, tais como: quantidades de RNA total (3, 5 e 9 μ L); incubação do RNA durante 15 min em gelo após junção com os 'random hexamers' e desnaturação a 70°C; diminuição da concentração de 'primers' para 0,2 μ M; variação da concentração de MgCl₂ (1,0, 1,25, 1,5 e 1,75 mM) e da utilização de diferentes temperaturas de hibridação dos 'primers' (55, 57 e 60°C).

9.3. Detecção de OLV-1 por RT-PCR 'single-step'

Estes testes de RT-PCR permitem realizar num só passo as duas reacções necessárias para a amplificação de vírus com genoma de RNA, a reacção de transcrição reversa e a reacção de amplificação. Para a sua realização utilizaram-se 3 μ L de RNA total, aos quais se juntou 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 1 mM de MgCl₂, 0,2 μ M de cada um dos 'primers' A e B, 40 U de RNaseOUT (Invitrogen), 200 U de M-MLV e 5 U da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), num volume total de reacção de 50 μ L. A reacção foi realizada num termociclador Personal Cycler (Biometra) com o seguinte programa: 45 min a 37°C, para permitir a transcrição reversa do RNA, 2 min a 94°C para inactivação da enzima M-MLV, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C e 1 min a 72°C, e a extensão final durante 10 min a 72°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de 1% de agarose, que decorreu à voltagem constante de 80 V durante 1 h. O gel foi depois corado e observado como descrito em 7.3..

De modo a optimizar o resultado final da amplificação foi necessário fazer algumas modificações ao protocolo descrito em 9.2.,. Entre elas, aumento da quantidade de RNA total utilizada, modificação do tempo e da temperatura da transcrição reversa, variação da quantidade de MgCl₂, adição de um inibidor de RNases e um aumento da quantidade da enzima *Taq* DNA polimerase.

Estes testes de RT-PCR foram utilizados para identificação viral em plantas herbáceas inoculadas e com sintomas, bem como para análise de padrões de SSCP a partir dos produtos de amplificação obtidos naquela reacção.

9.4. Detecção simultânea de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR 'single-step multiplex'

A detecção simultânea dos vírus OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR 'single-step', foi otimizada, inicialmente em plantas de *N. benthamiana* infectadas com cada um dos vírus e posteriormente com material vegetal de oliveira (ramos e frutos).

Para a detecção simultânea de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV utilizaram-se os 'primers' A e B referidos em 9.2. para detectar OLV-1 e os 'primers' GP₁INT5' e GP₁INT3' (Cardoso *et al.*, 2004) para detectar TNV-D e/ou OMMV. Tomaram-se 3 µL de RNA total, aos quais se juntou 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 1 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada um dos 'primers' A e B, 0,2 µM de cada um dos 'primers' GP₁INT5' e GP₁INT3', 40 U de RNaseOUT (Invitrogen), 200 U de M-MLV e 5 U da enzima *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) num volume total de reacção de 50 µL. A amplificação foi realizada num termociclador Personal Cycler (Biometra) com o seguinte programa: 45 min a 37°C para fazer a RT do RNA, 2 min a 94°C para inactivação da enzima M-MLV, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, tendo a extensão final tido a duração de 5 min a 72°C.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese em gel de 1% de agarose, que correu à voltagem constante de 80 V durante 1 h. O gel foi depois corado e observado como em 7.3..

A optimização deste protocolo foi feita com base nos protocolos de detecção de OLV-1 e de TNV-D por RT-PCR 'single-step'. A partir de cada um destes, modificaram-se vários parâmetros, tais como: concentração de MgCl₂ (0,5, 0,75, 1,0 e 1,25 mM); concentrações de 'primers' (0,2, 0,25 e 0,3 µM) diminuição da temperatura de hibridação dos 'primers' e diminuição do tempo de extensão final.

10. Análise da transmissão do isolado GM6 pelo solo

Para determinar se o isolado viral GM6 é transmitido através do solo para plantas hospedeiras sem o auxílio de vectores, adaptou-se o protocolo referido por Martelli *et al.* (1996). Semearam-se sementes de *N. benthamiana* numa mistura de solo e vermiculite autoclavados, na proporção de 3:1. Quando as plântulas atingiram o estágio de 4 a 5 folhas, transplantaram-se para vasos plásticos e cheios com uma mistura de terra e vermiculite esterilizada, onde permaneceram cerca de uma semana até ultrapassarem a

crise de transplantação. Após este período, as plantas foram inoculadas com uma preparação purificada do isolado GM6, como descrito no ponto 3., mantidas entre 22-25°C e regadas com água destilada esterilizada. Dois meses após a inoculação as plantas que mostravam elevado número de necroses removeram-se do vaso. Para o substrato desses vasos transplantaram-se novas plântulas saudáveis. Dois meses depois, as plantas foram retiradas do solo e as suas raízes foram lavadas, imergindo-as inicialmente numa solução aquosa de SDS a 1% durante 10 min para eliminar possíveis partículas virais que estivessem aderentes no seu exterior, e depois durante a noite em água corrente para retirar completamente todos os resíduos de SDS.

Por fim, amostras de folhas e de raízes foram maceradas num almofariz em presença de azoto líquido. O macerado foi utilizado para a realização de três testes de diagnóstico diferentes, que tiveram como objectivo avaliar se as raízes tinham sido infectadas por vírus eventualmente libertados para o substrato pelas plantas inoculadas. Estes testes foram: i) inoculação mecânica em plantas de *N. benthamiana*, com descrito no ponto 3., ii) DAS-ELISA, em que se utilizou um anticorpo policlonal para diagnóstico de OLV-1 e em que se seguiu o protocolo que se refere no ponto 8.2. e iii) RT-PCR com 'primers' específicos também para o diagnóstico do OLV-1, em que se seguiu o protocolo descrito no ponto 9.3.

11. Análise do polimorfismo da conformação da cadeia simples ('single strand conformation polymorphism' - SSCP)

A análise do polimorfismo da conformação de cadeias simples (SSCP) descrita por Orita *et al.* (1989), permite a rápida diferenciação de fragmentos de DNA do mesmo tamanho, mas com variações na sequência. Na análise de SSCP, a cadeia dupla de DNA é desnaturada por aquecimento, sendo depois a amostra contendo ambas as cadeias desnaturadas sujeita a electroforese em gel de poliacrilamida, em condições não desnaturantes. A migração das cadeias simples de DNA depende das suas sequências nucleotídicas e da conformação que elas adquirem (Rubio *et al.*, 1996).

Com o objectivo de verificar a existência de variabilidade genética entre os diferentes isolados de OLV-1, aplicou-se a análise SSCP. Utilizaram-se vários isolados de OLV-1, identificados por DAS-ELISA e por RT-PCR, provenientes de olivais situados no Norte e Sul do país e obtidos de diferentes cultivares de oliveira (Quadro III). Deste teste resultou a amplificação de uma região do genoma com cerca de 750 pb, que corresponde à quase totalidade do gene da cápside proteica (Figura 5). Esta região foi

amplificada por PCR com os 'primers' A e B, específicos para o diagnóstico de OLV-1 (Martelli *et al.*, 1996). O protocolo utilizado foi o referido no Ponto 9.3..

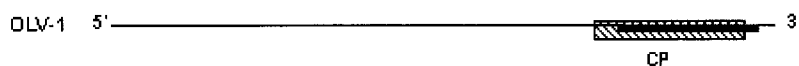


Figura 5. Esquema da extremidade 3' do genoma do OLV-1. CP corresponde à região do gene da cápside proteica; a azul, está marcada a região amplificada pelos 'primers' A e B.

A análise SSCP foi efectuada a partir dos produtos de PCR obtidos por reacções de RT-PCR aplicadas a cada isolado de OLV-1. A 3 μ L de cada um das amostras de DNA amplificado juntaram-se 7 μ L de solução de desnaturação (950 mL/L de formamida, 20 mM EDTA, 500 mg/L azul de bromofenol), tendo a mistura sido aquecida durante 10 min em banho maria a 99°C e depois imediatamente arrefecida em gelo. O DNA desnaturado foi sujeito a electroforese num gel de 8,0% poliacrilamida em condições não desnaturantes. Para a preparação de 10 mL de gel, procedeu-se do seguinte modo: num copo colocaram-se 5,19 mL de água desionizada, 2,7 mL de uma solução de poliacrilamida a 30% (29% de acrilamida, 1% de N,N'-Metilenodiacrilamida), 2,0 mL de TBE 5x, 100 μ L de persulfato de amónio a 10% (p/v) e 10 μ L de TEMED. A electroforese decorreu numa tina vertical Mini-Protean[®] (BIO-RAD) na presença de tampão TBE 1x e à voltagem constante de 200 V durante 3 h a 4°C. No final, os géis foram retirados das placas de vidro, corados e observados como o descrito em 7.3..

12. Sequenciação do RNA genómico do isolado GM6

De modo a obter a sequencia do RNA genómico do isolado GM6 utilizou-se inicialmente o Copy Kit[™] (Invitrogen) que permite a síntese do cDNA do genoma viral. No entanto, nas nossas condições tal não se verificou, tendo-se optado por uma estratégia que consistiu em amplificar e clonar o genoma viral em fragmentos diferentes A, B e C. Como o 'primer' reverso do fragmento B se localizava na mesma região em que foi desenhado o 'primer' directo do fragmento A, e com o objectivo de se sequenciar essa região, amplificou-se uma outra região que se designou por fragmento AB (Figura 6).

Para a amplificação e clonagem das extremidades 3' e 5', utilizou-se a técnica RACE ('Rapid Amplification of cDNA End's') (Frohman *et al.*, 1988; Grieco *et al.*, 1996a), com as modificações descritas em 12.5..

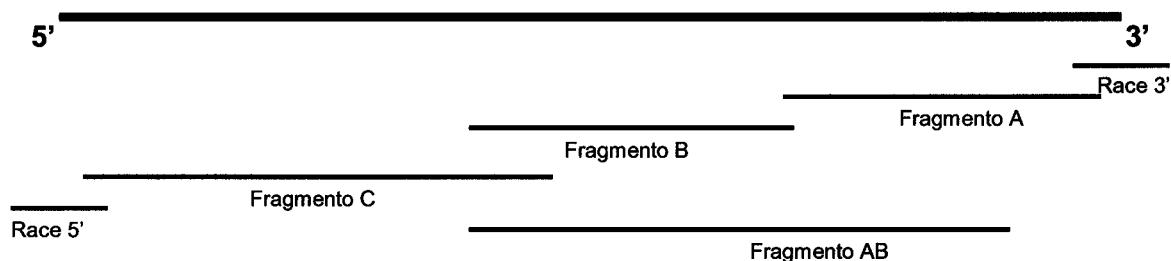


Figura 6. Esquema da estratégia de amplificação, clonagem e sequenciação do genoma viral.

12.1. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA seguiu-se o protocolo otimizado descrito em 9.2..

12.2. Amplificação por PCR

Para a amplificação de cada um dos fragmentos A, B, C e AB utilizaram-se 3 μ L da reacção anterior de transcrição reversa, aos quais se juntaram 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml de BSA, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M de cada um dos 'primers' (directo e reverso) e 2,5 U da enzima para PCR de alta-fidelidade, *Pfufurbo* DNA Polimerase (Stratagene), num volume total de 50 μ L. Os 'primers' utilizados (Invitrogen) foram desenhados com base na sequência publicada do genoma de OLV-1 (Grieco *et al.*, 1996) e foram designados da seguinte forma: 'Primers' Comum5' e Comum3' para a amplificação do fragmento A, G6B5' e G6B3' para a amplificação do fragmento B, G6C5' e G6C3' para a amplificação do fragmento C e G6B5' e G6cd3' para a amplificação do fragmento AB (Figura 7 e Quadro V). O local de restrição para a enzima *Nofl* foi adicionado à extremidade 5' de cada um dos 'primers' utilizados para amplificar os fragmentos A, B e AB

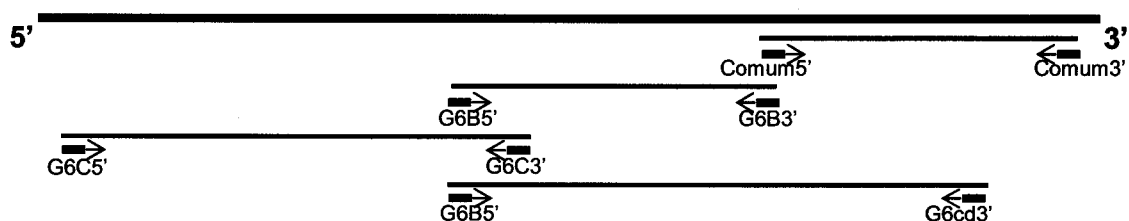


Figura 7. Localização no genoma, dos locais de complementaridade dos 'primers' utilizados para amplificar cada um dos fragmentos A, B, C e AB.

Quadro V. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar os fragmentos A, B, C e AB do genoma do isolado GM6

Designação	Posição no genoma	Sequência 5'→3'
Comum5'	2584 – 2606	tttttgcgccgcAAGACTCAACACATTTTCGATCGC
Comum3'	3671 – 3691	tttttgcgccgcGGCAAAGGCCCTCAATCTGG
G6B5'	1475 – 1493	tttttgcgccgcCAGCGTTTGCTAGTGATGG
G6B3'	2586 – 2605	tttttgcgccgcCGATCGAAATGTGTTGAGTC
G6C5'	16 – 34	GTATACGGATATCGGTGCG
G6C3'	1633 – 1652	CAGACAATGACGCAGTCATC
G6cd3'	3172 – 3190	tttttgcgccgcGCTGCGCATCGATTCTGTC

As reacções de amplificação foram realizadas num termociclador Personal Cycler (Biometra). Os programas de amplificação foram ajustados às condições exigidas pelo tamanho do fragmento e pelos 'primers' utilizados. Assim, para o fragmento A o programa consistiu em 1 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 65°C e 2 min a 72°C, tendo a extensão final sido de 10 min a 72°C; para o fragmento B e AB, 1 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 54°C e 2 min a 72°C, e a extensão final durante 10 min a 72°C; e para o fragmento C, 1 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 53°C e 2 min a 72°C, tendo a extensão final sido de 10 min a 72°C. Os produtos de amplificação, foram analisados como descrito em 8.3.. As bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados de cerca de 1100 pb para o fragmento A, 1130 pb para o fragmento B, 1600 bp para o fragmento C e 1900 para o fragmento AB, foram cortadas do gel e o DNA purificado com as colunas 'Gel Extraction Spin Kit' (Genomed) seguindo-se as instruções do fabricante. A coluna foi eluída com 30 µL de água miliQ e fez-se uma nova electroforese em gel de agarose 1% para a quantificação aproximada do DNA.

12.3. Clonagem

12.3.1. Vector plasmídico

Como vector de clonagem utilizou-se o plasmídeo pZErO™-2 (Invitrogen) (Figura 8). Este plasmídeo tem 3297 pb, a origem de replicação dos vectores '*pUC*' e um local de clonagem múltiplo com 17 locais de restrição. Tem ainda o gene que confere resistência ao antibiótico Canamicina para selecção e o gene *ccdB* letal para *Escherichia coli*, que só é inactivado pela inserção do fragmento de DNA, permitindo assim a selecção das bactérias que contêm o plasmídeo recombinante. Este plasmídeo inclui também os locais para os 'primers' universais M13 directo e reverso que permitem a sequenciação do fragmento inserido.

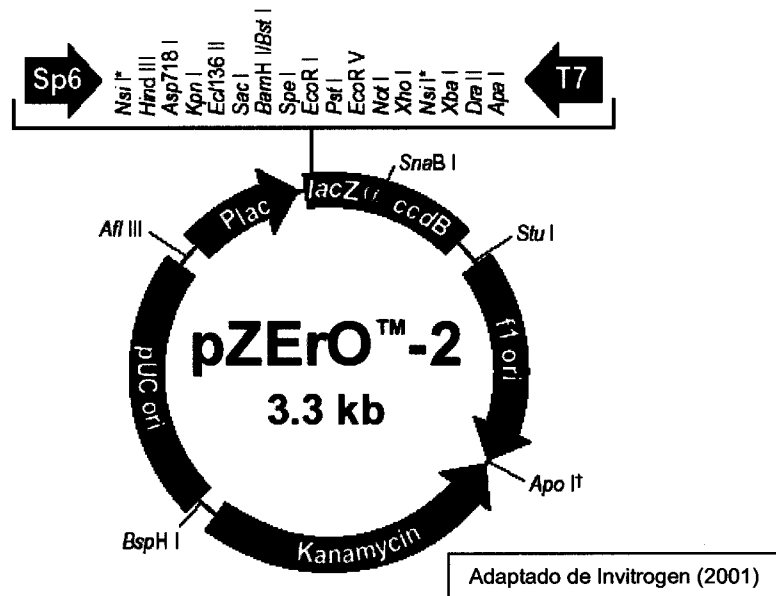


Figura 8. Esquema do vector pZER0™-2 utilizado para clonar os vários fragmentos do genoma viral do isolado GM6.

12.3.2. Restrição do vector de clonagem e do fragmento a clonar

O DNA plasmídico foi digerido com 5 U da enzima de restrição *NotI* (Takara), de modo a ficar linear e com as extremidades coesivas para a ligação com os fragmentos A e B. A reacção de restrição, constituída por 1 µg de DNA plasmídico, tampão H 1x (Takara), 0,01% de BSA e 0,01% de Triton X-100, num volume total de 50 µL, decorreu durante 3 h a 37°C. As mesmas condições foram utilizadas para as restrições de 300 ηg de cada um dos fragmentos A e B.

Para a clonagem dos fragmentos C e AB, o DNA plasmídico foi digerido com 5 U da enzima de restrição *EcoRV* (Fermentas), de modo a ficar linear com as extremidades rombas. A reacção de restrição, constituída por 100 ηg de DNA plasmídico e tampão R⁺ 1x (Fermentas) num volume total de 30 µL, decorreu durante 30 min a 37°C, tendo sido posteriormente sujeita a 65°C durante 20 min para a inactivação da enzima. Os fragmentos C e AB não foram sujeitos a restrição, pois a amplificação com a enzima *Pfufurbo* DNA Polimerase (Stratagene) deixa-os com as extremidades rombas e, neste caso, prontos para a ligação.

12.3.3. Ligação

Para as reacções de ligação entre cada um dos fragmentos A, B e o vector plasmídico, foram utilizadas duas proporções molares diferentes, 3:1 e 5:1 (fragmento:vector). As reacções de ligação constituídas por 2 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampão de ligação 1x (Invitrogen), num volume total de 10 µL, foram

incubadas durante 30 min a 16°C. Foi também preparada uma reacção de ligação idêntica às anteriores, mas sem o fragmento, que foi utilizada como controlo negativo.

As reacções de ligação entre os fragmentos C e AB e o vector foram feitas nas proporções 3:1 e 5:1 (fragmento : vector). As reacções de ligação constituídas por 2 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampão de ligação 1x (Invitrogen), num volume total de 10 µL, foram incubadas durante 1 h a 16°C, uma vez que as extremidades estavam rombas. Tal como anteriormente, também neste caso foi preparada uma reacção de ligação idêntica às anteriores, mas sem o fragmento, que foi utilizada como controlo negativo.

12.3.4. Transformação de *E. coli*

Para a introdução do plasmídeo recombinante em células de *E. coli* utilizou-se a transformação por choque térmico de células competentes *E. coli* Top 10 (Invitrogen). Na transformação usaram-se 50 µL de células competentes, às quais se juntaram 5 µL da reacção de ligação, seguida de homogeneização suave e incubação durante 20 min em banho de gelo, após o que se efectuou um choque térmico a 42°C durante 30 seg. Por fim, adicionaram-se às células 250 µL de meio de cultura SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levedura, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose, pH 7,5) à temperatura ambiente, e a mistura foi a incubar durante 1 h a 37°C com agitação a 225 rpm num agitador orbital Aerotron[®] (Infors AG). As células foram depois recolhidas num microtubo, por centrifugação a 3000 rpm (Micro centrifuga Sanyo MSE) durante 10 min, à temperatura ambiente. Descartou-se um volume de cerca de 250 µL do sobrenadante e as células foram ressuspensas nos restantes 50 µL. A suspensão de bactérias foi cuidadosamente espalhada com uma ansa de vidro em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB)-Agar (1% triptona, 0,5% extracto de levedura, 0,5 NaCl, 1,5% agar, pH 7,5), com 35 µg/mL de Canamicina (GIBCOBRL). As placas foram depois invertidas e mantidas durante a noite a 37°C.

12.3.5. Análise das colónias de bactérias com o DNA recombinante

Retiraram-se as colónias da placa com um palito estéril e inoculou-se, cada uma delas em 3 mL de meio de cultura LB (1% triptona, 0,5% extracto de levedura, 0,5 NaCl, pH 7,5), com 35 µg/mL de Canamicina e depois incubou-se durante a noite a 37°C com agitação a 225 rpm.

O DNA plasmídico recombinante foi purificado com o 'Plasmid Miniprep Spin Kit' (Genomed) segundo o protocolo do fabricante. Deste, foram analisados 5 µL que foram digeridos com 5 U da enzima *NotI* (Takara), na presença de tampão H 1x (Takara), 0,01% de BSA e 0,01% de Triton X-100, num volume total de 30 µL. Após incubação

durante 3 h a 37°C, os produtos da restrição foram analisados por electroforese em gel de 1% de agarose realizada a 80 V durante 1 h e visualizados como descrito em 7.3..

12.4. Sequenciação

A sequenciação de cada um dos fragmentos A, B, C e AB, foi feita na empresa STAB, em que foi utilizado um sequenciador automático ABI PRISM 310 Sequencer e o kit de sequenciação 'ABI PRISM BigDye Terminator Reaction Cycle' com os 'primers' M13 (directo e reverso).

Para completar a sequenciação dos fragmentos, uma vez que com as primeiras reacções não se conseguiu obter a sua sequência completa, foi necessário desenhar 'primers' internos para cada um dos fragmentos A, B e C, a partir da sequência obtida com os 'primers' M13 (directo e reverso), e que se designaram G6int5' e G6int3', G6Bint5' e G6Bint3' e G6Cint5' e G6Cint3' (Invitrogen) respectivamente (Figura 9 e Quadro VI).

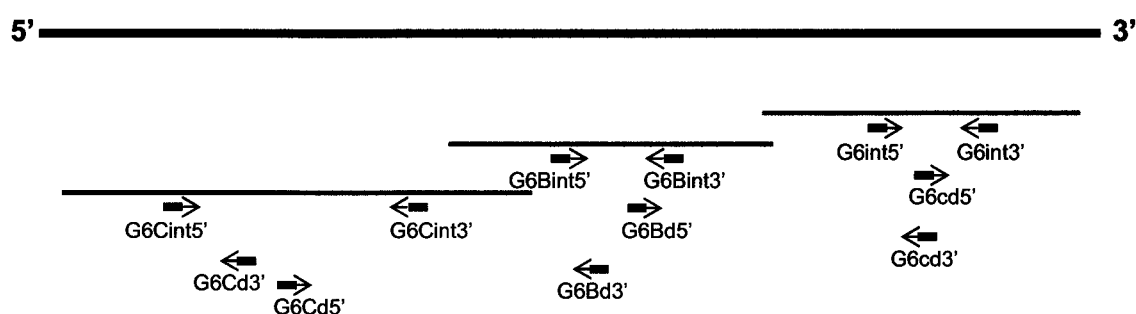


Figura 9. Localização no genoma, dos 'primers' utilizados para completar a sequenciação e sequenciar em cadeia dupla cada um dos fragmentos A, B, C.

Quadro VI. Sequências dos 'primers' utilizados para sequenciar os fragmentos A, B e C do genoma do isolado GM6

'Primer'	Posição no genoma	Sequência 5'→3'
G6int5'	2970 – 2987	CCTCTCATGGTTGGCAGG
G6int3'	3341 – 3359	CCTTGATCACTTGCAGTGG
G6cd5'	3094 – 3112	tttttgcgccgcGGGTATGATGGTGCTATGG
G6cd3'	3172 – 3190	tttttgcgccgcGCTGCGCATCGATTCTGTC
G6Bint5'	1840 – 1859	GTCACTAGCTTAATCCCATG
G6Bint3'	2249 – 2265	CGACCGCGTACGCTCAC
G6Bd5'	2182 – 2201	GATACCTACCAAGTATCAGG
G6Bd3'	1960 – 1979	CGTTTAACTCCAGTTTGGAG
G6Cint5'	394 – 412	GCTACAGAGGCCAATCGAC
G6Cint3'	1242 – 1260	GACCGTGATCTCCCCAAAG
G6Cd5'	762 – 781	GCGTCAGTTGTTACGCTATAG
G6Cd3'	579 – 598	CTTGGAGGTTGTCCATACCA

Para a sequenciação dos fragmentos em cadeia dupla desenharam-se, com base na sequência inicialmente obtida, os 'primers' G6dc5' e G6dc3', para o fragmento A, G6Bd5' e G6Bd3', para o fragmento B e G6Cd5' e G6Cd3' para o fragmento C (Figura 9 e Quadro VI). Como apenas se necessitava de uma pequena parte do fragmento AB, esta foi obtida directamente com a sequenciação feita pelos 'primers' M13, não tendo sido necessário desenhar outros 'primers'.

12.5. Amplificação, clonagem e sequenciação das extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6

Para a amplificação das extremidades 5' e 3' do RNA genómico do isolado GM6, utilizou-se a técnica RACE. Esta técnica permite a amplificação da extremidade de uma sequência genómica a partir de uma pequena porção interna, sobre a qual é desenhado um 'primer' específico com a orientação da sequência a determinar. Este 'primer' específico permite sintetizar o cDNA que contém toda a sequência desconhecida, sendo na extremidade 3' deste cDNA adicionado um polímero de adenina ou citosina, de modo a criar uma 'cauda' na extremidade 3' da sequência e assim se poder amplificar, clonar e sequenciar os extremos de uma sequência nucleotídica. Após esta adição procede-se à amplificação do fragmento por PCR, em que se utiliza o 'primer' usado para a síntese do cDNA ou outro específico, mais interno à sequência, e um 'primer' constituído por um polímero de timina ou guanina, complementar à 'cauda' junta ao cDNA, e por uma sequência complementar a um 'primer anchor'.

12.5.1. Síntese do cDNA

Para a sequenciação da extremidade 5' (Figura 10) fez-se a extracção do RNA viral com o 'kit da Qiagen', como descrito no ponto 7.2.. Os 'primers' utilizados foram desenhados com base na sequência publicada de OLV-1 (Grieco *et al.*, 1996).

A 4 µL de RNA viral (500 ng/µL) juntaram-se 0,7 µM do 'primer' específico G6Sp1 (Quadro VII) e incubou-se durante 5 min a 70°C, seguido de banho de gelo durante 10 min. A reacção de transcrição reversa foi feita num volume total de 20 µL com 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 40 U de RNaseOUT™ (Invitrogen) e 200 U da Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), durante 1 h a 42°C, após o que foi a incubar durante 10 min a 70°C. A cadeia de RNA foi depois degradada com 5 U de *E. coli* Ribonuclease H (Fermentas) durante 30 min a 37°C. Para a separação do cDNA sintetizado dos restantes componentes das reacções anteriores, tais como 'primers', dNTP's não incorporados e proteínas, foi utilizado o 'PCR Purification Spin Kit' (Genomed) seguindo-se as instruções do fabricante.

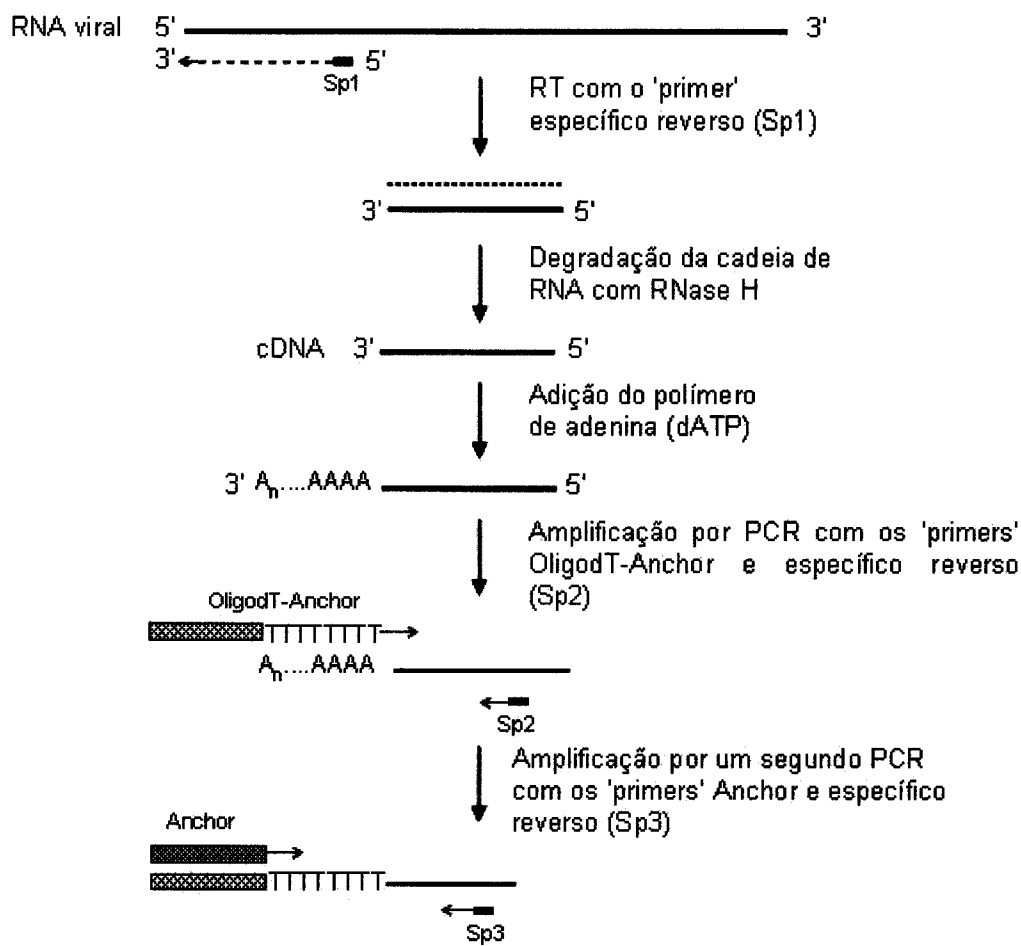


Figura 10. Esquema de amplificação da extremidade 5' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.

Quadro VII. Sequências dos 'primers' utilizados para a síntese do cDNA da extremidade 5' e 3' do RNA do isolado GM6

'Primer'	Posição no genoma	Sequência 5'→3'
G6Sp1	394 – 412	GTCGATTGGCCTCTGTAGC
G6Sp4	3247 – 3266	CAGGTTTAACGGGCTGGG

O cDNA purificado foi modificado na extremidade 3' por adição de adeninas num volume total de reacção de 20 µL contendo, 40 U de Terminal deoxinucleotide Transferase (TdT) (Fermentas), tampão da reacção 1x (Fermentas) e 50 µM de dATP. A reacção foi incubada durante 10 min a 37°C e depois durante 10 min a 70°C para inactivação da enzima.

Para clonar e sequenciar a extremidade 3' do RNA viral (Figura 11), utilizaram-se dsRNA que se extraíram de plantas de *N. benthamiana* infectadas com o isolado viral GM6, como descrito nos pontos 7.4.1., 7.4.2. e 7.4.3.. Foram utilizadas dsRNA, pois estando em presença da cadeia directa e da complementar, pode-se utilizar esta última para, a partir dela, amplificar, clonar e sequenciar a extremidade 3'. Assim, a fracção das

dsRNA correspondente à totalidade do genoma viral, foi cortada do gel e extraída com o 'Gel Extraction Spin Kit' (Genomed). Após a desnaturação destas duas cadeias e com a utilização de um 'primer' complementar da cadeia de sentido negativo, obtivemos o cDNA com a extremidade 3' livre para a ligação de adeninas. Uma amostra de 1 μ L de dsRNA foi desnaturado durante 5 min a 95°C após o que foi imediatamente colocada em banho de gelo, ao que se juntaram 0,7 μ M do 'primer' específico G6Sp4 (Quadro VII) tendo-se depois seguido o procedimento esquematizado na figura 11.

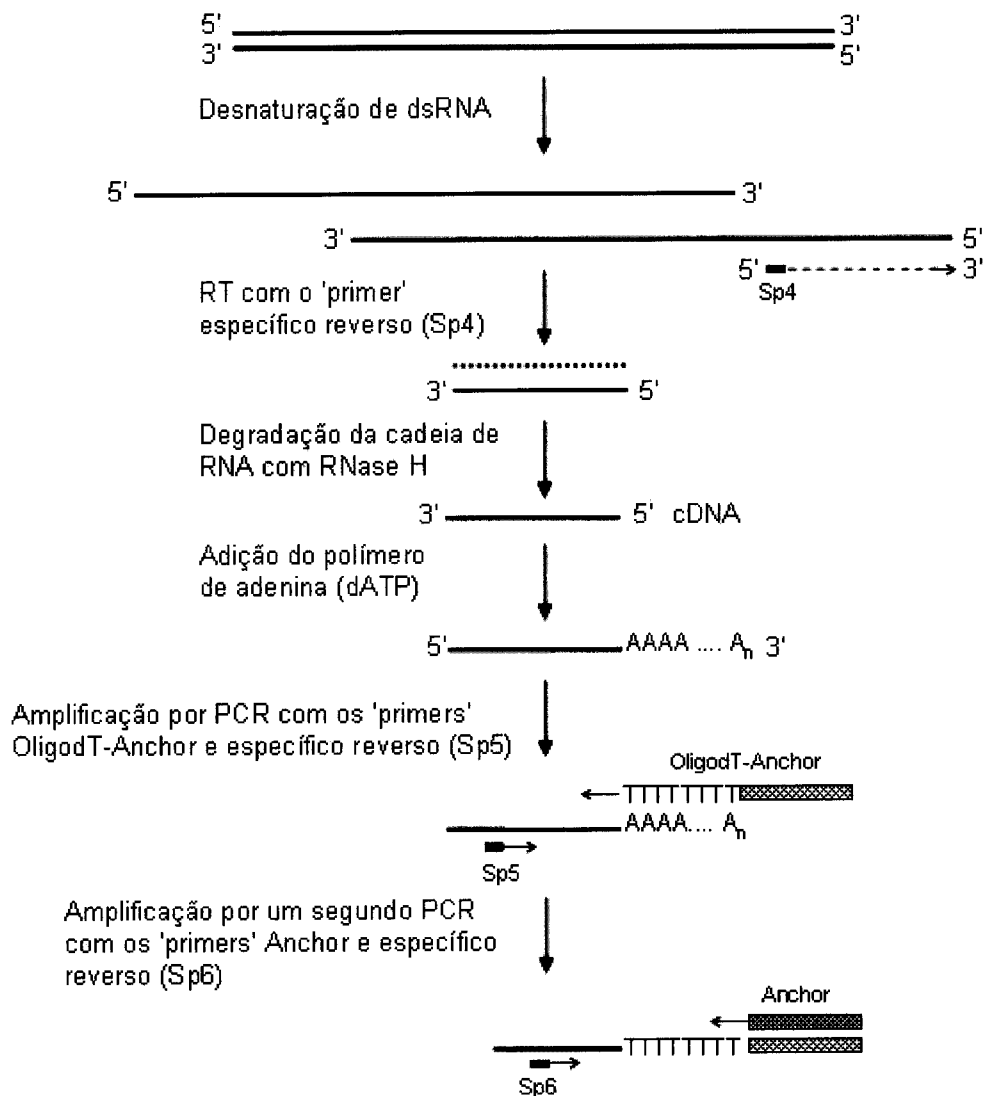


Figura 11. Esquema de amplificação da extremidade 3' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.

12.5.2. Amplificação por PCR

Para a amplificação da região correspondente à extremidade 5' (Figura 10), utilizou-se o cDNA sintetizado e com a extremidade 3' modificada como descrito no ponto

anterior. As condições utilizadas para a reação de PCR foram as seguintes: 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl; 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/mL de BSA, 0,2 μM de 'primer' específico G6Sp2 (Quadro VIII), 0,6 μM de 'primer' OligodT-Anchor (Quadro VIII) e 2,5 U de *Pfutu* DNA polimerase (Stratagene), num volume total de reação de 50 μL. A amplificação foi realizada com o seguinte programa: 2 min a 94°C, seguido de 10 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 40 seg a 72°C, 25 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 40 seg a 72°C (neste segundo conjunto de ciclos, a extensão fez-se com um incremento de 20 seg por ciclo), tendo a extensão final sido de 7 min a 72°C. O produto do PCR foi analisado num gel de 1% de agarose que correu à voltagem constante de 80 V durante 1 h. As bandas correspondentes ao marcador DNA Ladder 1kb plus (GIBCOBRL) e ao produto de amplificação foram coradas e visualizadas como referido em 7.3.. A zona correspondente ao tamanho do produto esperado, cerca de 330 pb, foi cortada do gel e o DNA foi extraído com uma coluna do Gel Extraction Spin Kit (Genomed) seguindo-se as instruções do fabricante.

Para a amplificação da região correspondente à extremidade 3' (Figura 11) utilizou-se o cDNA sintetizado e com a extremidade 3' modificada. As condições utilizadas para a reação de PCR foram as mesmas descritas anteriormente tendo-se apenas modificado o par de 'primers' utilizado, que para a amplificação desta região do genoma foram; 0,2 μM de 'primer' específico G6Sp5 e 0,6 μM de 'primer' OligodT-Anchor (Quadro VIII).

Quadro VIII. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6

'Primer'	Posição no genoma	Sequência 5'→3'
G6Sp2	246 – 263	CGCTGCGATTGGCCTCCA
OligodT-Anchor		AACCCGGCTCGAGCGGCCGCT ₁₈
G6Sp5	3418 – 3437	GAACCAGTGAACCCAACTGT

12.5.3. Amplificação por um segundo PCR

Para aumentar a concentração do produto amplificado pelo primeiro PCR, realizou-se um segundo PCR em que se utilizou um 'primer' mais interno à sequência amplificada na reação anterior e um 'primer' Anchor. Assim, para a reação de PCR que iria amplificar a extremidade 5', utilizaram-se 2 μL do DNA obtido como descrito no ponto anterior, após eluição da coluna. As condições utilizadas para a reação de PCR foram as mesmas descritas no ponto anterior, mas utilizando 0,2 μM do 'primer' específico G6Sp3 e 0,6 μM de 'primer' Anchor (Quadro IX). O produto amplificado foi primeiro analisado em gel de 1% de agarose para verificar se tinha o tamanho esperado de

aproximadamente 170 pb e o restante produto foi purificado com o 'PCR Purification Spin Kit' (Gemoned) seguindo-se as instruções do fabricante.

Quadro IX. Sequências dos 'primers' utilizados para amplificar por um segundo PCR as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado GM6

'Primer'	Posição no genoma	Sequência 5'→3'
G6Sp3	80 – 100	CTTCAGCAGCAGTTTGCTTAT
Anchor		AACCCGGCTCGAGCGGCCGC
G6Sp6	3531 – 3548	CGAATGGACAAGTTGTGGTA

Para a extremidade 3' do genoma viral também se realizou uma segunda reacção de amplificação, idêntica à realizada para a extremidade 5', mas utilizando 0,2 µM do 'primer' específico G6Sp6 e 0,6 µM de 'primer' Anchor (Quadro IX). O programa de amplificação foi modificado na temperatura de hibridação dos 'primers', que neste caso foi de 53°C. O produto amplificado, com o tamanho esperado de aproximadamente 260 pb, foi analisado e purificado como referido acima.

12.5.4. Clonagem

A clonagem foi efectuada seguindo o mesmo procedimento usado para o fragmento C, referida em 12.3.2., 12.3.3., 12.3.4., e 12.3.5..

12.5.5. Sequenciação

A sequenciação de cada uma das extremidades foi feita utilizando 4 clones positivos diferentes e realizou-se como referido em 12.4. com o 'primer' M13 directo.

12.6. Análise bioinformática

A análise das sequências obtidas por sequenciação foi feita com o programa BioEdit (versão 7.0.5.) (Haff, 1999). O programa ClustalW 1.83 (Thompson *et al.*, 1994) foi utilizado para o alinhamento das sequências de aminoácidos dos polipéptidos prováveis codificados pelas ORFs do isolado GM6, com sequências de outros necrovirus, obtidos após uma pesquisa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Para a análise filogenética foi utilizado o programa MEGA 3 (versão 3.1) (Kumar *et al.*, 2004) em que se utilizou o método Neighbour-Joining (Saitou e Nei 1987) com um suporte de 'bootstraps' de 1000 replicações (Felsenstein, 1985). Para a pesquisa de motivos foi utilizado o PROSITE (Falquet *et al.*, 2002). As massas moleculares relativas (M_r) dos polipéptidos foram determinadas com o programa EMBOSS (Rice *et al.*, 2000).

IV. Resultados

1. Caracterização serológica e molecular de isolados virais

A caracterização dos 23 isolados virais obtidos de azeitonas teve como principal objectivo, fazer uma primeira distinção serológica entre eles e avaliar quais os que eram OLV-1 e TNV *l.s.*. Após esta caracterização tentou-se amplificar os isolados de OLV-1 com 'primers' para o diagnóstico deste vírus e os isolados amplificados foram sujeitos a SSCP para, numa abordagem preliminar, se perceber se existiria variabilidade entre os isolados de OLV-1 em estudo.

1.1. Aplicação do teste DAS-ELISA

A aplicação de testes serológicos DAS-ELISA para o diagnóstico de OLV-1 e de serotipos de TNV a preparações purificadas dos 24 isolados virais diferentes (23 provenientes de cultivares nacionais e um isolado italiano de OLV-1) mostrou que 18 destes reagiram positivamente com as IgG para o OLV-1 (G1A) (Quadro X). Destes, 3 foram obtidos de árvores de Trás-os-Montes das cvs. Santulhana (2 isolados) e Negrinha de Freixo (1 isolado) e os restantes 14 foram obtidos das cvs. Galega vulgar (8 isolados), Verdeal Alentejana (4 isolados) e Cordovil de Serpa (2 isolados), do Sul de Portugal. Em testes DAS-ELISA para a detecção de serotipos de TNV nos mesmos 24 isolados em estudo, 8 mostraram ser relacionados com TNV. Verificou-se que destes, 5 isolados estavam presentes em 6 das árvores da cv. Santulhana testadas, 2 provieram de árvores da cv. Verdeal alentejana e 1 de Galega vulgar, tendo este isolado sido utilizado como controlo positivo (Quadro X). Os isolados V10A e A1P2 deram resultados positivos nos testes ELISA quer com o antisoro para o OLV-1 (G1A), quer com o antisoro para o TNV.

1.2. Testes de RT-PCR

Dos 18 isolados serologicamente identificados como OLV-1 (ver ponto 1.1.), 17 foram testados por RT-PCR 'single-step' com os 'primers' específicos para este vírus (Martelli *et al.*, 1996). O isolado V4A não se utilizou nestes testes, pois não se conseguiu

Quadro X. Reacções obtidas em teste DAS-ELISA em que se usaram anticorpos específicos para OLV-1 (G1A) e para TNV ('Broad range') para identificação dos isolados virais purificados, obtidos de oliveiras portuguesas

Designação do isolado viral	IgG anti - OLV-1 (G1A)		IgG anti – TNV ('Broad range')	
	D. O. ($A_{405\text{ nm}}$) ^a	Relação com OLV-1	D. O. ($A_{405\text{ nm}}$) ^a	Relação com TNV
G1A ^b	1,415	+	0,201	-
G2A	1,516	+	0,197	-
G5A	1,466	+	0,188	-
GP ^{c, d}	0,303	-	1,671	+
G1PB	1,405	+	0,203	-
G1S	1,593	+	0,212	-
G3S	1,237	+	0,221	-
GM6	1,988	+	0,193	-
GM8	1,747	+	0,207	-
V4A	1,419	+	0,181	-
V6A	1,219	+	0,176	-
V8A	0,261	-	1,439	+
V10A	0,939	+	1,107	+
V4PB	1,418	+	0,236	-
C7C	1,096	+	0,215	-
C1VM	1,651	+	0,167	-
* A1P2	0,901	+	1,101	+
A4P2	1,847	+	0,190	-
A5P2	0,195	-	0,956	+
A4P5	0,172	-	1,063	+
A6P5	0,160	-	1,472	+
A10P2	0,274	-	1,097	+
* N	1,432	+	0,206	-
OLV-1i	1,343	+	0,205	-
Controlo - ^e	0,192	-	0,185	-

^a Valores da média de absorvância da reacção final das duas repetições de cada amostra;

^b Controlo positivo para OLV-1;

^c Controlo negativo para OLV-1;

^d Controlo positivo para TNV *l.s.*;

^e *N. benthamiana* não inoculada, usada como controlo negativo;

* Amostras testadas num teste DAS-ELISA diferente em que os valores de Densidade óptica (D.O.) a 405 nm, do controlo positivo (G1A) e do controlo negativo (GP) para o teste com o antisoro para o OLV-1, foram de 1,602 e 0,312, respectivamente. Para o teste com o antisoro para o TNV, os valores de D.O. a 405 nm do controlo positivo (GP) e do controlo negativo (G1A), foram de 1,304 e 0,217, respectivamente.

a sua transmissão mecânica. Após a análise em gel de agarose dos produtos de amplificação, verificou-se que todos os isolados obtidos de árvores das cvs. Galega vulgar, Cordovil de Serpa, Verdeal Alentejana e Negrinha de Freixo apresentaram a banda com o tamanho esperado de cerca de 750 pb (Figura 12) identificando-se como isolados de OLV-1. Os isolados A4P2 (Figura 12 A, poço 5) e A1P2 (Figura 12 B, poço 12), que correspondem aos dois isolados obtidos de árvores da cv. Santulhana, não apresentaram a referida banda correspondente ao produto de amplificação, comportando-se como não sendo OLV-1, ao contrário do esperado tendo em conta os resultados serológicos.

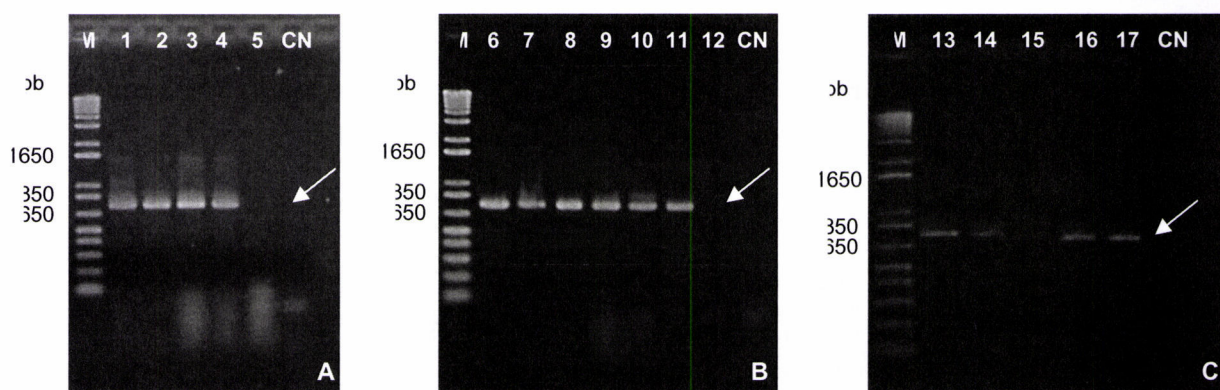


Figura 12. Análise dos produtos amplificados por RT-PCR 'single-step', para identificação de isolados de OLV-1. **A:** 1 - G2A, 2 - G5A, 3 - V4PB, 4 - V6A, 5 - A4P2; **B:** 6 - G1S, 7 - G3S, 8 - G8M, 9 - C1VM, 10 - N, 11 - G1PB, 12 - A1P2; **C:** 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 15 - G1A, 16 - C7, 17 - V10A. M – 'DNA Ladder 1kb plus' (GIBCOBRL), CN – Controlo negativo de PCR. As setas indicam as bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados (750 pb).

1.3. Análise de SSCP de diferentes isolados portugueses de OLV-1

A análise electroforética dos perfis de SSCP dos produtos amplificados após RT-PCR, relativos aos 15 isolados revelou diferenças entre si. Foram obtidos padrões com uma, duas e três conformações (Figura 13 a)). Destes, cinco são distintos entre si (Figura 13 b)).

Os produtos de amplificação dos isolados GM6, GM8, G1A e C7 apresentaram apenas um tipo de conformação estável (Figura 13 b), A) e o do isolado de OLV-1 italiano (OLV-1i) originou um padrão com duas formas, idêntico ao obtido para os isolados G2A, G5A e V10A (Figura 13 b), B). Perfis de SSCP constituídos por duas formas, mas com mobilidades diferentes das observadas em outros isolados, foram os obtidos com os G3S, N, C1VM e V4PB (Figura 13 b), C). A presença de três conformações, com dois padrões diferentes, um em que as três formas migram no gel com uma distância aproximadamente igual entre si e outro em que as duas primeiras formas se observam

mais juntas no gel, correspondem aos isolados G1S (Figura 13 b), D) e aos isolados V6A e G1PB (Figura 13 b), E) respectivamente.

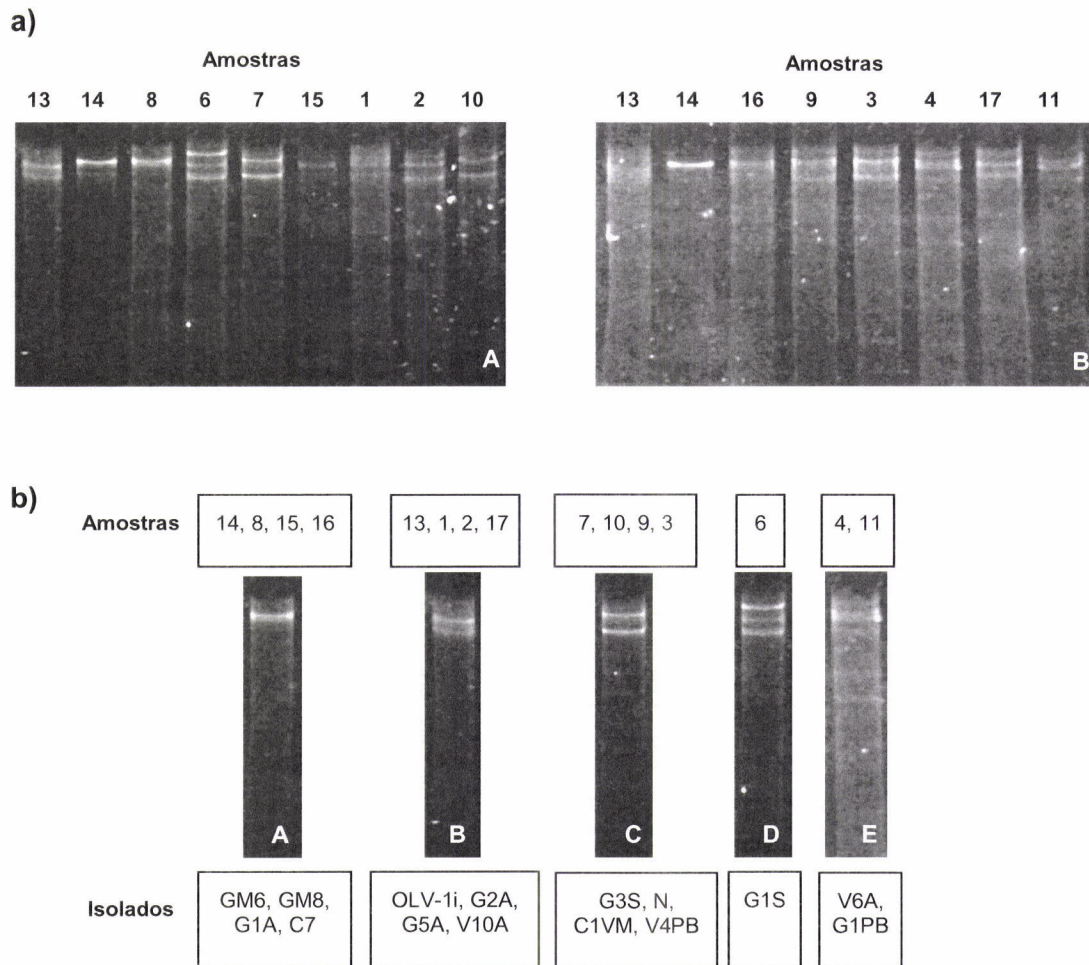


Figura 13. **a)** Perfis de SSCP obtidos após electroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de RT-PCR desnaturados. A: Amostras – 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 8 - G8M, 6 - G1S, 7 - G3S, 15 - G1A, 1 - G2A, 2 - G5A, 10 – N; B: Amostras – 13 - OLV-1i, 14 - GM6, 16 - C7, 9 - C1VM, 3 - V4PB, 4 - V6A, 17 - V10, 11 - G1PB. **b)** A, B, C, D e E: Tipos de padrões de SSCP diferentes, obtidos dos vários isolados de OLV-1.

2. Caracterização bioquímica e molecular do isolado viral GM6

2.1. Gama de hospedeiros

As inoculações do extracto de planta infectada com o isolado GM6 em 10 espécies herbáceas indicadoras diferentes, mostraram que todas eram susceptíveis e reagiram com a formação de necroses locais (Quadro XI). O tipo de necroses observadas variou com alguns dos hospedeiros utilizados. Em *G. globosa* as necroses apresentaram

inicialmente uma zona central avermelhada que depois passou a necrótica, rodeada por uma auréola avermelhada. Em *V. unguiculata* as lesões apresentadas eram muito pequenas, inicialmente cloróticas e depois foram ficando avermelhadas escuras. Em todas as outras plantas as lesões apresentadas eram arredondadas e necróticas (Figura 14). No entanto, as necroses observadas em plantas de *N. benthamiana* eram mais extensas do que as formadas noutras espécies e as que mais rapidamente invadiam e alastravam na folha inoculada. Assim, esta planta passou a ser utilizada para a multiplicação do vírus em larga escala e foi sempre a utilizada nos trabalhos subsequentes.

Quadro XI. Sintomas observados em plantas herbáceas indicadoras inoculadas com o isolado viral GM6

Família botânica	Espécies	Sintomas observados
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i> L.	Necroses locais
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn	Necroses locais
	<i>Chenopodium murale</i> L.	Necroses locais
	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	Necroses locais
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.	Necroses locais
<i>Leguminoseae</i>	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Necroses locais
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	Necroses locais
	<i>Nicotiana occidentalis</i>	Necroses locais
	<i>Nicotiana rustica</i> L.	Necroses locais
	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. White Burley	Necroses locais

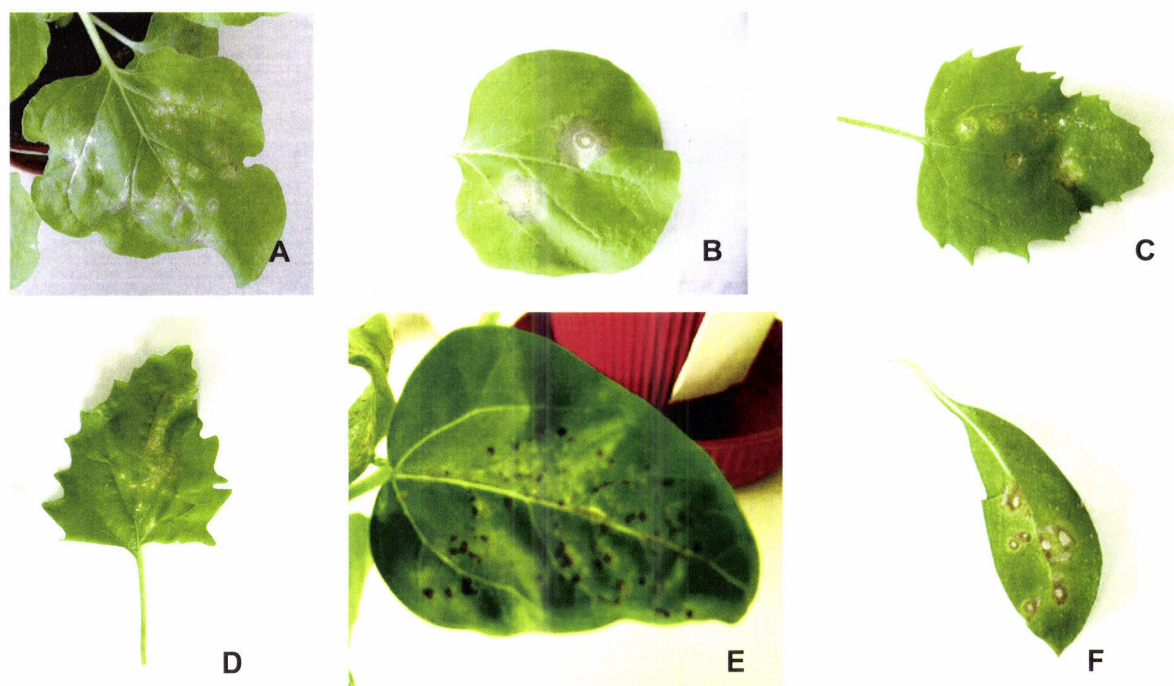


Figura 14. Sintomas observados em alguns dos hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral GM6: A e B: lesões locais em *N. benthamiana*; C: lesões locais em *C. murale*; D: lesões locais em *C. quinoa*; E: lesões locais em *V. unguiculata* e F: lesões locais em *G. globosa*.

2.2. Purificação viral

A purificação das partículas virais do isolado GM6 feita a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas e congeladas a -20°C , resultou em preparações infecciosas. A utilização do clorofórmio e butanol como solventes orgânicos, permitiu uma boa clarificação do homogenado. O procedimento que permitiu obter maiores quantidades de vírus purificado foi o Protocolo 1, no qual se utilizou PEG para a adsorção das partículas virais (Quadro XII).

Quadro XII. Quantidade de vírus obtida em 4 experiências de purificação usando dois protocolos

	Quantidade de vírus (mg/mL)			
	1	2	3	4
Protocolo 1 (Adsorção com PEG e 1 ciclo de centrifugação diferencial)	1,3	1,2	0,9	1,1
Protocolo 2 (2 ciclos de centrifugação diferencial)	0,8	0,8	0,6	0,7

A centrifugação das preparações virais em gradientes de densidade de sacarose, revelou que o isolado GM6 sedimenta numa única banda (Figura 15 A). A posição desta banda foi idêntica à observada com o isolado italiano de OLV-1, quando centrifugados

simultaneamente em tubos diferentes. Do mesmo modo, quando o isolado GM6 se misturou com uma preparação do isolado italiano notou-se que ambos sedimentaram numa única banda coincidente, revelando que ambos os isolados (GM6 e OLV-1i) apresentam uma taxa de sedimentação idêntica, de 111 S como referido por Gallitelli e Savino (1985).

2.3. Morfologia das partículas virais

A observação ao microscópio electrónico de transmissão de preparações virais do isolado GM6, previamente contrastadas, revelou serem constituídas por partículas com contornos isométricos (Figura 15 B) e cerca de 30 nm de diâmetro, características semelhantes às referidas por outros autores para o OLV-1 (Gallitelli e Savino, 1985).

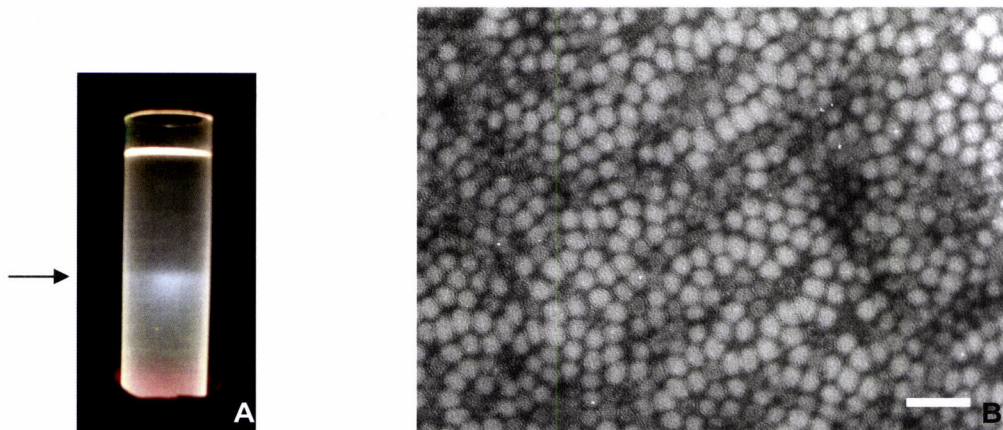


Figura 15. **A:** Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de GM6. **B:** Fotografia do isolado viral GM6, observado ao microscópio electrónico de transmissão (Barra=100 nm).

2.4. Análise da proteína da cápside viral

A análise por SDS-PAGE dos péptidos dissociados da cápside viral, mostrou que esta é constituída por apenas um tipo de péptidos, com uma massa molecular aparente de 32 kDa (Figura 16), valor semelhante ao obtido para outros necrovirus, nomeadamente OLV-1 (Gallitelli e Savino, 1985).

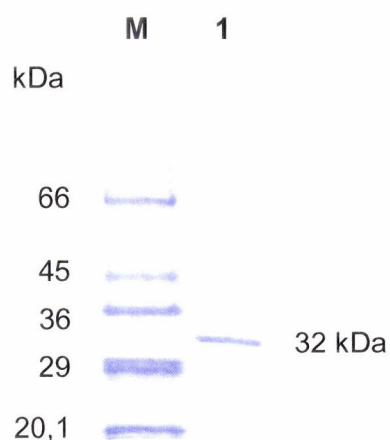


Figura 16. Análise da proteína da cápside do isolado GM6 por electroforese em gel descontínuo de SDS-poliacrilamida; M: 'Sigmamarker Low range' (SIGMA); 1: péptido constituinte da cápside viral.

2.5. Análise do ácido nucleico viral

O tratamento de preparações do isolado GM6 com fenol e SDS, para separação do ácido nucleico viral, revelou-se bastante eficaz. Quando analisadas por electroforese em gel de agarose, as preparações revelaram uma única banda, correspondente a uma espécie de ácido nucleico com a dimensão de cerca de 3700 bases. No entanto, a aplicação deste método de extracção resultou geralmente no aparecimento de ácidos nucleicos degradados (Figura 17 A). O método de extracção baseado no uso do 'RNeasy plant Mini Kit' (Qiagen) revelou ser muito mais rápido e mais simples do que o do fenol e SDS, e resultou também no aparecimento em gel de uma única banda com tamanho idêntico ao obtido pelo método anterior, mas com a vantagem de se ter obtido, aparentemente, uma maior quantidade de RNA e menos degradado (Figura 17 B).

Uma amostra do ácido nucleico viral revelou-se infeccioso quando inoculado em plantas de *N. benthamiana*, originando necroses locais extensas, idênticas às observadas aquando da inoculação mecânica de partículas completas do isolado GM6 naquele hospedeiro (ver Figura 14 A). O tratamento de uma amostra idêntica, com RNase A, resultou na sua digestão enzimática, não se visualizando qualquer banda em gel de agarose após electroforese, e resultou também na perda de infecciosidade. Estes resultados demonstraram que o ácido nucleico do isolado GM6 é constituído por RNA.

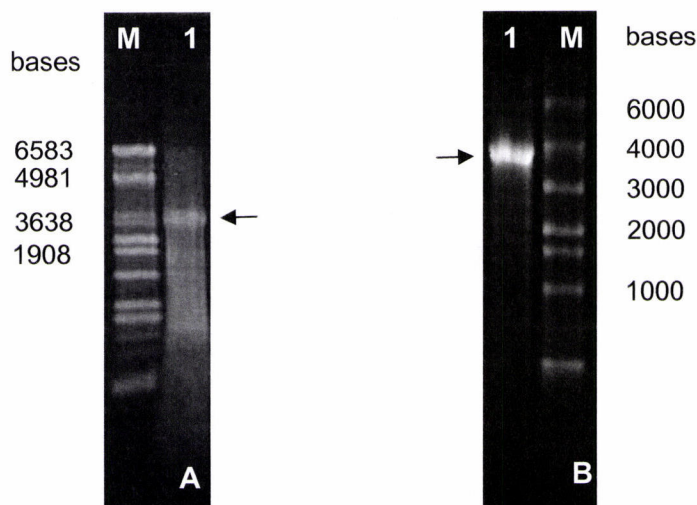


Figura 17. Análise electroforética em gel de 1% de agarose do ácido nucleico viral extraído de preparações purificadas de vírus. **A** - M: 'RNA Markers, 0.28-6.58 kb' (Promega), 1: Ácido nucleico viral extraído com fenol e SDS; **B** - 1: Ácido nucleico viral extraído com o RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); M: 'RNA Ladder, High Range' (Fermentas). A seta indica a posição do RNA viral, com cerca de 3700 bases.

2.6. Análise das dsRNA nos tecidos infectados

A fracção correspondente às cadeias duplas de RNA obtida a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas, mostrou em gel de agarose, um perfil electroforético constituído por 3 bandas principais, correspondentes a três espécies de dsRNA com cerca de 3700 pb, 1500 pb e 1300 pb (Figura 18), interpretadas, a primeira, como sendo as formas replicativas do RNA viral inteiro e as outras duas, como sendo os dois RNAs subgenómicos, segundo os resultados obtidos por Merciega *et al.* (1996) e Pantaleo *et al.* (1999) para isolados de OLV-1.

2.7. Caracterização molecular do isolado GM6

2.7.1. Sequência nucleotídica do RNA genómico

A amplificação por PCR de cada um dos fragmentos do genoma viral, designados por A, B, C e AB resultou em produtos de amplificação com os tamanhos esperados de cerca de 1100, 1130, 1600 e 1900 pb respectivamente, tendo em conta a posição dos 'primers' que possibilitaram a amplificação. Cada um destes produtos amplificados foi clonado no vector pZErOTM-2 (Invitrogen) obtendo-se quatro diferentes clones cujas sequências se sobrepunham parcialmente, correspondendo a cerca de 98% da sequência genómica do isolado GM6. Os restantes 2% do genoma, correspondiam a

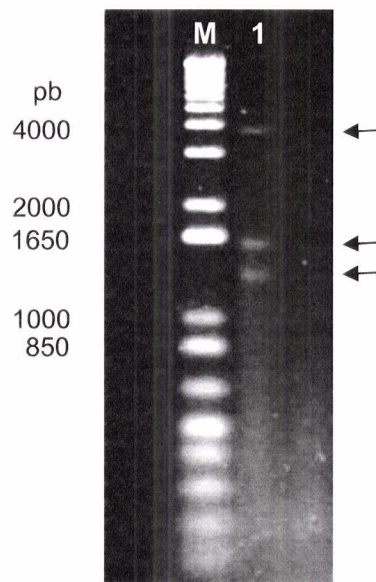


Figura 18. Análise electroforética em gel de 0,8% de agarose dos ácidos ribonucleicos de cadeia dupla isolados de plantas de *N. benthamiana* infectadas. M – ‘DNA Ladder 1kb plus’ (GIBCOBRL); 1 - Bandas correspondentes às formas replicativas do isolado GM6. As setas indicam a posição de cada uma das 3 bandas obtidas.

cerca de 34 nts da extremidade 5’ e a cerca de 29 nts da extremidade 3’ e foram amplificados através da técnica RACE. A extremidade 5’ do RNA viral foi amplificada recorrendo à adição de um polímero de adenina à extremidade 3’ do cDNA. Numa primeira reacção de PCR, foi amplificado um fragmento com cerca de 330 pb, o qual se utilizou como molde para fazer um segundo PCR em que se obteve um fragmento para clonar com cerca de 170 pb. Dos vários clones positivos obtidos, quatro foram sequenciados e todos eles apresentavam a mesma sequência com o residuo timina junto ao polímero de adenina. A sequência da extremidade 3’ foi obtida por um processo idêntico ao da extremidade 5’, tendo-se utilizado a cadeia complementar do RNA viral proveniente da desnaturação da molécula de dsRNA correspondente ao genoma completo do isolado GM6. Assim, após a primeira reacção de amplificação, obteve-se um fragmento com cerca 350 nts, onde se incluía o polímero de adenina que se juntou ao cDNA. A partir deste fragmento foi feito um segundo PCR, em que se obteve um fragmento com cerca de 250 nts, o qual foi clonado. Foram também sequenciados quatro clones independentes, em que todos eles apresentavam a mesma e com uma guanina como residuo terminal.

A sequência completa de 3702 nts que compõem a totalidade do genoma do isolado viral GM6 (Figura 19 e Anexo IV) (Número de acesso ao ‘GenBank’: DQ083996) foi determinada em ambas as direcções. Esta sequência nucleotídica tem um conteúdo

estimado de 51,67% de A+U e 48,33% de G+C, sendo a composição por bases de 27,09% de A, 23,74% de C, 24,58% de G e 24,58% de U.

1	TAG	TAT	ACA	TAC	CAA	GTA	TAC	GAT	ACC	GGT	GCA	AGC	CCG	TAC	ACA	45
46	GCT	AAA	GTG	TCT	AAA	ATG	GAG	TTA	CCC	AAC	CAA	CAT	AAG	CAA	ACT	90
1						M	E	L	P	N	Q	H	K	Q	T	10
91	GCT	GCT	GAA	GGT	TTC	GTT	TCT	TTC	CTT	AAC	TGG	CTT	TGT	AAT	CCC	135
11	A	A	E	G	F	V	S	F	L	N	W	L	C	N	P	25
136	TGG	AGA	CGT	CAA	CGT	ACA	GTC	AAC	GCT	GCT	GTC	GCT	TTT	CAG	AAT	180
26	W	R	R	Q	R	T	V	N	A	A	V	A	F	Q	N	40
181	AGC	ATT	CTT	GCT	ATT	GAG	GAC	GTG	GAA	CAT	TTC	GAA	GAT	ATC	AAC	225
41	S	I	L	A	I	E	D	V	E	H	F	E	D	I	N	55
226	GAA	TGT	TTC	GAG	GAA	TCA	TCT	GGA	GGC	CAA	TCG	CAG	CGC	ACT	AAG	270
56	E	C	F	E	E	S	S	G	G	Q	S	Q	R	T	K	70
271	GTT	GTC	GCT	GAA	GGG	GCT	TAT	TCT	CCC	GTA	AAA	TCC	GAA	CGC	ACC	315
71	V	V	A	E	G	A	Y	S	P	V	K	S	E	R	T	85
316	CGC	CGA	GTC	CGC	AAG	CAA	AAG	AAG	GCC	AAA	TTC	GTC	AAA	TAT	TTG	360
86	R	R	V	R	K	Q	K	K	A	K	F	V	K	Y	L	100
361	GTT	AAT	GAG	GCT	CGT	GCC	GAG	TTT	GGT	CTC	CCC	AAA	GCT	ACA	GAG	405
101	V	N	E	A	R	A	E	F	G	L	P	K	A	T	E	115
406	GCC	AAT	CGA	CTC	ATG	GTG	CAA	CAC	TTC	CTG	CTC	CGA	AGG	TGT	AAG	450
116	A	N	R	L	M	V	Q	H	F	L	L	R	R	C	K	130
451	GAT	TGG	GGG	GTT	GTC	ACA	TCC	CAG	TGC	CAC	AAC	AAT	GTT	GCA	CTC	495
131	D	W	G	V	V	T	S	Q	C	H	N	N	V	A	L	145
496	GCC	TTG	ACT	CTC	GTG	TTT	GTC	CCA	ACA	GAG	GAT	GAT	TTG	CTG	GCG	540
146	A	L	T	L	V	F	V	P	T	E	D	D	L	L	A	160
541	CGA	GCT	ATG	ATG	AAC	ACG	TAC	AAG	ACG	AGG	TCT	GCG	GTC	CGT	GGT	585
161	R	A	M	M	N	T	Y	K	T	R	S	A	V	R	G	175
586	ATG	GAC	AAC	CTC	CAA	GGT	GAG	GGG	TGG	TGG	AAC	AAC	AGG	CTT	GGC	630
176	M	D	N	L	Q	G	E	G	W	W	N	N	R	L	G	190
631	ATA	GGT	GGC	CAG	GCC	GGC	TGG	GCC	TTT	CGG	GCC	AAG	TAG	GGG	TGC	675
191	I	G	G	Q	A	G	W	A	F	R	A	K	*	G	C	205
676	CTA	GAG	AGG	AGG	CCG	GGG	TTT	TCC	ACG	TCT	GTT	TCG	CGT	GGA	AAC	720
206	L	E	R	R	P	G	F	S	T	S	V	S	R	G	N	220
721	CAC	CCC	GAT	CTG	GTG	GTC	AAA	CCA	TCA	GGA	CAC	CCC	GAG	AAA	CAG	765
221	H	P	D	L	V	V	K	P	S	G	H	P	E	K	Q	235
766	CGT	CAG	TTG	TTA	CGC	TAT	AGT	GGA	ATT	GGC	GGC	CAT	TTA	TTA	ATC	810
236	R	Q	L	L	R	Y	S	G	I	G	G	H	L	L	I	250
811	GGC	ATC	CAC	AAC	AAC	TCT	CTC	TCC	AAC	TTG	CGT	AGG	GGC	TTA	ATG	855
251	G	I	H	N	N	S	L	S	N	L	R	R	G	L	M	265
856	GAG	AGA	GTA	TTC	TAC	GTT	GAG	GGA	CCC	AAT	GGG	CTC	CAA	GAC	GCC	900
266	E	R	V	F	Y	V	E	G	P	N	G	L	Q	D	A	280
901	CCT	AAA	CCC	GTT	CGG	GGG	GCA	TTC	AAC	TCC	CTG	AAT	AAG	TTT	CGA	945
281	P	K	P	V	R	G	A	F	N	S	L	N	K	F	R	295
946	GAC	CTA	TAT	ACC	AAA	AAT	AGT	TGG	CGT	CAT	TCC	CCT	GTA	ACC	AAT	990
296	D	L	Y	T	K	N	S	W	R	H	S	P	V	T	N	310
991	GAA	CAA	TTC	TTG	ATG	AAT	TAC	TCG	GGC	AGG	AAA	CTA	ACT	ATT	TAC	1035
311	E	Q	F	L	M	N	Y	S	G	R	K	L	T	I	Y	325
1036	AAA	GAA	GCG	GTT	GAT	AGT	TTG	TCG	CAT	CAA	CCA	CTT	AGC	TTA	CGG	1080
326	K	E	A	V	D	S	L	S	H	Q	P	L	S	L	R	340
1081	GAC	TCG	AGG	CTG	AAG	ACT	TTC	GTT	AAG	GCC	GAA	AAA	CTT	AAT	CTG	1125
341	D	S	R	L	K	T	F	V	K	A	E	K	L	N	L	355
1126	AGC	AAG	AAG	CCA	GAT	CCA	GCA	CCC	CGG	GTC	ATT	CAA	CCC	AGG	TCA	1170
356	S	K	K	P	D	P	A	P	R	V	I	Q	P	R	S	370
1171	CCT	CGG	TAC	AAC	GTT	TGT	TTG	GGT	CGT	TAT	CTA	CGT	CAC	TAT	GAA	1215
371	P	R	Y	N	V	C	L	G	R	Y	L	R	H	Y	E	385
1216	CAC	CAC	GCG	TTC	AAA	ACC	ATT	GCT	AAA	TGC	TTT	GGG	GAG	ATC	ACG	1260
386	H	H	A	F	K	T	I	A	K	C	F	G	E	I	T	400
1261	GTC	TTT	AAA	GGG	TTT	ACT	CTA	GAG	CAA	CAA	GGC	GAA	ATC	ATG	TTT	1305

401	V	F	K	G	F	T	L	E	Q	Q	G	E	I	M	F	415
1306	TCG	AAG	TGG	AAG	AAA	TAT	GTT	AAT	CCC	GTC	GCC	GTT	GGA	CTC	GAT	1350
416	S	K	W	K	K	Y	V	N	P	V	A	V	G	L	D	430
1351	GCA	AGT	CGG	TTC	GAC	CAA	CAC	GTG	TCA	GTT	GAA	GCA	CTT	CAA	TAT	1395
431	A	S	R	F	D	Q	H	V	S	V	E	A	L	Q	Y	445
1396	GAG	CAT	GAA	TTT	TAC	ATT	AGA	GAT	TAC	CCG	AAT	GAT	AAA	CAG	CTA	1440
446	E	H	E	F	Y	I	R	D	Y	P	N	D	K	Q	L	460
1441	AAA	TGG	TTG	TTA	AAG	CAA	CAA	CTG	AGC	AAT	ATT	GGC	ACA	GCG	TTT	1485
461	K	W	L	L	K	Q	Q	L	S	N	I	G	T	A	F	475
1486	GCT	AGT	GAT	GGC	ATC	ATA	AAG	TAC	AAG	AAG	GAG	GGT	TGT	CGT	ATG	1530
476	A	S	D	G	I	I	K	Y	K	K	E	G	C	R	M	490
1531	AGT	GGA	GAT	ATG	AAC	ACC	AGT	TTG	GGC	AAT	TGC	ATT	CTC	ATG	TGT	1575
491	S	G	D	M	N	T	S	L	G	N	C	I	L	M	C	505
1576	GCG	ATG	GTC	TAC	GGG	TTG	AAG	GAA	CAC	CTG	GGC	ATA	AAT	TTA	TCC	1620
506	A	M	V	Y	G	L	K	E	H	L	G	I	N	L	S	520
1621	CTT	GCC	AAT	AAT	GGG	GAT	GAC	TGC	GTC	ATT	GTC	TGT	GAG	AAA	GCG	1665
521	L	A	N	N	G	D	D	C	V	I	V	C	E	K	A	535
1666	GAT	TTG	AAG	AAA	TTG	ACA	AGC	AGC	ATC	GAA	CCA	TAT	TTT	AGG	CAA	1710
536	D	L	K	K	L	T	S	S	I	E	P	Y	F	R	Q	550
1711	TTT	GGA	TTC	AAA	ATG	GAG	GTG	GAA	CAA	CCC	GTA	GAT	ATA	TTT	GAG	1755
551	F	G	F	K	M	E	V	E	Q	P	V	D	I	F	E	565
1756	CGC	ATT	GAG	TTT	TGT	CAA	ACC	CAA	CCT	GTG	TTC	GAT	GGC	TAC	CAA	1800
566	R	I	E	F	C	Q	T	Q	P	V	F	D	G	Y	Q	580
1801	TAC	ATC	ATG	GTT	CGA	AAA	CCC	TCG	GTA	GTC	ACT	TCG	AAG	GAT	GTC	1845
581	Y	I	M	V	R	K	P	S	V	V	T	S	K	D	V	595
1846	ACT	AGC	TTA	ATC	CCA	TGC	CAG	AAT	CAG	GCT	CAA	TAT	GCA	GAA	TGG	1890
596	T	S	L	I	P	C	Q	N	Q	A	Q	Y	A	E	W	610
1891	CTG	CAA	GCT	GTG	GGT	GAG	TGC	GGA	ATG	AGT	ATC	AAT	GGT	GGA	ATA	1935
611	L	Q	A	V	G	E	C	G	M	S	I	N	G	G	I	625
1936	CCT	GTT	ATG	CAG	AAC	TTT	TAC	CAT	ATG	CTC	CAA	ACT	GGA	GTT	AAA	1980
626	P	V	M	Q	N	F	Y	H	M	L	Q	T	G	V	K	640
1981	CGC	ACC	AAA	TTC	ACC	AAG	ACC	GGC	GAG	TTT	CAG	ACG	AAC	GGG	TTG	2025
641	R	T	K	F	T	K	T	G	E	F	Q	T	N	G	L	655
2026	GGG	TAT	CAC	TCT	AGA	TAT	ATG	CAT	AGA	GTG	GCC	CGA	GCC	ATT	TCG	2070
656	G	Y	H	S	R	Y	M	H	R	V	A	R	A	I	S	670
2071	CCC	GAA	ACC	CGT	TTA	TCC	TTC	TAT	TTA	GCG	TTC	GGT	ATC	ACA	CCA	2115
671	P	E	T	R	L	S	F	Y	L	A	F	G	I	T	P	685
2116	GAC	CTT	CAG	GAA	GCA	CTG	GAG	GCC	TTT	TAT	GAT	ACC	CAT	ACG	CTT	2160
686	D	L	Q	E	A	L	E	A	F	Y	D	T	H	T	L	700
2161	GAG	TTG	GAT	GAT	GTT	GTC	CCA	GTT	GAT	ACC	TAC	CAA	GTA	TCA	GGA	2205
701	E	L	D	D	V	V	P	V	D	T	Y	Q	V	S	G	715
2206	GAG	CAT	TTG	ATC	AAT	GGA	TTA	CCA	AAC	TGA	GGT	TAG	TGA	GGA	TAA	2250
716	E	H	L	I	N	G	L	P	N	*						724
					M	D	Y	Q	T	E	V	S	E	D	N	11
2251	CGT	GAG	CGT	ACG	CGG	TCG	GGC	TAG	GAG	GGG	CAC	TGA	GGA	TAA	GAA	2295
12	V	S	V	R	G	R	A	R	R	G	T	E	D	K	K	26
2296	GCA	CAA	TGG	ATC	GGG	ATT	AAC	TGG	CGT	TAA	GCG	TCA	TGC	GGT	GAG	2340
27	H	N	G	S	G	L	T	G	V	K	R	H	A	V	S	41
2341	TGA	AAC	ATC	TCA	GAA	ATC	ACA	GCA	AGG	TAC	TGG	CAA	CGG	CAC	GAT	2385
42	E	T	S	Q	K	S	Q	Q	G	T	G	N	G	T	M	56
2386	GAC	CAA	CAT	AGC	TGA	AGA	GCA	GAC	CAT	TAC	CGT	GAC	ATA	CAA	CTT	2430
57	T	N	I	A	E	E	Q	T	I	T	V	T	Y	N	F	71
2431	TAA	CTT	TTA	GTT	ATG	GCT	GTG	TGT	CGC	TGT	TGT	GAT	ACT	TCA	CCA	2475
					M	A	V	C	R	C	C	D	T	S	P	11
72	N	F	*													
2476	GGT	ATT	ACA	TTA	TTC	CCT	TAC	TTT	GCT	ATT	CTC	ATT	CTC	ATC	CTT	2520
12	G	I	T	L	F	P	Y	F	A	I	L	I	L	I	L	26
2521	GCA	ATA	TTA	GTT	GTT	GGA	ACT	CCA	AAC	CAG	CAA	TAT	CAT	CAT	TCT	2565
27	A	I	L	V	V	G	T	P	N	Q	Q	Y	H	H	S	41
2566	CCT	AGT	ACT	TAC	GAG	TAT	AAG	ACT	CAA	CAC	ATT	TCG	ATC	GCA	AAA	2610
42	P	S	T	Y	E	Y	K	T	Q	H	I	S	I	A	K	56

2611	TAG	ACA	TTT	CGC	AAC	TCT	CTC	AAC	ATG	GTT	AAT	TAT	TAC	TGG	GAT	2655
	*								M	V	N	Y	Y	W	D	7
2656	AGT	CGA	ATT	CAG	AGG	TGG	TTC	TAC	GAA	AGT	GGA	CCA	CAG	CGT	GTC	2700
8	S	R	I	Q	R	W	F	Y	E	S	G	P	Q	R	V	22
2701	CGA	ACA	TAT	ATG	AAA	GCG	GAT	TTC	ACC	CCA	CCA	AAC	GGC	AAA	CTG	2745
23	R	T	Y	M	K	A	D	F	T	P	P	N	G	K	L	37
2746	CCT	GCC	CGC	AAG	ACT	AAA	AGG	TCA	CCC	CCG	AAT	AGG	GGC	AAC	CTC	2790
38	P	A	R	K	T	K	R	S	P	P	N	R	G	N	L	52
2791	CAG	GTT	CTT	CCG	GTT	ACA	GCA	CCC	GCT	GCT	GGT	GGA	GTG	ATC	TCC	2835
53	Q	V	L	P	V	T	A	P	A	A	G	G	V	I	S	67
2836	ACA	AGA	AGA	CGC	GTT	CCT	CGA	ATT	ACT	ACT	ACT	AAT	GAG	CAG	ACT	2880
68	T	R	R	R	V	P	R	I	T	T	T	N	E	Q	T	82
2881	GTC	GTG	AGA	AAC	ACA	GAA	ATC	ATA	AGT	GCC	ATT	AAC	TCT	GCC	GCT	2925
83	V	V	R	N	T	E	I	I	S	A	I	N	S	A	A	97
2926	CTA	GGT	GCA	TTT	TCG	GCG	ACC	ACT	GTC	ACG	GTG	ATC	CCG	TCC	AAC	2970
98	L	G	A	F	S	A	T	T	V	T	V	I	P	S	N	112
2971	CTC	TCA	TGG	TTG	GCA	GGG	TTG	TCC	GAT	TTG	TAC	AGC	AAG	TAC	CGT	3015
113	L	S	W	L	A	G	L	S	D	L	Y	S	K	Y	R	127
3016	TGG	CGC	AAG	CTC	CGG	TTT	ATT	TAT	ATT	CCG	GTC	TGC	CCA	ACC	AGC	3060
128	W	R	K	L	R	F	I	Y	I	P	V	C	P	T	S	142
3061	ACA	CAA	GGC	AAT	GTC	TCT	ATG	TCA	CTA	TCA	TTC	GAC	AGA	ATC	GAT	3105
143	T	Q	G	N	V	S	M	S	L	S	F	D	R	I	D	157
3106	GCG	CAG	CCA	ACA	AGC	ATC	ACT	CAA	ATG	CAA	CAG	GGC	TAC	CGT	GCC	3150
158	A	Q	P	T	S	I	T	Q	M	Q	G	Y	R	A	A	172
3151	ATC	ACG	TTC	CCG	CCT	TAC	GCG	GGG	TAT	GAT	GGT	GCT	ATG	GCC	TTG	3195
173	I	T	F	P	P	Y	A	G	Y	D	G	A	M	A	L	187
3196	TCG	TCC	TTC	GGC	AAC	ATT	CCT	GGA	ATG	GTT	GTC	GTC	GAT	GTG	GAC	3240
188	S	S	F	G	N	I	P	G	M	V	V	V	D	V	D	202
3241	TGT	GCA	CGA	ATG	GAC	AAG	TTG	TGG	TAT	CCT	AAT	GTT	ACC	CTG	GCC	3285
203	C	A	R	M	D	K	L	W	Y	P	N	V	T	L	A	217
3286	ACC	TTC	CTT	GCC	ATG	GCA	ACT	AAC	ATC	CAG	AAC	GGA	TAT	TGC	GGA	3330
218	T	F	L	A	M	A	T	N	I	Q	N	G	Y	C	G	232
3331	GTA	ACC	CTG	TCC	ACT	GCA	AGT	GAT	CAA	GGG	CCA	GCC	GCC	GCC	ACT	3375
233	V	T	L	S	T	A	S	D	Q	G	P	A	A	A	T	247
3376	AAC	TTT	GGC	CAA	GTG	TTC	TGC	CAG	TAC	GAA	ATC	GAA	TTT	ATA	GAA	3420
248	N	F	G	Q	V	F	C	Q	Y	E	I	E	F	I	E	262
3421	CCA	GTG	AAC	CCA	ACT	GTC	AAT	GTG	TAA	CCA	CAC	AAC	GAT	GGG	TGA	3465
263	P	V	N	P	T	V	N	V	*							270
3466	GTT	GCG	TAA	CTG	TGT	CAA	TTC	CTA	AAG	GTT	TTA	GTA	GAG	CGG	TAA	3510
3511	GCA	AGA	CGG	ATC	CTG	GGA	AAC	AGG	TTT	AAC	GGG	CTG	GGG	GTG	GTG	3555
3556	CCC	CGG	CCG	TCG	CAT	CAC	TTG	CTG	ATA	CAA	TCT	ACA	AGG	CCC	ATG	3600
3601	GAA	GGG	TCT	GCA	CAG	GTA	TCC	ACG	CCA	AGG	ACG	GGG	CGA	AAG	TCT	3645
3646	CGG	ACG	GGG	GGT	AGT	GGA	CCC	AAC	ACC	AGA	TTG	AGG	GGC	TTT	TGC	3690
3691	CCC	ACC	CCC	CCG			3702									

Figura 19. Sequência completa de bases do genoma do isolado viral GM6. A sequência de aminoácidos deduzida para as proteínas codificadas pelo RNA viral é apresentada na parte inferior da sequência, com diferentes cores para cada provável proteína. Os asteriscos (*) correspondem ao códon stop.

2.7.2. Organização do genoma

Por análise informática com o programa BioEdit (Hall, 1999), foram identificadas 5 ORFs na sequência nucleotídica do genoma do isolado viral GM6 (Figura 20). A NCR na extremidade 5' tem início no resíduo timina e é constituída por 60 nucleótidos. Esta região tem um elevado conteúdo de A+T (58,4%), que é consistente com as sequências 5'

iniciais de outros vírus de plantas (Galli *et al.*, 1987). A NCR na extremidade 3' é constituída por 258 nucleótidos.

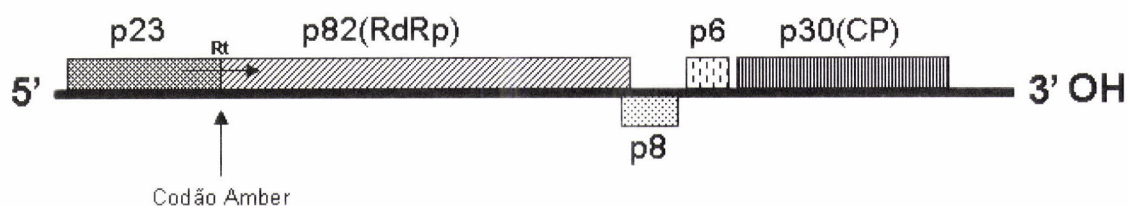


Figura 20. Organização do genoma do isolado viral GM6. As caixas sombreadas representam as proteínas codificadas por cada uma das ORFs: p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. Rt – leitura contínua ('read through'), RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica.

A ORF 1 começa com o codão AUG no nucleótido 61 e termina com um codão stop 'amber' UAG no nucleótido 666. Esta ORF codifica um provável polipéptido com 202 aminoácidos e com uma M_r estimada em 23004 (p23). A leitura contínua ('read through') do codão stop 'amber' da ORF 1 origina um polipéptido constituído por 724 aa com uma M_r estimada em 82484 (p82), parcialmente idêntica à p23, que termina no codão 'opal' UGA (nt 2232) (ORF 2). A seguir aparecem duas ORFs centrais, ORF 3 e ORF 4. A ORF 3 sobrepõe-se aos 14 nts finais da ORF 2, situa-se entre os nucleótidos 2219 e 2437 e codifica um polipeptídeo com 73 aa e com uma M_r estimada de 8051 (p8). A ORF 4 compreende os nts de 2443 a 2610 e codifica um polipeptídeo com 56 aa e uma M_r estimada de 6268 (p6). Por fim, ORF 5 começa no nucleótido 2635 e termina no codão stop 'ochre' UAA na posição 3444, codificando um polipeptídeo com 270 aa que tem uma M_r estimada de 29853 (p30).

A organização do genoma do isolado viral GM6 é muito compacta, tendo apenas duas ICR muito pequenas. As ORF 3 e ORF 4 estão separadas por uma ICR composta por 5 nucleótidos e a ORF 4 está separada da ORF 5 por uma ICR de 24 nts.

2.7.3. Proteínas hipotéticas codificadas no genoma e identidade com as de outros vírus de plantas

2.7.3.1. Proteína p82

Após uma pesquisa com o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997), a proteína p82 foi identificada como sendo uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Nesta proteína foi identificado o perfil de RdRp de vírus com genoma RNA de sentido positivo (Marchler-Bauer *et al.*, 2003), apresenta os motivos estruturais A, B e C, responsáveis pela formação do centro catalítico das RdRp (Poch *et al.*, 1989) e o motivo altamente conservado GDD (Karmner e Argos, 1984; Argos, 1988).

A sequência de aminoácidos da RdRp do isolado GM6 foi alinhada com a de outros vírus da família *Tombusviridae*: OLV-1citrino, isolado de citrino (Número de acesso ao 'GenBank': NP_043907), OMMV (YP_224015), TNV-A (NP_056825), TNV-A^{Ch} isolado da China (AAT69238), TNV-D (BAA00785), TNV-D^H isolado da Hungria (NP_608311), LWSV (NP_044740), BBSV (NP_758810), GaMV (NP_044732), MNSV (NP_041226), TCV (NP_620720), CarMV (NP_051882) e TBSV (NP_062897), tendo mostrado percentagens de identidade variando entre 31,5% e 97,3% (Quadro XIII). Verificou-se que a sequência de aminoácidos da RdRp do isolado GM6 apresenta uma elevada percentagem de identidade com a de alguns necrovirus, como a do isolado de citrino de OLV-1 (97,3%), a de OMMV (92,1%), a de TNV-A (90,7%) e a de TNV-A^{Ch} (90,4%). Quanto à RdRp dos restantes necrovirus, a percentagem de identidade observada foi mais baixa, como por exemplo com a de TNV-D (34,1%), a de TNV-D^H (35,3%), a de BBSV (34,8%) e a de LWSV (33,9%). Verificou-se ainda que a RdRp do carmovirus GaMV tem uma percentagem de identidade, com a do isolado em estudo de 51,1%, superior à observada para alguns necrovirus.

Quadro XIII. Percentagem de identidade das duas maiores proteínas (RdRP e CP) codificadas pelo genoma do isolado GM6 com as de outros membros da família *Tombusviridae*

Vírus / isolado	Identidade da sequência de aminoácidos (%)	
	RdRp	CP
OLV-1citrino	97,3	87,7
OLV-1tulipa	nd	98,5
OMMV	92,1	43,3
TNV-A	90,7	41,5
TNV-A ^{ch}	90,4	41,1
TNV-D	34,1	42,5
TNV-D ^H	35,3	42,2
LWSV	33,3	28,2
BBSV	34,8	36,3
GaMV	51,1	13,9
MNSV	37,8	14,6
TCV	36,3	14,6
CarMV	32,0	13,4
TBSV	31,5	14,6

nd – Não disponível.

A análise filogenética obtida através do alinhamento da sequência de aminoácidos da RdRp do isolado GM6 com a de várias sequências de membros da família *Tombusviridae* acima referidas mostra que os necrovirus formam dois grupos distintos (Figura 21): um em que se incluem os isolados GM6, OLV-1citrino, OMMV, TNV-A e TNV-A^{Ch}, e outro onde se encontram os isolados TNV-D, TNV-D^H, BBSV e LWSV. Filogeneticamente, o GaMV encontra-se num ramo perto do do isolado GM6. Esta análise filogenética é coerente com os resultados das percentagens de identidade obtidos para as sequências de RdRp de cada um destes isolados (ver Quadro XIII).

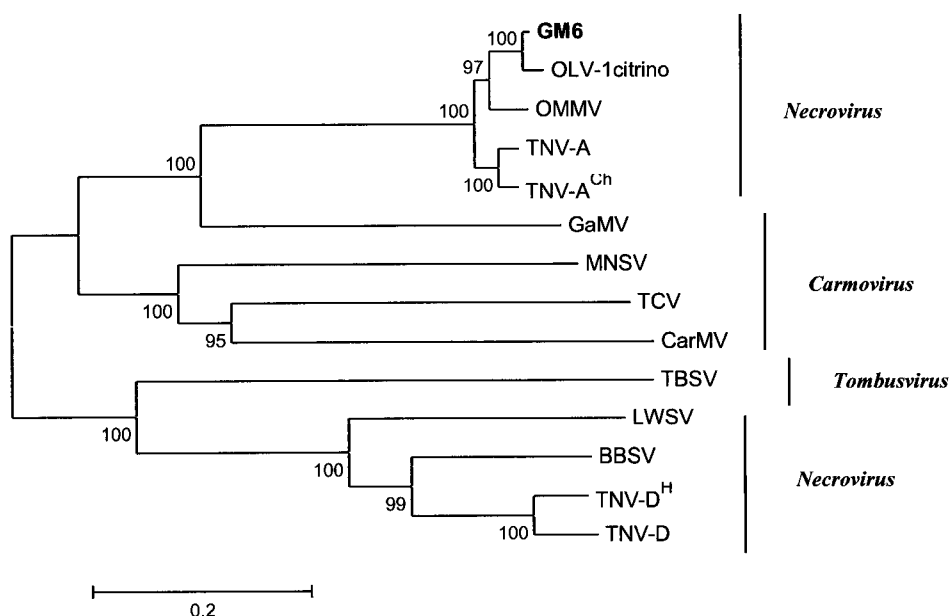


Figura 21. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining após o alinhamento das sequências de aminoácidos da RdRp do isolado GM6 com as de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

2.7.3.2. Proteína p30

A proteína p30 foi identificada como sendo a da cápside proteica (CP) pelo seu tamanho, anteriormente determinado por SDS-PAGE (ver ponto 1.4.) e pelo grau de semelhança da sequência do gene com outras sequências homólogas de vírus pertencentes à família *Tombusviridae*, obtidas após uma pesquisa BLAST, e que foram: OLV-1tulipa, isolado de tulipa (BAB55656), OLV-1citrino (NP_043911), OMMV (YP_224020), TNV-A (NP_056828), TNV-A^{Ch} (AAT69241), TNV-D (BAA00790), TNV-D^H (NP_608316), LWSV (NP_044744), BBSV (NP_758815), MNSV (NP_041231), TCV (NP_620723), GaMV (NP_044736) e CarMV (NP_051885). O alinhamento mostrou que existe uma maior percentagem de identidade com a sequência equivalente do OLV-1 isolado de tulipa (98,5%) do que com a do isolado de citrino (87,7%). Por outro lado, foi observada uma baixa percentagem de identidade com a sequência de aminoácidos da

CP de TNV-A (41,5%), de TNV-A^{Ch} (41,1%), de TNV-D (42,5%) de TNV-D^H (42,2%) e também com a de OMMV (43,3%) o outro necrovirus que afecta a oliveira (ver Quadro XIII).

A árvore filogenética obtida pelo método de Neighbour-Joining (Figura 22), após o alinhamento das várias sequências que constituem as CP virais, veio confirmar os resultados referidos acima, isto é, mostrou que a cápside proteica do isolado GM6 se encontra filogeneticamente mais próxima da de OLV-1 isolado de tulipa do que da do isolado de citrino. Mais distante filogeneticamente, encontra-se a sequência de OMMV, que aparece integrada no grupo dos isolados de TNV-D.

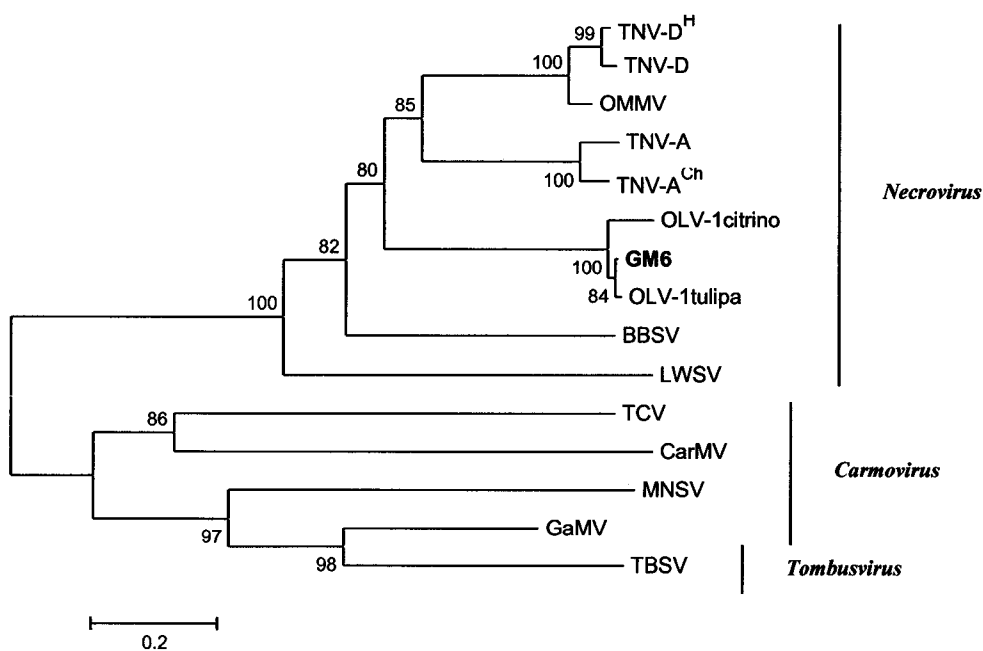


Figura 22. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining, após o alinhamento das sequências de aminoácidos da CP de GM6 com as de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

Após uma pesquisa de regiões conservadas foi encontrado o domínio S (Shell) da sequência da CP, situado entre os aminoácidos 53 e 270 e também a respectiva região de consenso do domínio S, designada por assinatura das CPs dos vírus de plantas icosaédricos (Figura 23). Esta assinatura, é constituída por 26 aminoácidos entre os resíduos 135 e 160 com a seguinte sequência ([FYW]-x-[PSTA]-x(7)-G-x-[LIVM]-x-[LIVM]-x-[FYWI]-x(2)-D-x(5)-P) em que x representa um qualquer aminoácido (Falquet *et al.*, 2002). No entanto, observou-se que na 17^a posição desta sequência, respeitante ao isolado GM6, se encontra o aminoácido leucina, o qual aliás também se encontra na mesma posição nas sequências equivalentes dos outros isolados de OLV-1, mas que não

consta da sequência consenso da assinatura referida por Falquet *et al.*, (2002). Um alinhamento feito apenas com as sequências das CPs das espécies de necrovirus que apresentam as percentagens de identidade mais elevadas, veio mostrar que existem zonas altamente conservadas, não só entre os vários isolados de OLV-1, mas também entre os vírus TNV-A, TNV-D e OMMV (Figura 23). Como zonas mais conservadas estão os quatro resíduos de ligação ao Ca^{2+} , dois resíduos de ácido aspártico, um de lisina, e um de leucina, e que são responsáveis pela estabilidade da estrutura quaternária da cápside proteica (Oda *et al.*, 2000).

GM6	1	MVN -YYWDSR	----	IQRW FY	ESGPQR VRTY	MKADFT PPNG	KLPARK TKRS	PPNRGN LQVL	55							
OLV-1tulipa	1	MVN -YFWSR	----	IQRW FY	ESGPQR VRTY	MKADFT PPNG	KLPARK TKRS	PPNRGN LQVL	55							
OLV-1citrino	1	MVN -FYWDSR	----	IQRW FY	ESGPQR VRTY	IKRISP HQMA	SLPARK TKRS	PPNRGN LQVL	55							
TNV-A	1	MAGKKN	NNNG	QYIIL	RTP	EQ	QVEID	QRNAR	RAQMGRMKKA	RQP	VQRYLQQ	HGLR	NGLSGR	60		
TNV-D	1	MP--	KRGRVG	----	LAES	FQ	SKTKK	QKENE	YNAF	QREKME	RALANN	ARAA	-PKSS	GMTFR	53	
OMMV	1	MP--	KRGRVG	----	LAES	FQ	GKTKQ	QKRAE	YEA	VKRE	QLE	RAFAN	NSKVA	NPRSS	GLSFR	54
GM6	56	P-- VTAPAAG	GVISTR RRVP	RITTTN EQTV	VRNTEI ISAI	NSAALG AFSA	TTVTVI PSNL	113								
OLV-1tulipa	56	P-- VTAPAAG	GAISTR RRVP	RITTTN EQTV	VRNTEI ISAI	NSAALG AFSA	TTVTVI PSNL	113								
OLV-1citrino	56	P-- VIAPVAG	GVISTE GHVP	RITTTN EQTV	VRNTEI ISAI	NSAALG AIFG	NYVTVI PSNL	113								
TNV-A	61	GGYIV	APTSG	GVVT-	RPIVP	KFSNR	GDSTI	VRNTEI	LNNQ	ILAA	LGA	FNT	TNSAL	IAAAP	119	
TNV-D	54	P-- LTVPVAG	SVIYSR PRVP	QVRTN QSTF	VVNTEL VANI	TLAAAG AFSF	TTQPLI PSFG	111								
OMMV	55	P-- LVAPIAG	SVVYSR PRVP	QIRTN QSTI	VVNTEL VANI	TLAAAG AFSF	TAQPLI PSFG	112								
GM6	114	SWLAGL SDLY	SKYRWR KLRF	IYIPVC PTST	QGNVSM SLSF	DRIDTQ PTSI	TOMQOQ YRAI	173								
OLV-1tulipa	114	SWLAGL SDLY	SKYRWR KLRF	IYIPVC PTST	QGNVSM SLSF	DRIDTQ PTSI	TOMQOQ YRAI	173								
OLV-1citrino	114	SWLAGL SDLY	SKYRWR KLRF	IYLPVC PTST	QGNVSM SLSF	DRIDTQ PTSI	TOMQOQ YRAI	173								
TNV-A	120	SWLASI ADLY	SKYRWL SCEI	IYIPKC PTTT	SGSIAM AFTY	DRNDA AFTAR	AQLSQS YKAI	179								
TNV-D	112	SWLANI ADLY	SKWRWL SCSV	VYIPKC PTST	QGSVVM AIVY	DAQDTV PTTR	TQVSQC YQSI	171								
OMMV	113	SWLANI ADLY	SKWRWIR CSV	IYIPKC PTTT	QGSVVM AIVY	DAQDTV PTTR	TQVSQC YQSI	172								
GM6	174	TFFPYA GYDG	AMALSS FGNI	PGMVVV DVDC	ARMDKL WYPN	VTLATF LAMA	TNIQNG YCGV	233								
OLV-1tulipa	174	TFFPYA GYDG	AMALSS FGNI	PGMVVV DVDC	ARMDKL WYPN	VTLATF LAMA	TNIQNG YCGV	233								
OLV-1citrino	174	TFFPYA GYDG	AMALAS FGNI	PGMVVV DVDC	ARMDKL WYPN	VTLATF LAMA	PTSRTD TCGV	233								
TNV-A	180	NFFPYA GYDG	AAYLNS NQGA	GSAIAV QLDV	TKLDKP PWYPT	ISSAGF GALS	VLDQNQ FCPA	239								
TNV-D	172	TFFPYA GYGG	ASALNH KGSG	GESLVS TLDT	NRVDKR WYST	IGNAAFT TALT	SIDKNQ FCPA	231								
OMMV	173	TFFPYA GYGG	ASALNS NSSG	GESLVS TLDT	NRVDK WYST	IGNAAFT TALT	SIDKNQ FCPA	232								
GM6	234	TLSTAS DQGP	AAATNF GQVF	CQYEIE FIEP	VNPTVN V	270										
OLV-1tulipa	234	TLFTAS DQGP	AAATNF GQVF	CQYEIE FIEP	VNPTVN V	270										
OLV-1citrino	234	TLFTAS DQGP	AAATNF GQVF	CQYEIE FIEP	VNPTVN L	270										
TNV-A	240	SLVVAS DGGP	ATATPA GDLF	IKYVIE FIEP	INPTMN V	276										
TNV-D	232	TALIAG DGGP	AAATAV GDIF	MRYDIE FIEP	VNPSIN V	268										
OMMV	233	TALIAG DGGP	VAATAV GDVF	MRYEIE FIEP	INPTIN V	269										

Figura 23. Alinhamento da sequência de aminoácidos da CP do isolado GM6, com as de OLV-1tulipa (BAB55656), OLV-1citrino (NP_043911), TNV-A (NP_056828), TNV-D (BAA00790), e OMMV (YP_224020). Os resíduos idênticos estão a negrito. Os traços indicam espaços introduzidos para maximizar o alinhamento. A região sublinhada corresponde ao domínio S da cápside proteica, os resíduos a cinzento correspondem ao padrão de consenso do domínio S e a seta indica o aminoácido leucina na 17ª posição deste consenso. Os locais de ligação ao cálcio (Ca^{2+}) estão indicados abaixo das sequências, junto dos aminoácidos que favorecem essa ligação.

2.7.3.3. Proteínas p8 e p6

As proteínas p8 e p6, codificadas pela região central do genoma do isolado GM6, poderão estar relacionadas com o movimento das partículas virais de célula para célula. De facto, estas proteínas apresentam elevadas percentagens de identidade, (93,2% e 100%, respectivamente) quando comparadas com as proteínas p8 e p6 do isolado OLV-1 de citrino, que têm um papel importante no movimento das partículas entre células (Pantaleo *et al.*, 1999). Elas apresentam também elevada percentagem de identidade com as respectivas p8 e p6 dos necrovirus OMMV, TNV-A (Quadro XIV). Verificou-se no entanto, que a percentagem de identidade com pequenas proteínas de outros necrovirus, como o TNV-D, TNV-D^H, BBSV e LWSV, é muito baixa, mas mais elevada quando as comparamos com as proteínas p8 e p7 do carmovirus GaMV (Quadro XIV).

Quadro XIV. Percentagem de identidade das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 codificadas pelo genoma do isolado GM6, com outras pequenas proteínas de outros membros da família *Tombusviridae*

Vírus/isolado	Proteína	(%)	Vírus/isolado	Proteína	(%)
GM6	p8	100	GM6	p6	100
OLV-1citrino	p8	93,2	OLV-1citrino	p6	100
OMMV	p8	87,6	OMMV	p6	100
TNV-A	p8	89,0	TNV-A	p6	98,2
TNV-A ^{Ch}	p7	91,7	TNV-A ^{Ch}	p5	98,2
TNV-D ^H	p7 ₁	10,5	TNV-D ^H	p7a	7,6
TNV-D ^H	p7a	20,5	TNV-D ^H	p7b	16,4
TNV-D	p7 ₁	6,7	TNV-D	p7a	6,1
TNV-D	p7a	20,5	TNV-D	p7b	17,9
BBSV	p5	12,3	BBSV	p7a	7,9
BBSV	p7a	23,2	BBSV	p7b	20,0
LWSV	p11	13,0	LWSV	p6	21,0
MNSV	p7a	28,7	MNSV	p7a	9,2
TCV	p8	15,7	MNSV	p7b	27,4
GaMV	p8	43,2	GaMV	p7	36,2

Número de acesso ao 'GenBank' das sequências proteicas dos isolados utilizados: OLV-1citrino proteína p8 (NP_043909), p6 (NP_043910); OMMV p8 (YP_224018), p6 (YP_224019); TNV-A p8 (NP_056826), p6 (NP_056827); TNV-A^{Ch} p7 (AAT69239), p5 (AAT69240); TNV-D^H p7₁ (NP_608313), p7a (NP_608314), p7b (NP_608315); TNV-D p7₁ (BAA00787), p7a (BAA00788), p7b (NP_758814); BBSV p5 (NP_758812), p7a (NP_758813), p7b (NP_758814); LWSV p11 (NP_044742), p6 (NP_044743); MNSV p7a (NP_041229), p7b (NP_041230); TCV p8 (NP_620722); GaMV p8 (NP_044734), p7 (NP_044735).

Na árvore filogenética onde se incluíram as pequenas proteínas dos necrovirus OLV-1 isolado de citrino, OMMV, TNV-A, TNV-A^{Ch}, TNV-D e TNV-D^H, bem como as dos carmovirus MNSV, TCV e GaMV, pode-se observar que a proteína p8 do isolado GM6

fica no mesmo grupo que as p8 do OLV-1 isolado de citrino, dos isolados de TNV-A e do OMMV. Por outro lado, esta proteína fica relativamente próxima, em termos filogenéticos, da p8 do GaMV. A proteína p6 do isolado GM6 forma outro grupo distinto, juntamente com as p6 do OLV-1 isolado de citrino, do OMMV e dos isolados de TNV-A (Figura 24).

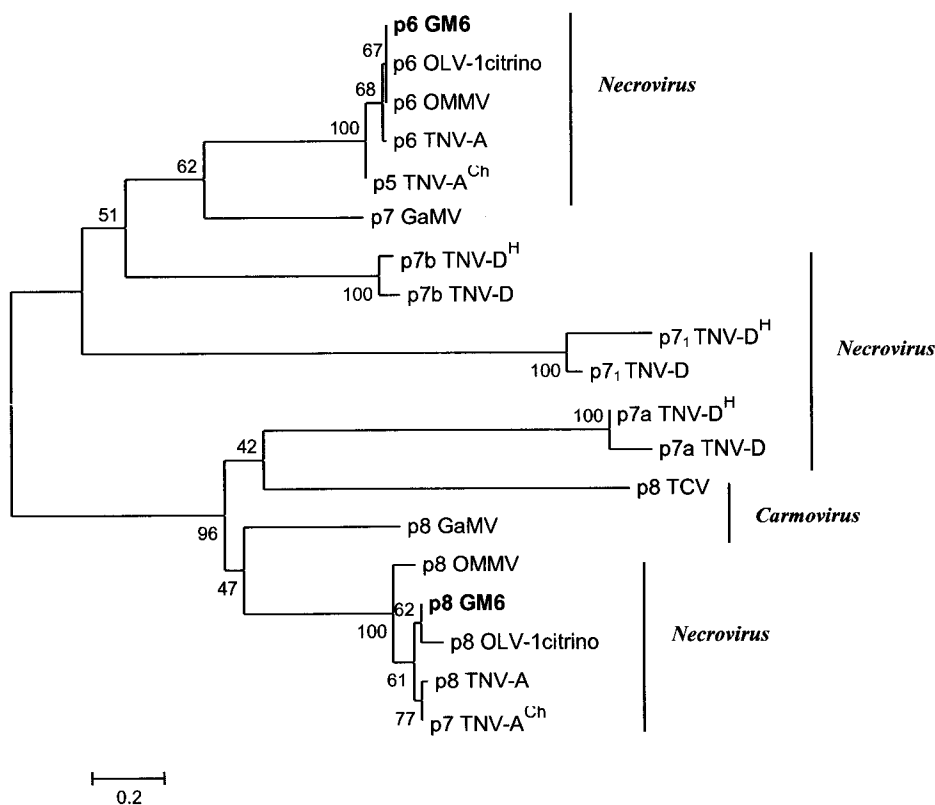


Figura 24. Árvore filogenética obtida por aplicação do método de Neighbour-Joining a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 de GM6 com pequenas proteínas codificadas pelo genoma de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

Realizou-se ainda uma outra análise filogenética em que se compararam as proteínas p8 e p6 do isolado GM6, com as de outros necrovirus e carmovirus, com idêntica função (Figura 25 A e B). Esta análise mostrou resultados semelhantes aos observados na Figura 24, e permitiu verificar que as proteínas p5 e p7b do BBSV e p11 do LWSV, apesar de os genes que as codificam ocuparem uma posição no genoma viral semelhante à da p8 do GM6, são bastante distantes filogeneticamente. O mesmo se observou para as proteínas p7b do BBSV e p6 do LWSV em relação à proteína p6 do GM6.

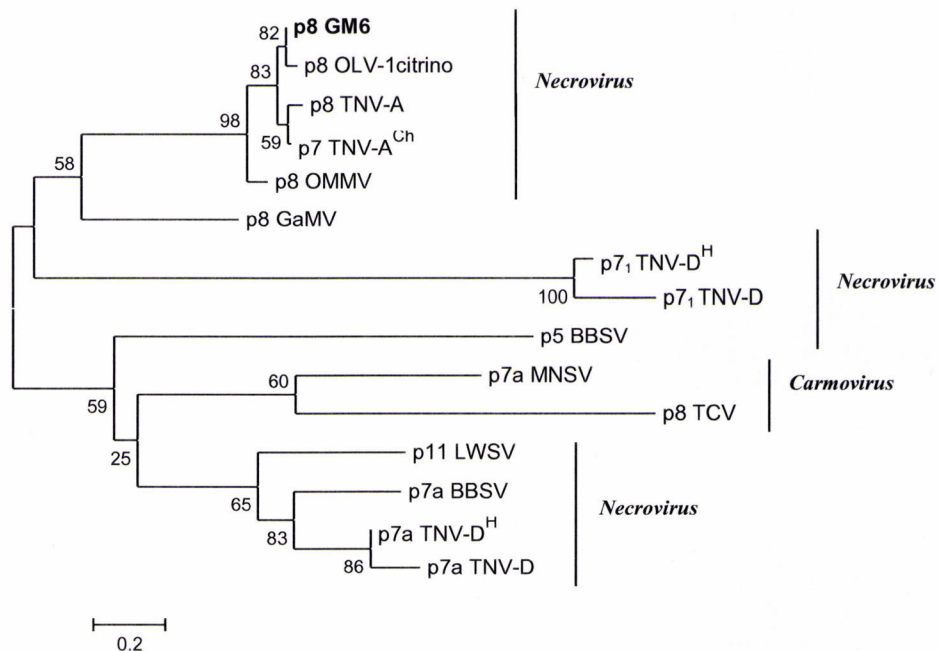
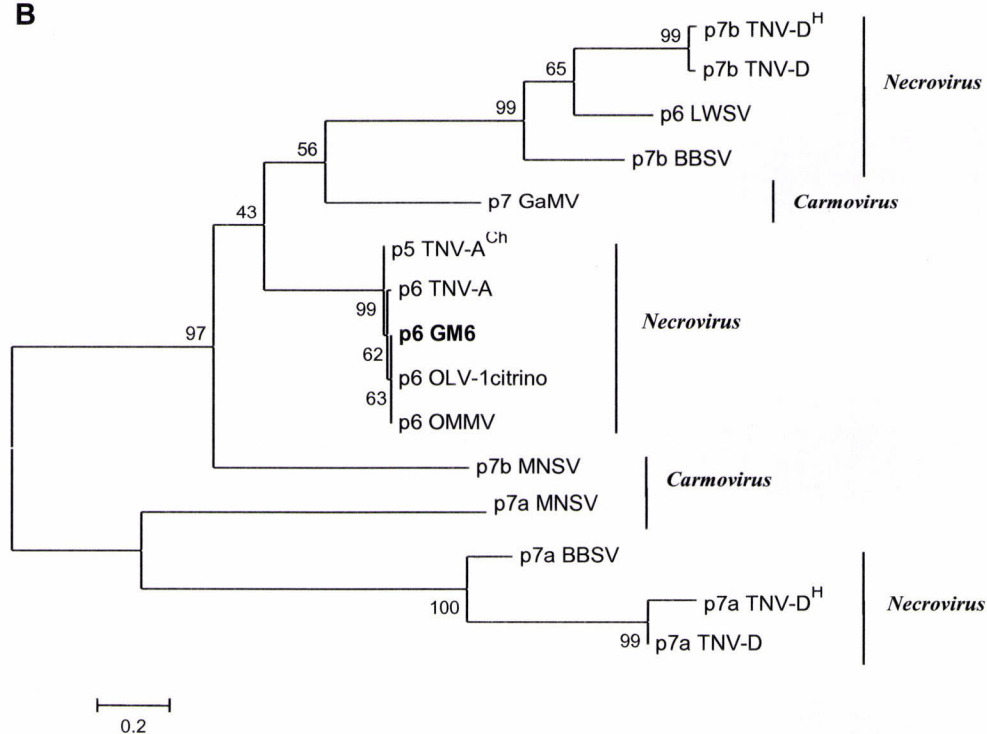
A**B**

Figura 25. Árvores filogenéticas obtidas por aplicação do método de Neighbour-Joining a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas p8 (A) e p6 (B), de GM6, com outras pequenas proteínas localizadas em zonas idênticas do genoma, de outros membros da família *Tombusviridae*. Os valores numéricos representam os 'bootstraps'.

2.8. Transmissão do isolado viral GM6 pelo solo

As plantas de *N. benthamiana* cultivadas durante 2 meses em solo onde anteriormente tinham crescido outras infectadas com o isolado GM6, não apresentaram nenhum tipo de sintomatologia, quer nas folhas quer nas raízes. No entanto, quando se inocularam extractos das suas raízes em outras plantas de *N. benthamiana*, estas reagiram com a formação de necroses locais (Figura 26 A), ao contrário das inoculadas com extractos de folhas que resultaram negativas. Em testes DAS-ELISA usando antisoro para o OLV-1, as amostras de raiz também revelaram valores de absorvância considerados positivos para a presença do vírus (Quadro XV). Um resultado concordante com esta identificação revelou-se com a aplicação do teste RT-PCR usando 'primers' específicos, que mostrou um produto amplificado, em gel de cerca de 750 pb, tamanho esperado para infecção por OLV-1 (Figura 26 B). As análises das folhas de *N. benthamiana* revelaram ausência do vírus em cada um dos três tipos de teste realizados.

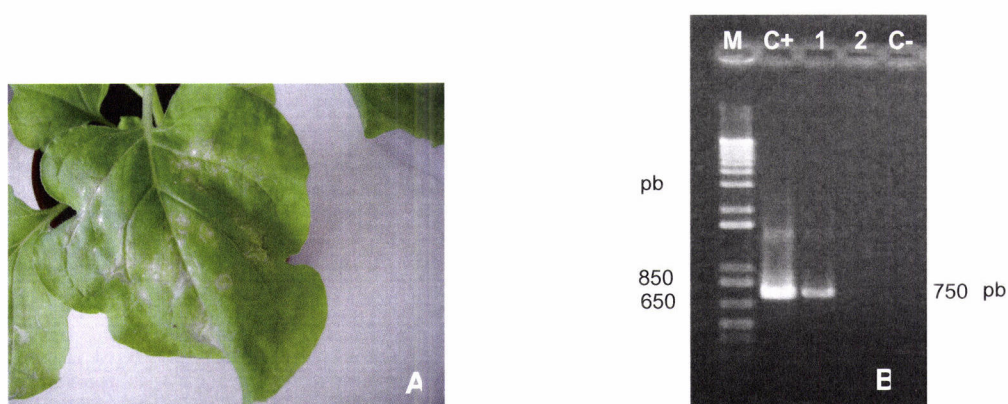


Figura 26. **A** – Planta de *N. benthamiana* revelando extensas necroses, após ter sido inoculada com raízes de *N. benthamiana* cultivada em solo contaminado com GM6. **B** – Análise electroforética em gel de agarose, em que se observam os produtos de amplificação resultantes de RT-PCR usando RNA total extraído de raízes (1) e folhas (2) de plantas de *N. benthamiana*. C+ - Controlo positivo; C- - Controlo negativo; M - 'RNA Ladder, High Range' (Fermentas).

Quadro XV. Valores das absorvâncias a 405 nm dos produtos da reacção do teste DAS-ELISA, para diagnóstico de OLV-1 (isolado G1A), aplicado a folhas e raízes de *N. benthamiana* cultivada em solo contaminado com GM6

	Folhas (D.O.)	Raízes (D.O.)	Controlo positivo (D.O.)	Controlo negativo (D.O.)
Experiência 1	0,198	2,212	2,318	0,145
Experiência 2	0,187	2,199	2,413	0,132

3. Técnicas para a detecção de OLV-1 e de TNV-D e/ou OMMV directamente em tecidos de oliveira

3.1. Análise das dsRNA

O teste de diagnóstico de vírus com genoma do tipo RNA, baseado no isolamento da fracção das dsRNA aplicou-se a tecidos de oliveira, ramos e frutos. A análise electroforética dos géis de agarose não permitiu visualizar nenhuma banda correspondente a dsRNA, mesmo nos casos em que se tinha verificado, que quando analisadas por outros testes as oliveiras estavam infectadas com OLV-1.

3.2. Reacção de amplificação por RT-PCR

3.2.1. Detecção de OLV-1

A aplicação do método de RT-PCR para o diagnóstico de OLV-1 em preparações de RNA total obtidas de ramos e frutos através do 'RNeasy Plant mini kit' (Qiagen), permitiu obter alguns resultados positivos, demonstrados pela presença da banda formada pelo produto amplificado, com o tamanho esperado de cerca de 750 pb, indicativa de infecção por OLV-1. A banda correspondente apareceu no gel com grande intensidade nas duas amostras de controlo positivo e foi também visível em amostras de frutos e de ramos da oliveira Galega vulgar árvore 1 da Herdade da Abóboda 1F e 1R, respectivamente (Figura 27). A banda correspondente à amostra 1F proveniente de frutos mostrou menor intensidade do que a correspondente à amostra 1R proveniente de ramos. As amostras 2F e 2R, correspondentes respectivamente a amostras de frutos e ramos, da oliveira Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada, não apresentaram a banda dos 750 pb. No entanto, esta oliveira também estava infectada com OLV-1, pois dela se tinha obtido o isolamento viral G2A, identificado como sendo OLV-1 por testes serológicos DAS-ELISA (ponto 1.1.).

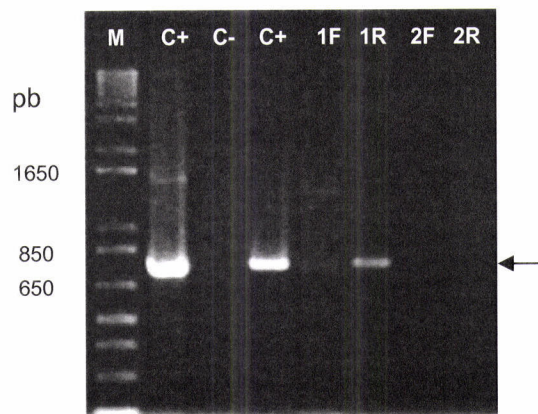


Figura 27. Detecção do vírus OLV-1 por RT-PCR usando RNA total extraído de *N. benthamiana* previamente inoculada com OLV-1 (C+), de ramos e de frutos de oliveiras da cultivar Galega vulgar árvore 1 (1R) e (1F), e árvore 2 (2R) e (2F). Controlo negativo da reacção de amplificação (C-), Marcador '1kb Plus DNA Ladder' (GIBCOBRL) (M). A seta indica a posição do produto de amplificação esperado para OLV-1 com cerca de 750 pb.

3.2.2. Detecção de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR 'single-step multiplex'

A detecção simultânea de OLV-1 e TNV-D e/ou OMMV por RT-PCR numa única reacção, mostrou resultados satisfatórios quando esta técnica foi aplicada a plantas de *N. benthamiana* previamente inoculadas com os vírus OLV-1 e OMMV. Pela observação do gel (Figura 28 A) podemos verificar que apesar de se observarem algumas bandas não específicas, principalmente na amostra do poço 1, a banda de cerca de 360 pb, correspondente à infecção por OMMV, aparece com grande intensidade. Quanto à detecção de OLV-1, apesar de se observar a presença de uma banda não específica, a banda esperada de cerca de 750 pb é muito intensa. A detecção simultânea dos dois vírus mostrou uma forte amplificação de ambos, tendo diminuído o número de bandas não específicas observadas anteriormente (Figura 28 A, poço 3).

Quando se aplicou esta técnica a material vegetal de oliveiras, que se sabia estarem infectadas com um ou ambos os vírus por testes de diagnóstico realizados anteriormente (pontos 1.1. e 1.2.), a análise por electroforese em gel de agarose revelou que uma infecção múltipla foi detectada apenas na amostra V10A (poço 3) (Figura 28 B). As amostras contidas nos poços 1 e 2, correspondentes aos produtos de amplificação de RNA total extraídos respectivamente de ramos das árvores Galega vulgar árvore 1 e árvore 2 da Herdade da Abóbada, confirmaram a presença de OLV-1. As amostras das árvores Galega vulgar árvore 5 (poço 4) e Verdeal Alentejana árvore 4 (poço 5), ambas da Herdade da Abóbada, não apresentaram qualquer banda indicativa de infecção viral, embora através de testes realizados anteriormente se soubesse que estas árvores estavam infectadas com OLV-1 (1.1. e 1.2.). Por fim, no poço 6, em que se amplificou o RNA total de ramos da árvore 8 da cv. Verdeal Alentejana da Herdade da Abóbada,

observou-se uma amplificação com cerca de 360 pb, correspondente à infecção por TNV-D e / ou OMMV.

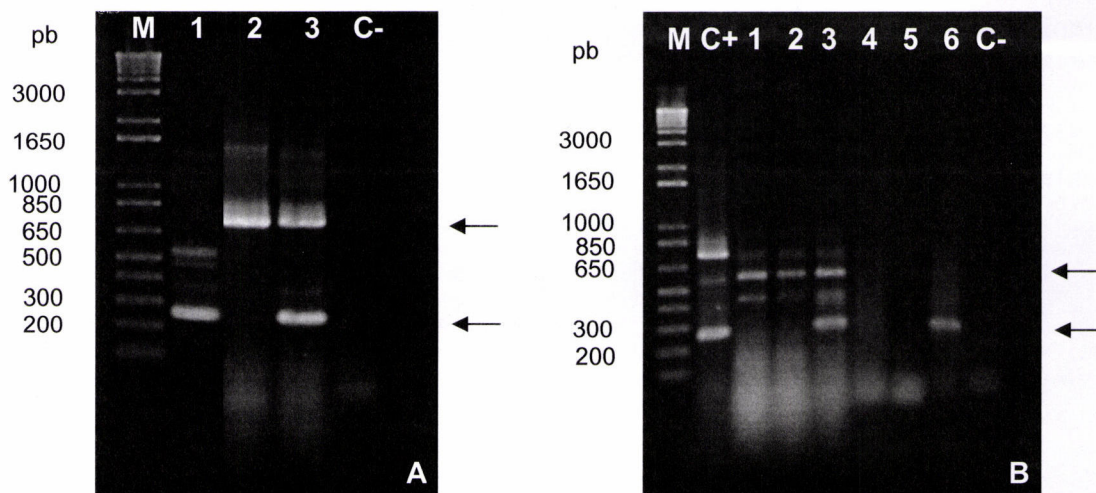


Figura 28. Detecção simultânea dos vírus OLV-1 e TNV-D por RT-PCR num passo. **A** – Gel de agarose onde se observa o resultado da reacção de amplificação obtida a partir do RNA total extraído de plantas de *N. benthamiana*. M - Marcador '1kb Plus DNA Ladder' (GIBCOBRL); 1 - *N. benthamiana* previamente inoculada com TNV-D; 2 - *N. benthamiana* infectada com OLV-1; 3 - *N. benthamiana* infectada com TNV-D e com OLV-1; C- - Controlo negativo do PCR. **B** – Gel de agarose onde se observa o resultado de uma reacção de amplificação em que se utilizou o RNA total extraído de ramos (R) de oliveira. M - Marcador '1kb Plus DNA Ladder' (GIBCOBRL); C+ *N. benthamiana* infectada com TNV-D e com OLV-1; 1 - Galega vulgar, árvore 1 da Herdade da Abóbada; 2 - Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada; 3 - Verdeal Alentejana, árvore 10 da Herdade da Abóbada; 4 - Galega vulgar, árvore 5 da Herdade da Abóbada; 5 - Verdeal Alentejana, árvore 4 da Herdade da Abóbada; 6 - Verdeal Alentejana, árvore 8 da Herdade da Abóbada, C- - controlo negativo do PCR. As setas indicam as bandas referentes aos produtos de amplificação de cerca de 750 pb (seta superior) e cerca de 360 pb (seta inferior).

3.2.3. RT-PCR usando dsRNA

As amostras de dsRNA extraídas de ramos de oliveira tal como descrito no ponto 3.1. e previamente desnaturadas, foram utilizadas como molde numa reacção de RT-PCR. Após a electroforese dos produtos de amplificação obtidos, a observação do gel de agarose (Figura 29) revelou que apenas o controle positivo (1) e as amostras do poço 2 (Galega vulgar, árvore 1 da Herdade da Abóbada) e do poço 3 (Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada) apresentaram a banda com o tamanho esperado de cerca de 750 pb indicadora de infecção com OLV-1. As amostras dos poços 4 e 5 (Galega vulgar, árvore 5 da Herdade da Abóbada e Verdeal Alentejana, árvore 10 da Herdade da Abóbada, respectivamente) revelaram-se negativas, apesar de já ter sido sugerido por outras análises que amostras destas mesmas árvores estavam infectadas com este vírus em outros testes de diagnóstico (pontos 1.1., 1.2. e 3.2.2.).

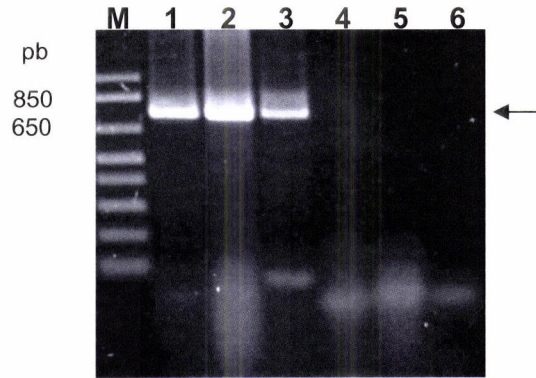


Figura 29. Detecção do vírus OLV-1 por RT-PCR usando dsRNA previamente desnaturado. 1 - dsRNA extraído de *N. benthamiana* infectada com OLV-1; 2 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 1 da Herdade da Abóbada; 3 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 2 da Herdade da Abóbada; 4 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Galega vulgar, árvore 5 da Herdade da Abóbada; 5 - dsRNA extraído de ramos da cultivar Verdeal Alentejana, árvore 10 da Herdade da Abóbada; 6 - Controlo negativo da reacção de amplificação; M - Marcador '1kb Plus DNA Ladder' (GIBCOBRL). A seta indica o produto de amplificação esperado de cerca de 750 pb.

V. Discussão

1. Caracterização do isolado GM6 e de outros isolados de OLV-1 obtidos de oliveira

Neste trabalho sequenciou-se pela primeira vez o genoma de um isolado de oliveira de OLV-1. O GM6, foi inicialmente escolhido para estes estudos por ter sido recuperado de oliveira, produzir abundantes sintomas nas plantas indicadoras herbáceas, das quais foi possível obter quantidades de vírus suficientes para as análises efectuadas que permitiram a sua caracterização detalhada. As características bioquímicas e serológicas deste isolado, nomeadamente morfologia, coeficiente de sedimentação em gradientes de densidade, massa molecular do péptido da cápside proteica, do RNA genómico e das dsRNA induzidas em plantas infectadas, revelaram-se idênticas às publicadas por outros autores (Gallitelli e Savino, 1985; Martelli *et al.*, 1996; Merciega *et al.*, 1996).

A sequência completa do genoma do isolado GM6 de oliveira tem 3702 nucleótidos, mais 3 do que o genoma do OLV-1 isolado de citrino (Grieco *et al.*, 1996) com o qual revela uma identidade de 95%. A organização do genoma do isolado GM6 apresenta 5 ORFs e o número de genes e a sua disposição são idênticas à do isolado de citrino e também à do outro necrovirus isolado de oliveira, o OMMV (Cardoso *et al.*, 2005).

No que se refere às extremidades não codificantes do genoma, verificou-se que a NCR 5' terminal dos isolados GM6 e de citrino, tem em ambos os casos 60 nucleótidos com um conteúdo idêntico de A+U (58,4%), consistente com as de outros vírus de plantas (Galli *et al.*, 1987), mas difere ligeiramente na percentagem de cada uma das bases: o genoma do isolado GM6 tem 36,7% de A, 23,3% de C, 18,3% de G e 21,7% de U e o de citrino tem 35% de A, 20% de C, 21,6% de G e 23,4% de U. A NCR 3' dos dois isolados é semelhante, mas o genoma do GM6 apresenta mais 3 nucleótidos terminais.

A proteína p23, codificada pela ORF1 do GM6 tem uma percentagem de identidade relativamente baixa de apenas 50,4% com a p23 do isolado de citrino (Grieco *et al.*, 1996). A proteína p82, codificada pela ORF2, resulta da leitura contínua do codão stop 'amber' UAG da ORF1, que é traduzido numa glutamina (Harrel *et al.*, 2002). Esta proteína foi identificada como uma RdRp com base na elevada percentagem de identidade com a RdRp do isolado de citrino (Grieco *et al.*, 1996) (97,3%), com base na presença do motivo altamente conservado GDD (Karmer e Argos, 1984; Argos, 1988) e na presença dos motivos estruturais A, B e C, responsáveis pela formação do centro

catalítico das RdRp (Poch *et al.*, 1989). Não foram no entanto encontrados outros motivos, o que está de acordo com o referido para os necrovirus por Hull (2002). Ambas as proteínas, p23 e p82, são funcionais na replicação de RNA, como foi demonstrado para o isolado de citrino (Pantaleo *et al.*, 1999) e também para outros membros da família *Tombusviridae*, como TCV (Hacker *et al.*, 1992) e CymRSV (Dalmay *et al.*, 1993).

A proteína p30, identificada como sendo a constituinte da cápside proteica, apresentou uma identidade da sequência de 98,5% com a da cápside do isolado de tília, diferindo apenas em 4 aminoácidos. Quando comparada, por alinhamento, com a da cápside do isolado de citrino verificou-se uma identidade, de apenas 87,7%, correspondente a uma diferença em 32 aminoácidos. Esta diferença, associada ao facto da proteína da cápside estar envolvida no movimento de longa distância dos vírus (Pantaleo *et al.*, 1999 e 2006), poderá ser responsável pela diferente sintomatologia causada em *N. benthamiana* pelos dois isolados, com o GM6 a provocar apenas lesões locais, enquanto o de citrino, e também um outro de oliveira italiano, provocarem lesões locais e sistémicas (Gallitelli e Savino, 1985; Merciega *et al.*, 1996; Martelli *et al.*, 1996).

Na pesquisa de domínios efectuada à sequência da cápside proteica do GM6, detectou-se o domínio S, com o padrão de consenso típico dos vírus de pequena dimensão, constituído por 26 aminoácidos entre os resíduos 135 e 160 (Falquet *et al.*, 2002). Contudo, observou-se uma diferença num aminoácido da 17^a posição daquela sequência. Nesta posição, tanto no isolado GM6 como nos de citrino (Grieco *et al.*, 1996) e de tília (Kanematsu *et al.*, 2001) encontra-se o aminoácido leucina. Por esta razão, propomos a sua introdução na 17^a posição daquela sequência assinatura dos vírus de plantas de pequena dimensão, passando esta a ser enunciada da seguinte forma: ([FYW]-x-[PSTA]-x(7)-G-x-[LIVM]-x-[LIVM]-x-[FYWIL]-x(2)-D-x(5)-P). Os resíduos de ligação ao Ca²⁺ detectados no domínio S da cápside do isolado GM6, são conservados, observando-se também no isolado de citrino (Grieco *et al.*, 1996) e no OMMV (Cardoso *et al.*, 2004).

As proteínas menores, p8 e p6, codificadas pelo RNA genómico de GM6 foram consideradas funcionais no movimento da partícula viral de célula para célula, por analogia, tendo em conta as elevadas percentagens de identidade com as homólogas do isolado de citrino, 93,2% e 100%, respectivamente.

As percentagens de identidade entre as proteínas codificadas pelo genoma de GM6 com as de idêntica função codificadas pelos genomas de outros *Tombusviridae*, indicam que as proteínas p82, p8 e p6 tem uma maior identidade com as homólogas do carmovirus GaMV do que com as dos necrovirus TNV-D, LWSV e BBSV. Este facto poderá dever-se às características do GaMV que se considera ser um vírus recombinante entre necrovirus e tombusvirus, como foi sugerido por Ciuffreda *et al.* (1998). A análise

filogenética daquelas proteínas, revelou uma consistente divisão dos necrovirus em dois grupos distintos. Um grupo que engloba os isolados de OLV-1 GM6, de citrino, OMMV e os isolados de TNV-A, e outro grupo, que engloba LWSV, BBSV e os isolados de TNV-D. Estes resultados estão em concordância com outros anteriores que mostram que os necrovirus LWSV e BBSV têm uma maior identidade e estão mais próximos filogeneticamente, do TNV-D, do que de qualquer outro necrovirus (Cao *et al.*, 2002; Lot *et al.*, 1996). Esta separação dos necrovirus reflecte as diferenças encontradas nos genomas virais dos necrovirus comparados, e é consistente com a separação dos isolados TNV-A dos de TNV-D baseados nas propriedades dos TNV-A suportarem a replicação do vírus satélite de TNV ao contrário dos TNV-D. Isto contraria em definitivo o conceito histórico de se considerarem TNV todos os vírus capazes de induzir necroses locais, mas não sintomas sistémicos em plantas de tabaco (Stuart *et al.*, 2004).

O OMMV surge filogeneticamente muito próximo do OLV-1 e do TNV-A, principalmente na região da RdRp, correspondente à p82, e tem uma identidade com a região homóloga relativa aqueles vírus de 91,2% e de 90,7%, respectivamente. Já no que diz respeito à sequência da cápside proteica, o OMMV surge num ramo da árvore filogenética junto do TNV-D com o qual tem uma identidade de 86,2%. Estes dados suportam a possibilidade anteriormente avançada do OMMV ser um vírus recombinante entre OLV-1 (ou TNV-A) e TNV-D (Cardoso *et al.*, 2005). Também o GaMV, provável vírus recombinante, aparece num ramo filogenético muito próximo dos necrovirus nomeadamente do grupo que engloba os isolados de TNV-A, OLV-1 de citrino, OMMV e o isolado de OLV-1, GM6, de oliveira.

Deverá notar-se no entanto que o OLV-1, apesar de filogeneticamente próximo do TNV-A no que se refere aos vários produtos dos seus genes, são distintos na organização, número e arranjo, dos respectivos genomas.

Os fenómenos de recombinação entre moléculas de RNA são frequentes durante o processo de replicação viral e constituem uma importante via de evolução (Lai, 1992; Cheng e Nagy, 2003; Froissart *et al.*, 2005). Os mecanismos de recombinação mais frequentemente usados pelos vírus com genoma RNA são: i) 'Copy-choice', em que a enzima RdRp muda de RNA molde durante o processo de síntese do RNA complementar (cRNA) para outra molécula de RNA receptora, utilizando-a como novo molde prosseguindo a síntese de cRNA e ii) 'Quebra e ligação' ('breakage and ligation') no qual, após quebra de moléculas diferentes de RNA ocorre a ligação entre fragmentos de diferente origem e a conseqüente formação de novas moléculas de RNA, eventualmente funcionais (Cheng e Nagy, 2003). A recombinação, seja qual for o mecanismo, pode originar extensas deleções relativamente à sequência nucleotídica da molécula de RNA genómica original, resultando na formação de moléculas mais pequenas, RNAs subvirais,

e que dependem da replicase viral para a sua própria replicação mediante a síntese das respectivas dsRNAs. Aquelas moléculas subvirais são chamadas 'defective interfering' (DI) RNA se interferirem com a replicação do RNA viral alterando a expressão dos sintomas nas plantas, caso contrário são chamadas apenas 'defective' (D) RNA e, se forem encapsidadas, chamam-se vírus 'defective' (Ayllón *et al.*, 1999; Hull, 2002; White e Nagy, 2004). A análise de dsRNAs induzidas pelo isolado GM6 em tecidos de *N. benthamiana* não revelou quaisquer moléculas de dsRNA para além das 3 com os tamanhos de cerca de 3700 pb, 1500 pb e 1300 pb, idênticas às isoladas por Merciega *et al.* (1996) de plantas infectadas com OLV-1. Estas moléculas correspondem, a primeira, ao genoma inteiro encapsidado e as outras duas mais pequenas às formas replicativas dos RNAs subgenómicos sg1 e sg2. O RNA sg1 é bicistrónico, codifica os polipeptídeos p8 e p6 e o RNA sg2 é monocistrónico e contém o gene da cápside proteica (Pantaleo *et al.*, 1999). A presença de DI e D RNAs são relativamente comuns em infecções causadas por *Tombusviridae* especialmente tombusvirus como é o caso do TBSV, TCV e CymRSV (Burgyan *et al.*, 1989; Hull, 2002), mas neste estudo, não foram pesquisadas as populações de ssRNA nos tecidos infectados, com características de DI ou D RNAs.

A recombinação ocorre com mais frequência no decurso da replicação de vírus taxonomicamente próximos que apresentem características comuns, como é o caso dos géneros *Carmovirus* e *Tombusvirus*, ambos pertencentes à família *Tombusviridae* (Cheng e Nagy, 2003). Os vírus OLV-1, TNV-A e TNV-D são membros desta família, o que confere suporte à proposta do OMMV ser um novo vírus proveniente da recombinação dos necrovirus detectados em oliveira. Além das características genéticas e biológicas comuns, aqueles necrovirus ocorrem muitas vezes simultaneamente numa mesma oliveira, no campo, o que torna ainda mais plausível que o OMMV resulte de um fenómeno de recombinação. A ocorrência de infecções mistas em oliveira, com OLV-1 e TNV (*l. s.*) ficou demonstrada neste estudo, quando por exemplo, os isolados virais obtidos deste hospedeiro, designados VA10 e A1P2, reagiram positivamente com os dois antisoros específicos para aquelas espécies virais. No entanto, e neste caso poderemos também estar em presença de vírus com cápsides mistas, isto é, com subunidades de OLV-1 e de (TNV *l. s.*), que é um fenómeno que ocorre com alguma frequência na natureza, apesar de ser dificilmente detectado por testes ELISA (Creamer e Falk, 1990).

Para além do isolado GM6, foi feita uma caracterização breve dos 23 isolados virais obtidos de oliveira. Estes isolados apresentaram, após inoculação mecânica, uma gama de hospedeiros herbáceos susceptíveis e sintomatologias muito semelhantes entre si. Além disso, as propriedades físicas (sedimentação em gradientes de densidade) e bioquímicas (massa molecular da cápside proteica e do RNA viral) sugeriam tratar-se de

necrovirus (dados não apresentados). Para efectuar uma primeira distinção entre eles, foram realizados testes DAS-ELISA, com antisoros específicos para OLV-1 e para uma larga gama de TNV (*l. s.*). Apesar do pequeno número de isolados virais estudados, aparenta haver alguma predominância de OLV-1 (14 isolados obtidos de 16 árvores testadas) nos olivais do Sul de Portugal, nomeadamente do Alentejo, enquanto que TNV (*l. s.*) (5 isolados obtidos de 7 árvores testadas) mostra maior predominância no Norte do País. Resultado idêntico foi obtido por Varanda (2005), quando testou por RT-PCR, um campo de 161 clones da cultivar Negrinha de Freixo, no Norte do País e encontrou 34 árvores infectadas com TNV-D e/ou OMMV e apenas 1 com OLV-1.

O antisoro utilizado, nestes estudos, em DAS-ELISA para o diagnóstico de TNV é uma mistura artificial de antisoros específicos para cada uma das várias espécies e isolados deste vírus, o que não nos permite identificar a espécie ou serotipo de cada isolado em estudo, que poderão ser TNV-A, TNV-D ou OMMV. Este último vírus também reage serologicamente com o antisoro para TNV (*l. s.*) em concordância com o facto da sua cápside proteica ser muito semelhante à do TNV-D, como referido anteriormente.

Dos 18 isolados obtidos de oliveira e serologicamente identificados como OLV-1, 17 foram analisados por RT-PCR 'single-step' e 15 apresentaram o produto de amplificação esperado. Os outros dois, o V4A e o A4P2, não originaram qualquer produto de amplificação, em várias reacções de RT-PCR, feitas com RNA molde obtido de diferentes extracções. Este resultado é muito interessante sugerindo que o genoma encapsidado difere consideravelmente do de OLV-1. A confirmar-se, aqueles dois isolados poderão ter resultado de i) um fenómeno de transencapsidação, como descrito para alguns vírus, em casos de infecções mistas, como é o exemplo de algumas estirpes de *Barley yellow dwarf virus* (Creamer e Falk, 1990), ou ii) mutações na sequência genómica no local de hibridação dos 'primers' usados na reacção de RT-PCR, impossibilitando a sua amplificação. Também Fonseca *et al.* (2005) verificaram que alguns isolados virais serologicamente identificados como *Prune dwarf virus* (PDV) quando sujeitos a IC/RT-PCR não produziam o produto de amplificação esperado sugerindo que o genoma encapsidado nas partículas não seria típico do PDV. A ocorrência de mutações no genoma de vírus com RNA é muito frequente e resulta da incapacidade de a RNA polimerase corrigir os erros cometidos durante a replicação molecular, originando o aparecimento de variantes genéticas dos vírus parentais (Vives *et al.*, 2002; Elena e Sanjuán, 2005). Segundo Holland e Domingo (1998) as taxas de mutação de um nucleótido, num genoma de RNA, pode variar entre 10^{-3} e 10^{-5} por cada 10 kb. Este facto origina misturas de vírus com genomas mutantes nos tecidos infectados diferindo uns dos outros num ou em vários nucleótidos e dando origem a uma população viral formada por *quasispecies* (Roossinck, 1997; Holland e Domingo, 1998; Hull, 2002).

A análise de SSCP demonstra uma grande sensibilidade para a detecção de mutações pontuais e diferentes polimorfismos de moléculas de DNA (Orita *et al.*, 1989) de tamanhos que podem ser superiores a 700 nts (Rubio *et al.*, 1996). Os resultados obtidos neste estudo relativamente à análise de SSCP dos produtos amplificados por reacções de RT-PCR aplicados aos isolados de OLV-1, sugerem, apesar do número relativamente reduzido de isolados analisados, a natureza de *quasispecies* deste vírus, tal como conceptualizado por Roossinck (1997). Vários dos isolados originaram mais do que um padrão de SSCP, com várias conformações estáveis das moléculas dos amplificados o que pode corresponder à presença de diferentes variantes na mesma árvore. Este tipo de observação ocorre com muita frequência em plantas lenhosas e instaladas no terreno durante muitos anos (D' Urso *et al.*, 2003) como é o caso da oliveira. Por outro lado, isolados obtidos de oliveiras contíguas, como é o caso dos G1A e G2A, apresentam padrões de SSCP diferentes. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Fadel *et al.* (2005) e Essakhi *et al.* (2006) em análises de SSCP realizadas com isolados de OLYaV obtidos de oliveiras de campo. Também D' Urso *et al.* (2003) e Turturo *et al.* (2005), nos seus estudos com os vírus *Citrus tristeza virus* e *Grapevine leaf roll associated virus 3*, respectivamente, não encontraram nenhuma correlação entre a localização geográfica e os padrões de SSCP relativos aos amplificados correspondentes aqueles vírus e observaram uma ampla variabilidade de isolados em plantas cultivadas dentro da mesma parcela.

A variabilidade dos padrões electroforéticos de SSCP dos produtos amplificados podem também corresponder à presença nos tecidos infectados de moléculas de DI ou D RNA, uma vez que as reacções de RT-PCR incidiram sobre fracções de RNA total das plantas infectadas e os 'primers' usados permitem uma amplificação de uma região relativamente pequena, de cerca de 750 nts.

2. Epidemiologia de OLV-1

As partículas virais do isolado GM6 são libertadas para o solo pelas raízes das plantas infectadas, ou por decomposição das raízes destas, e aí permanecem viáveis pelo menos durante 8 semanas. Adicionalmente têm a capacidade de, através do solo infectar raízes de plantas de *N. benthamiana* na ausência de um vector biológico, tal como referido por Martelli *et al.* (1996) para o isolado de citrino de OLV-1 em plantas de *V. unguiculata*. Estas observações mostram que o solo pode actuar como um reservatório de partículas virais, o que é um factor de grande importância na epidemiologia do OLV-1,

principalmente se se verificar na cultura da oliveira, com importantíssimas implicações nas actividades de multiplicação de estacas em viveiros, e de mobilização de terrenos dos olivais. Este facto pode ter contribuído significativamente para a grande dispersão deste vírus no campo demonstrando ser um vírus muito bem adaptado a diferentes ambientes, regiões e culturas, encontrando-se presente em hospedeiros tão diversos como a oliveira, a tília e os citrinos. Também a sua transmissão por semente (Saponari *et al.*, 2002b) terá certamente facilitado a sua dispersão em muitos países olivícolas, tais como, Itália, Portugal, Jordânia, Turquia, Líbano e Síria, onde em épocas mais remotas, a propagação da oliveira se fazia por semente e a selecção posterior de genótipos com interesse, ainda hoje, incide sobre essas árvores. Actualmente, em algumas regiões, nomeadamente no Sul de Itália, a propagação da oliveira ainda se faz por enxertia, usando porta enxertos originados de semente proveniente de variedades de fácil enraizamento e resistentes ou tolerantes a solos e condições mais desfavoráveis.

3. Diagnóstico de OLV-1, TNV-D e/ou OMMV directamente de tecidos de oliveira

A análise por electroforese em gel das dsRNA extraídas de tecidos de oliveira, nas nossas condições, revelou que por si só, não constitui um método de diagnóstico fiável para a detecção de vírus neste hospedeiro. Os resultados geralmente obtidos foram sempre negativos, apesar de se saber, por outros tipos de testes, que as árvores utilizadas estavam infectadas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Varanda (2005), mas diferem dos de outros autores que obtiveram elevadas taxas de infecção quando analisaram as dsRNA extraídas de material vegetal de oliveira (Martelli *et al.*, 1999; Grieco *et al.*, 2000a; b; Saponari *et al.*, 2001). Uma explicação possível para esta discrepância na sensibilidade deste método poderá residir no facto de termos testado predominantemente frutos em vez de ramos e / ou a presença de polissacáridos ou de pigmentos dos frutos, possa ter impedido a extracção correcta das dsRNA e contribuído para a não visualização de bandas de dsRNA nos géis (Alkowni, 2000). Também a utilização, neste trabalho, de géis de agarose em vez de poliacrilamida e da coloração com brometo de etídio em vez de nitrato de prata, pode ter contribuído para uma perda de resolução no que diz respeito à presença de moléculas de dsRNA pouco concentradas. Apesar de inúmeras vezes se ter tentado utilizar este método de coloração do gel, este nunca funcionou satisfatoriamente.

No entanto, estas preparações da fracção de dsRNA isolada de tecidos de oliveira, quando usadas em reacções de RT-PCR, utilizando os 'primers' específicos para

OLV-1, originaram resultados positivos em amostras que tinham dado resultados negativos por análise prévia por electroforese em gel. Estes resultados demonstram que a quantidade de dsRNA extraída não era suficiente para a sua visualização em gel e que os cerca de 20 g, de material vegetal de oliveira utilizados para a extracção são claramente insuficientes. A utilização de dsRNA, como molde em reacções de RT-PCR apresenta importantes vantagens, i) as moléculas de dsRNA têm uma maior estabilidade do que as de ssRNA e não necessitam de muitos cuidados anti-RNase, ii) evita o recurso a kits de extracção de RNA total, que são normalmente muito caros e iii) as amostras de dsRNA podem ser guardadas por longos períodos de tempo, o que permite realizar vários testes utilizando sempre a mesma amostra de RNA (Nolasco *et al.*, 2000). Assim, a fracção de dsRNA, poderá, com vantagem, ser adoptada em testes de rotina, para diagnóstico viral, baseados em RT-PCR.

Os testes baseados em RT-PCR têm elevada especificidade e sensibilidade, e têm mostrado ser o meio de diagnóstico mais fiável, principalmente para vírus de plantas lenhosas. Com a aplicação destes para a detecção de OLV-1 obtiveram-se resultados positivos tanto utilizando amostras de ramos como de frutos. No entanto, o produto de amplificação de OLV-1 a partir de frutos é menos concentrado do que a partir de ramos. Isto sugere que a concentração viral é superior nos ramos do que nos frutos, ou que os frutos contêm algumas substâncias que interfiram na reacção de PCR (De Nino *et al.*, 1997; Wilson, 1997).

Os testes de RT-PCR 'single-step', que permitem uma economia de tempo, também possibilitam a detecção de OLV-1 em plantas de *N. benthamiana* infectadas. No entanto, este teste não foi aplicado a plantas de oliveira, por se ter dado preferência à optimização do RT-PCR 'single-step multiplex' para a detecção simultânea dos necrovirus que infectam a oliveira. Este teste reduz o tempo necessário para o diagnóstico e o custo em reagentes e permitiu-nos diagnosticar infecções mistas e simples. Contudo, a sua aplicação não detectou algumas infecções em amostras, que por outros estudos, se sabiam estarem infectadas, situação que se está actualmente a investigar.

Os resultados obtidos com este trabalho mostraram que os testes de RT-PCR são mais eficientes para o diagnóstico viral em plantas lenhosas, apesar de algumas discrepâncias encontradas. Os falsos negativos obtidos, quer nos testes de análise de dsRNA, quer nos baseados em RT-PCR, podem ser justificados pela irregular distribuição dos vírus em plantas lenhosas e pela variação da concentração viral ao longo do ano (Martelli, 2000). Estas observações determinam que, para um correcto diagnóstico viral em plantas lenhosas, como a oliveira, seja tomada para análise, uma amostra composta por órgãos provenientes dos vários quadrantes da árvore, em diferentes épocas do ano e preferencialmente em mais do que um ano.

4. Perspectivas futuras

De entre as linhas de investigação futura abertas no decorrer do presente trabalho, surgem como prioritárias a análise genómica detalhada de alguns isolados virais, cujo comportamento se revelou diferente do esperado. Esses isolados podem reunir-se em dois grupos: i) os que se revelaram serologicamente reactivos com o antisoro para OLV-1, mas cujas reacções de RT-PCR não os identificaram como pertencentes a essa espécie, e ii) os que reagiram serologicamente em simultâneo com os antisoros para OLV-1 e TNV (*l. s.*). A ocorrência de fenómenos de recombinação genética, como os que originaram OMMV, facilitada pelas infecções mistas várias vezes observadas e justificadas até certo ponto pela variabilidade dos padrões de SSCP, poderá ser esclarecida.

Também neste estudo, se demonstrou a transmissão pelo solo e na ausência de vectores biológicos, do isolado GM6, a plantas de *N. benthamiana*. Neste momento, estão em curso trabalhos sobre a transmissão deste isolado de OLV-1 a plantas de oliveira.

VI. Bibliografia

- Adams, M.J. (1991). Transmission of plant virus by fungi. *Annals of Applied Biology*, **118**, 479-492.
- Al Abdullah, A.; T. El Beaino; M. Saponari; H. Hallak; M. Digiario (2005). Preliminary evaluation of the status of olive-infecting viruses in Syria. *Bulletin OEPP/EPPO*, **35**, 249-252.
- Alkowni, R. (2000). *Development and application of molecular diagnosis for detection of olive-infecting viruses and molecular characterization of olive latent ringspot virus (OLRSV)*. Ph.D. Thesis, Università degli Studi di Bari, 108 pp.
- Alkowni, R.; F. Grieco; G.P. Martelli (2001). Complete nucleotide sequence of RNA-2 of *Olive latent ringspot virus*. *Archives of Virology*, **146**, 127-133.
- Altschul, S.F.; T.L. Madden; A.A. Schäffer; J. Zhang; Z. Zhang; W. Miller; D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search Programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3340.
- Argos, P. (1988). A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9909-9916.
- Ayllón, M.A.; C. López; J. Navas-Castillo; M. Mawassi; W.O. Dawson; J. Guerri; R. Flores; P. Moreno (1999). New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven templates switching mechanism in their generation. *Journal of General Virology*, **80**, 817-821.
- Babos, P.; B. Kassanis (1963). Serological relationships and some properties of Tobacco necrosis virus strains. *Journal of General Microbiology*, **32**, 135.
- Bertolini, E.; A. Olmos; M.C. Martínez; M.T. Gorris; M. Cambra (2001). Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, **96**, 33-41.

- Bertolini, E.; A. Olmos; M.M. López; M. Cambra (2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, **93**, 286-292.
- Bertolini, E.; Z. Fadda; F. Garcia; B. Celada; A. Olmos; M.T. Gorris; C. Del Rio; J. Caballero; N. Duran-Vila; M. Cambra (1998). Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma*, **102**, 191-193.
- Burgyan, J.; F. Grieco; M. Russo (1989). A defective interfering RNA molecule in *Cymbidium* ringspot virus infections. *Journal of General Virology*, **70**, 235-239.
- Cao, Y.; Z. Cai; Q. Ding; D. Li; C. Han; J. Yu; Y. Liu (2002). The complete nucleotide sequence of Beet black scorch virus (BBSV), a new member of the genus *Necrovirus*. *Archives of Virology*, **147**, 2431-2435.
- Cardoso, J.M.S.; M.R. Félix; M.I.E. Clara; S. Oliveira (2005). The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L.. *Archives of Virology*, **150**, 815-823.
- Cardoso, J.M.S.; M.R. Félix; S. Oliveira; M.I.E. Clara. Utilização da técnica RT-PCR para diagnóstico dos necrovirus OLV-1 e TNV em *Olea europaea* L.. *Revista das Ciências Agrárias (não publicado)*.
- Cardoso, J.M.S.; M.R. Félix; S. Oliveira; M.I.E. Clara (2004). A *Tobacco necrosis virus D* isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Archives of Virology*, **149**, 1129-1138.
- Castellano, M.A.; A. Di Franco; G.P. Martelli (1987). Electron microscopy of two olive viruses in host tissues. *Journal of Submicroscopic Cytology*, **19**, 495-508.
- Cheng, C.P.; P.D. Nagy (2003). Mechanism of RNA Recombination in Carmo- and Tombusviruses: Evidence for Template Switching by the RNA-Dependent RNA Polymerase In Vitro. *Journal of Virology*, **77**, 12033-12047.
- Ciuffreda, P.; L. Rubino; M. Russo (1998). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of galinsoga mosaic genomic RNA. *Archives of Virology*, **143**, 173-180.

- Clara, M.I.E.; F. Rei; M.R. Félix; F.A. Leitão; J.F. Serrano; M.F. Potes (1997). Viruses affecting *Olea europaea* L. crop and diagnostic techniques. *Olivae*, **66**, 56-60.
- Clark, M.F.; A.M. Adams (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, **34**, 475-483.
- Corte, A.; R. Ciferri; D. Rui (1961). Infezioni su ligustro da malformazioni foliari dell' olivo. *Rivista di Patologia Vegetale*, **S. III 1**, 251-260.
- Creamer, R.; B.W. Falk (1990). Direct detection of transcapsidated barley yellow dwarf luteoviruses in doubly infected plants. *Journal of General Virology*, **71**, 211-217.
- D' Urso, F.; A. Sambade; A. Moya; J. Gerri; P. Moreno (2003). Variation of haplotype distributions of two genomic regions of *Citrus tristeza virus* populations from eastern Spain. *Molecular Ecology*, **12**, 517-526.
- Dalmay, T.; L. Rubino; J. Burgyán; A. Kollár; M. Russo (1993). Functional Analysis of Cymbidium ringspot virus genome. *Virology*, **194**, 697-704.
- De Nino, A.; N. Lombardo; E. Perri; A. Procopio; A. Raffaelli; G. Sindona (1997). Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 533-541.
- Di Franco, A.; G.P. Martelli; M. Russo (1983). Na ultrastructural study of Olive latent ringspot virus in *Gomphrena globosa*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, **15**, 539-548.
- Diener, T.O.; I.R. Schneider (1968). Virus degradation and nucleic acid release in single-phase phenol systems. *Archives Biochemistry and Biophysics*, **124**, 401-412.
- Dodds, J.A.; T.J. Morris; R.L. Jordan (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, **22**, 151-168.

- El Beaino, T.; M. Saponari; A. Minafra; M.A. Castellano; V. Savino; G.P. Martelli (2005). Further data on olive leaf yellowing-associated virus. *Journal of Plant Pathology*, **87**, 223-228.
- Elena, S.F.; R. Sanjuán (2005). Adaptive Value of High Mutation Rates of RNA Viruses: Separating Causes from Consequences. *Journal of Virology*, **79**, 11555-11558.
- Essakhi, S.; T. El Beaino; D. Digiario; M. Saponari; G.P. Martelli (2006). Nucleotide sequence variations in the HSP70 gene of Olive leaf yellowing-associated virus. *Journal of Plant Pathology*, **88**, 285-291.
- Fadel, C.; M. Digiario; E. Choueiri; T. El Beaino; M. Saponari; V. Savino; G.P. Martelli (2005). On the presence and distribution of olive viruses in Lebanon. *Bulletin OEPP/EPPO*, **35**, 33-36.
- Faggioli, F.; L. Ferretti; G. Albanese; R. Sciarroni; G. Pasquini; V. Lumia; M. Barba (2005). Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, **87**, 49-55.
- Faggioli, F.; L. Ferretti; G. Pasquini; M. Barba (2002). Detection of Strawberry latent ring spot virus in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, **150**, 636-639.
- Faggioli, F.; M. Barba (1995). An elongated virus isolated from olive (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, **386**, 593-599.
- Falquet, L.; M. Pagni; P. Bucher; N. Hulo; C.J. Sigrist; K. Hofman; A. Bairoch (2002). The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research*, **30**, 235-238.
- FAO (2006). <http://apps3.fao.org/wIEWS/olive/intro.jsp>
- Félix, M.R. (1998). Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L. na perspectiva de programas de selecção sanitária da oliveira. Tese de Mestrado em Melhoramento de Plantas. Universidade de Évora, 57 pp.

- Félix, M.R.; M.I.E. Clara (1998). Características biológicas e bioquímicas da estirpe G1, do Necrovirus Olive laten 1 isolado de *Olea europaea* L.. In: *Actas da 2ª Reunião Bienal da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, p. 67.
- Félix, M.R.; M.I.E. Clara (2001). Detection of *Tobacco necrosis virus* and of *Olpidium brassicae* in *Olea europaea* L. in soil and in field trees. In: *Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 40-42.
- Félix, M.R.; M.I.E. Clara (2002). Two Necrovirus isolates with properties of *Olive latent virus 1* and of *Tobacco necrosis virus* from olive in Portugal. *Acta Horticulturae*, **586**, 725-728.
- Félix, M.R.; M.I. Clara; F. Leitão; J. Serrano (2002). Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. *Acta Horticulturae*, **586**, 721-724.
- Félix, M.R.; T.M. Louro; M.I. Clara; F. Leitão; J. Serrano (2001). Preparation and application of an ELISA kit to identify *Olive latent virus 1* isolates obtained from *Olea europaea* L. Cultivars grown in Portugal. In: *Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 214-216.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstraps. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Foissac X.; L. Svanella-Dumas; P. Gentit; M.J. Dulucq; T. Candresse (2001). Polyvalent detection of fruit trees Tricho-, Capillo-, and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (DOP RT-PCR). *Acta Horticulturae*, **550**, 37-43.
- Fonseca, F.; J.D. Neto; V. Martins; G. Nolasco (2005). Genomic variability of prune dwarf virus as affected by agricultural practice. *Archives of Virology*, **150**, 1607-1619.
- Frohman M.A, M.K. Dush; G. Martin (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **85**, 8998-9002.

- Froissart, R.; D. Roze; M. Uzest; L. Galibert; S. Blanc; Y. Michalakis (2005). Recombination Every Day: abundant Recombination in a Virus during a Single Multi-Cellular Host Infection. *PLoS Biology*, **3**, 389-395.
- Gallie, D.R.; D.E. Sleat; J.W. Watts; P.C. Turner; T.M.A. Wilson (1987). A comparison of eucariotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Research*, **15**, 8693-8711.
- Gallitelli, D.; V. Savino (1985). Olive latent virus 1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annual of Applied Biology*, **106**, 295-303.
- Grieco, F.; G. Parrella; C. Vovlas (2002). An isolate of olive latent virus 2 infecting castor bean in Greece. *Journal of Plant Pathology*, **84**, 129-131.
- Grieco, F.; G.P. Martelli; V. Savino (1995). The nucleotide sequence of RNA3 and RNA4 of Olive Latent virus 2. *Journal of General Virology*, **76**, 929-937.
- Grieco, F.; G.P. Martelli; V. Savino; P. Piazzolla (1992). Properties of Olive Latent virus 2. *Rivista di Patologia Vegetal S.V.*, **2**, 125-136.
- Grieco, F.; M. Dell' Orco; G.P. Martelli (1996a). The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of Olive Latent virus 2 and its relationships in the family *Bromoviridae*. *Journal of General Virology*, **77**, 2637-2644.
- Grieco, F.; M. Saponari; R. Alkowni; V. Savino; G.P. Martelli (2000a). Progressi nella diagnosi dei virus dell' olivo. *Informatore Fitopatologico*, **11**, 49-52.
- Grieco, F.; R. Alkowni; M. Saponari; V. Savino; G.P. Martelli (2000b). Molecular detection of olive viruses. *Bulletin OEPP/EPPO*, **30**, 469-473.
- Grieco, F., V. Savino; G.P. Martelli (1996b). Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of olive latent virus 1. *Archives of Virology*, **141**, 825-838.
- Gunasinghe, U.B.; T.L. German (1988). Detection of viral RNA in mealybugs associated with mealybug-wilt of pineapple. *Phytopathology*, **78**, 1584.

- Hacker, D.L.; I.T.D. Petty; N. Wei; T.J. Morris (1992). Turnip crinckle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, **186**, 1-8.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Harrel, L.; U. Melcher; J.F. Atkins (2002). Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons. *Nucleic Acids Research*, **30**, 2011-2017.
- Henriques, M.I.C. (1994). Virus diseases of olive: an overlook. *Acta Horticulturae*, **356**, 379-385.
- Henriques, M.I.C.; F.T. Rei; F.A. Leitão; J.F. Serrano; M.F. Potes (1992). Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of *Strawberry latent ringspot nepovirus*. *Phytopathologia Mediterranea*, **31**, 127-132.
- Holland, J.; E. Domingo (1998). Origin and Evolution of Viruses. *Virus Genes*, **16**, 13-21.
- Hull, R. (2002). Nomenclature and classification of plant viruses pp.13-45. In: *Plant Virology*. Academic Press, London, UK.
- Invitrogen (2001). Zero Background™ /Kan Cloning Kit, Version I, Instruction Manual.
- Kanematsu, S.; Y. Taga; T. Morikawa (2001). Isolation of Olive latent virus 1 from tulip in Toyama Prefecture. *Journal of General Plant Pathology*, **67**, 333-334.
- Karmer, G.; P. Argos (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*, **12**, 7269-7282.
- Kumar, S.; K. Tamura; M. Nei (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, **5**, 150-163.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-683.
- Lai, M.C. (1992). RNA Recombination in Animal and Plant Viruses. *Microbiological Reviews*, **56**, 61-79.
- Lavee, S.; L. Tanne (1984). Spherosis – a virus disease of the olive (*Olea europaea*). Symptoms, growth, tree development and production. *Olea*, **12**, 71-75.
- Lobão, D.L.; M.R. Félix; M.I.E. Clara; S. Oliveira; F.A. Leitão; J.F. Serrano (2002). Detection of *Olive latent virus 1* in *Olea europaea* L. tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. In: *XIII Congresso Nacional de Bioquímica*, p. 102.
- Lot, H.; L. Rubino; B. Delecolle; M. Jacquemond; C. Turturo; M. Russo (1996). Characterization, nucleotide sequence and genome organization of leek with stripe virus, a putative new species of the genus *Necrovirus*. *Archives of Virology*, **141**, 2375-2386.
- Louro, T.J.F.M. (2004). Caracterização de um isolado viral de *Olea europaea* L., produção de anticorpos policlonais específicos, e aplicação de métodos de diagnóstico. Tese de Mestrado Luso-Brasileira em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade de Évora, Évora, 91 pp.
- Marchler-Bauer, A.; J.B. Anderson; C. DeWeese-Scott; N.D. Fedorova; L.Y. Geer; S. He; D.I. Hurwitz; J.D. Jackson; A.R. Jacobs; C.J. Lanczycki; C.A. Liebert; C. Liu; T. Madej; G.H. Marchler; R. Mazumder; A.N. Nikolskaya; A.R. Panchenko; B.S. Rao; B.A. Shoemaker; V. Simonyan; J.S. Song; P.A. Thiessen; S. Vasudevan; Y. Wang; R.A. Yamashita; J.J. Yin; S.H. Bryant (2003). CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research*, **31** (1), 383-387.
- Marte, M.; F. Gadani; V. Savino; E. Rugini (1986). Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease*, **70**, 171-172.
- Martelli, G.P. (1998). Enfermedades infecciosas y certificación del olivo: Panorama general. *Phytoma*, **102**, 180-186.

- Martelli, G.P. (1999). Infectious disease and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP/EPPO*, **29**, 127-133.
- Martelli, G.P.; F. Grieco (1997). Oleavirus, a new genus in the family Bromoviridae. *Archives of Virology*, **142**, 1933-1936.
- Martelli, G.P.; M.A. Yilmaz; V. Savino; S. Baloglu; F. Grieco; M.E. Güldür; N. Greco; R. Laforzezza (1996). Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology*, **102**, 527-536.
- Martelli, G.P.; S. Sabanadzovic; V. Savino; A.R. Abu-Zurayk; M. Masannat (1995). Virus-like disease and viruses of olive in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea*, **34**, 133-136.
- Materazzi, A.; S. Toni; A. Panattoni; M. Osti; E. Triolo (1996). Alcune evidenze sulla presenza di un nuovo virus isodiametrico. In *Olea europaea* L.. In: *Atti Convegno annuale SIPaV*, Udine, C57-C59.
- Merciega, V.; D. Boscia; V. Savino (1996). Comparison of five isolates of olive latent virus 1. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**, 1-8.
- Mohamed, M. (1996). *Characterization biologique physico-chimique et serologique d'un virus filamenteux associe a un jaunissement de l'olivier*. Master of Sciences en virologie vegetale, Institut Agronomique Mediterranee de Bari, 51 pp..
- Morris, T.J.; J.A. Dodds (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissues. *Phytopathology*, **69**, 854-858.
- Nicolini, J.C.; B.A. Traversi (1950). Observaciones sobre una nueva enfermedad del olivo en la Argentina. *Informe de la Dirección de Investigaciones Agrícolas*, Buenos Aires, **3**, 1-6.
- Nolasco, G. ; A. Mansinho; M. Teixeira santos; C. Soares; Z. Sequeira; P.K. Correia; O.A. Sequeira (2000). Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *European Journal of Plant Pathology*, **106**, 311-318.

- Nuss, D.L. (1990). Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 37-58.
- Oda, Y.; K. Saeki; Y. Takahashi; T. Maeda; H. Naitow; T. Tsukihara; K. Fukuyama (2000). Crystal structure of tobacco necrosis virus at 2.25 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **300**, 153-169.
- Olmos, A.; M. Cambra; O. Esteban; M.T. Gorris; E. Terrada (1999). New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Research*, **27**, 1564-1565.
- Orita, M.; Y. Suzuki; T. Sekiya; K. Hayashi (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**, 874-879.
- Pacini, E.; M. Cresti (1977). Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, **173**, 1-4.
- Pantaleo, V.; F. Grieco; A. Di Franco; G.P. Martelli (2006). The role of the C-terminal region of olive latent virus 1 coat protein in the host systemic infection. *Archives of Virology*, **151**, 1973-1983.
- Pantaleo, V.; F. Grieco; M.A. Castellano; G.P. Martelli (1999). Synthesis of infectious transcripts of olive latent virus 1: genes required for RNA replication and virus movement. *Archives of Virology*, **144**, 1071-1079.
- Pantaleo, V.; M. Saponari; D. Gallitelli (2001). Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting virus in crude extracts. *Journal of Plant Pathology*, **83**, 143-146.
- Poch, O.; I. Sauvaget; M. Delarue; N. Tordo (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal*, **8**, 3867-3874.
- Rei, F.T. (1995). A aplicação do método de isolamento de cadeias duplas de RNA (double-stranded RNA-dsRNA) no diagnóstico de infecções virais em *Olea*

- europaea* L.. Tese de Mestrado em Protecção Integrada, Instituto Superior de Agronomia, 91 pp..
- Rei, F.T.; M.I.E.C. Henriques; F.A. Leitão; J.F. Serrano; M.F. Potes (1993). Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO*, **23**, 501-504.
- Ribaldi, M. (1959). Osservazioni preliminary sopra un giallume infettivo dell' olivo (*Olea europaea* var. *sativa*). *Notiziario sulle Malattie delle Piante*, **47-48**, 178-181.
- Rice, P.; I. Longden; A. Bleasby (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, **16**, 276-277.
- Roossinck, M.J. (1997). Mechanisms of Plant Virus Evolution. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 191-209.
- Rubio, L.; M.A. Ayllón; J. Gerri; H. Pappu; C. Niblett; P. Moreno (1996). Differentiation of Citrus tristeza Closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology*, **129**, 479-489.
- Rugini, E. (1997). Perspectives of technological innovations for the propagation and sanitation of olive. In: *La Certificazione del Materiale Vivaistico, Indirizzi per l'Olivo. I Georgofili, Quaderni 1997-II*, 97-107.
- Sabanadzovic, S.; N. Abou-Ghanem; P. La Notte; V. Savino; G.P. Martelli (1999). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, **81**, 37-45.
- Saitou, N.; N. Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Saldarelli, P.; A. Minafra; G.P. Martelli; B. Walter (1994). Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridisation. *Plant Pathology*, **43**, 91-96.
- Sambrook, J.; E.F. Fritsch; T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Saponari, M. (2001). *Miglioramento sanitario dell' olivo e caratterizzazione molecolare del virus associato all' ingiallimento fogliare dell' olivo (OLYaV)*. Ph.D. Thesis, Università degli Studi di Bari, 81 pp..
- Saponari, M.; R. Alkowni; F. Grieco; V. Pantaleo; V. Savino; G.P. Martelli (2002a). Detection of olive-infecting viruses in Mediterranean Basin. *Acta Horticulturae*, **586**, 787-790.
- Saponari, M.; T. El Beaino; F. Grieco; V. Savino; G.P. Martelli (2001). Diagnosi di virus dell' olivo mediante l'impiego degli RNA a doppia elica. *Atti Progetto POM A32*, 793-797.
- Saponari, M.; V. Savino; G.P. Martelli (2002b). Trasmissioni per seme dei virus dell'olivo. *Frutticoltura*, **4**, 103-105.
- Saponari, M.; S. Murolo; T. El Beaino; V. Savino; G.P. Martelli (2002c). Clonal and sanitary selection of olive in Abruzzo and Apúlia. *Journal of Plant Pathology*, **84**, 194.
- Savino, V.; D. Gallitelli (1981). Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologia Mediterranea*, **20**, 202-203.
- Savino, V.; D. Gallitelli (1983). Isolation of *Cucumber mosaic virus* from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **22**, 76-77
- Savino, V.; D. Gallitelli; M. Barba (1983). Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology*, **103**, 243-249.
- Savino, V.; M. Barba; D. Galitelli; G.P. Martelli (1979). Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **18**, 135-142.
- Savino, V.; S. Sabanadzovic; G. Sacrito; C. Laviola; G.P. Martelli (1996). Due giallumi dell' olivo di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, **5**, 55-59.
- Serrano, J.M.F.; F. Leitão; M.F. Potes; M.I.E. Clara; F.T. Rei; L. Amaral (1995). Studies on rooting ability of virus-infected vegetative material of *Olea europaea* L. cultivars. *Olea*, **23**, 37-38.

- Stuart, G.; K. Moffett; R.F. Bozarth (2004). A whole genome perspective on the phylogeny of the plant virus family *Tombusviridae*. *Archives of Virology*, **149**, 1595-1610.
- Teakle, D.S. (1962). Transmission of Tobacco necrosis virus by a fungus *Olpidium brassicae*. *Virology*, **18**, 224-231.
- Thomas, H.E. (1958). Sick leaf of olive. *Plant Disease Reporter*, **42**, 1154.
- Thompson, J.D.; D.G. Higgins; T.J. Gibson (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tooley, P.W.; A.D. Hewings; K.F. Flakenstein (1989). Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **79**, 470-474.
- Triolo, E.; A. Materazzi; S. Toni (1996). An isolate of *Tobacco mosaic virus* from *Olea europaea* L.. *Advances in Horticulture Science*, **10**, 39-45.
- Turturo, C.; P. Saldarelli; D. Yafeng; M. Digiario; A. Minafra; V. Savino; G.P. Martelli (2005). Genetic variability and population structure of *Grapevine leafroll-associated virus 3* isolates. *Journal of General Virology*, **86**, 217-224.
- Valverde, R.A.; S.T. Nameth; R.L. Jordan (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, **74**, 255-258.
- van Regenmortel, M.H.V.; C.M. Fauquet; D.H.L. Bishop; E.B. Carstens; M.K. Estes; S.M. Lemon; J. Maniloff; M.A. Mayo; D.J. McGeoch; C.R. Pringle; R.B. Wickner (2000). *Virus Taxonomy*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Varanda, C.M.R. (2005). Avaliação das técnicas de diagnóstico viral baseadas em isolamento de dsRNA e RT-PCR, para certificação de uma colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo' (D.O.) de *Olea europaea* L. Tese de Mestrado em Biologia de Pragas e Doenças das Plantas. Universidade de Évora, 65 pp..
- Vives, M.C.; L. Rubio; L. Galipienso; L. Navarro; P. Moreno; J. Guerri (2002). Low genetic variation between isolates of *Citrus leaf blotch virus* from different geographical origins. *Journal of General Virology*, **83**, 2587-2591.

Waterworth, H.E.; A. Hadidi (1998). Economic losses due to plant viruses. In: *Plant Virus Disease Control* (eds: A. Hadidi, R. K. Khetarpal, H. Koganezawa). APS Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp.1-13.

Wilson, I.G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acids amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **Oct.**, 3741-3751.

White, K.A.; P.D. Nagy (2004). Advances in the molecular biology of Tombusviruses: Gene expression, genome replication and recombination. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **78**, 188-226.

VII. ANEXOS



Anexo I

Primers usados em testes de RT-PCR para a detecção de vírus que infectam a oliveira e tamanho dos produtos de amplificação obtidos¹

Vírus	Tipo de teste	"Primer"	Sequencia 5'—3'	Tamanho do produto amplificado	Região amplificada
SLRSV	RT-PCR	directo reverso	TCAAGGAGAATATCCCTGGCCC CTAAGTGCCAGAACTAAACC	525	CP
	Single-step RT-PCR	directo reverso	CCCTTGGTTACTTTTACCTCCTCATTGTCC AGGCTCAAGAAAACACAC	291	CP
AMV	RT-PCR	directo reverso	TTGGTTAGTGAATGGAACGG TCAACTCACCCCTCCAAATCCC	504	CP
CLRV	RT-PCR	directo reverso	TTGGCGACCGTGAACGGCA GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG	431	CP
OLRSV	RT-PCR	directo reverso	CTGCAAAACTAGTGCCAGAGG TGCATAAGGCTCACAGGAG	492	3' terminal
CMV	RT-PCR	directo reverso	TAACTCCCAGTTCTCACCGT CCATCACCTTAGCTTCCATGT	513	RdRp
OLV-1	RT-PCR	directo reverso	CTCACCCATCGTTGTGTGG TTTCACCCACCAAATGGC	747	3' terminal
TNV-D --- OMMV	RT-PCR	directo reverso	GTGTTCAGTCATATACATACC GCCTATTGTGCTGTACCAC	257	CP
OLV-2	RT-PCR	directo reverso	ACGTGTTAGTCGCTGTGGTACC TATGTTTTGACGCACCCGGAGCG	390	RdRp
OLYaV	RT-PCR	directo reverso	CGAAGAGAGCGGGCTGAAGGCTC GGGACGGTTACGGTCGAGAGG	383	hsp70-like protein

¹ Adaptado de Grieco et al. (2000^a), Faggioli et al. (2002) e Cardoso et al. (2004);
CP - Cápside proteica; hsp70 – heat shock protein 70; RdRp – RNA polimerase dependente de RNA.

Anexo II

Primers usados em testes de RT-PCR e de RT-*nested*-PCR, e tamanho dos produtos de amplificação ¹

Vírus	Tipo de teste	"Primer"	Sequencia 5'—3'	Tamanho do produto amplificado	Região amplificada
SLRSV	RT-PCR	directo	AAAGCTTCAAGGAGAATATCCCTGGCCC	525	CP
		reverso	AAGGATCCTAAGTGCCAGAACTAAACC		
	<i>nested</i>	directo	O mesmo <i>primer</i> directo que para RT-PCR	396	
	RT-PCR	reverso	CATTGTCATGTTGAGGCT		
ArMV	RT-PCR	directo	AATACCCCGGGTGTACATCG	421	CP
		reverso	CATTAACCTAAGATCAAGGATTC		
	<i>nested</i>	directo	O mesmo <i>primer</i> directo que para RT-PCR	184	
	RT-PCR	reverso	CCCCAATGATTAATTCCTATGG		
CLRV	RT-PCR	directo	AAAGCTTGGCGACCGTGTAAACGGCA	431	Região não codificante 3' terminal do RNA2
		reverso	AAGAATTCGTCGGAAGATTACGTAAAAGG		
	<i>nested</i>	directo	CCCAAGAATTTAGGGGG	170	
	RT-PCR	reverso	AAACTCTAAAAGTAAA		
OLRSV	RT-PCR	directo	AAGAATTCGCAAAACTAGTGCCAGAGG	492	3' terminal do RNA2
		reverso	AAAAGCTTGCATAAGGCTCACAGGAG		
	<i>nested</i>	directo	GTGGTGACGTGCTCTATCC	163	
	RT-PCR	reverso	GGAGTCTAGGAATTGAAAACA		
OLV-1	RT-PCR	directo	GTGGACTGCGCTCGAATGGA	230	CP
		reverso	CTCACCATCGTTGTGTGG		
	<i>nested</i>	directo	AATGTTACCCCTGGCCACC	167	
	RT-PCR	reverso	TGTGGTTACAAATTGAC		
OLV-2	RT-PCR	directo	CCGTTCTGTGGCCTTTGAGA	222	RdRp
		reverso	AACACGATCCTCACCC		
	<i>nested</i>	directo	CGTCGGAGATTATCTCTGA	175	
	RT-PCR	reverso	TGACTCTGTTCAGAAGTAG		

¹ Adaptado de Pantaleo *et al.* (2001);

CP – Cápside proteica; RdRp – RNA polimerase dependente de RNA.

Anexo III

Primers utilizados em testes de PCR multiplex, para a detecção de vírus que infectam a oliveira e sondas usadas para a sua detecção colorimétrica dos produtos de reacção de PCR¹

Vírus	Posição no genoma	Tipo de teste	"Primer"	Sequência 5'— 3'	Tamanho do produto amplificado
SLRSV	3412-3443	RT-PCR	directo	GTTACTTTTACCTCCTCATTGTCCATGTGTTG	181
	3592-3561		reverso	GACTATCGTACGGTCTACAAGCGTGTGCCGTC	
	3448-3466	Nested	directo	TGGCCTTTATTGGTTGGAT	109
	3538-3556	RT-PCR	reverso	ATCTGCCACTGATTCTCAC	
	3501-3540		sonda	AGTAAGCAGCCGCTAGCGTTCTGGAWTTCCAGGCAYAGTG	
ArMV	2428-2448	RT-PCR	directo	CGGATTGGGAGTTCGTTGTCCG	340
	2767-2746		reverso	CCGTTCCATTCACTAACAATC	
	2449-2468	Nested	directo	AATTATATGCTGAGTTTGAG	203
	2630-2651	RT-PCR	reverso	AAAATTATACACCTTATGAGTA	
	2547-2581		sonda	ATCCCACCCTGGAATATGACTTAAGTGCAACCAG	
CLRv	1433-1453	RT-PCR	directo	CATTTCCATGCGACCCTGCTT	283
	1715-1693		reverso	AGTCCGACACTCATAACAATAAGC	
	1497-1515	Nested	directo	GTTAACGAAATATCTACTGC	171
	1649-1667	RT-PCR	reverso	CAATATTGCTAAACAACC	
	1601-1640		sonda	AAGCCCAAGAATTTAGGGGTTATGTGGGTAGATAGCGTT	
CMV	1150-1169	RT-PCR	directo	CTTTCTCATGGATGCTTCTC	885
	2034-2017		reverso	GCCGTAAGCTGGATGGAC	
	1408-1426	Nested	directo	ACTATTAAACCACCACCT	172
	1461-1579	RT-PCR	reverso	TTTGAATGCCGGAACAAG	
	1588-1622		sonda	AATCCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACCCTGTGGGT	
OLV-1	2720-2738	RT-PCR	directo	CTCACCCATCGTTGTGTGG	747
	3461-3449		reverso	TTTCACCCCAACAATGGC	
	2812-2851		sonda	CCCGTTGCTGGTGGAGTGATTTCTACAGAAGGCCACGTTTC	
OLV-2	2180-2198	RT-PCR	directo	GAAGGTGGCTCGCCTAGAG	206
	2385-2367		reverso	GCGAGGAGTTTGAGCTTTG	
	2316-2338		sonda	GAGAGGGTTTTTCCGGTACTTTA	

¹ Adaptado de Bertolini et al. (2001) e (2003)


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
Frag. A  CGATTTGTAC AGCAAGTACC GTTGGCGCAA GCTCCGGTTT ATTTATATTC CGGTCTGCCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
Frag. A  AACCAGCACA CAAGGCAATG TCTCTATGTC ACTATCATT CACAGAAATCG ATGCGCAGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900
Frag. A  AACAAGCATC ACTCAAATGC AACAGGGCTA CCGTGCCATC ACGTTCCCGC CTTACGCGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950      960
Frag. A  GTATGATGGT GCTATGGCCT TGTCGTCCTT CGGCAACATT CCTGGAATGG TTGTCGTCGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      970      980      990      1000     1010     1020
Frag. A  TGTGGACTGT GCACGAATGG ACAAGTTGTG GTATCCTAAT GTTACCCTGG CCACCTTCTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1030     1040     1050     1060     1070     1080
Frag. A  TGCCATGGCA ACTAACATCC AGAACGGATA TTGCGGAGTA ACCCTGTCCA CTGCAAGTGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1090     1100     1110     1120     1130     1140
Frag. A  TCAAGGGCCA GCCGCCGCCA CTAACCTTGG CCAAGTGTTT TGCCAGTACG AAATCGAATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1150     1160     1170     1180     1190     1200
Frag. A  TATAGAACCA GTGAACCCAA CTGTCAATGT GTAACCACAC AACGATGGGT GAGTTGCGTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1210     1220     1230     1240     1250     1260
Frag. A  ACTGTGTCAA TTCCTAAAGG TTTTAGTAGA GCGGTAAGCA AGACGGATCC TGGGAAACAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1270     1280     1290     1300     1310     1320
Frag. A  GTTTAACGGG CTGGGGGTGG TGCCCCGGCC GTCGCATCAC TTGCTGATAC AATCTACAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1330     1340     1350     1360     1370     1380
Frag. A  GCCCATGGAA GGGTCTGCAC AGGTATCCAC GCCAAGGACG GGGCGAAAGT CTCGGACGGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1390
Frag. A  GGGTAGTGA CCCAACAC

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
Frag. AB  GGAGGGGCAC TGAGGATAAG AAGCACAATG GATCGGGATT AACTGGCGTT AAGCGTCATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90      100     110     120
Frag. AB  CCGTGAGTGA AACATCTCAG AAATCACAGC AAGGTAAGTG CAACGGCACG ATGACCAACA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      130     140     150     160     170     180
Frag. AB  TAGCTGAAGA GCAGACCATT ACCGTGACAT ACAACTTTAA CTTTGTAGTTA TGGCTGTGTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      190     200     210     220     230     240
Frag. AB  TCGCTGTTGT GATACTTCAC CAGGTATTAC ATTATTCCCT TACTTTGCTA TTCTCATTCT

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250      260      270      280      290      300
Frag. AB  CATCCTTGCA ATATTAGTTG TTGGGACTCC AAACCAGCAA TATCATCATT CTCCTAGTAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310      320      330      340      350      360
Frag. AB  TTACGAGTAT AAGACTCAAC ACATTTTCGAT CGCAAAATAG ACATTTTCGCA ACTCTCTCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      370      380      390      400      410      420
Frag. AB  CATGGTTAAT TATTACTGGG ATAGTCGAAT TCAGAGGTGG TTCTACGAAA GTGGACCACA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430      440      450      460      470      480
Frag. AB  GCGTGTCCGA ACATATATGA AAGCGGGTTT CACCCACCA AACGGCAAAC TGCCTGCCCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490      500      510      520      530      540
Frag. AB  CAAGACTAAA AGGTCACCCC CGAATAGGGG CAACCTCCAG GTTCTTCCGG TTACAGCACC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      550      560      570      580      590      600
Frag. AB  CGCTGCTGGT GGAGTGATCT CCACAAGAAG ACGCGTTCCT CGAATTACTA CTACTAATGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650      660
Frag. AB  GCAGACTGTC GTGAGAAACA CAGAAATCAT AAGTGCCATT AACTCTGCCG CTCTAGGTGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      670      680      690      700      710      720
Frag. AB  ATTTTCGGCG ACCACTGTCA CGGTGATCCC GTCCAACCTC TCATGGTTGG CAGGGTTGTC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
Frag. AB  CGATTTGTAC AGCAAGTACC GTTGGCGCAA GCTCCGGTTT ATTTATATTC CGGTCTGCCC

.....|.....|.....|.....|..
      790
Frag. AB  AACCAGCACA CAAGGCA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
Frag. B  AGCGTTTGCT AGTGATGGCA TCATAAAGTA CAAGAAGGAG GGTTGTCGTA TGAGTGGAGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90      100     110     120
Frag. B  TATGAACACC AGTTTGGGCA ATTGCATTCT CATGTGTGCG ATGGTCTACG GGTTGAAGGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      130     140     150     160     170     180
Frag. B  ACACCTGGGC ATAAATTTAT CCCTTGCCAA TAATGGGGAT GACTGCGTCA TTGTCTGTGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      190     200     210     220     230     240
Frag. B  GAAAGCGGAT TTGAAGAAAT TGACAAGCAG CATCGAACCA TATTTTAGGC AATTTGGATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300
Frag. B  CAAAATGGAG GTGAACAAC CCGTAGATAT ATTTGAGCGC ATTGAGTTTT GTCAAACCCA

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      310      320      330      340      350      360
Frag. B ACCTGTGTTT GATGGCTACC AATACATCAT GGTTCGAAAA CCCTCGGTAG TCACTTCGAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      370      380      390      400      410      420
Frag. B GGATGTCACT AGCTTAATCC CATGCCAGAA TCAGGCTCAA TATGCAGAAT GGCTGCAAGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      430      440      450      460      470      480
Frag. B TGTGGGTGAG TCGGGAATGA GTATCAATGG TGAATACCT GTTATGCAGA ACTTTTACCA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490      500      510      520      530      540
Frag. B TATGCTCCAA ACTGGAGTTA AACGCACCAA ATTCACACAA GACCGGCGAG TTTTCAGACGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      550      560      570      580      590      600
Frag. B ACGGGTTGGG GTATCACTCT AGATATATGC ATAGAGTGGC CCGAGCCATT TCGCCCGAAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      610      620      630      640      650      660
Frag. B CCCGTTTATC CTTCTATTTA GCGTTCGGTA TCACACCAGA CCTTCAGGAA GCACTGGAAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      670      680      690      700      710      720
Frag. B GCCTTTTATG ATACCCATAC GCTTGAGTTG GATGATGTTG TCCAGTTGA TACCTACCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
Frag. B GTATCAGGAG AGCATTGAT CAATGGATTA CCAAAGTGGG GTTAGTGAGG ATAACGTGAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
Frag. B CGTACGCGGT CGGCTAGGA GGGGCACTGA GGATAAGAAG CACAATGGAT CGGGATTAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900
Frag. B TGGCGTTAAG CGTCATGCGG TGAGTGAAAC ATCTCAGAAA TCACAGCAAG GTACTGGCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950      960
Frag. B CGGCACGATG ACCAACATAG CTGAAGAGCA GACCATTACC GTGACATACA ACTTTAACTT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      970      980      990      1000      1010      1020
Frag. B TTAGTTATGG CTGTGTGTCG CTGTTGTGAT ACTTCACCAG GTATTACATT ATTCCCTTAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
Frag. B TTTGCTATTC TCATTCTCAT CCTTGCAATA TTAGTTGTTG GAACTCCAAA CCAGCAATAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1090      1100      1110      1120
Frag. B CATCATTCTC CTAGTACTTA CGAGTATAAG ACTCAACACA TTTTCGAT

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50          60
Frag. C TAGTATACAT ACCAAGTATA CGATACCGGT GCAAGCCCGT ACACAGCTAA AGTGTCTAAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          70          80          90          100         110         120
Frag. C ATGGAGTTAC CCAACCAACA TAAGCAAAC TCTGCTGAAG GTTTCGTTTC TTTCTTAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          130         140         150         160         170         180
Frag. C TGGCTTTGTA ATCCCTGGAG ACGTCAACGT ACAGTCAACG CTGCTGTCGC TTTTCAGAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          190         200         210         220         230         240
Frag. C AGCATTCTTG CTATTGAGGA CGTGGAACAT TTCGAAGATA TCAACGAATG TTTTCGAGAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          250         260         270         280         290         300
Frag. C TCATCTGGAG GCCAATCGCA GCGCACTAAG GTTGTGCTG AAGGGGCTTA TTCTCCCGTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350         360
Frag. C AAATCCGAAC GCACCCGCCG AGTCCGCAAG CAAAAGAAGG CCAAATTCGT CAAATATTTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          370         380         390         400         410         420
Frag. C GTTAATGAGG CTCGTGCCGA GTTTGGTCTC CCCAAAGCTA CAGAGGCCAA TCGACTCATG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          430         440         450         460         470         480
Frag. C GTGCAACACT TCCTGCTCCG AAGGTGTAAG GATTGGGGGG TTGTCACATC CCAGTGCCAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          490         500         510         520         530         540
Frag. C AACAAATGTTG CACTCGCCTT GACTCTCGTG TTTGTCCCAA CAGAGGATGA TTTGCTGGCG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          550         560         570         580         590         600
Frag. C CGAGCTATGA TGAACACGTA CAAGACGAGG TCTGCGGTCC GTGGTATGGA CAACCTCCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          610         620         630         640         650         660
Frag. C GGTGAGGGGT GGTGGAACAA CAGGCTTGGC ATAGGTGGCC AGGCCGGCTG GGCCTTTCGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          670         680         690         700         710         720
Frag. C GCCAAGTAGG GGTGCCTAGA GAGGAGGCCG GGGTTTTCCA CGTCTGTTTC GCGTGAAAC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          730         740         750         760         770         780
Frag. C CACCCCGATC TGGTGGTCAA ACCATCAGGA CACCCCGAGA AACAGCGTCA GTTGTTCACG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          790         800         810         820         830         840
Frag. C TATAGTGAA TTGGCGGCA TTTATTAATC GGCATCCACA ACAACTCTCT CTCCAACCTG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          850         860         870         880         890         900
Frag. C CGTAGGGGCT TAATGGAGAG AGTATTCTAC GTTGGGGGAC CCAATGGGCT CCAAGACGCC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          910         920         930         940         950         960
Frag. C CCTAAACCCG TTCGGGGGGC ATTCAACTCC CTGAATAAGT TTCGAGACCT ATATACCAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          970         980         990         1000        1010        1020
Frag. C AATAGTTGGC GTCATTCCCC TGTAACCAAT GAACAATTCT TGATGAATTA CTCGGGCAGG

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
Frag. C  AAACATACTA TTTACAAAGA AGCGTTGAT AGTTTGTGCG ATCAACCACT TAGCTTACGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
Frag. C  GACTCGAGGC TGAAGACTTT CGTTAAGGCC GAAAAACTTA ATCTGAGCAA GAAGCCAGAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
Frag. C  CCAGCACCCC GGGTCATTCA ACCCAGGTCA CCTCGGTACA ACGTTTGTTT GGGTCGTTAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
Frag. C  CTACGTCACT ATGAACACCA CGCGTTCAAA ACCATTGCTA AATGCTTTGG GGAGATCAGC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
Frag. C  GTCTTTAAAG GGTTTACTCT AGAGCAACAA GCGGAAATCA TGTTTTCGAA GTGGAAGAAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
Frag. C  TATGTTAATC CCGTCGCCGT TGGACTCGAT GCAAGTCGGT TCGACCAACA CGTGTCAATT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
Frag. C  GAAGCACTTC AATATGAGCA TGAATTTTAC ATTAGAGATT ACCCGAATGA TAAACAGCTA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
Frag. C  AAATGGTTGT TAAAGCAACA ACTGAGCAAT ATTGGCACAG CGTTTGCTAG TGATGGCATC

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
Frag. C  ATAAAGTACA AGAAGGAGGG TTGTCGTATG AGTGGAGATA TGAACACCAG TTTGGGCAAT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
Frag. C  TGCATTCTCA TGTGTGCGAT GGTCTACGGG TTGAAGGAAC ACCTGGGCAT AAATTTATCC

.....|.....|.....|
      1630
Frag. C  CTTGCCAATA ATGGG

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
GM6 3'  GGTTTAAACGG GCTGGGGGTG GTGCCCCGGC CGTCGCATCA CTTGCTGATA CAATCTACAA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90      100     110     120
GM6 3'  GGCCCATGGG AGGGTCTGCA CAGGTATCCA CGCCAAGGAC GGGACGAAAG TCTCGGACGG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      130     140     150     160     170
GM6 3'  GGGGTAGTGG ACCCAACACC AGATTGAGGG GCTTTTGCCC CACCCCCCG

```