

**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**Mestrado em Biologia de Pragas e Doenças das Plantas**

**Avaliação das técnicas de diagnóstico viral baseadas em  
isolamento de dsRNA e RT-PCR, para certificação de uma  
coleção de clones da cv. ‘Negrinha de Freixo’ (D.O.) de *Olea  
europaea* L.**

**Carla Marisa Reis Varanda**



155017

**Orientadora: Professora Doutora Maria Ivone Esteves da Clara**

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

**Évora**

**2005**

634.1  
VERNEY

## **AGRADECIMENTOS**

- À **Professora Maria Ivone Esteves da Clara**, pela disponibilidade proporcionada e pelos conhecimentos transmitidos e essenciais para a execução deste trabalho;
  
- À **Eng. Maria do Rosário Fernandes Félix**, por toda a sua ajuda e apoio diário que tornaram possível a realização deste trabalho;
  
- Ao **Eng. Fausto Leitão**, pela disponibilidade e ajuda proporcionadas;
  
- À **D. Maria Mário, Joana, Matilde, Ana, Marta, Elsa e José Manuel**, pelo companheirismo e espírito de inter-ajuda, que garantiram um óptimo ambiente de trabalho;
  
- Aos meus professores e aos colegas do Mestrado: **Liliana, Joana, Mónica, Catarina, Sandra, Petra, Rui e Paulo** pelo espírito de camaradagem e excelente relacionamento ao longo do curso;
  
- Ao **Fernando Águas**, pela ajuda e apoio, especialmente nos momentos de maior stress;
  
- Aos meus pais, pelo apoio sem o qual era impossível a realização deste trabalho;
  
- Os estudos constantes desta dissertação foram parcialmente financiados pelo **Projecto POCTI/SAPIENS 36230/99 e Agro 186**.

*Aos meus Pais e Irmã*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS / UNIDADES</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>RESUMO</b> .....	4
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	5
<b>II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
<b>1. Sintomas Causados por Vírus</b> .....	8
<b>2. A Transmissão de Vírus de Plantas</b> .....	9
<b>2.1. Modos de Transmissão dos Vírus de Plantas</b> .....	9
<b>2.1.1. Transmissão por fungos</b> .....	9
<b>2.1.1.1. Classe <i>Chytridiomycetes</i></b> .....	10
<b>2.1.1.1.1. Ciclo de vida do fungo <i>Olpidium brassicae</i></b> .....	11
<b>2.1.1.1.2. A transmissão de vírus</b> .....	12
<b>3. Diagnóstico de Vírus</b> .....	14
<b>3.1. Observação da Sintomatologia</b> .....	14
<b>3.2. Transmissão Mecânica</b> .....	14
<b>3.3. Testes Sorológicos</b> .....	14
<b>3.4. Hibridação Molecular</b> .....	15
<b>3.5. Análise de dsRNA</b> .....	16
<b>3.6. Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	21
<b>4. <i>Olea europaea</i> L.</b> .....	23
<b>4.1. Sintomas sugestivos da Presença de Vírus em <i>Olea europaea</i> L.</b> .....	25
<b>4.2. A Presença de Vírus em <i>Olea europaea</i> L.</b> .....	26
<b>4.2.1. Género <i>Necrovirus</i></b> .....	27
<b>4.2.2. Género <i>Nepovirus</i></b> .....	27

4.2.3. Género <i>Cucumovirus</i> .....	28
4.2.4. Género <i>Oleavirus</i> .....	28
4.2.5. Género <i>Closterovirus</i> .....	28
4.2.6. Género <i>Tobamovirus</i> .....	29
4.2.7. Género <i>Potexvirus</i> .....	29
4.2.8. Outros.....	29
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>1. Proveniência do Material Vegetal e dos solos.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Extracção e Purificação de dsRNA.....</b>	<b>33</b>
2.1. Extracção de dsRNA.....	33
2.2. Tratamento Enzimático da Fracção contendo dsRNA.....	35
2.3. Análise das dsRNA.....	35
2.3.1. Preparação das Amostras.....	36
2.3.2. Preparação do gel de poliacrilamida 6%.....	36
2.3.3. Preparação do gel de agarose 0,8%.....	36
2.3.4. Coloração dos géis com brometo de etídio.....	36
<b>3. Optimização do Protocolo da Transcrição Reversa – Reacção da Polimerase em Cadeia (RT-PCR) para a detecção dos vírus OLV-1 e TNV-D.....</b>	<b>37</b>
3.1. Desnaturação de dsRNA.....	37
3.2. Reacção de Transcrição Reversa.....	37
3.3. Amplificação por PCR.....	37
3.3.1. PCR com <i>primers</i> específicos para OLV-1.....	37
3.3.2. PCR com <i>primers</i> específicos para TNV-D.....	38
3.4. Análise dos produtos amplificados.....	38
3.4.1. Preparação das amostras.....	38
3.4.2. Electroforese em gel de agarose 1%.....	38
3.4.3. Coloração dos géis com brometo de etídio.....	39
<b>4. Análise da presença do fungo <i>Olpidium brassicae</i> no solo.....</b>	<b>39</b>

<b>IV. RESULTADOS</b> .....	40
<b>1. Análise de dsRNA, extraídas de ramos de oliveira, na Primavera</b> .....	41
<b>1.1. Análise de dsRNA</b> .....	41
<b>1.1.1. Visualização em gel de poliacrilamida 6%</b> .....	41
<b>1.1.2. Visualização em gel de agarose 0,8%</b> .....	41
<b>1.2. Análise de dsRNA após tratamento enzimático</b> .....	42
<b>2. RT-PCR a partir de dsRNA isolado de ramos na Primavera</b> .....	43
<b>2.1. PCR com <i>primers</i> específicos para OLV-1</b> .....	43
<b>2.2. PCR com <i>primers</i> específicos para TNV-D</b> .....	44
<b>3. Análise de dsRNA, extraídas de frutos de oliveira, no Outono</b> .....	45
<b>3.1. Análise de dsRNA</b> .....	45
<b>3.2. Análise do dsRNA após Tratamento Enzimático</b> .....	46
<b>4. RT-PCR a partir de dsRNA isolado de frutos no Outono</b> .....	48
<b>4.1. PCR com <i>primers</i> específicos para OLV-1</b> .....	48
<b>4.2. PCR com <i>primers</i> específicos para TNV-D</b> .....	49
<b>5. Análise da Presença do fungo <i>O. brassicae</i></b> .....	52
<b>V. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b> .....	56
<b>VII. ANEXOS</b> .....	I

## ÍNDICE DE FIGURAS

### II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>Olpidium brassicae</i> .....	12
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo simplificado da replicação de um vírus ssRNA positivo numa célula vegetal .....	17
<b>Figura 3:</b> Etapas básicas do processo de extracção de dsRNA a partir de tecido vegetal .....	20

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Figura 4:</b> Colecção de clones ‘Negrinha’ – Quinta do Valongo (Trás-os-Montes) .	32
---	----

### IV. RESULTADOS

<b>Figura 5:</b> Análise das dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, não tratadas enzimaticamente, em gel de poliacrilamida 6%.....	41
<b>Figura 6:</b> Análise das dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, não tratadas enzimaticamente, em gel de agarose 0,8% .....	42
<b>Figura 7:</b> Análise das preparações de dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, após tratamento enzimático, em gel de agarose 0,8%.....	43
<b>Figura 8:</b> Análise em gel de agarose 1% do produto amplificado por RT-PCR usando <i>primers</i> específicos para o vírus OLV-1, e como molde, preparações de dsRNA extraídas do córtex de ramos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ .....	43

<b>Figura 9:</b> Análise em gel de agarose 1% do produto amplificado por RT-PCR usando <i>primers</i> específicos para o vírus TNV-D, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas do córtex de ramos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ .....	44
<b>Figura 10:</b> Análise das dsRNA isoladas dos frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, não tratadas enzimaticamente, em gel de agarose 0,8%.....	46
<b>Figura 11:</b> Análise das preparações de dsRNA isoladas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, após tratamento enzimático, em gel de agarose 0,8%.....	47
<b>Figura 12:</b> Análise em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR com <i>primers</i> específicos para o vírus OLV-1, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ .....	48
<b>Figura 13:</b> Análise em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR usando <i>primers</i> específicos para o vírus TNV-D, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ .....	49
<b>Figura 14:</b> Esporos de resistência de <i>Olpidium brassicae</i> dentro das células das raízes de <i>Lactuca sativa</i> L. cultivadas em terras provenientes do campo de clones estudado neste trabalho .....	52



## ÍNDICE DE TABELAS

### II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> desenhados para o diagnóstico por RT-PCR de vírus que infectam a oliveira.....	22
<b>Tabela 2:</b> Taxas de infecção viral em olivais portugueses detectadas pelos testes DAS-ELISA (para os vírus SLRSV, CLRV, CMV e ArMV) e inoculação mecânica.....	24
<b>Tabela 3:</b> Taxas de infecção viral em olivais de várias origens geográficas detectadas por análise de dsRNA.....	24
<b>Tabela 4:</b> Distribuição geográfica dos vírus que infectam a oliveira .....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Tabela 5:</b> Resultados obtidos pelos 2 métodos de diagnóstico viral, nas duas épocas do ano.....	II
<b>Tabela 6:</b> Detecção dos vírus OLV-1 e TNV-D por RT-PCR em amostras de ramos e frutos colhidos na Primavera e no Outono .....	VI
<b>Tabela 7:</b> Identificação das árvores da colecção de clones da cv. ‘Negrinha de Freixo’ que se revelaram infectadas pelos vírus OLV-1 e TNV-D, pela aplicação do teste RT-PCR .....	VII
<b>Tabela 8:</b> Taxa de infecção dos clones da cv. ‘Negrinha de Freixo’ pelos vírus TNV-D e OLV-1 diagnosticada pelo método RT-PCR .....	VIII
<b>Tabela 9:</b> Mapa da colecção de clones ‘Negrinha de Freixo’ – Quinta do Valongo (Trás-os-Montes) onde se assinalam as árvores infectadas e a sua disposição no terreno .....	IX
<b>Tabela 10:</b> Presença de TNV-D diagnosticada por RT-PCR nas árvores em solo onde foi detectado o fungo <i>O. brassicae</i> .....	X

## LISTA DE ABREVIATURAS / UNIDADES

**ArMV** – *Arabis mosaic virus*

**APS** – peroxidissulfato de amónio

**bp** – pares de bases

**°C** – graus centígrados

**ca** – abreviatura utilizada para ‘cerca de’

**cDNA** – DNA complementar

**CLRV** – *Cherry leafroll virus*

**CMV** – *Cucumber mosaic virus*

**CP** – controlo positivo

**CTV** – *Citrus tristeza virus*

**cv** – cultivar

**DAS-ELISA** – Double Antibody Sandwich Enzyme - Linked Immunosorbent

### Assay

**DNA** – deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

**DNase** – desoxirribonuclease

**dNTP** – desoxinucleótido

**D.O.** – Denominação de origem

**dsRNA** – double stranded RNA (RNA de cadeia dupla)

**DTT** – ditioneitol

**EDTA** – ácido etilenoaminotetracético

**g** – força da gravidade

**GM6** – Isolado de OLV-1 proveniente da cv. Galega vulgar, árvore 6 da

### Herdade da Mota

**gr** – grama

**kg** – kilograma

**kbp** – kilobase

**kDa** – kiloDalton

**M** – molar

**mg** – miligrama

**mL** – mililitro

**mM** – milimolar

**nm** – nanómetro

**nt** – nucleótido

**OLV-1** – *Olive latent virus 1*

**OLV-2** – *Olive latent virus 2*

**PCR** – Polimerase Chain Reaction (Reacção em Cadeia da Polimerase)

**PPV** – *Plum pox virus*

**p/v** – peso/volume

**RF** – replicative form (forma replicativa)

**RI** – replicative intermediate (forma replicativa intermédia)

**RNA** – ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

**RNase** - ribonuclease

**RT** – Reverse Transcription (Transcrição reversa)

**SDS** – sulfato dodecil de sódio

**SLRSV** – *Strawberry latent ringspot virus*

**SSC** – Tampão salino de citrato de sódio

**ssRNA** – single stranded RNA (RNA de cadeia simples)

**STE** – Tampão de sódio – Tris – EDTA

**TAE** – Tris-Base, ácido acético e EDTA

**Taq** – *Thermus aquaticus*

**TBE** – Tampão Tris – Borato – EDTA

**TE** – Tampão Tris – EDTA

**TEMED** – N, N, N', N' – Tetrametilen-diamina

**TNV-D** – *Tobacco necrosis virus D*

**Tris** – Tris (hidroximetil) aminometano

**U** – unidades

**V** – volt

**V10** – complexo de OLV-1 e TNV-D, proveniente de cv. Verdeal Alentejana,

árvore nº10

**µg** – micrograma

**µL** - microlitro

**EVALUATION OF DIAGNOSTIC TECHNIQUES BASED ON ISOLATION OF dsRNA AND RT-PCR, FOR CERTIFICATION OF A COLLECTION OF CLONES OF CV. 'NEGRINHA DE FREIXO' (D.O.) OF *OLEA EUROPAEA* L.**

Virology studies based on mechanical inoculation and serological methods (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) in olive fields from northeast and south of Portugal, showed high levels of viral infection, reaching in some cases 100%. These diagnostic techniques are time consuming and less sensitive when compared to the ones based on reverse transcription of viral RNA followed by amplification through PCR.

This study concerns the adaptation and application of two viral diagnostic techniques to samples taken from a collection of olive trees clones of cv. 'Negrinha de Freixo' (*Olea europaea* L.) located in Quinta do Valongo, Trás-os-Montes, one based on the isolation of dsRNA, and the other, RT-PCR using specific *primers* for *Olive latent virus 1* and *Tobacco necrosis virus D*. RT-PCR was previously optimized using samples from known TNV-D and OLV-1 infected olive trees. From there, dsRNA was isolated, denatured and used as template for RT-PCR. Isolation of dsRNA, from fruits of olive trees, showed to be not enough sensitive for viral detection when used as a diagnostic method by itself.

RT-PCR using specific *primers* of OLV-1, amplified a fragment *ca* 750 nt and RT-PCR using specific *primers* of TNV-D, amplified a fragment *ca* 260 nt. Of the 161 samples tested, only one showed to be OLV-1 infected and 35 showed to be TNV-D infected. Due to the high levels of TNV-D infections, the presence of *Olpidium brassicae* Wor. Dang., a known vector of this virus in other crops, was analysed in the soil around 10 olive trees, 6 of which had tested TNV-D positive. This fungus was found in all of the soil samples.

RT-PCR using dsRNA as template showed to be highly sensitive, showing infection in trees that had tested negative by the method of analysis of dsRNA.

This study shows the possibility of the application in large scale of RT-PCR using dsRNA and its usefulness for sanitary certification of olive plants.

## RESUMO

Estudos realizados na área da virologia com base na aplicação de testes de transmissão mecânica e sorológicos (*Enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) em oliveiras do nordeste e do sul do país, revelaram níveis de infecção viral muito elevados, atingindo em alguns casos 100%. Estas técnicas de diagnóstico são morosas e menos sensíveis quando comparadas com outras desenvolvidas mais recentemente, como por exemplo as baseadas na transcrição reversa do RNA viral, seguida de amplificação por reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Este trabalho consiste na adaptação e aplicação de duas técnicas de diagnóstico viral a amostras provenientes da colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo' de oliveira (*Olea europaea* L.) existente na Quinta do Valongo em Trás-os-Montes, uma baseada na análise de duplas cadeias de RNA (dsRNA) e a segunda, RT-PCR específico para *Olive latent virus 1* e *Tobacco necrosis virus D*. A técnica RT-PCR foi previamente optimizada usando amostras provenientes de oliveiras infectadas com cada um dos vírus em análise. Isolou-se a fracção de dsRNA das plantas, a qual se desnaturou para servir de 'molde' para sintetizar o DNA complementar (cDNA). Este cDNA foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos para cada um dos genomas virais. Os resultados obtidos com o método de isolamento de dsRNA põem em causa a eficácia deste método para detecção de vírus a partir de frutos de oliveira e mostram a sua baixa sensibilidade. No caso de infecção por OLV-1 a reacção de RT-PCR resultou na amplificação de um fragmento de *ca* 750 nt de comprimento e, no caso da infecção por TNV-D, num fragmento de *ca* 260 nt de comprimento. Das amostras de 161 árvores analisadas apenas uma se revelou infectada por OLV-1 e 35 infectadas por TNV-D. Dada a elevada taxa de infecção das árvores com o vírus TNV-D, foi analisada a presença do fungo *Olpidium brassicae* Wor. Dang, conhecido vector deste vírus em outras culturas, no solo circundante de 10 árvores, 6 das quais infectadas com TNV-D. Observou-se a presença daquele fungo em todas as amostras de solo testadas.

A realização do método RT-PCR utilizando preparações de dsRNA como "molde" permitiu verificar a alta sensibilidade deste método, revelando a presença de vírus nas amostras que se tinham revelado negativas por análise das dsRNA. Este estudo permitiu mostrar a possibilidade de aplicação em larga escala, da técnica RT-PCR usando como 'molde' dsRNA, possibilitando o seu uso na certificação fitossanitária de plantas de oliveira.

# *I. Introdução*

Os vírus podem infectar todos os tipos de plantas, afectando algumas ou todas as partes da planta. Quase todas as doenças virais parecem causar algum grau de nanismo ou impedimento no desenvolvimento da planta e redução da produção total. Os vírus normalmente encurtam o tempo de vida das plantas infectadas, embora raramente causem a sua morte (Agrios, 1997). Os vírus são responsáveis por uma porção considerável das perdas anuais em várias culturas, perdas essas que ocorrem mesmo quando os vírus não induzem sintomas visíveis nas plantas. Esta diminuição na qualidade e quantidade dos produtos das plantas infectadas por vírus, pode ser catastrófica, suave ou insignificante, dependendo do vírus e do hospedeiro em causa. As perdas nas culturas devido a infecções virais podem ser minimizadas tomando medidas para evitar a disseminação destes patógenos dentro de uma cultura, o que exige um diagnóstico atempado e preciso. Uma vez que não são conhecidos métodos curativos contra os vírus, a utilização de medidas preventivas como a selecção clonal e sanitária parecem ser as estratégias mais sensatas para evitar a sua propagação (Martelli *et al.*, 2002).

A oliveira, como árvore típica do clima mediterrânico, encontra em Portugal condições edafoclimáticas óptimas para o seu desenvolvimento, ocupando um lugar de destaque no panorama agrícola português. Esta cultura é atacada por várias pragas e doenças que podem ter um significativo impacto económico na cultura (Martelli *et al.*, 2002). A importância económica dos vírus da oliveira não está suficientemente esclarecida, no entanto, a sua presença surge frequentemente associada a um declínio da árvore e a uma diminuição da capacidade de enraizamento de estacas provenientes dessas plantas (Clara, 1998).

A directiva da União Europeia “*Conformitas Agraria Communitatis*” (CAC) (Directiva da União Europeia 93/48 de 23/6/93) relativa ao material propagativo de árvores de fruto, exige que o material propagativo de oliveira esteja isento de todos os vírus.

O objectivo deste trabalho consiste em adaptar e aplicar duas técnicas de diagnóstico viral baseadas em propriedades dos RNAs genómicos dos necrovirus *Olive latent virus 1* e *Tobacco necrosis virus D*, para aplicação em larga escala, com vista à certificação fitossanitária de uma colecção de clones da cv. ‘Negrinha de Freixo’ (D.O.) de *Olea europaea* L.



## *II.*

# *Revisão Bibliográfica*

## 1. SINTOMAS CAUSADOS POR VÍRUS

Segundo Matthews (1992), a observação da sintomatologia foi o passo inicial da investigação em virologia, antes dos vírus terem sido isolados e caracterizados. Este método, utilizado com vista à identificação do vírus, era confuso uma vez que vários vírus causam sintomas idênticos e o mesmo vírus pode causar uma grande variedade de sintomas (Matthews, 1992).

A sintomatologia observada nos hospedeiros é de tal modo importante que os vírus incluem, nos seus nomes, termos que descrevem um sintoma importante no hospedeiro onde pela primeira vez foi descrito. Alguns vírus podem infectar uma planta sem produzir quaisquer sintomas visíveis de doença (infecções latentes) enquanto que outros podem levar à rápida morte da planta. Entre estes dois extremos pode ser produzida uma larga variedade de sintomatologias. Os sintomas macroscópicos podem ser locais ou sistémicos. São sintomas locais quando o vírus causa a formação de pequenas lesões, cloróticas ou necróticas, apenas nos locais de entrada (Agrios, 1997). Em quase todas as doenças virais de plantas que ocorrem no campo, o vírus está presente por toda a planta e os sintomas produzidos são denominados sistémicos. Os sintomas mais comuns produzidos por infecções sistémicas são os mosaicos e as manchas em anel. Os mosaicos são caracterizados pela alternância de áreas verde-claras ou amarelas com o verde normal das folhas ou frutos (Agrios, 1997). As manchas em anel consistem num grupo central de células mortas, em volta do qual estão anéis superficiais concêntricos, também de células mortas, e que têm o tecido verde normal entre eles (Matthews, 1992). Um grande número de outros sintomas menos comuns, já descritos, incluem: impedimento no desenvolvimento; nanismo; enrolamento das folhas; amarelecimentos; tumores; distorções dos caules e frutos (Agrios, 1997).

## 2. A TRANSMISSÃO DE VÍRUS DE PLANTAS

Como parasitas obrigatórios, os vírus normalmente dependem, para a sua sobrevivência, da capacidade de passar frequentemente de um indivíduo susceptível para outro. O conhecimento dos modos pelos quais os vírus são transmitidos de planta para planta é importante por várias razões: 1) do ponto de vista experimental, pode-se ver que uma doença é provocada por um vírus se fôr transmitida a indivíduos saudáveis por algum meio e reproduzida; 2) os vírus só são economicamente importantes se conseguirem disseminar rapidamente relativamente à vida comercial da cultura; 3) o conhecimento dos modos pelos quais os vírus se mantêm e se espalham no campo é normalmente essencial para o desenvolvimento de medidas de controlo.

Os vírus por si só não conseguem penetrar a cutícula da planta intacta e a sua parede celular. Este problema é ultrapassado quer evitando a necessidade de penetrar a superfície da planta intacta (ex. em transmissão por semente ou por propagação vegetativa) quer através de algum método envolvendo a penetração através de feridas, como na inoculação mecânica e transmissão por insectos (Hull, 2002).

### 2.1. MODOS DE TRANSMISSÃO DOS VÍRUS DE PLANTAS

Os vírus são transmitidos para as plantas de várias formas, tais como através de: propagação vegetativa, transmissão mecânica, semente, pólen, plantas parasitas (*Cuscuta* spp.), insectos, ácaros, nemátodes e fungos (Agrios, 1997).

Neste trabalho será dada particular importância à transmissão de vírus por fungos.

#### 2.1.1. Transmissão por fungos

Os vírus de plantas que têm fungos como vectores são cerca de 20 a 30. Embora seja um número pequeno comparando com os que têm como vectores artrópodes, nestes estão incluídos agentes de várias doenças importantes. Comparada com a transmissão por insectos, particularmente por afídeos, a transmissão por fungos não está muito estudada (Adams, 1991). Os fungos envolvidos são todos parasitas obrigatórios que invadem as raízes através dos seus zoósporos e que são membros da classe *Chytridiomycetes* e divisão Eumycota (*Olpidium* spp.) ou da classe *Plasmodiophoromycetes* e divisão Myxomycota (*Polymyxa* ou *Spongospora* spp.) (Hull, 2002), no entanto de acordo com alguns autores (Alexopoulos *et al.*, 1996), os

*Plasmodiophoromycetes*, pertencentes ao filo *Plasmodiophora*, são considerados como membros do Reino Protista. O progresso no entendimento da relação entre os vírus e os seus vectores tem sido lento, principalmente devido à biologia do fungo. No entanto, sabe-se que existem 2 tipos de transmissão, o tipo não-persistente no qual o vírus é transportado externamente pelo zoósporo e é transmitido à planta quando o zoósporo infecta a célula da raiz. A transmissão não persistente ocorre entre os vírus isométricos da família *Tombusviridae* (como é o caso do TNV) e os fungos *Olpidium brassicae* e *O. bornavirus*. Existe também o tipo persistente no qual o vírus é transportado internamente nos zoósporos, os vírus só podem ser adquiridos pelo vector quando este está a crescer dentro da planta hospedeira e o vírus é transportado dentro dos esporos do fungo. A transmissão persistente ocorre entre os vírus de forma alongada dos géneros *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus* ou *Pomovirus* ou filamentosos do género *Bymovirus* e são transmitidos por fungos da classe *Plasmodiophoromycetes* e também pelo *O. brassicae* (Hull, 2002).

A classe *Plasmodiophoromycetes* é a única classe pertencente ao filo *Plasmodiophoromycota*. Os seus membros são, em geral, endoparasitas obrigatórios de plantas vasculares, algas e outros organismos, como fungos. Este filo possui apenas dez géneros, no entanto, destacam-se três espécies pela sua importância económica, uma vez que são vectores de vírus de plantas, nomeadamente, *Spongospora subterranea*, *Polymyxa graminis* e *Polymyxa betae* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

De seguida apresenta-se um estudo mais aprofundado da transmissão de vírus pelos fungos da classe *Chytridiomycetes*.

#### 2.1.1.1. Classe *Chytridiomycetes*

Os chytridiomycetes constituem a única classe pertencente ao Filo *Chytridiomycota*. Estes fungos dependem dos seus zoósporos para a sua dispersão. Os vectores de vírus pertencentes a esta classe – *O. brassicae* e *O. bornavirus* – são parasitas obrigatórios e são extremamente comuns nas raízes de várias plantas em todo o mundo. São parasitas que não causam danos por si só, mas estão associados a perdas de culturas porque os seus zoósporos podem ser vectores importantes de vírus de plantas (Weber & Webster, 2000).

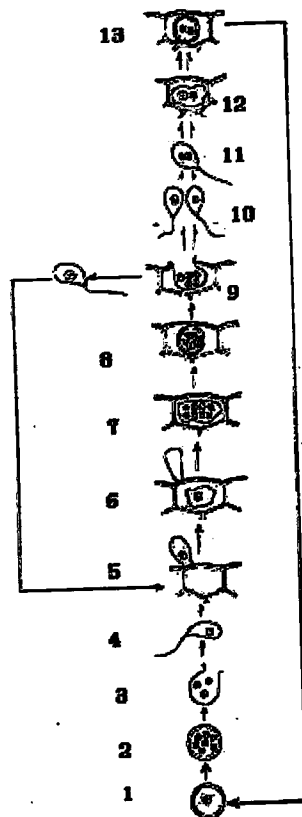
#### 2.1.1.1.1. Ciclo de vida do fungo *Olpidium brassicae*

Em condições de humidade, os esporângios de resistência (2) do fungo *O. brassicae* libertam zoosporos (3, 4). Os zoosporos enquistam (5) nas células epidérmicas de um hospedeiro adequado, especialmente na zona de alongação da raiz (Fry & Campbell, 1966; citados por Temmink & Campbell, 1969), recolhendo o seu flagelo (Temmink & Campbell, 1969) (figura 1).

Após o enquistamento do zoosporo, o conteúdo do quisto entra na célula (6), deixando para trás o seu ectoplasto e tonoplasto (Matthews, 1992) e forma um talo holocárpico (7), uma única estrutura tipo saco na qual todo o citoplasma é convertido em zoosporos, que se torna num zoosporângio (8) (Temmink & Campbell, 1968).

Em condições de humidade, os zoosporos são libertados (9) através de um máximo de 3 tubos de saída por esporângio e vão repetir o processo de infecção (Kassanis e Macfarlane, 1964).

Quando as condições deixam de ser favoráveis, o fungo passa para a reprodução sexuada, os dois gâmetas unem-se (10) dando origem a um zigoto (11) que invade as células das plantas e torna-se num esporângio de resistência (12) com uma parede espessa (Kassanis & Macfarlane, 1964). No entanto, embora Kusano (1912) (citado por Alexopoulos *et al.*, 1996) tenha descrito a copulação dos gâmetas e a formação de esporângios de resistência com uma parede espessa, esta parte do ciclo ainda não foi confirmada (Alexopoulos *et al.*, 1996) e não se sabe quais são as condições que levam à formação dos esporos de resistência (Barr, 1988). Em 1960, Sparrow (citado por Garret e Tomlinson, 1967) refere que em algumas espécies pertencentes à classe *Chytridiomycetes*, esporos de resistência, não distintos daqueles formados sexualmente, se podiam formar por processos assexuados. Mais tarde, Kassanis e Macfarlane (1968) referem que a formação dos esporos de resistência não é, ou não é só, resultado de um processo sexual que ocorre antes da infecção, uma vez que eles observaram que alguns *thalli* uninucleados se podiam desenvolver e formar esporos de resistência (Kassanis e Macfarlane, 1968). Através dos esporos de resistência, *O. brassicae* pode permanecer viável no solo até 20 anos (Campbell, 1985; citado por Weber & Webster, 2000).



Adaptado de [www.gartenbau.uni-hannover.de](http://www.gartenbau.uni-hannover.de)

Figura 1: Ciclo de vida do *Oplidium brassicae*

#### 2.1.1.1.2. A transmissão de vírus

Aqui há que distinguir os 2 tipos de transmissão, a transmissão não persistente e a transmissão persistente.

Como já foi referido anteriormente, no caso da transmissão não persistente, os vírus são adsorvidos à superfície da parede do zoosporo (Hull, 2002). Este tipo de transmissão envolve uma associação altamente específica entre o vírus e o vector e depende inicialmente da adsorção das partículas virais às membranas externas dos zoosporos.

Menos claro é o mecanismo pelo qual o vírus, na superfície do zoosporo é transmitido à célula da planta. A explicação mais simples seria que o vírus entrava no hospedeiro pela mesma via que o fungo. As partículas virais serão quase inevitavelmente empurradas para a célula do hospedeiro aquando do enquistamento do zoosporo (Kassanis e Macfarlane, 1964). A parede do zoosporo, com os vírus adsorvidos, permanece fora do hospedeiro, após o conteúdo do zoosporo ter penetrado. A membrana que envolve o protoplasto do zoosporo no interior do hospedeiro é

sintetizada de novo e por isso, isenta de vírus (Temminck e Campbell, 1969). Uma outra teoria, actualmente aceite, propõe que o vírus entra com a recolha do flagelo e enquistamento do zoosporo. Durante a recolha do flagelo, os vírus a este adsorvidos, entram no citoplasma do fungo e, após o citoplasma do quisto penetrar na célula da raiz do hospedeiro, o vírus é libertado no citoplasma do hospedeiro onde se multiplica (Adams, 1991). Não se sabe como é que o vírus passa do citoplasma do zoosporo para o citoplasma do hospedeiro mas pensa-se que tal ocorre logo no início na infecção da raiz pelo fungo (Hull, 2002).

No caso da transmissão persistente o vírus é transportado dentro dos zoosporos quando eles são libertados dos esporângios ou dos esporos de resistência e infectam o novo hospedeiro quando estes zoosporos causam a sua própria infecção na raiz. O processo de aquisição e libertação do vírus por parte dos zoosporos ainda não é conhecido.

Como já se referiu anteriormente, os vírus de plantas são vectorizados apenas pelos fungos *Olpidium* spp. (classe *Chytridiomycetes*) e pelos géneros *Polymyxa* e *Spongospora* spp. (classe *Plasmodiophoromycetes*). Nenhum outro género de fungo é conhecido como vector de vírus, pelo que se pode questionar porque é que este papel é restricto a apenas algumas espécies. Uma característica comum aos fungos vectores é que são parasitas obrigatórios que infectam as células das plantas sem as matar. As infecções por espécies de *Olpidium* e *Polymyxa* são tão comuns nas raízes, que existe uma grande quantidade de zoósporos vectores para os vírus os explorarem. Para além disso, tanto o *Olpidium* spp. como os plasmodiophoromycetes podem sobreviver vários anos no solo sob a forma de esporos de resistência. Em muitos casos, estes esporos de resistência podem conter partículas virais, tornando praticamente impossível erradicar os vírus do local, uma vez lá introduzidos.

### 3. DIAGNÓSTICO DE VÍRUS

As técnicas de diagnóstico tornam-se úteis em vários sentidos: para seleccionar plantas saudáveis para propagação, para auxiliar em programas de selecção clonal e sanitária, para conhecer a ecologia e epidemiologia das doenças virais e para ajudar a desenvolver estratégias adequadas a estas doenças (Clara *et al.*, 1997).

Existem vários métodos que podem ser usados, individualmente ou em simultâneo, para determinar a presença de vírus em plantas de oliveira (Clara *et al.*, 1997).

#### 3.1. OBSERVAÇÃO DA SINTOMATOLOGIA

A **observação da sintomatologia** das plantas não é grande ajuda no diagnóstico de vírus uma vez que diferentes factores podem causar sintomas muito semelhantes (Clara *et al.*, 1997) e em certos casos, não induzem sintomas. Por exemplo, as oliveiras infectadas, na sua maioria, não apresentam sintomas e, alguns vírus que causam sintomas em certas cultivares, são latentes noutras (Martelli *et al.*, 2002).

#### 3.2. TRANSMISSÃO MECÂNICA

A **transmissão mecânica** consiste na introdução do vírus infeccioso, ou do RNA viral, numa planta, através de feridas feitas na superfície das folhas, o que se torna necessário, uma vez que os vírus são incapazes de penetrar por si só nas células vegetais (Matthews, 1992). Este método requer equipamento simples e é de fácil realização, no entanto exige um longo tempo para se obterem resultados, só detecta vírus mecanicamente transmissíveis e não é específico, ou seja, não dá informação acerca do vírus presente (Clara *et al.*, 1997). Este método não nos permite dizer que determinada planta suspeita não tem vírus, mas permite-nos dizer que tem quando as plantas inoculadas apresentam sintomas que são transmitidos a outras plantas herbáceas indicadoras (Vala, 2001).

#### 3.3. TESTES SOROLÓGICOS

Os **testes sorológicos** são baseados em reacções de ligação entre os antígenos e os anticorpos específicos e proporcionam um método rápido para detectar vírus em plantas (Matthews, 1992). As propriedades antigénicas da proteína do vírus e os anticorpos produzidos em animais de laboratório constituem a base de um conjunto de



testes sorológicos que oferece numerosas vantagens em relação aos testes tradicionais baseados na observação da sintomatologia e no uso de plantas indicadoras (Sward e Eagling, 1995). Os complexos antigene-anticorpo podem ser observados, em condições apropriadas, como um precipitado branco, em testes de precipitação ou de imunodifusão (Clara *et al.*, 1997), após sombreamento metálico ou coloração negativa ao microscópio electrónico, em imunomicroscopia electrónica (Matthews, 1992), ou como uma mudança de cor, em teste ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Clara *et al.*, 1997).

O teste ELISA, essencialmente descrito por Clark e Adams (1977), tem sido utilizado com sucesso, na detecção de vírus em vários órgãos de plantas de oliveira, tal como folhas, frutos e raízes novas (Henriques *et al.*, 1992; Rei *et al.*, 1993). De entre as diversas variantes do teste ELISA, a mais usada é a 'double antibody sandwich' (DAS-ELISA), ou seja a 'sandwich' dupla de anticorpos descrita por Clark e Adams (1977). As principais vantagens do teste ELISA são: a identificação do vírus presente; a especificidade da reacção que permite ao vírus ser detectado na presença de materiais do hospedeiro ou outras impurezas; a rapidez na obtenção dos resultados; a directa proporcionalidade da resposta à concentração do vírus e, tal como os outros testes sorológicos, é particularmente útil com vírus que não são transmissíveis mecanicamente (Matthews, 1992). Este método permite testar um elevado número de amostras e é um teste sensível, detectando concentrações tão baixas como 1 – 10 ng/ml (Matthews, 1992). No entanto, este método exige que exista um anticorpo específico para o vírus a ser identificado, o que se pode considerar uma desvantagem (Clara *et al.*, 1997).

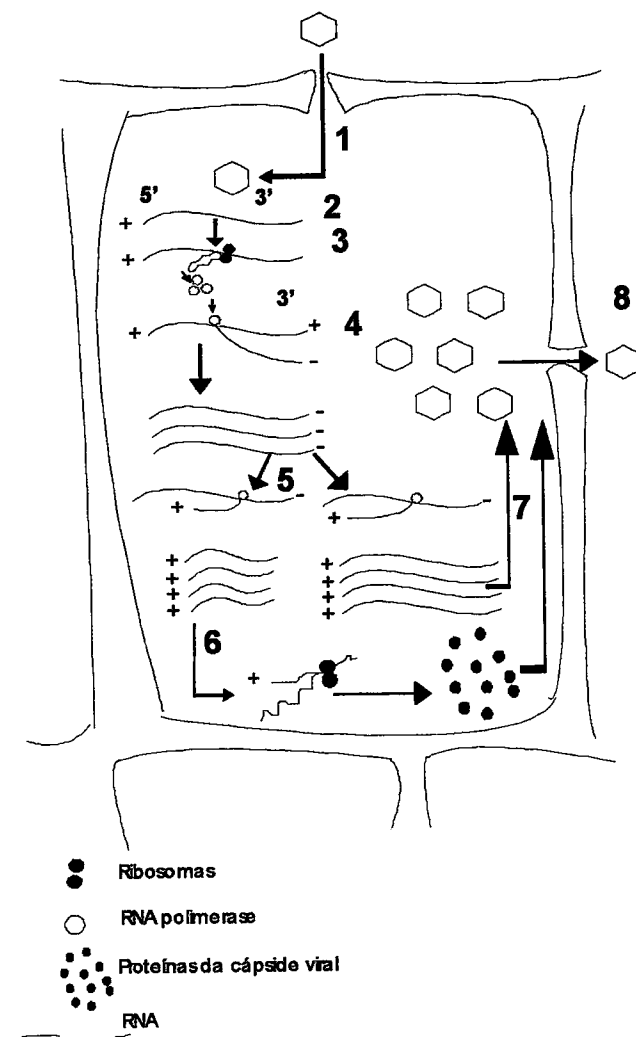
### 3.4. HIBRIDAÇÃO MOLECULAR

A **hibridação molecular** baseia-se na interacção entre as bases de duas cadeias complementares de ácidos nucleicos ligadas por ligações de pontes de hidrogénio (Hull, 2002). Quando os ácidos nucleicos em solução são sujeitos a altas temperaturas, as cadeias são desnaturadas devido à quebra das ligações de hidrogénio. Esta temperatura de desnaturação ( $T_m$  – 'melting temperature') depende de vários factores, tais como: a composição do ácido nucleico, a concentração de sais e o pH da solução e a presença de compostos que podem quebrar a ligação de hidrogénio, como é o caso da formamida. A dupla cadeia é reassociada quando a temperatura é inferior à  $T_m$ . Na técnica de hibridação 'dot blot', a mostra de ácido nucleico a ser testada é desnaturada e

imobilizada numa membrana de nitrocelulose ou nylon seguida de hibridação a uma sonda de ácido nucleico marcada radioactivamente ou não radioactivamente.

### 3.5. ANÁLISE DE DSRNA

A análise de duplas cadeias de ácido ribonucleico (dsRNA), como método de diagnóstico, baseia-se no facto de as plantas não infectadas com vírus RNA (que constituem cerca de 90% dos vírus de plantas até agora conhecidos (Valverde *et al.*, 1990)) não conterem quantidades detectáveis de segmentos de dsRNA de alto peso molecular ( $> 0,1 \times 10^6$  Da) e por esta razão a sua existência numa planta pode ser um indicador da infecção por um vírus RNA (Dodds *et al.*, 1984). Durante a sua replicação na célula hospedeira infectada são produzidas duplas cadeias de RNA específicas do vírus, como um produto intermediário, que podem ser isoladas e depois detectadas num gel por electroforese em agarose ou poliacrilamida (Clara *et al.*, 1997). Estas duplas cadeias de RNA são chamadas de 'formas replicativas' (RF – replicative form) e estão presentes quando uma planta está infectada com um vírus de cadeia simples de RNA (Valverde *et al.*, 1990). Como se pode observar através da figura 2 que representa um esquema muito simplificado da replicação de um vírus RNA de sentido positivo, quando o vírus entra na célula (1), o RNA liberta-se da cápside (2). O RNA infeccioso associa-se aos ribosomas do hospedeiro e é sintetizada a RNA-polimerase (3). A RNA-polimerase, faz uma cópia do genoma viral de sentido positivo, formando uma cadeia de RNA complementar de sentido negativo (4), que vai servir de molde para a síntese de outras cadeias de sentido positivo (5). Os ribosomas da célula hospedeira sintetizam um grande número de subunidades da cápside proteica (6). As cadeias de sentido positivo, após encapsidação, constituirão as novas partículas virais (7) que podem migrar para as células vizinhas das plantas através dos plasmodesmos (8). Durante o processo de replicação, podem-se formar outras formas moleculares, de cadeia parcialmente dupla e parcialmente simples de RNA, denominadas de formas replicativas intermédias (RI – intermediate replicative).



Adaptado de Matthews, 1992

**Figura 2:** Esquema representativo simplificado da replicação de um vírus ssRNA positivo numa célula vegetal (o esquema não se encontra à escala)

Morris e Dodds (1979) desenvolveram um método para o isolamento e análise de dsRNA a partir de plantas ou fungos infectados. De seguida descrevem-se as etapas deste método, que se resumem na figura 3:

1. Maceração dos tecidos da planta para libertar os conteúdos celulares; 2. Desnaturação de proteínas e minimização da actividade das ribonucleases: os tecidos são homogeneizados na presença de um tampão apropriado para desnaturar proteínas. Normalmente utiliza-se um tampão de pH elevado e com um teor salino moderado (0,1M) a elevado (1M) para reduzir a actividade das ribonucleases (Diaz-Ruiz e Kaper,

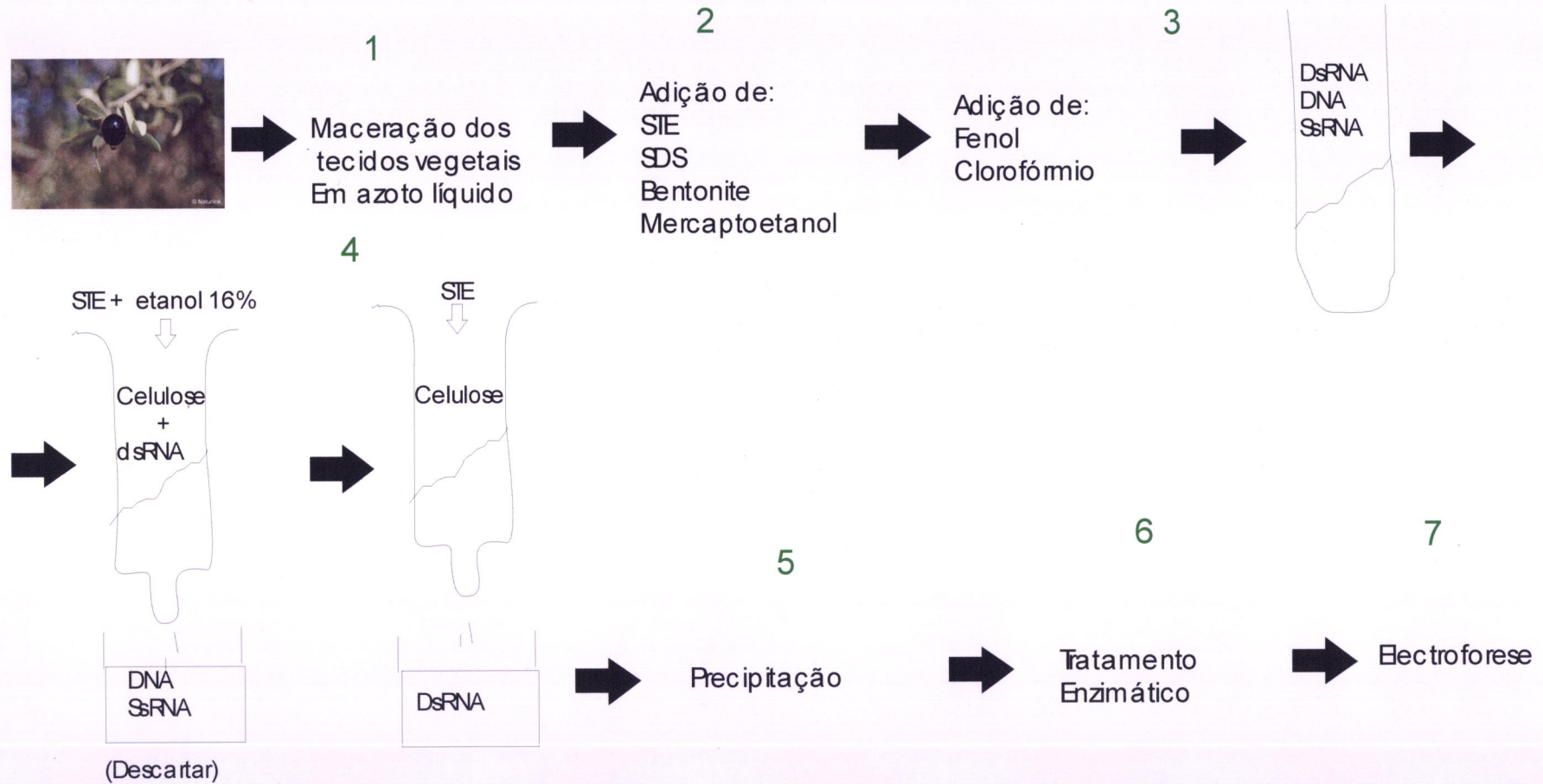
1978, citados por Dodds *et al.*, 1984). Aditivos como a bentonite também são usados para reduzir a actividade das nucleases. Detergentes como o sulfato dodecil de sódio (SDS) são utilizados para assegurar a desnaturação das proteínas e a libertação do ácido nucleico. Aditivos como o mercaptoetanol podem ser úteis para prevenir a oxidação e escurecimento dos extractos de tecidos das plantas (Dodds *et al.*, 1984); 3. Separação de ácidos nucleicos das proteínas e outros componentes celulares: o uso do fenol e clorofórmio garante uma boa separação das fases após centrifugação e promove uma remoção mais completa das proteínas da fase aquosa onde os ácidos nucleicos se encontram em solução (Dodds *et al.*, 1984); 4. Fraccionamento dos ácidos nucleicos usando celulose: o fraccionamento dos ácidos nucleicos faz-se por eluição em cromatografia em colunas de celulose (Whatman CF11). Esta técnica é baseada na diferente adsorção à celulose que as cadeias simples e duplas de RNA e DNA têm, na presença de várias concentrações de etanol. A adsorção da maior parte dos ácidos nucleicos ocorre com concentrações de etanol superiores a 35%. As fracções de DNA e de ssRNA eluem em tampões com 15 – 18% de etanol, enquanto que o RNA de estrutura secundária, como as dsRNA, mantém-se ligado. A celulose é lavada com vários volumes de tampão contendo 15% de etanol para remover ssRNA e DNA. A eluição das dsRNA é feita num pequeno volume de tampão sem etanol (Dodds *et al.*, 1984); 5. Precipitação e centrifugação para recolha das dsRNA; 6. Remoção de eventuais resíduos de DNA e ssRNA por digestão com enzimas apropriadas: a eliminação de eventuais cadeias contaminantes de ssRNA e/ou de DNA faz-se por digestão com enzimas (RNases e DNases) (Saldarelli *et al.*, 1994). Tais procedimentos requerem subsequente remoção das proteínas pela proteinase K e a extracção fenólica para evitar a degradação das dsRNA (Tullis e Rubin, 1980, citados por Dodds *et al.*, 1984); 7. Separação das dsRNA por electroforese em géis de agarose ou poliácridamida: a separação das diferentes moléculas de dsRNA faz-se em função da sua mobilidade dependente do seu tamanho. As moléculas mais pesadas migram menos, pelo que é possível a determinação das massas moleculares de cada uma das bandas de dsRNA que aparecem no perfil electroforético, em função da mobilidade de outras bandas de dsRNA de massa molecular conhecida (Félix, 1998); 8. Detecção das dsRNA por coloração do gel com nitrato de prata ou brometo de etídio e, neste último caso, as moléculas só são visualizadas com radiação ultravioleta (Clara *et al.*, 1997).

Esta técnica de análise de dsRNA é relativamente simples, não requer o conhecimento das propriedades das partículas do vírus e o isolamento deste tipo de

moléculas é geralmente independente do hospedeiro (Dodds, 1986) ou do vírus com genoma RNA (Valverde *et al.*, 1990). Permite a detecção de um vasto leque de infecções causadas por vírus com genoma RNA, quer sejam mecanicamente transmissíveis ou não, podendo os resultados ser obtidos em 2 dias (Clara *et al.*, 1997). Esta técnica detecta infecções mistas que passam 'despercebidas' por outros métodos podendo resultar em diagnósticos incorrectos (Valverde *et al.*, 1990).

Por outro lado, esta técnica é relativamente morosa, requer grandes quantidades de amostra e obriga a um conhecimento de prática laboratorial considerável. Não identifica o vírus presente, embora o peso molecular das dsRNA forneça indicações do género a que pertence (Clara *et al.*, 1997), sendo para isso necessário o conhecimento do número e peso molecular dos RNA virais dos diferentes grupos de vírus (Valverde *et al.*, 1990). As dsRNA detectadas podem ser tanto as formas replicativas de um vírus ssRNA como o genoma de um vírus dsRNA (Dodds *et al.*, 1984). Embora a forma replicativa de um vírus ssRNA seja o tipo mais comum de encontrar, os outros tipos de dsRNA são importantes porque podem ser confundidos com a RF dos vírus ssRNA. Os vírus de plantas conhecidos como tendo um genoma dsRNA são de dois tipos principais: vírus pertencentes ao género *Cryptovirus* (Boccardo *et al.*, 1987, citados por Jones, 1992) e vírus pertencentes ao género *Reovirus* (Boccardo e Milne, 1984, citados por Jones, 1992) (Jones, 1992).

Este método não detecta vírus com genomas DNA e torna-se impraticável para diagnóstico de alguns grupos de vírus, como os dos géneros *Luteovirus* e a maioria dos vírus do género *Potyvirus*, porque possuem baixas quantidades de dsRNA (Valverde *et al.*, 1990).



Adaptado de Valverde *et al.*, 1990

**Figura 3:** Etapas básicas do processo de extracção e análise de dsRNA a partir de tecido vegetal

### 3.6. REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reacção em cadeia da polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction), pela primeira vez descrita em 1985, tornou-se um meio eficaz e relativamente simples para a detecção de baixas concentrações de ácidos nucleicos de viróides, vírus e outros patógenos (Bos, 1999). A sua descoberta foi um grande passo no desenvolvimento da biologia molecular, ultrapassando o problema das baixas quantidades de DNA nas amostras, permitindo que uma sequência de DNA com interesse fosse amplificada milhões de vezes. Um factor que pode ser um problema no uso desta técnica é a possibilidade de que DNA não alvo possa ser amplificado (Matthews, 1992).

O PCR é um mecanismo para amplificar uma região de DNA entre 2 oligonucleótidos (*primers*), que são sintetizados para serem complementares de sequências conhecidas do DNA alvo (Matthews, 1992). Estes têm 14 – 30 nucleótidos de comprimento e são usados para delimitar a sequência de DNA escolhida para ser amplificada (Bos, 1999). Inicialmente o DNA (que é constituído por 2 cadeias) é sujeito a temperaturas elevadas (temperatura de desnaturação) para separar as cadeias e depois a um abaixamento da temperatura (temperatura de *annealing*), permitindo a hibridação dos *primers* (Matthews, 1992). Os dois *primers* hibridam em cadeias opostas da sequência de DNA alvo e são orientados de modo a que a síntese de DNA siga na região entre os primers (Saiki, 1990). Esta região é replicada a temperaturas elevadas (temperatura de extensão), a partir de dNTPs adicionados e com a ajuda da DNA polimerase (Bos, 1999). O factor chave que veio possibilitar o vasto uso do PCR foi a introdução, em 1986, da DNA polimerase (*Taq* polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* (Skerrit e Appels, 1995), que é estável a altas temperaturas, não obrigando à adição de nova enzima após cada ciclo de amplificação (Bos, 1999). Ciclos sucessivos de desnaturação do DNA, hibridação dos primers e extensão desses primers com a DNA polimerase, duplicam a quantidade de DNA alvo sintetizada no ciclo anterior. No fim do primeiro ciclo existem duas cópias da sequência alvo. O resultado é uma acumulação exponencial do fragmento alvo específico, aproximadamente  $2^n$ , sendo 'n' o número de ciclos de amplificação executados (Saiki, 1990). Os produtos amplificados são depois visíveis por electroforese num gel de agarose ou de poliacrilamida.

Todos os vírus que infectam a oliveira, até agora conhecidos, têm um genoma constituído por cadeias simples de RNA. Uma vez que este método amplifica fragmentos de DNA, é necessário que o RNA viral seja previamente transcrito para

DNA complementar (cDNA) e isso é conseguido através da enzima transcriptase reversa (RT- Reverse Transcription) (Tzanetakis, 2005).

Diferentes variantes de RT-PCR têm sido desenvolvidas, entre elas incluem-se: RT-PCR num só passo, 'nested PCR', 'co-PCR', 'multiplex PCR' e 'PCR em tempo real'.

Na tabela 1 podem-se observar os *primers* desenhados para RT-PCR de alguns dos vírus que infectam a oliveira assim como a região amplificada (Grieco *et al.*, 2000).

Tabela 1: *Primers* desenhados para o diagnóstico por RT-PCR de vírus que infectam a oliveira

Vírus	Região amplificada	Sequências dos primers	Comprimento da região amplificada
OLV-1	3'-terminal	5'-CTCACCCATCGTTGTGTGG-3'	747 nt
		5'-TTTCACCCACCAAATGGC-3'	
SLRV	cápside proteica	5'-TCAAGGAGAATATCCCTGGCCC-3'	525 nt
		5'-CTAAGTGCCAGAACTAAACC-3'	
CMV	RdRp	5'-TAACCTCCCAGTTCTCACCGT-3'	513 nt
		5'-CCATCACCTTAGCTTCCATGT-3'	
ArMV	cápside proteica	5'-TTGGTTAGTGAATGGAACGG-3'	504 nt
		5'-TCAACTCACCTCCAAATCCC-3'	
OLRSV	3'-terminal	5'-CTGCAAACTAGTGCCAGAGG-3'	492 nt
		5'-TGCATAAGGCTCACAGGAG-3'	
CLRV	cápside proteica	5'-TTGGCGACCGTGTAAACGGCA-3'	431 nt
		5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3'	
OLV-2	RdRp	5'-ACGTGTTAGTCGCTGTGGTACC-3'	390 nt
		5'-TATGTTTGACGCACCGGAGCG-3'	
OLYaV	proteína semelhante a hsp70	5'-CGAAGAGAGCGGCTGAAGGCTC-3'	383 nt
		5'-GGGACGGTTACGGTCGAGAGG-3'	
TNV-D	cápside proteica	5'-GTGTTTCAGTCATATACATACC-3'	257 nt
		5'-GCCTATTGTGCTGTACCAC-3'	

Adaptado de Grieco *et al.*, 2000 e Cardoso *et al.*, 2004



#### 4. *Olea europaea* L.

A oliveira tem desde sempre estado associada a práticas religiosas, a mitos e tradições, a manifestações artísticas e culturais, a usos medicionais e gastronómicos. Na Antiga Grécia eram feitas coroas de folhas de oliveira para os atletas vencedores, tradição esta reposta nos últimos jogos olímpicos (Atenas 2004). É extenso o legendário sobre o azeite e a oliveira o que mostra a consideração e o respeito que sempre teve por parte dos povos (Saramago, 2001). A origem da oliveira remonta à Era Terciária, antes do nascimento do Homem, e situa-se na Ásia Menor. Por volta de 3000 a.C., a oliveira era já cultivada por todo o “crescente fértil”, tendo sido os gregos os responsáveis pela dispersão desta cultura pela Europa mediterrânica. Mais tarde, a cultura do olival espalhou-se pela bacia mediterrânica, chegando à América através das expedições marítimas dos portugueses e espanhóis (Ferguson *et al.*, 1994). Actualmente a oliveira encontra-se um pouco por todo o mundo, concentrando-se entre as latitudes de 30° e 45°, dos dois Hemisférios, que apresentam clima mediterrânico (Civantos, 1999).

A oliveira, como árvore típica do clima mediterrânico, encontra em Portugal condições edafoclimáticas óptimas para o seu desenvolvimento, ocupando assim um lugar de destaque no panorama agrícola português. Em termos nacionais a cultivar predominante é a Galega com cerca de 80% do total, aparecendo regionalmente outras cultivares tradicionais, nomeadamente a Azeiteira, Carrasquenha, Maçanilha Algarvia, Cordovil de Serpa, Cordovil de Castelo Branco, Verdeal Alentejana, Verdeal Transmontana, Galega de Serpa, Conserva de Elvas, Redondil, Bical, Negrinha e Madural (Sobreiro, 1993). Em fase de reconversão a que se está a assistir nos nossos olivais, têm sido implantados, ultimamente, um razoável número de olivais com cultivares regionais tradicionais (Sobreiro, 1993).

Em Portugal, o azeite ocupa o 8º lugar no que se refere aos produtos vegetais que mais contribuem para o rendimento agrícola (INE, 2001), o que mostra a importância que a oliveira tem no nosso país. Uma das mais importantes áreas produtoras de azeite do país situa-se na região de Moura-Serpa, onde se produz o ‘Azeite de Moura’, reconhecido com denominação de origem.

Estudos realizados em Portugal a 4 diferentes cultivares de oliveira, tais como a Santulhana (Trás-os-Montes), Verdeal Alentejana (Alentejo), Cordovil de Serpa (Alentejo) e Galega Vulgar (Alentejo), revelaram a presença de um número elevado de árvores infectadas, frequentemente atingindo os 100% (tabela 2) (Félix *et al.*, 2002).

**Tabela 2:** Taxas de infecção viral em oliveiras portuguesas detectadas pelos testes DAS-ELISA (para os vírus SLRSV, CLRV, CMV e ArMV) e inoculação mecânica

Santulhana (Trás-os-Montes)						
Oliveiras Testadas	I	II	III	IV	V	VI
Nível de infecção	60%	100%	73%	66%	70%	60%

Verdeal Alentejana (Alentejo)						
Oliveiras Testadas	A	B	C	D	E	F
Nível de infecção	50%	90%	90%	80%	50%	60%

Cordovil de Serpa (Alentejo)								
Oliveiras Testadas	G	H	I	J	L	M	N	O
Nível de infecção	0%	0%	0%	100%	80%	90%	10%	50%

Galega Vulgar (Alentejo)				
Oliveiras Testadas	P	Q	R	S
Nível de infecção	10%	10%	100%	100%

Adaptado de Félix *et al.*, 2002

Estes estudos foram realizados com o recurso a 2 métodos de diagnóstico: inoculação mecânica e teste DAS-ELISA, o que significa que o uso de métodos mais sensíveis, como RT-PCR, poderia dar ainda um maior número de árvores infectadas. Também noutros países se pode observar (tabela 3) que as taxas de infecção podem ser bastante elevadas, chegando mesmo a atingir os 100% no caso da Tunísia.

**Tabela 3:** Taxas de infecção viral em oliveiras de várias origens geográficas detectadas por análise de dsRNA

Países	Taxa de infecção (%)
Itália	76
Espanha	42
Grécia	63
Albânia	24
Malta	42
Chipre	33
Egipto	50
Líbano	70
Palestina	67
Tunísia	100
Marrocos	80
EUA	37
Austrália	50

Adaptado de Saponari *et al.*, 2002

A maioria dos vírus descritos para oliveira causam infecções latentes, cujo efeito no hospedeiro ainda não foi determinado. No entanto, a ocorrência de dsRNA mesmo em plantas sem sintomas indica que vários outros vírus, difíceis de isolar estão presentes na natureza. Existe pouca informação acerca da distribuição geográfica dos vírus que infectam a oliveira. Embora maior parte dos relatos venham de Itália e Portugal (Tabela 5), o isolamento de vários vírus de oliveira na Jordânia, Turquia e Espanha mostrou que estes ocorrem na natureza em todos os locais onde se pratica esta cultura.

Tabela 4: Distribuição geográfica dos vírus que infectam a oliveira

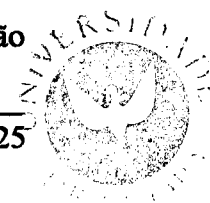
Vírus	Género	Distribuição geográfica
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal, Espanha
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	<i>Nepovirus</i>	Itália
<i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal, Espanha
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	Itália, Portugal, Espanha
<i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV)	<i>Nepovirus</i>	Itália, Portugal
<i>Olive latent virus 1</i> (OLV-1)	<i>Necrovirus</i>	Itália, Jordânia, Turquia, Portugal
<i>Olive latent virus 2</i> (OLV-2)	<i>Oleavirus</i>	Itália, Líbano
<i>Olive vein yellowing associated virus</i> (OVYaV)	<i>Potexvirus</i>	Itália
<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i> (OYMDaV)	Não determinado	Itália
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	Itália
<i>Olive semi-latent virus</i> (OSLV)	Não determinado	Itália
<i>Olive leaf yellowing associated virus</i> (OLYaV)	<i>Closterovirus</i>	Itália
<i>Tobacco necrosis virus A/D</i> (TNV-A/D)	<i>Necrovirus</i>	Portugal
<i>Olive mild mosaic virus</i> (OMMV)	<i>Necrovirus</i>	Portugal

Adaptado de Grieco *et al.*, 2000

#### 4.1. SINTOMAS SUGESTIVOS DA PRESENÇA DE VÍRUS EM *OLEA EUROPAEA* L.

Existem várias anomalias em árvores de *O. europaea* L., suspeitas de ser de origem viral por serem transmitidas por enxertia (Clara, 1996). Estas doenças podem ser agrupadas em 3 diferentes grupos (Martelli *et al.*, 2002): I) alterações transmitidas em oliveira por enxertia, mas cujos agentes ainda não foram identificados; II) alterações que não foram reproduzidas em oliveira por enxertia, aos quais estão associados agentes não identificados que induzem sintomas noutros hospedeiros para além da oliveira; III) alterações do tronco ou frutos, caracterizadas por serem semelhantes a sintomas induzidos por vírus, mas que ainda não foram transmitidas por enxertia.

No grupo I) encontram-se: a doença das folhas fauciformes (“sickle leaf”) que se manifesta por as folhas apresentarem limbos bi, tri, tetra ou pentafoliados ou leptofilicos, folhas com o limbo muito reduzido e uma elevada relação



comprimento/largura (Thomas, 1958; citado por Mohamed, 1996); a “**spherosis**” que foi pela primeira vez observada em Israel e é uma doença cuja sintomatologia é caracterizada por nanismo, redução do vigor e baixa produtividade (Lavee e Tanne, 1984) e o **amarelecimento infeccioso** (“infectious yellows”) cuja doença foi pela primeira vez observada em Itália na cv ‘Dolce Agogia’, que apresentava um amarelo intenso nas folhas acompanhado de uma redução do rendimento (Ribaldi, 1959; citado por Mohamed, 1996).

No grupo II) encontram-se: a **paralisia parcial** (“partial paralysis”), observada pela primeira vez na Argentina, em 1950 (Nicolini e Traversi, 1950; citados por Mohamed, 1996), as árvores infectadas apresentavam mosaicos e lesões em anel nas folhas, que se apresentavam sob a forma de roseta; a **deformação foliar** (“foliar deformation”), que é caracterizada por alterações na forma e tamanho das folhas, frequentemente acompanhadas por fasciação e bifurcação dos lançamentos (Fogliani, 1953; Ciferri *et al.*, 1953; citados por Alkowni, 2000).

No grupo III) encontram-se: o **fendilhamento da “casca” das árvores** (“bark cracking”) que foi observada na Jordânia em oliveiras da cv ‘Nabali’, que mostravam reduções no crescimento e na taxa de floração, assim como um amarelecimento generalizado das folhas. A “casca” da parte mais baixa das árvores mostrava-se anormalmente espessa, enrugada e com fendas (Martelli *et al.*, 1995). As **manchas dos frutos** (“olive fruit hump” e “olive fruit pox”) também pertencem a este grupo, foram pela primeira vez observadas, em 1993, 2 sintomatologias distintas na cv ‘Koroneiki’ e cv ‘Kolyreiki’ e foram descritas na Grécia (Kyriakopoulou, 1996). “Olive fruit hump” consiste no aparecimento de lesões esbranquiçadas e ligeiramente avolumadas na superfície dos frutos. “Olive fruit pox” consiste no aparecimento de lesões afundadas castanhas, normalmente de superfície áspera, não mostrando nenhuma forma de ferida na superfície.

#### 4.2. A PRESENÇA DE VÍRUS EM *OLEA EUROPAEA* L.

A primeira doença a sugerir a presença de vírus em oliveira foi descrita em Itália por Pesante em 1938 (citado por Mohamed, 1996) e consistia em anomalias das folhas, necrose do floema e um enfraquecimento seguido por vezes da morte da árvore. Mais tarde demonstrou-se que esta doença era, na realidade, causada pela carência de boro e é actualmente designada por leptonecrose (Mohamed, 1996). A presença de vírus em oliveira só foi observada mais tarde, na sequência de estudos de grãos de pólen da cv.

‘Correggiolo’ (Pacini e Cresti, 1977). Desde 1977 até hoje já foram isolados e descritos, a partir de material vegetal de oliveira, 14 vírus, encontrados quer em plantas que manifestavam sintomas da sua presença, quer em plantas aparentemente saudáveis (Martelli *et al.*, 2002).

Dos 41 géneros de vírus de plantas até hoje descritos (Martelli, 1997), 7 (Grieco *et al.*, 2002) contêm os 14 vírus que actualmente infectam a oliveira.

#### 4.2.1. Género *Necrovirus*

O género *Necrovirus* pertence à família *Tombusviridae* e apresenta vírus isométricos com genomas ssRNA não divididos. As partículas são icosaédricas com um diâmetro de *ca* 30 nm. As subunidades proteicas têm um peso de *ca* 30 kDa. O genoma consiste numa única molécula de (+)ssRNA, com cerca de 3,8 kb (19% do peso da partícula) (Martelli, 1997).

Os vírus pertencentes a este género que infectam a oliveira são: o OLV-1 (Gallitelli e Savino, 1985), o TNV (Félix e Clara, 2002), detectado sorologicamente com um antisoro de largo espectro (que detecta TNV-A e TNV-D) e o OMMV (Cardoso *et al.*, 2005).

#### 4.2.2. Género *Nepovirus*

O género *Nepovirus* pertence à família *Comoviridae* e apresenta vírus isométricos com genomas ssRNA bipartidos. As partículas são isométricas com um diâmetro de *ca* 30 nm, que sedimentam como 3 componentes (top (T), middle (M) e bottom (B)). As subunidades proteicas têm um peso de 55-60 kDa. O genoma consiste em 2 moléculas de (+)ssRNA encapsidadas em partículas M (RNA2: 3,5-7,2 kb) e partículas B (RNA1: 5,9-8,4 kb) constituindo 25-40% e 35-46% do peso da partícula, respectivamente (Martelli, 1997).

Os vírus pertencentes a este género que infectam a oliveira são: o ArMV (Savino *et al.*, 1979), o SLRSV (Savino *et al.*, 1979), o CRLV (Savino e Gallitelli, 1981), e o OLRV (Savino *et al.*, 1983). O SLRSV está associado a sintomas como folhas estreitas e enroladas, encurtamento dos entrenós, frutos pequenos, enrugados com caroços deformados (‘bumpy fruits’) e crescimento arbustivo (Marte *et al.*, 1986). Esta doença foi observada em plantas de oliveira da cv ‘Ascolana tenera’, em Itália (Marte *et al.*, 1986) e em Portugal, em várias cultivares de oliveira (Henriques *et al.*, 1992).

#### 4.2.3. Género *Cucumovirus*

O género *Cucumovirus* pertence à família *Bromoviridae* e apresenta vírus com genomas ssRNA tripartidos, com subunidades proteicas que têm um peso de 20-26 kDa. O genoma consiste em 3 moléculas funcionais de (+)ssRNA, encapsuladas em diferentes partículas (ca 18% do peso da partícula), RNA1: 2,9-3,6 kb, RNA2: 2,6-3 kb, RNA3: 2-2,2 kb de tamanho. O RNA4 (0,8-1 kb), uma forma subgenómica do RNA3 também está encapsulado.

O género *Cucumovirus* apresenta partículas isométricas de aparência granular e de diâmetro de ca 30 nm (Martelli, 1997). O CMV (Savino e Gallitelli, 1983) pertence a este género.

#### 4.2.4. Género *Oleavirus*

O género *Oleavirus* pertence à família *Bromoviridae*. As partículas são de quase esféricas a bastonetes de quatro tamanhos (26-55 x 18 nm). O genoma consiste em 3 moléculas de RNA funcionais de 3,1 kb (RNA1), 2,7 kb (RNA2) e 2,4 kb (RNA3) de tamanho, mas os viriões encapsulam ainda uma quarta molécula de RNA (2,1 kb). Um RNA subgenómico de 1 kb de tamanho não está encapsulado. As subunidades proteicas têm 24 kDa de peso.

O OLV-2 (Savino *et al.*, 1984) pertence a este género.

#### 4.2.5. Género *Closterovirus*

O género *Closterovirus* pertence à família *Closteroviridae* e apresenta vírus filamentosos com genomas ssRNA. Comprimento da partícula superior a 1000 nm, genoma monopartido. As subunidades proteicas têm um peso de 22-43 kDa. O genoma consiste em (+)RNA que constitui ca 5-6% do peso da partícula. O tamanho do genoma é de 15,5 a 19,3 kb.

O OLYaV (Sabadanovic *et al.*, 1999) pertence a este género. Apesar deste vírus nunca ter sido isolado nem observado ao microscópio electrónico foi denominado OLYaV por ter sido detectada, em extratos de tecidos corticais de plantas de oliveira das cultivares 'Biancolilla' e 'Nostrana' da Sicília que mostravam descoloração amarela intensa nas folhas, por RT-PCR, homologia com o gene Heat shock protein 70 (HSP70) da família *Closteroviridae* (Sabadanovic *et al.*, 1999).

#### 4.2.6. Género *Tobamovirus*

O género *Tobamovirus* é um género não agrupado, de vírus com partículas em forma de bastonete, de comprimento de 280 a 352 nm, mas com um tamanho frequente de 300 x 18 nm (como é o caso do TMV). Algumas espécies têm também partículas mais pequenas de 35-50 nm de comprimento. As subunidades proteicas têm um peso de 18 kDa. As partículas maiores encapsidam o genoma que consiste numa molécula de (+)ssRNA, de 6,4 kb de tamanho (ca 6% do peso da partícula). As partículas mais pequenas, quando presentes, encapsidam um RNA subgenómico que contém o gene da cápside proteica.

O TMV pertence a este género. Este vírus foi isolado e identificado sorologicamente a partir de plantas infectadas da cv 'Leccino', em Itália, que apresentavam sintomas de uma descoloração amarelada ao longo das nervuras principais, baixa produção, desfoliação severa e declínio – 'vein banding' (Triolo *et al.*, 1996). Fotografias da seiva infectada tiradas a partir do microscópio electrónico de transmissão, mostraram partículas semelhantes às do TMV.

#### 4.2.7. Género *Potexvirus*

O género *Potexvirus* é um género não agrupado, onde se encontram vírus com partículas filamentosas, com 470-580 x 13 nm de tamanho. As subunidades proteicas têm um peso de 18-23 kDa. O genoma é monopartido, de (+)ssRNA, de 6 kb de tamanho (6% do peso da partícula).

O OVYaV pertence a este género. Este vírus foi recuperado por transmissão mecânica de plantas infectadas por 'vein yellowing' (amarelecimento das nervuras) (Faggioli e Barba, 1995, citados por Martelli *et al.*, 2002).

#### 4.2.8. Outros

O OYMDaV (Savino *et al.*, 1996) e o OSLV (Materazzi *et al.*, 1996; citados por Saponari, 2001) são duas espécies de géneros ainda não determinados. Embora ainda não tenha sido provado o envolvimento deste último na doença 'vein clearing', que consiste numa clorose moderada das nervuras das folhas, as partículas isométricas de cerca de 28 nm de diâmetro observadas nos tecidos de plantas que manifestavam estes sintomas, foram denominadas de *Olive semilatent virus*.

*III.*

*Materiais e Métodos*



## **1. PROVENIÊNCIA DO MATERIAL VEGETAL E DOS SOLOS**

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes de frutos e ramos de oliveiras da Quinta do Valongo, em Mirandela, Trás-os-Montes pertencentes à colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo'. A cultivar 'Negrinha de Freixo' com 'Denominação de Origem' tem um elevado interesse económico e uma larga difusão em Trás-os-Montes, devido às boas características dos seus frutos para conserva. É uma cultivar de porte pequeno ou médio, típica das zonas de Barca d'Alva e Freixo-de-Espada à Cinta. Apresenta frutos arredondados com um peso médio de 3 a 5 gr e um baixo rendimento em azeite (12-16%). É uma cultivar por excelência dirigida à conserva (Leitão *et al.*, 1986) e encontra-se caracterizada morfológicamente (Santos *et al.*, 2001; Leitão, 2002) segundo a metodologia reconhecida internacionalmente e seguida pelo Conselho Oleícola Internacional. Tendo em vista a selecção dos melhores clones e a certificação de clones isentos de vírus, no final dos anos 80, foram eleitas, de um total de 125 árvores da cv. 'Negrinha de Freixo', as 15 árvores mais produtivas e com maior relação polpa/caroço (parâmetro importante uma vez que a azeitona é usada para mesa). Para tal foi feito o controlo das produções, sendo colhidas amostras destas árvores, ao acaso, e realizadas análises biométricas (Leitão, 1996). Estas árvores foram testadas para verificar a isenção de vírus, através de testes de inoculação mecânica em indicadores herbáceos e DAS-ELISA com antisoros para os vírus: SLRSV, CLRV e CMV.

De cada uma das árvores-mãe eleitas constituíram-se 15 clones (A – O) e propagaram-se 12 jovens plantas para se fazerem 4 repetições com grupos de 3 árvores. Em Março de 1996 foi instalado um ensaio comparativo com estas 180 árvores, na Quinta do Valongo, em Mirandela, Trás-os-Montes, com a disposição que se pode observar na figura 4. Em Abril de 2003 foram retestadas as 5 árvores com produções mais elevadas, pelo método de diagnóstico viral de análise de duplas cadeias de RNA. A análise, por este método, de tecidos floémicos de ramos semi-lenhosos revelou ausência de duplas cadeias de RNA, indicando a isenção de vírus (Leitão *et al.*, 2003).

														Parcela	
♣180	♣157	♣156	♣133	♣132	♣109	♣108	♣85	♣84	♣61	♣60	♣37	♣36	♣13	♣12	I
♣179	♣158	♣155	♣134	♣131	♣110	♣107	♣86	♣83	♣62	♣59	♣38	♣35	♣14	♣11	
♣178	♣159	♣154	♣135	♣130	♣111	♣106	♣87	♣82	♣63	♣58	♣39	♣34	♣15	♣10	
M	J	I	K	A	O	B	N	H	F	E	G	C	L	D	
														II	
♣177	♣160	♣153	♣136	♣129	♣112	♣105	♣88	♣81	♣64	♣57	♣40	♣33	♣16		♣9
♣176	♣161	♣152	♣137	♣128	♣113	♣104	♣89	♣80	♣65	♣56	♣41	♣32	♣17		♣8
♣175	♣162	♣151	♣138	♣127	♣114	♣103	♣90	♣79	♣66	♣55	♣42	♣31	♣18		♣7
O	E	D	N	H	A	L	I	J	K	F	B	M	G	C	
														III	
♣174	♣163	♣150	♣139	♣126	♣115	♣102	♣91	♣78	♣67	♣54	♣43	♣30	♣19		♣6
♣173	♣164	♣149	♣140	♣125	♣116	♣101	♣92	♣77	♣68	♣53	♣44	♣29	♣20		♣5
♣172	♣165	♣148	♣141	♣124	♣117	♣100	♣93	♣76	♣69	♣52	♣45	♣28	♣21		♣4
O	M	H	B	L	G	J	A	I	K	F	D	N	E	C	
														IV	
♣171	♣166	♣147	♣142	♣123	♣118	♣99	♣94	♣75	♣70	♣51	♣46	♣27	♣22		♣3
♣170	♣167	♣146	♣143	♣122	♣119	♣98	♣95	♣74	♣71	♣50	♣47	♣26	♣23		♣2
♣169	♣168	♣145	♣144	♣121	♣120	♣97	♣96	♣73	♣72	♣49	♣48	♣25	♣24		♣1
D	I	O	H	A	K	C	F	J	B	N	G	E	L	M	

Clones	
1	A
2	B
3	C
4	D
5	E
6	F
7	G
8	H
9	I
10	J
11	K
12	L
13	M
14	N
15	O

Figura 4: Colecção de clones 'Negrinha' – Quinta do Valongo (Trás-os-Montes)

Na Primavera de 2004 foram testados ramos de 2 anos das 5 árvores mais produtivas e das 5 árvores menos produtivas, n<sup>os</sup> 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147 e 150. No Outono de 2004 foram testados frutos de 161 árvores, n<sup>os</sup> 14 a 69, 71 a 96, 98 a 114, 116, 118 a 119, 121 a 174 e 176 a 180. Como controlos positivos foram utilizadas plantas de *Nicotiana benthamiana* Domin que foram semeadas e transplantadas no laboratório de Sanidade Vegetal e inoculadas com o isolado de OLV-1 designado GM6 (Félix, 2003) e outras com o complexo viral V10 que em estudos anteriores mostrou ser positivo para OLV-1 e TNV-D (Varanda, 2003).

Foram semeadas alfaces (*Lactuca sativa* L.) em amostras de solo retiradas em volta das árvores testadas na Primavera, para pesquisar a presença do fungo *Ospidium brassicae*, potencial vector do vírus TNV-D.

## 2. EXTRACÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DSRNA

### 2.1. EXTRACÇÃO DE DSRNA

A extracção de dsRNA foi realizada, a partir de ramos e de frutos de oliveira, em duas épocas do ano: Primavera e Outono de 2004. O RNA de cadeia dupla foi extraído seguindo o protocolo descrito por Morris e Dodds (1979), com algumas modificações.

Cada amostra (ramos e frutos), constituída por 10 gr de tecido vegetal, foi colocada em almofarizes de porcelana esterilizados e macerada, na presença de azoto líquido, até ficar em pó. Este foi colocado em frascos de polipropileno e foi-lhe adicionado: 45 mL de STE 2x (STE 1x: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 7,5), 17 mL de SDS 10 % (p/v), 1 mL de uma solução de bentonite (45 mg/mL de bentonite em 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 mL de β-mercaptoetanol, 25 mL de fenol saturado com água, contendo 0,1 % de 8-hidroxiquinolina (ao qual se juntou NH<sub>4</sub>OH na proporção de 4 µL/1 mL de fenol) e 25 mL de clorofórmio.

Os frascos ficaram a agitar cerca de 1 hora, selados com parafilme, à temperatura ambiente. O homogenado foi centrifugado a 16000 g durante 10 minutos. Ao sobrenadante adicionou-se etanol absoluto de modo a ficar numa concentração de 16 %, ao qual se juntou celulose (CF11 Whatman) na proporção de 1 gr por 10 gr de tecido vegetal. Deixou-se a agitar 2 horas à temperatura ambiente.

A partir deste ponto foram seguidos dois protocolos diferentes. Os frutos tiveram de ser testados com um protocolo diferente (protocolo 2) porque o uso de seringas como

colunas de cromatografia com extractos de frutos provocou o entupimento na extremidade da seringa tornando impossível a eluição.

**Protocolo 1:** Deitou-se a celulose numa coluna constituída por uma seringa de plástico com um tubo de borracha na extremidade, usando-se uma mola para controlar o fluxo de eluição. No interior da seringa, colocou-se previamente um 'filtro' de entretela com um diâmetro igual ao da seringa, para funcionar como barreira à celulose. A celulose foi lavada com 15 volumes de 1x STE contendo 16% de etanol e todo o volume eluído foi descartado. As dsRNA permaneceram adsorvidas à celulose e a sua eluição foi feita com 4 volumes de 1x STE, sendo todo o volume eluído colocado em tubos corex, a cada um dos quais se juntou 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5, durante 18 horas, para precipitação da fracção das dsRNA.

**Protocolo 2:** A mistura foi centrifugada a 10000 g durante 5 minutos e o sobrenadante descartado. De seguida ressuspendeu-se a celulose em 30 mL de STE-16 % de etanol e foi novamente centrifugada a 10000 g durante 6 minutos. Este passo repetiu-se 5 vezes, para permitir a transição do DNA e do RNA de cadeia simples para o tampão sobrenadante. Para a recolha da fracção contendo as dsRNA a celulose foi ressuspensa em 10 mL de tampão STE 1x e centrifugada a 10000 g durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e colocado em tubos corex a cada um dos quais se juntou 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5, durante 18 horas, para precipitação da fracção das dsRNA.

A partir deste passo os procedimentos dos dois protocolos foram idênticos. O precipitado foi centrifugado a 7600 g, durante 45 minutos, para recolher as dsRNA. O *pellet* obtido foi ressuspensa em 50 µL de tampão TE (1mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5). A ressuspensão foi centrifugada a 7200 g, durante 4 minutos, à temperatura ambiente. Ao sobrenadante juntaram-se 2,5 volumes de etanol absoluto a -20 °C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M pH 5,5, ficando a precipitar durante 18 horas a -20 °C, sendo depois centrifugado a 12000 g, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol a 70 % a 4 °C. Realizou-se uma nova centrifugação a 12000 g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O *pellet* contendo as dsRNA foi ressuspensa em 30 µL de água estéril.

## 2.2. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DA FRACÇÃO CONTENDO DSRNA

O tratamento enzimático da fracção eluída da coluna de celulose com STE que contem RNA de cadeia dupla, com o objectivo de eliminar DNA e ssRNA contaminantes, foi realizado segundo o protocolo de Saldarelli *et al.* (1994) com algumas modificações.

A 12,5 µL da fracção referida adicionaram-se 0,25 µL de 1M MgCl<sub>2</sub>, 0,25µL de Dnase (1 U/µL) e 12 µL de água estéril, que se incubou a 37 °C durante 30 minutos. De seguida juntaram-se 3,75 µL de tampão SSC 20X (1X: 0,15 M NaCl, 0,015 M de citrato de sódio, pH 7,2), 0,75 µL de Ribonuclease A (Fermentas) (0,025 µg/µL) e 8 µL de água estéril. Foi novamente a incubar a 37 °C durante 30 minutos e por fim adicionaram-se 0,75 µL de Proteinase K (5 µg/µL) e a mistura foi incubada a 37 °C, durante 30 minutos.

Após o tratamento com as enzimas, estas foram inactivadas por extracção com fenol/clorofórmio. A 5 µL de SDS 10%, 7,5 µL de água estéril e 50 µL de fenol saturado com Tris (fenol-Tris), juntou-se a amostra. Agitou-se no vortex cerca de 40 segundos e centrifugou-se a 14000 g, durante 5 minutos, na centrífuga de bancada. Ao sobrenadante adicionaram-se 25 µL de fenol-Tris e 25 µL de clorofórmio e agitou-se no vortex durante 40 segundos. Centrifugou-se novamente a 14000 g, durante 5 minutos. Ao sobrenadante voltou-se a adicionar 25 µL de fenol-Tris e 25 µL de clorofórmio e agitou-se no vortex durante 40 segundos. Centrifugou-se a 14000 g, durante 5 minutos e ao sobrenadante adicionaram-se 500 µL de etanol absoluto a -20 °C e 20 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e ficou a precipitar a -20 °C durante 18 horas. De seguida as amostras foram centrifugadas a 12000 g, durante 30 minutos e o *pellet* foi ressuspensão em 12,5 µL de água estéril.

## 2.3. ANÁLISE DAS DSRNA

A análise das dsRNA foi feita antes do tratamento enzimático e após o tratamento enzimático, por electroforese em géis de agarose 0,8%. A análise de algumas dsRNA extraídas de ramos na Primavera (árvores 17, 32, 56, 58, 63) foi feita também em gel de poliacrilamida 6%, para verificar se havia grandes diferenças na definição das bandas.

### **2.3.1. Preparação das amostras**

Às amostras juntou-se “loading buffer” 1x (6X: 300 µL de glicerol 100%; 2,5 mg orange G (Sigma) e 700 µL de água milliQ). Foi também usado um marcador (1µL de DNA 1 kb plus ladder (1µg/µL) da Invitrogen + “loading buffer” 1x)

### **2.3.2. Preparação do gel de poliacrilamida 6%**

Para a realização do gel de poliacrilamida 6%, utilizaram-se: 3,3 mL de água estéril, 830 µL de uma solução de 40% de poliacrilamida, 500 µL de tampão TAE 10X concentrado (1X: 40 mM Tris – acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3), 60 µL de APS (10%) e 6 µL de TEMED. O gel foi colocado entre as placas de vidro do aparelho vertical de electroforese Mini-PROTEAN 3 Cell (BIORAD). Colocou-se o ‘pente’ de modo a definir os poços onde iriam ser colocadas as amostras. Depois do gel solidificar, foi colocado no aparelho e submergido em tampão TAE 1X e foram colocadas as amostras. O gel foi sujeito a uma tensão de 90 V durante 5 horas.

### **2.3.3. Preparação do gel de agarose 0,8%**

Para a realização dos géis de agarose 0,8%, dissolveram-se 0,8 gr de agarose em 100 mL de tampão TBE 0,5x (TBE 1x: 0,1 M Tris, 0,09 M Ácido bórico, 1 mM EDTA). O gel foi colocado no molde do aparelho horizontal de electroforese, WIDE MINI – BUB CELL GT (BIORAD), e foi colocado o ‘pente’ para definir os poços onde iriam ser colocadas as amostras. Depois da agarose solidificar, o gel foi submergido em tampão TBE 0,5X e colocaram-se as amostras, o marcador e os controlos. Os géis foram sujeitos a uma voltagem de 80 V, durante 1 hora e 15 minutos.

### **2.3.4. Coloração dos géis com brometo de etídio**

Após a electroforese o gel foi retirado e agitado numa solução de brometo de etídio 10 mg/mL, durante cerca de 30 minutos. De seguida visualizaram-se as bandas num transiluminador com lâmpadas UV SXT-20.M (Uvitec) e os géis foram fotografados com um sistema Kodak (Kodak Digital Science 1D versão 2.0.3 e câmara DC120).

### 3. OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA – REACÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (RT-PCR) PARA A DETECÇÃO DOS VÍRUS OLV-1 E TNV-D

#### 3.1. DESNATURAÇÃO DE DSRNA

Cinco  $\mu\text{L}$  de cada amostra, que consistem em preparações contendo dsRNA, foram desnaturados em banho seco a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 2 minutos, sendo de seguida colocados em banho de gelo durante 5 minutos. A 5  $\mu\text{L}$  de dsRNA desnaturado, juntaram-se 1,5  $\mu\text{L}$  de “random primers” (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) da Promega. De modo a otimizar este passo, variou-se a quantidade de dsRNA desnaturado a usar (1 $\mu\text{L}$ , 3 $\mu\text{L}$  e 5 $\mu\text{L}$ ). A mistura incubou em banho seco a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para permitir a separação das cadeias dsRNA e passou de seguida para banho de gelo durante 15 minutos para que as ssRNA permanecessem separadas.

#### 3.2. REACÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

À mistura anterior juntou-se o volume necessário para perfazer o volume final de 20  $\mu\text{L}$  de: 50 mM de Tris – HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de DTT, 0,5 mM de dNTPs, 200 U da enzima Transcriptase Reversa, Moloney Murine Leukaemia Virus (MML-V) (Invitrogen). A mistura incubou em banho seco a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, para permitir a transcrição do RNA em cDNA.

#### 3.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR

##### 3.3.1. PCR com primers específicos para OLV-1

Os testes de 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. Vários parâmetros incluindo a quantidade de cDNA a usar na reacção de amplificação (3  $\mu\text{L}$  e 6  $\mu\text{L}$ ), a concentração de  $\text{MgCl}_2$  (1 mM, 1,25 mM e 1,5 mM) e também a temperatura de hibridação dos primers ( $50^{\circ}\text{C}$ ,  $55^{\circ}\text{C}$  e  $60^{\circ}\text{C}$ ) foram comparados.

O protocolo de PCR final otimizado foi o seguinte:

Em tubos de PCR de 0,2 mL, isentos de RNase e DNase, colocou-se: 50 mM de KCl, 10 mM de Tris – HCl pH 9,0, 0,1% Triton X 100, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0,25  $\mu\text{M}$  de Primer A (GibcoBRL), 0,25  $\mu\text{M}$  de Primer B (GibcoBRL) (Martelli *et al.*, 1996) e 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). A cada tubo

juntaram-se 6  $\mu$ L do produto da transcrição reversa e água milliQ para perfazer um volume final de 50  $\mu$ L.

A amplificação foi realizada num termociclador Personal Cyclor (Biometra) com o seguinte programa: 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C e 2 minutos a 72 °C. No último ciclo é feita a extensão a 72 °C durante 10 minutos. Estes *primers*, nestas condições, permitem a amplificação de um fragmento de *ca* 750 nt (Martelli *et al.*, 1996) específico do vírus OLV-1.

### **3.3.2. PCR com primers específicos para TNV-D**

A desnaturação das dsRNA e a reacção da transcrição reversa foi realizada segundo o protocolo optimizado neste estudo para o OLV-1.

Em tubos de PCR de 0,2 mL, isentos de RNase e DNase, colocaram-se: 50 mM de KCl, 10 mM de Tris - HCl pH 9,0, 0,1% Triton X100, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2  $\mu$ M de *primer* GP<sub>1</sub>INT5' e 0,2  $\mu$ M de *primer* GP<sub>1</sub>INT3' (Cardoso *et al.*, 2004) e 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). A cada tubo juntaram-se 6  $\mu$ L do produto da transcrição reversa e água milliQ para perfazer um volume final de 50  $\mu$ L.

A amplificação foi realizada num termociclador Personal Cyclor (Biometra) com o seguinte programa: 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C e 2 minutos a 72 °C. No último ciclo é feita a extensão a 72 °C durante 10 minutos. Estes *primers*, nestas condições, permitem a amplificação de um fragmento de *ca* 260 nt (Cardoso *et al.*, 2004) específico do vírus TNV-D.

Na tentativa de optimizar este método, optou-se por testar temperaturas de hibridação diferentes no ciclo de amplificação (50°C, 54°C e 60°C), sendo mantida a temperatura de 54°C.

## **3.4. ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS**

### **3.4.1. Preparação das amostras**

As amostras foram preparadas como em 2.3.1..

### **3.4.2. Electroforese em gel de agarose 1%**

Dissolveu-se 1 gr de agarose em 100 mL de tampão TBE 0,5X (TBE 1X: 0,1 M Tris, 0,09 M Ácido bórico, 1 mM EDTA), pelo calor. Os géis foram colocados no molde do aparelho horizontal de electroforese e colocou-se o 'pente' para definir os



poços onde iriam ser colocadas as amostras. O gel foi depois submerso pelo tampão TBE 0,5x, as amostras colocadas nos poços e a electroforese decorreu à voltagem constante de 80 V durante 1 hora.

### **3.4.3. Coloração dos géis com brometo de etídio**

Os géis foram corados como referido em 2.3.4.

## **4. ANÁLISE DA PRESENÇA DO FUNGO *OLPIDIUM BRASSICAE* NO SOLO**

Para testar se o solo à volta das árvores continha o fungo *Olpidium brassicae*, vector de TNV noutras culturas, seguiu-se o protocolo referido por Félix e Clara (2001) com algumas modificações. Recolheu-se cerca de 1 kg de solo, no Outono de 2004, à volta de algumas árvores escolhidas aos acaso (17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147 e 150), e nele foram semeadas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), hospedeiro do fungo *O. brassicae* (Garret e Tomlinson, 1967). Dois meses depois, as raízes das alfaces foram lavadas com água abundante para retirar a terra. De seguida foram cuidadosamente removidas da parte aérea da planta, lavadas, imersas numa solução de hidróxido de potássio 10% e autoclavadas a 121 °C durante 15 minutos. Estas raízes foram depois coradas, durante toda a noite, em tripano azul 1% feito numa solução de lactoglicerol (água, glicerol e ácido láctico em partes iguais). De seguida foram descoradas numa solução aquosa de glicerol 50% durante 18 horas, essencialmente como descrito por Phillip e Hayman (1970). As raízes foram montadas em lâminas, observadas ao microscópio óptico com uma ampliação de 400x (ZEISS Axiolab E re) e fotografadas com uma câmara digital (Olympus camedia C-3030 Zoom).

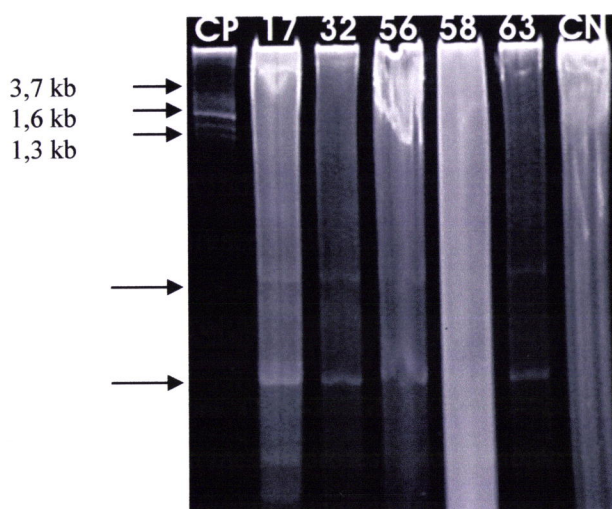
## *IV. Resultados*

## 1. ANÁLISE DE dsRNA, EXTRAÍDAS DE RAMOS DE OLIVEIRA, NA PRIMAVERA

### 1.1. ANÁLISE DE dsRNA

#### 1.1.1. Visualização em gel de poliacrilamida 6%

O controlo positivo, permitiu a observação de bandas, que correspondem ao perfil electroforético conhecido das dsRNA produzidas nas plantas infectadas por OLV-1, com tamanhos de 3,7; 1,6 e 1,3 kb (Regenmortel *et al.*, 2000) (figura 5). Nenhuma outra amostra parece apresentar este padrão, no entanto todas as amostras apresentam outras bandas que podem indicar a presença de outros padrões de dsRNA. No controlo negativo não é visível a presença de quaisquer bandas.

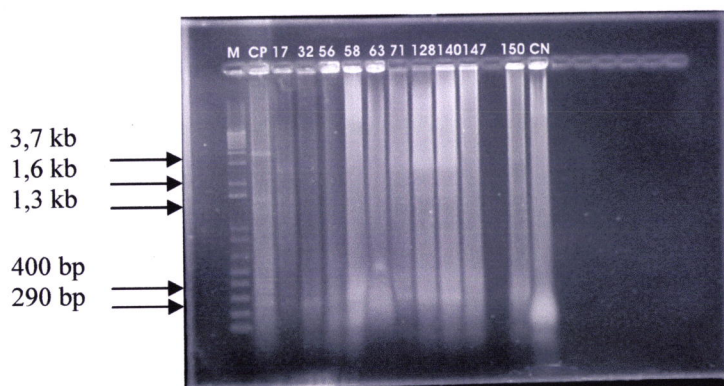


**Figura 5:** Análise das dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ não tratadas enzimaticamente em gel de poliacrilamida 6%: CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* são obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA; Amostras 17, 32, 56, 58, 63, dsRNA extraídas de ramos de 2 anos de árvores com o mesmo número, respectivamente, da cultivar Negrinha.

#### 1.1.2. Visualização em gel de agarose 0,8%

Tal como no gel anterior (figura 5) são visíveis bandas no controlo positivo, que correspondem ao perfil electroforético conhecido das dsRNA produzidas nas plantas infectadas por OLV-1 (3,7; 1,6 e 1,3 kb) e nenhuma outra amostra parece apresentar este padrão, no entanto todas as amostras, assim como o controlo positivo, apresentam outras bandas de cerca de 400 bp e 290 bp (figura 6), que podem indicar a presença de

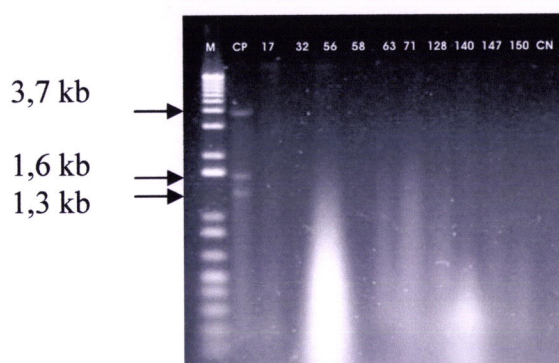
outro padrão de dsRNA ou a presença de ssRNA ou DNA contaminantes, pelo que de seguida se procedeu ao tratamento enzimático. Estas bandas não foram observadas no controlo positivo no gel de poliacrilamida 6% (figura 5). O gel de agarose apresentou uma melhor definição das bandas do que no gel de poliacrilamida realizado. Por estas razões e pelo facto de os géis de poliacrilamida serem mais difíceis de manusear, a acrilamida ser tóxica e todo o processo de preparação do gel ser mais moroso, optou-se pela realização de géis de agarose. No controlo negativo não é visível a presença de quaisquer bandas. O gel de agarose 0,8% parece apresentar uma melhor definição das bandas que o gel de poliacrilamida 6%.



**Figura 6:** Análise das dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, não tratadas enzimaticamente, em gel de agarose 0,8%: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* são obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA; Amostras 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147, 150, dsRNA extraídas de ramos de 2 anos de árvores com o mesmo número, respectivamente, da cultivar Negrinha.

## 1.2. ANÁLISE DE DSRNA APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Foi observada a presença de bandas, apenas no controlo positivo, as quais correspondem ao perfil electroforético conhecido das dsRNA produzidas em plantas infectadas com OLV-1 (3,7; 1,6 e 1,3 kb) e nenhuma outra amostra parece apresentar quaisquer bandas (figura 7) o que indica que as bandas formadas e visíveis nos géis realizados antes do tratamento enzimático não seriam dsRNA mas sim ssRNA ou DNA contaminantes. No controlo negativo não é visível a presença de quaisquer bandas.

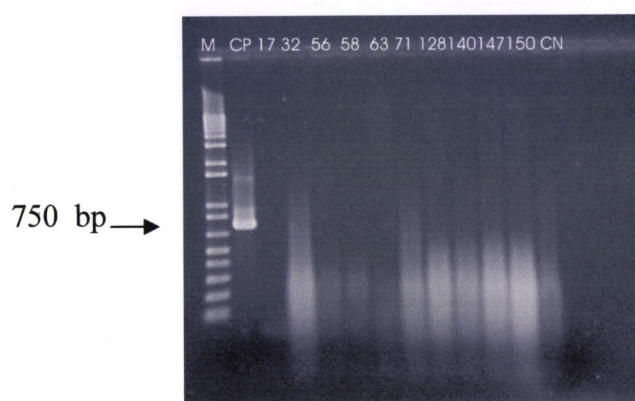


**Figura 7:** Análise das preparações de dsRNA isoladas do córtex de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, após tratamento enzimático, em gel de agarose 0,8%: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA, após tratamento enzimático, de *N. benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* são obtida pelo mesmo processo de extração de dsRNA e após tratamento enzimático; Amostras 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147, 150, dsRNA extraídas de ramos de 2 anos de árvores com o mesmo número, respectivamente, da cultivar Negrinha.

## 2. RT-PCR A PARTIR DE dsRNA ISOLADO DE RAMOS NA PRIMAVERA

### 2.1. PCR COM PRIMERS ESPECÍFICOS PARA OLV-1

A análise dos produtos amplificados por PCR com *primers* específicos para OLV-1 (figura 8), revelou a presença de um fragmento de *ca* 750 nt de comprimento (Martelli *et al.*, 1996) a partir do cDNA sintetizado por transcrição reversa a partir de dsRNA, não tratadas enzimaticamente, extraído de planta de *N. benthamiana* infectada com OLV-1, segundo o protocolo de RT-PCR atrás descrito. Não foram observadas quaisquer bandas em nenhuma das dez amostras testadas provenientes de ramos colhidos na Primavera.

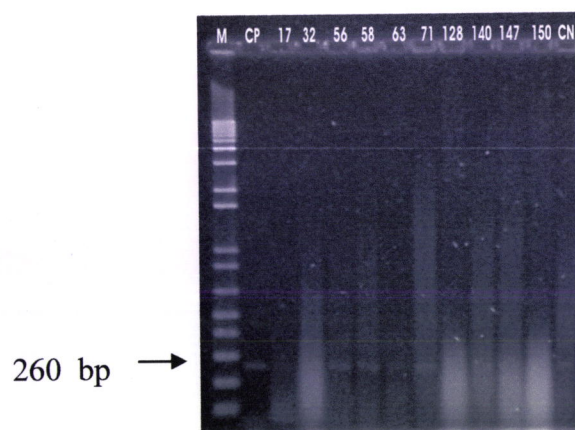


**Figura 8:** Análise em gel de agarose 1% do produto amplificado por RT-PCR usando *primers* específicos para o vírus OLV-1, e como molde, preparações de dsRNA extraídas do cortex de ramos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* sã obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA; Amostras 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147, 150, dsRNA extraídas de ramos de 2 anos de árvores com o mesmo número, respectivamente, da cultivar Negrinha.

## 2.2. PCR COM *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA TNV-D

A análise dos produtos amplificados por PCR com *primers* específicos para TNV-D em gel de agarose 1% (figura 9), revelou a presença de um fragmento de *ca* 260 nt de comprimento (Cardoso *et al.*, 2004) a partir do cDNA sintetizado a partir do extracto de dsRNA de seis oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’ com os números 56, 58, 63, 71, 140, 147 de um total de dez árvores analisadas e do controlo positivo de planta de *N. benthamiana* infectada com TNV-D, segundo o protocolo de RT-PCR utilizado.

Os *primers* utilizados na reacção de RT-PCR mostraram uma alta especificidade, pois não foram observados outros produtos amplificados no controlo positivo e no complexo V10, o que para além de TNV-D apresenta OLV-1 (Varanda, 2003).



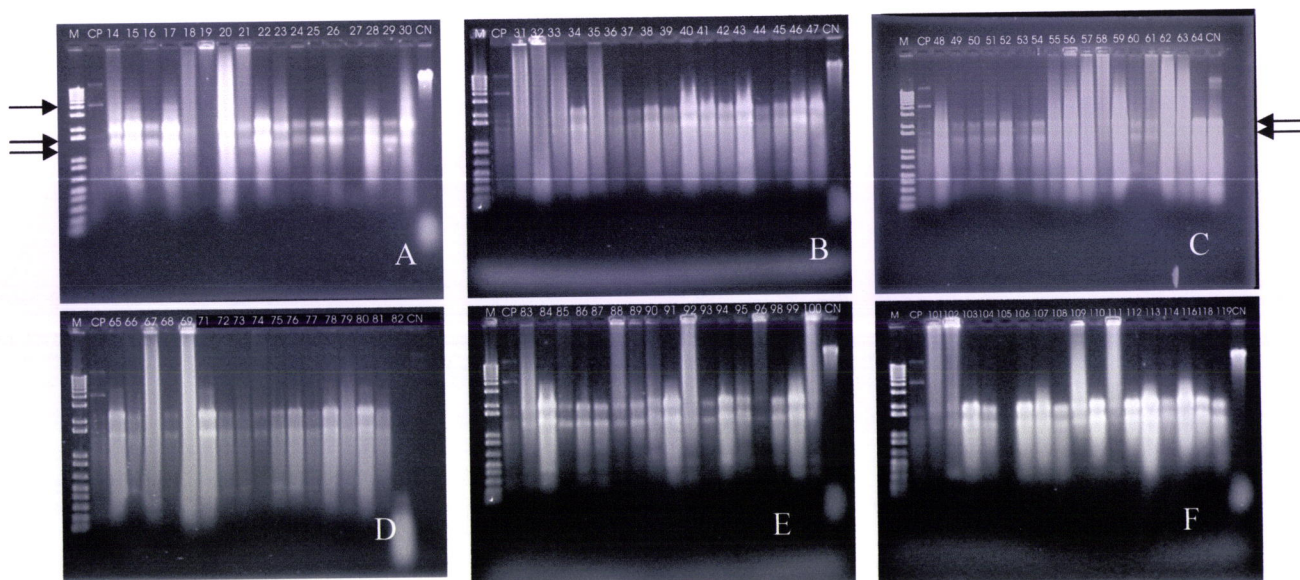
**Figura 9:** Análise em gel de agarose 1% do produto amplificado por RT-PCR usando *primers* específicos para o vírus TNV-D, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas do cortex de ramos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com TNV-D e OLV-1 (V10); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* sã obtida pelo mesmo processo

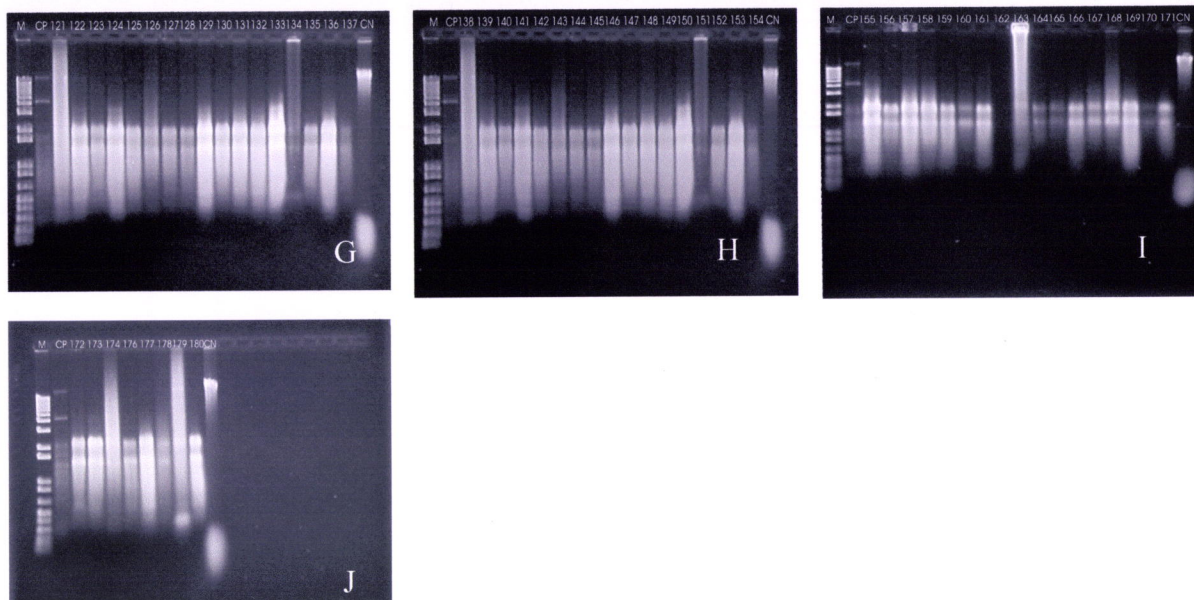
de extracção de dsRNA; Amostras 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147, 150, dsRNA extraídas de ramos de 2 anos de árvores com o mesmo número, respectivamente, da cultivar Negrinha.

### 3. ANÁLISE DE DSRNA, EXTRAÍDAS DE FRUTOS DE OLIVEIRA, NO OUTONO

#### 3.1. ANÁLISE DE DSRNA

São visíveis bandas no controlo positivo, que correspondem ao perfil electroforético conhecido das dsRNA produzidas nas plantas infectadas por OLV-1 (3,7; 1,6 e 1,3 kb) e nenhuma outra amostra parece apresentar este padrão, no entanto observou-se a formação de um padrão de 2 bandas de *ca* 3 kbp e 1,3 kbp nas amostras Negrinhas n<sup>os</sup> 14-18, 20-30, 34, 36-55, 58-61, 64-66, 68, 71-81, 83-91, 93-104, 106-119, 122-137, 139-161, 163-173, 176-178, 180 (figura 10). Este resultado é semelhante aos já obtidos em estudos anteriores (Vala, 2001) também a partir de frutos de oliveira. Estas bandas podem indicar a presença de outro padrão de dsRNA ou a presença de ssRNA ou DNA contaminantes, pelo que de seguida se procedeu ao tratamento enzimático. Estas bandas não foram observadas no controlo positivo no gel de poliacrilamida 6% (figura 5). No controlo negativo proveniente de plantas de *N. benthamiana* saudáveis não é visível a presença de quaisquer bandas.





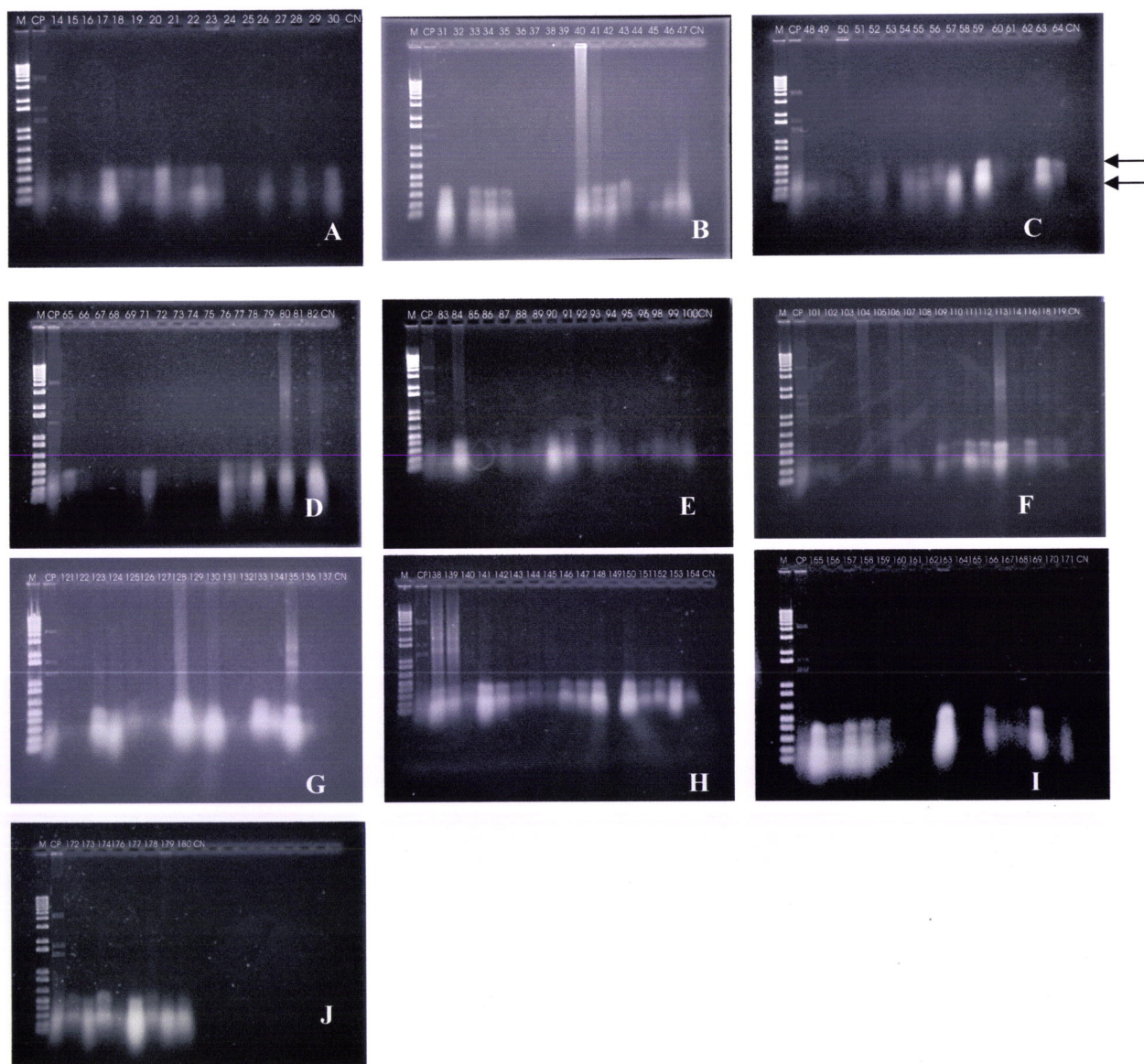
**Figura 10:** Análise das dsRNA isoladas dos frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, não tratadas enzimaticamente, em gel de agarose 0,8%: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* sã obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA; A – Amostras 14 – 30; B – Amostras 31 - 47; C – Amostras 48 - 64; D – Amostras 65 – 69 e 71 - 82; E - Amostras 83 - 96 e 98 - 100; F - Amostras 101 - 114, 116 e 118 - 119; G - Amostras 121 - 137; H - Amostras 138 - 154; I - Amostras 155 - 171; J - Amostras 172 - 174 e 176 - 180. O número das amostras corresponde ao número das árvores de onde se colheram as amostras de frutos no Outono. As setas à direita indicam bandas de *ca* 3 Kbp e 1,3 Kbp e à esquerda indicam bandas de *ca* 3,7; 1,6 e 1,3 Kbp.

### 3.2. ANÁLISE DO DSRNA APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Após o tratamento enzimático das dsRNA são visíveis bandas no controlo positivo, que correspondem ao perfil electroforético conhecido das dsRNA produzidas nas plantas infectadas por OLV-1 (3,7, 1,6 e 1,3 kb) e nenhuma amostra apresenta este padrão (figura 11), no entanto observou-se a formação de um padrão, diferente do padrão observado antes do tratamento enzimático, de 2 bandas de menor peso molecular, de *ca* 300 bp e 100 bp nas amostras Negrinhas n<sup>os</sup> 17-23, 26, 28, 30-31, 33-35, 40-43, 45-47, 54-57, 59, 63-65, 71, 76-78, 80, 82, 84, 90-91, 93, 109-119, 123-125, 128-130, 133-135, 138-148, 150-153, 155-153, 155-159, 163, 166-169, 171-174, 177-180 (figura 11), que poderiam corresponder a dsRNA de vírus de fungos. Muitos dos



vírus dos fungos têm genomas dsRNA e há moléculas dsRNA associadas a fungos patogênicos de plantas (Nuss e Koltin, 1990). Esta hipótese seria reforçada pelo facto deste padrão de duplas cadeias ser apenas encontrado em amostras provenientes dos frutos, órgãos que se apresentavam infectados por alguns fungos como o *Colletotrichum accutatum* ou *C. gloesporioides* e *Penicillium* sp. No entanto, as bandas obtidas, devido ao seu baixo peso molecular, parecem apenas poder pertencer a RNAs satélites. Estas bandas não foram observadas antes do tratamento enzimático. No controlo negativo proveniente de plantas de *N. benthamiana* saudáveis não é visível a presença de quaisquer bandas.



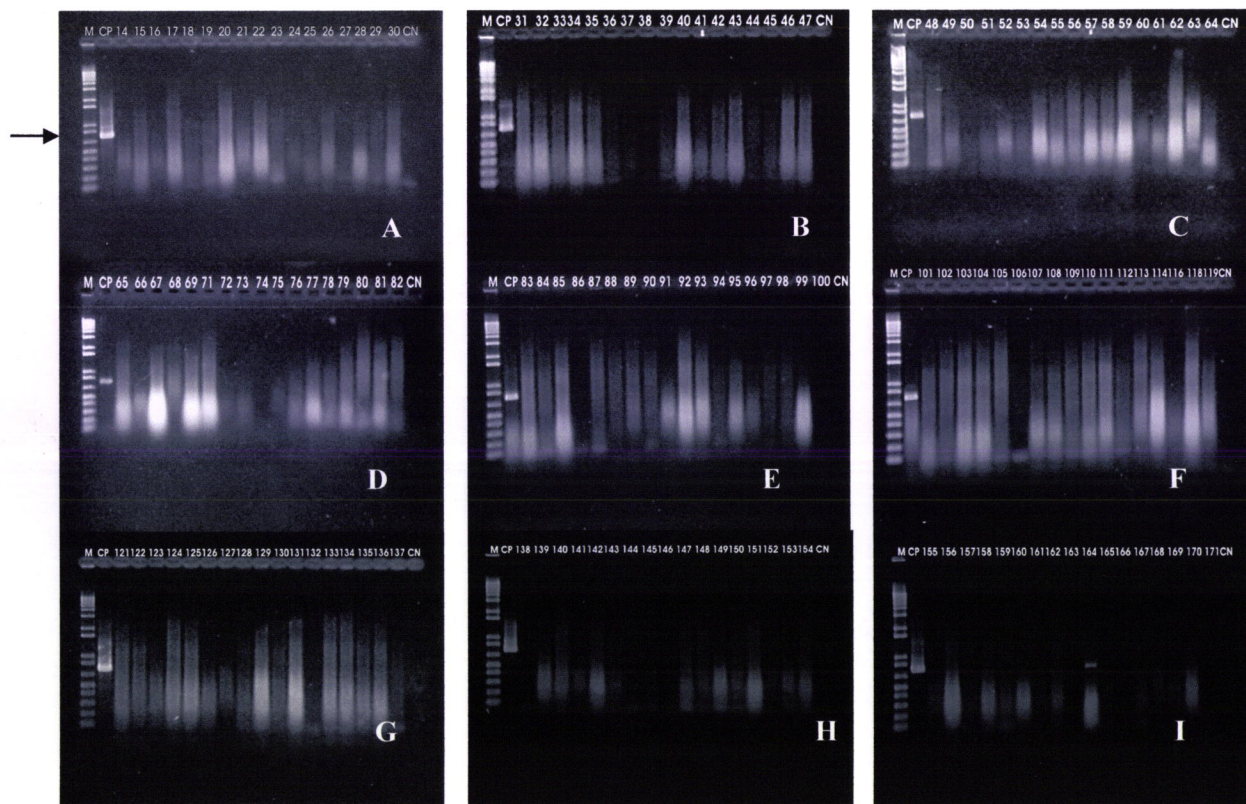
**Figura 11:** Análise das preparações de dsRNA isoladas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’, após tratamento enzimático, em gel de agarose 0,8%: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA, após tratamento enzimático, de *N.*

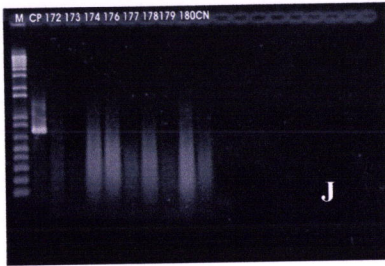
*benthamiana* infectada com OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* são obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA e após tratamento enzimático; A – Amostras 14 - 30; B – Amostras 31 - 47; C – Amostras 48 - 64; D – Amostras 65 - 69 e 71 - 82; E - Amostras 83 - 96 e 98 - 100; F – Amostras 101 - 114, 116 e 118 - 119; G - Amostras 121 - 137; H - Amostras 138 - 154; I - Amostras 155 - 171; J – Amostras 172 - 174 e 176 - 180. O número das amostras corresponde ao número das árvores de onde se colheram as amostras de frutos no Outono. As setas indicam bandas de *ca* 300 e 100 bp .

#### 4. RT-PCR A PARTIR DE DSRNA ISOLADO DE FRUTOS NO OUTONO

##### 4.1. PCR COM PRIMERS ESPECÍFICOS PARA OLV-1

A análise dos produtos amplificados por PCR com *primers* específicos para OLV-1 do cDNA sintetizado a partir do extracto de dsRNA (figura 12), revelou a presença de um fragmento de *ca* 750 nt de comprimento na amostra proveniente da oliveira 164 e dos controlos positivos de plantas de *N. benthamiana* infectadas com OLV-1.

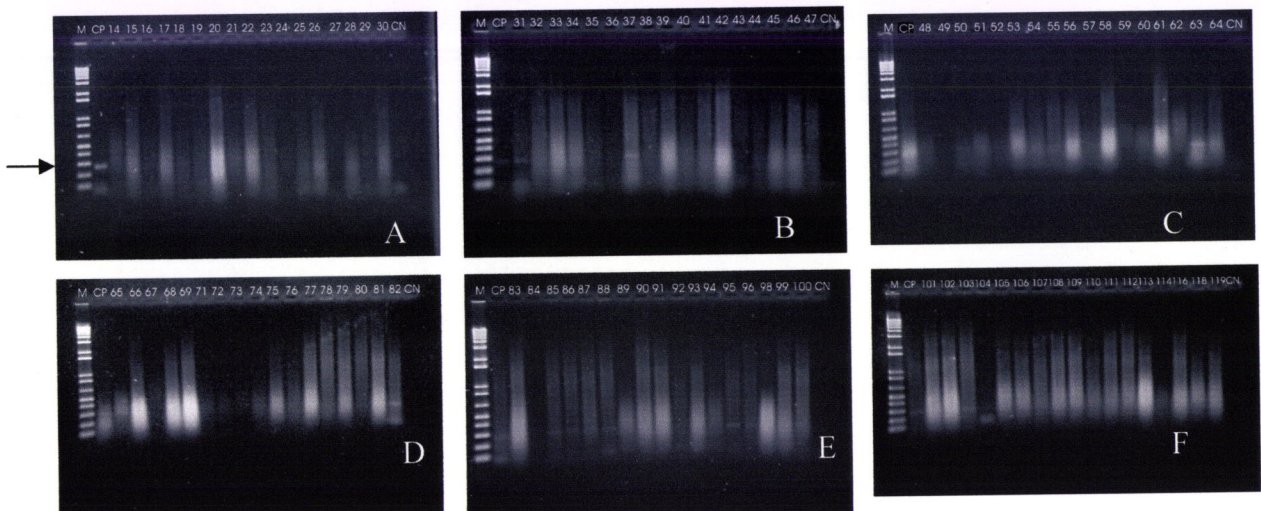


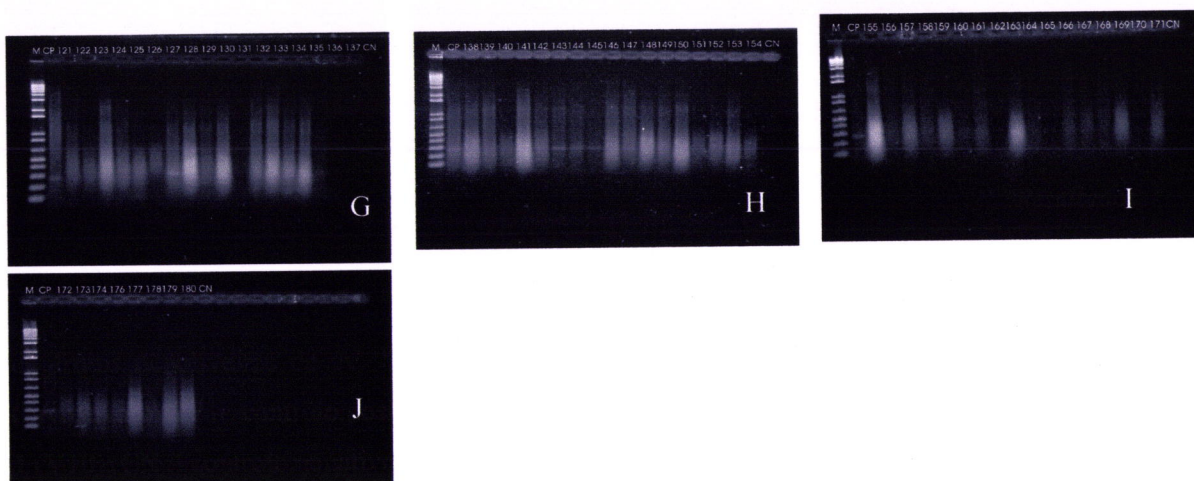


**Figura 12:** Análise em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR com *primers* específicos para o vírus OLV-1, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada OLV-1 (GM6); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* sã obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA; A – Amostras 14 - 30; B – Amostras 31 - 47; C – Amostras 48 - 64; D – Amostras 65 - 69 e 71 - 82; E - Amostras 83 - 96 e 98 - 100; F – Amostras 101 - 114, 116 e 118 - 119; G - Amostras 121 - 137; H - Amostras 138 - 154; I - Amostras 155 - 171; J - Amostras 172 - 174 e 176 - 180. O número das amostras corresponde ao número das árvores de onde se colheram as amostras de frutos no Outono. A seta indica bandas de *ca* 750 bp .

#### 4.2. PCR COM *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA TNV-D

A análise dos produtos amplificados PCR com *primers* específicos para TNV-D, em gel de agarose 1% (figura 13), revelou a presença de um fragmento de DNA de cerca de 260 nt de comprimento a partir do cDNA sintetizado a partir do extracto de dsRNA das oliveira da cv. ‘Negrinha de Freixo’ números 26, 31, 37, 41, 51, 54, 55, 63, 64, 65, 82, 85, 86, 87, 88, 95, 96, 99, 100, 103, 107, 108, 109, 110, 125, 127, 142, 143, 144, 145 e dos controlos positivos de plantas de *N. benthamiana* infectadas com TNV-D.





**Figura 13:** Análise em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por RT-PCR usando *primers* específicos para o vírus TNV-D, usando como molde, preparações de dsRNA extraídas de frutos de oliveiras da cv. ‘Negrinha de Freixo’: M – Marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); CP – controlo positivo, dsRNA de *N. benthamiana* infectada com TNV-D e OLV-1 (V10); CN – controlo negativo, preparação de *N. benthamiana* sã obtida pelo mesmo processo de extracção de dsRNA. A – Amostras 14 - 30; B – Amostras 31 - 47; C – Amostras 48 - 64; D – Amostras 65 - 69 e 71 - 82; E - Amostras 83 - 96 e 98 - 100; F – Amostras 101 - 114, 116 e 118 - 119; G - Amostras 121 - 137; H - Amostras 138 - 154; I - Amostras 155 - 171; J - Amostras 172 - 174 e 176 - 180. O número das amostras corresponde ao número das árvores de onde se colheram as amostras de frutos no Outono. A seta indica bandas de *ca* 260 bp .

Neste trabalho apenas se mostram os géis realizados após optimização dos protocolos de RT-PCR.

A realização dos testes anteriores permitiu verificar que o método de extracção de dsRNA aos ramos de dois anos de dez oliveiras e o método de RT-PCR com *primers* específicos para OLV-1, realizados ambos na Primavera, não mostraram infecção com este vírus. O método de RT-PCR com *primers* específicos para o TNV-D, também realizado na Primavera, em ramos, mostrou 6 das 10 árvores testadas, infectadas com TNV-D. A análise de dsRNA isoladas de frutos das 161 árvores testadas, no Outono, não mostrou a existência de oléculas de dsRNA nos géis realizados, o método de RT-PCR com *primers* específicos para OLV-1 revelou 1 árvore infectada com este vírus das 161 analisadas e o método de RT-PCR com *primers* específicos para o TNV-D mostrou 30 árvores infectadas num total de 161 (18%) (anexo A).

Quando se compararam os resultados obtidos de análise das 10 árvores, testadas na Primavera (ramos) e no Outono (frutos), foram detectadas algumas diferenças em relação à detecção da infecção por TNV-D (anexo B). Só no caso das amostras 17, 63, 128 e 150 é que os resultados foram idênticos, embora os das árvores 128 e 150 tenham sido inconclusivos em ambas as épocas. Nas amostras 71, 140 e 147 foi detectada a presença de TNV-D apenas nos ramos (Primavera). A presença de TNV-D foi detectada nos ramos, na Primavera, nas amostras 56 e 68 mas a sua detecção nos frutos destas árvores no Outono foi inconclusiva. Na amostra 32 a detecção de TNV-D foi inconclusiva a partir de ramos na Primavera e negativa nos frutos analisados no Outono.

No total das amostras testadas, na Primavera (ramos) e no Outono (frutos) (anexo C), foi detectado OLV-1 apenas na amostra 164 e TNV-D em 35 amostras correspondentes às árvores com os números: 26, 31, 37, 41, 51, 54, 55, 56, 58, 63, 64, 65, 71, 82, 85, 86, 87, 88, 95, 96, 99, 100, 103, 107, 108, 109, 110, 125, 127, 140, 142, 143, 144, 145 e 147.

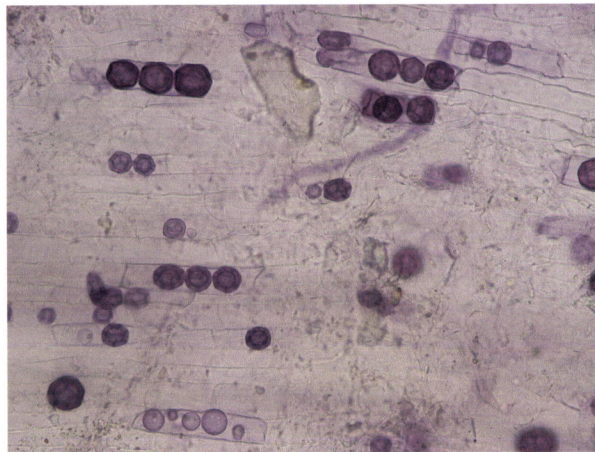
Na tentativa de relacionar os resultados obtidos com o estado fitossanitário das plantas mãe, procedeu-se à determinação da taxa de infecção, dos vírus TNV-D e OLV-1, para cada clone (anexo D) tendo em conta os resultados obtidos na Primavera e no Outono. No caso dos clones A e D, a taxa de infecção é de 0%, o que permite deduzir que nenhuma das plantas mãe destes clones estava infectada com o vírus TNV-D à data de propagação. Os valores de taxas de infecção mais elevados pertencem aos clones F (50%), B (38%) e H (36%).

Foi ainda avaliada a possível relação entre as taxas de infecção com TNV-D, a posição das árvores no campo e a presença do fungo vector no solo (como se relata mais à frente neste trabalho). Para tal foram assinalados os resultados obtidos no mapa da colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo' (anexo E), não parecendo haver qualquer relação entre estes três parâmetros. Foi também pesquisada a relação da presença do fungo com a presença de TNV-D (anexo F) e, das 10 amostras onde foi pesquisado e encontrado o fungo, o vírus foi detectado apenas em 6.

Tendo em conta estes resultados é plausível admitir que o vírus tenha origem no material propagativo (planta mãe) e não no fungo ou no solo.

## 5. ANÁLISE DA PRESENÇA DO FUNGO *OLPIDIUM BRASSICAE*

A observação microscópica das raízes de plantas de alface provenientes nas dez amostras de solo testadas circundantes das raízes das árvores 17, 32, 56, 58, 63, 71, 128, 140, 147 e 150, revelou a presença de estruturas semelhantes a esporos de resistência, típicas do fungo *Olpidium brassicae*, possuindo paredes espessas, dentro das células das raízes (figura 15), revelando a presença do potencial vector de isolados de oliveira de TNV-D, no campo de clones estudado neste trabalho.



**Figura 14:** Esporos de resistência de *Olpidium brassicae* dentro das células das raízes de *Lactuca sativa* L. (400x) cultivadas em terras provenientes do campo de clones estudado neste trabalho

Estes resultados parecem significar que o fungo está muito distribuído no solo da colecção de clones. Uma vez que o vírus TNV-D só se detectou em 6 das 10 árvores testadas, é possível que o vírus esteja presente nas árvores mãe e não no fungo do solo.

*V. Discussão e  
Conclusão*

A análise de preparações de dsRNA extraídas quer de ramos (dez árvores testadas na Primavera) quer de frutos (161 árvores testadas no Outono) provenientes da colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo' revelou a ausência de bandas em gel, após electroforese, o que indicaria a ausência de infecção viral naquelas árvores. O diagnóstico baseado na presença de dsRNA é habitualmente muito útil por ser 'generalista', sendo aplicável em situações em que apenas interessa determinar se uma determinada planta está ou não virótica, independentemente do vírus que a infecta. Apresenta, no entanto, algumas limitações, nomeadamente a sua menor sensibilidade quando comparado com outros, como os baseados em PCR. Estes têm a vantagem de serem muito sensíveis e a "desvantagem" (se o interesse for detectar genericamente a presença de vírus) de ser específico para um determinado vírus.

Os resultados obtidos neste estudo ilustram bem a situação referida. De facto, a aplicação da técnica RT-PCR, utilizando como 'molde' preparações de dsRNA isoladas de tecidos de oliveira e com recurso a *primers* específicos para diagnóstico de TNV-D e de OLV-1, permitiu detectar vários casos de infecção em material vegetativo da colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo'. Cinco das amostras de ramos das dez árvores analisadas na Primavera deram positivas para o vírus TNV-D mas deram negativas quando se testaram os frutos dessas mesmas árvores, no Outono (anexo B), mas o contrário não se verificou. A razão para este resultado poderá não ser devida à época do ano em que a análise foi feita mas sim ao tipo de órgão testado. Aparentemente, o vírus TNV-D é mais fácil de encontrar em amostras de ramos. O vírus OLV-1 não foi detectado na Primavera em qualquer das 10 árvores amostradas. A árvore 164, que deu positiva para OLV-1 em frutos no Outono, não fora testada na Primavera, pelo que não se pode concluir acerca do período e órgão óptimos para a detecção deste vírus. Na Primavera foi demonstrada a presença de TNV-D em 6 das 10 amostras testadas pelo método RT-PCR e destas, só uma se revelou também positiva para TNV-D, quando se analisaram os seus frutos, no Outono. No total das duas épocas de análise, 35 árvores revelaram-se infectadas por TNV-D e 1 por OLV-1.

É possível que, se se vierem a analisar ramos de todas as árvores na Primavera os resultados de infecção sejam diferentes, talvez mais elevados. A vantagem em utilizar diferentes tipos de órgãos vegetativos, resulta da sua diferente disponibilidade consoante a época do ano e a facilidade de processamento.

A presença de TNV-D em 35 das árvores testadas pode ter uma de duas origens: ou as jovens plantas já estavam infectadas quando foram instaladas no campo,



presumindo-se que o vírus estaria presente nas plantas mãe, ou o vírus já se encontrava no solo e as árvores adquiriram aí o vírus. Neste caso, a infecção só poderia ter ocorrido em presença do fungo vector *O. brassicae*.

As estruturas semelhantes a esporos de resistência observadas em raízes de alface cultivadas em solos recolhidos na zona das raízes das dez oliveiras testadas na Primavera, foram interpretadas como esporos de resistência do fungo *O. brassicae*, devido às suas características (Temminck e Campbell, 1968). A detecção do TNV-D em algumas oliveiras da cv. 'Negrinha de Freixo', assim como a presença generalizada de *O. brassicae* no solo, sugerem que este se torna vector do vírus TNV-D e que potencia a disseminação do vírus nesta cultura. No entanto, o facto de apenas 6 das árvores a crescer nestes solos se terem revelado infectadas com TNV-D, indica que o fungo não será o responsável pelas altas taxas de infecção de TNV-D neste campo de clones.

Tendo em conta todos estes resultados, é plausível admitir que o vírus tenha origem no material propagativo (planta mãe) e não no fungo ou no solo. É também plausível admitir que, a partir do momento da plantação das jovens árvores, as populações de *O. brassicae* que habitem a zona das raízes das árvores infectadas com TNV-D, se tornem virulíferos e possam disseminar-se, juntamente com o vírus, a maiores distâncias, por exemplo, aquando de mobilização dos terrenos.

Os resultados da infecção por TNV-D, no caso dos clones A e D, revelaram taxas de infecção de 0%, parecem indicar que as plantas mãe das quais estes clones são provenientes, não estariam infectadas. No entanto, a taxa de infecção de 50% no caso do clone F, e as taxas de infecção superiores a 30% dos clones B, H, N e O, sugerem que as plantas mãe das quais são provenientes já estavam infectadas com este vírus (anexo D). As baixas taxas de infecção observadas em alguns clones, apontam para uma irregular distribuição de TNV-D nas respectivas árvores mãe.

A presença de OLV-1 foi detectada apenas em 1 árvore, é possível que a planta mãe do clone M já estivesse infectada, no entanto, as outras 8 árvores testadas pertencentes a este clone estavam isentas de OLV-1, o que parece indicar que este vírus estaria muito irregularmente distribuído na árvore mãe.

Os estudos aqui apresentados confirmam o potencial da metodologia baseada em RT-PCR, para o diagnóstico dos vírus TNV-D e OLV-1 directamente em tecidos de oliveira revelando-se um poderoso auxiliar na certificação de material propagativo de *O. europaea*, no âmbito de programas de selecção clonal e sanitária.

## *VI. Bibliografia*

ADAMS, M. J. (1991). Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.*, **118**: 479 – 492.

AGRIOS, G. N. (1997). *Plant Pathology*. Academic Press (4<sup>th</sup> edition), San Diego. pp. 634

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons (4<sup>th</sup> edition), New York., pp. 868

ALKOWNI, R. (2000). Development and Application of Molecular Diagnosis for Detection of Olive-Infecting Viruses and Molecular Characterization of *Olive latent ringspot virus* (OLRSV). *Tesi di dottorato di ricerca in protezione delle colture*. Università degli studi di Bari, 108 pp.

BARR, D. J. S. (1988). Zoosporic plant parasites as fungal vectors of viruses: taxonomy and life cycles of species involved. In: *Viruses with Fungal Vectors*. Cooper, J. I. & Asher, M. J. C. Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, pp. 123 – 137.

BOS, L. (1999). *Plant Viruses, unique and intriguing pathogens – a textbook of plant virology*. Backhuys Publishers, Leiden.

CARDOSO, J. M. S.; FÉLIX, M. R.; OLIVEIRA, S.; CLARA, M. I. E. (2004). A Tobacco necrosis virus D isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Arch. Virol.*, **149**: 1129 – 1138.

CARDOSO, J. M. S.; FÉLIX, M. R.; CLARA, M. I. E.; OLIVEIRA, S. (2005). The complete genome sequence of a new Necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Arch. Virol.*, **150**: 815 - 823.

CIVANTOS, L. (1999). La Olivicultura en el Mundo y en España. In: *El Cultivo del Olivo*. Coeditado por grupo Mundi – Prensa e Junta de Andalucía. Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., edss (3<sup>a</sup> edição), Madrid, 17 – 33.

CLARA, M. I. E. (1996). Viruses and their importance on clonal and sanitary selection of *Olea europaea* L. cultivares in Portugal. Policopiado. Apresentado na Universidade de Cordoba em Espanha, 11 pp.

CLARA, M. I. E. (1998). As viroses em *Olea europaea* L.: Diagnóstico, Dispersão, Importância e Estratégias para a Protecção da Cultura. *Revista de Ciências Agrárias*, 21: 271 – 277.

CLARA, M. I. E.; REI, F. T.; FÉLIX, M. R. F.; LEITÃO, F. A.; SERRANO, J. M. F.; POTES, M. F. (1997). Viruses affecting *Olea europaea* L. crop and diagnostic techniques. *Olivae*, 66: 56 – 60.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475 – 483.

DODDS, J. A. (1986). The potencial for using double stranded RNAs as diagnostic probes for plant viruses. In: Developments and applications in testing. Jones R. A. C. & Torrance, L., eds. Association of Applied Biologists, Wells Bourne, Warwick, England, pp. 71 – 86.

DODDS, J. A.; MORRIS, T. J.; JORDAN, R. L. (1984). Plant viral double stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 151 – 168.

FÉLIX, M. R. F. (1998). Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L. na perspectiva de programas de selecção sanitária da oliveira. *Tese de Mestrado em Melhoramento de Plantas*. Universidade de Évora, 57 pp.

FÉLIX, M. R.; CLARA, M. I. E. (2001). Detection of *Tobacco necrosis virus* and of *Olpidium brassicae* in *Olea europaea* L. in the soil and in field trees. In: Congress Proceedings: 11<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3<sup>rd</sup> Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. University of Évora, Évora (Portugal), 17-20 September, 2001, pp 40 – 42.

---

FÉLIX, M. R. F.; CLARA, M. I. E. (2002). Two *Necrovirus* Isolates With Properties of *Olive latent virus 1* and *Tobacco necrosis virus* from Olive in Portugal. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing – Volume 2*. Vitagliano, C. & Martelli, G. P., eds. *Acta Horticulturae*, 586.

FÉLIX, M. R.; CLARA, M. I. E.; LEITÃO, F. A.; SERRANO, J. M. F. (2002). Virus Incidence in Four *Olea europaea* Cultivars Evaluated by Mechanical Inoculation and Immunological Assays. *Acta Horticulturae*, 586: 721 – 724.

FERGUSON, L.; SIBBET, G. S.; MARTIN, G. C. (1994). *Olive Production Manual*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA. Publication 3353. 160 pp.

GALLITELLI, D.; SAVINO, V. (1985). Olive latent virus-1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annals of Applied Biology*, 106: 195 – 303.

GARRET, R. G., TOMLINSON, J.A. (1967). Isolate differences in *Olpidium brassicae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 50 (3): 429-435.

GRIECO, F.; ALKOWNI, R.; SAPONARI, M.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. (2000). Molecular Detection of Olive Viruses. *Bulletin OEPP / EPPO. Bulletin*, 30: 469 – 473.

GRIECO, F.; ALKOWNI, R.; SAPONARI, M.; PANTALEO, V.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. (2002). Molecular Detection of Olive-Infecting Viruses. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing – Volume 2*. Vitagliano, C. & Martelli, G. P., eds. *Acta Horticulturae*, 586.

HENRIQUES, M. I. E. C. (1994). Virus diseases of olive: An overlook. *Acta Horticulturae*, 356: 379 – 385.

HENRIQUES, M. I. E. C.; REI, F. T.; LEITÃO, F. A.; SERRANO, J. M. F.; POTES, M. F. (1992). Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of strawberry latent ringspot nepovirus. *Phytopath. Medit.*, 31: 127 – 132.

HULL, R. (2002). *Mathews' Plant Virology*. Academic Press (4<sup>th</sup> edition), San Diego.

INE, Estatísticas Agrícolas (2001).

JAMES, D. (1999). A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods*, 83: 1 – 9.

JONES, A. T. (1992). Application of double-stranded RNA analysis of plants to detect viruses, virus-like agents, virus satellites and sub genomic viral RNAs. In: *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Duncan, J. M. & Torrance, L. (eds), 115 – 128.

KAKANI, K., SGRO, J.-Y., ROCHON, D. (2001). Identification of specific cucumber necrosis virus coat protein amino acids affecting fungus transmission and zoospore attachment. *Journal of Virology*, 75: 5576 – 5583.

KASSANIS, B., MACFARLANE, I. (1964). Transmission of tobacco necrosis virus by zoospores of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Microbiology*, 36: 79 – 93.

KYRIAKOPOULOU, P. E. (1996). Olive fruit hump and olive fruit pox: two new diseases of possible viral origin. *Phytopathol. Medit.*, 35: 231 – 232.

LAVEE, S.; TANNE, E. (1984). Spherosis – A virus disease of olive (*Olea europaea*). Symptoms, growth, tree development and production. *Olea*, 12: 71 – 75.

LEITÃO, F. (2002). Recursos genéticos de oliveira. Caracterização morfológica de cultivares. *Vida Rural*, **1676**: 12 – 13.

LEITÃO, F.; SERRANO, J. F.; POTES, M. F.; CLARA, M. I.; REI, F.; GENTIL-PINTO, A. (1996). Studies on clonal selection of olive cv. 'Negrinha' in the province of Trás-os-Montes. *Olivae*, **62**: 38 – 45.

LEITÃO, F.; CLARA, M. I.; LOPES, J.; SANTOS, M.; FÉLIX, M. R.; VARANDA, C.; SERRANO, M. C.; AMARO, J. T. (2003). Estudos para o registo da cv. 'Negrinha de Freixo' de *Olea europaea* L. na Lista Nacional de Recursos Genéticos Vegetais e para certificação de clones isentos de vírus.

MARTE, M.; GADANI, F.; SAVINO, V.; RUGIN, E. (1986). Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease*, **70**: 171 – 172.

MARTELLI, G. P. (1997). Plant Virus Taxa: Properties and Epidemiological characteristics. *Journal of Plant Pathology*, **79** (3), 151 – 171.

MARTELLI, G. P.; SABANADZOVIC, S.; SAVINO, V.; ABU-ZURAYK, A. R.; MASANNAT, K. (1995). Virus-like diseases and viruses of olive in Jordan. *Phytopath. Medit.*, **34**: 133 – 136.

MARTELLI, G. P.; YILMAZ, M. A.; SAVINO, V.; BALOGLU, S.; GRIECO, f.; GULDUR, M. E.; GRECO, N.; LAFORTEZZA, R. (1996). Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *Eur. J. Plant Path.* **102**: 527 – 536.

MARTELLI, G. P.; SALERNO, M.; SAVINO, V.; PROTA, U. (2002). An Appraisal of Diseases and Pathogens of Olive. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing – Volume 2*. Vitagliano, C. & Martelli, G. P., eds. *Acta Horticulturae*, **586**.

MATTHEWS, R. E. F. (1991). *Plant Virology*. Academic Press (3<sup>rd</sup> edition), San Diego.

MATTHEWS, R. E. F. (1992). *Fundamentals of Plant Virology*. Academic Press, San Diego.

MOHAMED, M. (1996). *Caractérisation biologique physico-chimique et sérologique d'un virus filamenteux associé à un jaunissement de l'olivier*. Thèse pour l'obtention de 'Master of Sciences' en virologie végétale. Institut Agronomique Méditerranéen de Bari, 51 pp.

MORRIS, T. R.; DODDS, J. A. (1979). Isolation and Analysis of Double stranded RNA from Virus-Infected Plant and Fungal Tissues. *Phytopathology*, **69** (8): 854 – 858.

NUSS, D. L.; KOLTIN, Y. (1990). Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**: 37 – 58.

PACINI, E.; CRESTI, M. (1977). Viral Particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, **137**: 1 – 4.

PHILLIP, J. M.; HAYMAN, D. S. (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscula mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, **55**, 158.

REI, F. T.; HENRIQUES, M. I. E. C.; LEITÃO, F. A.; SERRANO, J. M. F.; POTES, M. F. (1993). Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. *Bulletin OEPP / EPPO. Bulletin*, **23**: 501 – 504.

SABANADZOVIC, S.; ABOU-GHANEM, N.; NOTTE, P. La; SAVINO, V.; SCARITO, S.; MARTELLI, G. P. (1999). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, **81** (1): 37 – 45.



SAIKI, R. K. (1990). Amplification of genomic DNA. *In: PCR Protocols – A Guide to Methods and Applications*. Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J. & White, T. J., eds. Academic Press, pp 13 – 20.

SALDARELLI, P.; MINAFRA, A.; MARTELLI, G. P.; WALTER, B. (1994). Detection of grapevine leafroll – associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathology*, **43**: 91 – 96.

SANTOS, M.; MARQUES, D.; LEITÃO, F.; SERRANO, M.; LOPES, J. (2001). Descrição das cultivares dominantes de *Olea europaea* L. na região de Trás-os-Montes e Alto Douro. *Revista de Ciências Agrárias*. **XXIV** (1 e 2): 145 – 152.

SAPONARI, M. (2001). Miglioramento Sanitario dell'olivo e Caratterizzazione Molecolare del Virus Associato all'Ingiallimento Fogliare dell'olivo (OLYaV). *Tesi di dottorato di ricerca in protezione delle colture*. Università degli studi di Bari, 81 pp.

SAPONARI, M.; ALKOWNI, R.; GRIECO, F.; PANTALEO, V.; SAVINO, V.; MARTELLI, G. P. (2002). Detection of Olive-Infecting Viruses in the Mediterranean Basin. *In: Proceedings of the Fourth International Symposium on Olive Growing – Volume 2*. Vitagliano, C. & Martelli, G. P., eds. *Acta Horticulturae*, **586**.

SARAMAGO, A. (2001). A Oliveira e o Azeite: História e Simbologia. *Revista de Ciências Agrárias*, **7** – 11.

SAVINO, V.; BARBA, M.; GALLITELLI, D.; MARTELLI, G. P. (1979). Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopath. Medit.*, **18**: 135 – 142.

SAVINO, V.; GALLITELLI, D. (1981). Cherry Leafroll virus in Olive. *Phytopath. Medit.*, **20**: 202 – 203.

SAVINO, V.; GALLITELLI, D. (1983). Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopath. Medit.*, **22**: 202 – 203.

SAVINO, V.; GALLITELLI, D.; BARBA, M. (1983). Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology.*, **103**: 243 – 249.

SAVINO, V.; Piazzola, P.; DiFranco, A.; Martelli, G. P. (1984). 5<sup>th</sup> Congr. Un. Phytopath. Medit. Cairo, Egypt.

SAVINO, V.; SABANADZOVIC, S.; SCARITO, G.; LAVIOLA, C. & S.; MARTELLI, G. P. (1996). Due giallumi dell'olivo de possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, **46** (5): 55 – 56.

SKERRIT, J. H.; APPELS, R. (1995). An Overview of the Development and Application of Diagnostic Methods in Crop Sciences. *In: New Diagnostics in Crop Sciences*. Skerrit, J. H. & Appels, R., eds. Biotechnology in Agriculture n<sup>o</sup> 13, CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 1 – 32.

SOBREIRO, J. B. (1993). *Guia para a Protecção Fitossanitária da Oliveira*. Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar. Oeiras.

SWARD, R. J.; EAGLING, D. R. (1995). Antibody Approaches to Plant Viral Diagnostics. *In: New Diagnostics in Crop Sciences*. Skerrit, J. H. & Appels, R., eds. Biotechnology in Agriculture n<sup>o</sup> 13, CAB INTERNATIONAL, Wallingford, UK, 171 – 194.

TEMMINK, J. H. M., CAMPBELL, R. N. (1968). The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. I. Formation of sporangia. *Canadian Journal of Botany*, **46**: 951 – 956.

TEMMINK, J. H. M., CAMPBELL, R. N. (1969). The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of the host roots. *Canadian Journal of Botany*, **47**: 421 – 424.

TRIOLO, E.; MATERAZZI, A.; TONI, S. (1996). An isolate of Tobacco Mosaic Tobamovirus from *Olea europaea* L. *Adv. Hort. Sci.*, **10**: 39 – 45.

TZANETAKIS, I. E.; KELLER, K. E.; MARTIN, R. R. (2005). The use of reverse transcriptase for efficient first- and second- strand cDNA synthesis from single- and double- stranded RNA templates. *Journal of Virological Methods*, 124: 73 – 77.

VALA, R. M. T. (2001). Métodos aplicados na diagnóstico viral em oliveira (*Olea europaea* L.). Inoculação mecânica, DAS – ELISA (“double antibody sandwich” enzyme – linked immunosorbent assay), Cadeias duplas de RNA (double stranded RNA – dsRNA). *Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agrícola*. Universidade de Évora, 99 pp.

VALVERDE, R. A.; NAMETH, S. T.; JORDAN, R. L. (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255 – 258.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP D. H. L.; CARSTENS, E.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (eds) (2000a). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, San Diego.

VARANDA, C. M. R. (2003). Aplicação de Técnicas de Diagnóstico Viral em *Olea europaea* L. *Tese de fim de curso de Engenharia Agrícola*. Universidade de Évora, 92 pp.

WEBER, R. W. S., WEBSTER, J. (2000). Teaching techniques for mycology: 9. *Olpidium* and *Rhizophlyctis* (Chytridiomycetes). *Teaching techniques for mycology*. 14: 17 – 20.

[www.gartenbau.uni-hannover.de](http://www.gartenbau.uni-hannover.de)

## *VII. Anexos*

## ANEXO A

Tabela 5: Resultados obtidos pelos 2 métodos de diagnóstico viral, nas duas épocas do ano

Amostras	Testes de diagnóstico					
	Ramos (Primavera)			Frutos (Outono)		
	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D
14	NR	NR	NR	+	+	+
15	NR	NR	NR	+	+	+
16	NR	NR	NR	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+
18	NR	NR	NR	+	+	+
19	NR	NR	NR	+	+	+
20	NR	NR	NR	+	+	+
21	NR	NR	NR	+	+	+
22	NR	NR	NR	+	+	?
23	NR	NR	NR	+	+	+
24	NR	NR	NR	+	+	+
25	NR	NR	NR	+	+	+
26	NR	NR	NR	+	+	+
27	NR	NR	NR	+	+	+
28	NR	NR	NR	+	+	+
29	NR	NR	NR	+	+	+
30	NR	NR	NR	+	+	+
31	NR	NR	NR	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+
33	NR	NR	NR	+	+	?
34	NR	NR	NR	+	+	+
35	NR	NR	NR	+	+	+
36	NR	NR	NR	+	+	+
37	NR	NR	NR	+	+	+
38	NR	NR	NR	+	+	+
39	NR	NR	NR	+	+	?
40	NR	NR	NR	+	+	+
41	NR	NR	NR	+	+	+
42	NR	NR	NR	+	+	?
43	NR	NR	NR	+	+	+
44	NR	NR	NR	+	+	+
45	NR	NR	NR	+	+	+
46	NR	NR	NR	+	+	+
47	NR	NR	NR	+	+	+
48	NR	NR	NR	+	+	+
49	NR	NR	NR	+	+	+
50	NR	NR	NR	+	+	+
51	NR	NR	NR	+	+	+
52	NR	NR	NR	+	+	+
53	NR	NR	NR	+	+	+
54	NR	NR	NR	+	+	+
55	NR	NR	NR	+	+	+

Amostras	Testes de diagnóstico					
	Ramos (Primavera)			Frutos (Outono)		
	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D
56	+	+	+	+	+	+
57	NR	NR	NR	+	+	+
58	+	+	+	+	+	+
59	NR	NR	NR	+	+	+
60	NR	NR	NR	+	+	+
61	NR	NR	NR	+	+	+
62	NR	NR	NR	+	+	+
63	+	+	+	+	+	+
64	NR	NR	NR	-	-	+
65	NR	NR	NR	-	-	+
66	NR	NR	NR	-	-	?
67	NR	NR	NR	-	-	-
68	NR	NR	NR	-	-	?
69	NR	NR	NR	-	-	?
71	+	+	+	+	+	+
72	NR	NR	NR	+	+	+
73	NR	NR	NR	-	-	-
74	NR	NR	NR	-	-	-
75	NR	NR	NR	-	-	?
76	NR	NR	NR	+	+	+
77	NR	NR	NR	+	+	+
78	NR	NR	NR	+	+	+
79	NR	NR	NR	-	-	?
80	NR	NR	NR	-	-	-
81	NR	NR	NR	-	-	?
82	NR	NR	NR	+	+	+
83	NR	NR	NR	+	+	+
84	NR	NR	NR	+	+	+
85	NR	NR	NR	+	+	+
86	NR	NR	NR	+	+	+
87	NR	NR	NR	+	+	+
88	NR	NR	NR	+	+	+
89	NR	NR	NR	+	+	+
90	NR	NR	NR	+	+	+
91	NR	NR	NR	-	-	?
92	NR	NR	NR	-	-	-
93	NR	NR	NR	-	-	?
94	NR	NR	NR	+	+	+
95	NR	NR	NR	+	+	+
96	NR	NR	NR	+	+	+
98	NR	NR	NR	+	+	+
99	NR	NR	NR	+	+	+
100	NR	NR	NR	-	-	+
101	NR	NR	NR	-	-	?
102	NR	NR	NR	-	-	?
103	NR	NR	NR	+	+	+
104	NR	NR	NR	+	+	+
105	NR	NR	NR	+	+	?

Amostras	Testes de diagnóstico					
	Ramos (Primavera)			Frutos (Outono)		
	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D
106	NR	NR	NR	+	+	+
107	NR	NR	NR	+	+	+
108	NR	NR	NR	+	+	+
109	NR	NR	NR	-	-	+
110	NR	NR	NR	-	-	+
111	NR	NR	NR	-	-	-
112	NR	NR	NR	-	-	-
113	NR	NR	NR	-	-	?
114	NR	NR	NR	-	-	-
116	NR	NR	NR	+	+	+
118	NR	NR	NR	-	-	?
119	NR	NR	NR	-	-	?
121	NR	NR	NR	-	-	-
122	NR	NR	NR	-	-	-
123	NR	NR	NR	-	-	?
124	NR	NR	NR	+	+	+
125	NR	NR	NR	+	+	+
126	NR	NR	NR	+	+	+
127	NR	NR	NR	+	+	+
128	+	+	+	+	+	+
129	NR	NR	NR	+	+	+
130	NR	NR	NR	-	-	?
131	NR	NR	NR	-	-	-
132	NR	NR	NR	-	-	-
133	NR	NR	NR	-	-	?
134	NR	NR	NR	-	-	?
135	NR	NR	NR	-	-	?
136	NR	NR	NR	+	+	+
137	NR	NR	NR	+	+	+
138	NR	NR	NR	+	+	?
139	NR	NR	NR	+	+	+
140	+	+	+	+	+	+
141	NR	NR	NR	+	+	+
142	NR	NR	NR	+	+	+
143	NR	NR	NR	+	+	+
144	NR	NR	NR	+	+	+
145	NR	NR	NR	-	-	+
146	NR	NR	NR	-	-	-
147	-	-	+	-	-	-
148	NR	NR	NR	+	+	+
149	NR	NR	NR	+	+	+
150	+	+	+	+	+	+
151	NR	NR	NR	+	+	+
152	NR	NR	NR	+	+	+
153	NR	NR	NR	+	+	+
154	NR	NR	NR	+	+	+
155	NR	NR	NR	+	+	+
156	NR	NR	NR	+	+	+

Amostras	Testes de diagnóstico					
	Ramos (Primavera)			Frutos (Outono)		
	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D	dsRNA	RT-PCR com primers para OLV-1	RT-PCR com primers para TNV-D
157	NR	NR	NR	-	-	-
158	NR	NR	NR	-	-	-
159	NR	NR	NR	-	-	-
160	NR	NR	NR			
161	NR	NR	NR			
162	NR	NR	NR			
163	NR	NR	NR			
164	NR	NR	NR			
165	NR	NR	NR			
166	NR	NR	NR			
167	NR	NR	NR			
168	NR	NR	NR			
169	NR	NR	NR			
170	NR	NR	NR			
171	NR	NR	NR			
172	NR	NR	NR	-	-	-
173	NR	NR	NR	-	-	-
174	NR	NR	NR	-	-	-
176	NR	NR	NR	-	-	-
177	NR	NR	NR	-	-	-
178	NR	NR	NR			
179	NR	NR	NR			
180	NR	NR	NR			
Taxa de Infecção	0%	0%	6 em 10	0%	(1em 161) 0.6%	(30em 161) 18%

**Legenda:**

NR – Não realizado

- – Negativo

+ – Positivo

? – Não perceptível

Clone A	Clone I
Clone B	Clone J
Clone C	Clone K
Clone D	Clone L
Clone E	Clone M
Clone F	Clone N
Clone G	Clone O
Clone H	



## ANEXO B

**Tabela 6:** Detecção dos vírus OLV-1 e TNV-D por RT-PCR em amostras de ramos e frutos colhidos na Primavera e no Outono

		Órgãos testados			
		Ramos		Frutos	
Árvores	Vírus	OLV-1	TNV-D	OLV-1	TNV-D
	17		-	-	-
32		-	?	-	-
56		-	+	-	?
58		-	+	-	?
63		-	+	-	+
71		-	+	-	-
128		-	?	-	?
140		-	+	-	-
147		-	+	-	-
150		-	?	-	?

+ Presença  
 - Ausência  
 ? Resultado não conclusivo

## ANEXO C

**Tabela 7:** Identificação das árvores da colecção de clones da cv. 'Negrinha de Freixo' que se revelaram infectadas pelos vírus OLV-1 e TNV-D, pela aplicação do teste RT-PCR

Árvores	Vírus	
	OLV-1	TNV-D
26	-	+
31	-	+
37	-	+
41	-	+
51	-	+
54	-	+
55	-	+
56	-	+
58	-	+
63	-	+
64	-	+
65	-	+
71	-	+
82	-	+
85	-	+
86	-	+
87	-	+
88	-	+
95	-	+
96	-	+
99	-	+
100	-	+
103	-	+
107	-	+
108	-	+
109	-	+
110	-	+
125	-	+
127	-	+
140	-	+
142	-	+
143	-	+
144	-	+
145	-	+
147	-	+
164	+	-
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>35</b>

+ Presença de vírus  
 - Ausência de vírus

## ANEXO D

**Tabela 8:** Taxa de infecção dos clones da cv. 'Negrinha de Freixo' pelos vírus TNV-D e OLV-1 diagnosticada por método RT-PCR

<b>Clone</b>	<b>Taxa de infecção por TNV-D</b>	<b>Taxa de infecção por OLV-1</b>
A	0%	0%
B	38%	0%
C	20%	0%
D	0%	0%
E	15%	0%
F	50%	0%
G	9%	0%
H	36%	0%
I	8%	0%
J	8%	0%
K	18%	0%
L	18%	0%
M	10%	11%
N	33%	0%
O	33%	0%

ANEXO E

**Tabela 9:** Mapa da colecção de clones ‘Negrinha de Freixo’ – Quinta do Valongo (Trás-os-Montes) onde se assinalam as árvores infectadas, a sua disposição no terreno e a presença do fungo *O. brassicae*

														Parcela	
♣180	♣157	♣156	♣133	♣132	♣109	♣108	♣85	♣84	♣61	♣60	♣37	♣36	♣13	♣12	I
♣179	♣158	♣155	♣134	♣131	♣110	♣107	♣86	♣83	♣62	♣59	♣38	♣35	♣14	♣11	
♣178	♣159	♣154	♣135	♣130	♣111	♣106	♣87	♣82	♣63	♣58	♣39	♣34	♣15	♣10	
M	J	I	K	A	O	B	N	H	F	E	G	C	L	D	
♣177	♣160	♣153	♣136	♣129	♣112	♣105	♣88	♣81	♣64	♣57	♣40	♣33	♣16	♣9	II
♣176	♣161	♣152	♣137	♣128	♣113	♣104	♣89	♣80	♣65	♣56	♣41	♣32	♣17	♣8	
♣175	♣162	♣151	♣138	♣127	♣114	♣103	♣90	♣79	♣66	♣55	♣42	♣31	♣18	♣7	
O	E	D	N	H	A	L	I	J	K	F	B	M	G	C	
♣174	♣163	♣150	♣139	♣126	♣115	♣102	♣91	♣78	♣67	♣54	♣43	♣30	♣19	♣6	III
♣173	♣164	♣149	♣140	♣125	♣116	♣101	♣92	♣77	♣68	♣53	♣44	♣29	♣20	♣5	
♣172	♣165	♣148	♣141	♣124	♣117	♣100	♣93	♣76	♣69	♣52	♣45	♣28	♣21	♣4	
O	M	H	B	L	G	J	A	I	K	F	D	N	E	C	
♣171	♣166	♣147	♣142	♣123	♣118	♣99	♣94	♣75	♣70	♣51	♣46	♣27	♣22	♣3	IV
♣170	♣167	♣146	♣143	♣122	♣119	♣98	♣95	♣74	♣71	♣50	♣47	♣26	♣23	♣2	
♣169	♣168	♣145	♣144	♣121	♣120	♣97	♣96	♣73	♣72	♣49	♣48	♣25	♣24	♣1	
D	I	O	H	A	K	C	F	J	B	N	G	E	L	M	

Clones
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O

Legenda:	
	Planta infectada com TNV-D (por RT-PCR a partir de ramos na Primavera)
	Planta infectada com TNV-D (por RT-PCR a partir de frutos no Outono)
	Planta infectada com TNV-D (por RT-PCR a partir de ramos na Primavera e de frutos no Outono)
	Planta infectada com OLV-1 (por RT-PCR a partir de frutos no Outono)
	Plantas não testadas
	Plantas em que não foi detectado OLV-1 nem TNV-D
	Plantas em solo onde foi detectado o fungo <i>O. brassicae</i>

## ANEXO F

**Tabela 10:** Presença de TNV-D, diagnosticada por RT-PCR, nas árvores em solo onde foi detectado o fungo *O. brassicae*

Árvores	TNV-D	<i>O. brassicae</i>
17	-	+
32	-	+
56	+	+
58	+	+
63	+	+
71	+	+
128	-	+
140	+	+
147	+	+
150	-	+

+

Presença de vírus

-

Ausência de vírus