

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
MESTRADO EM MELHORAMENTO DE PLANTAS

**Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L.
na perspectiva de programas de selecção sanitária da
oliveira**

Maria do Rosário Fernandes Félix

Évora
1998

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
MESTRADO EM MELHORAMENTO DE PLANTAS

**Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L.
na perspectiva de programas de selecção sanitária da
oliveira**

Maria do Rosário Fernandes Félix
Dissertação apresentada para a obtenção
do grau de Mestre



Évora
1998

103 084

ÍNDICE

Páginas

AGRADECIMENTOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

ÍNDICE DE QUADROS E DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

1

CAPITULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2

1. A PRESENÇA DE VÍRUS EM *OLEA EUROPAEA* L.

2

1.1 Género *Nepovirus*

3

1.2 Género *Cucumovirus*

4

1.3 Género *Necrovirus*

4

1.4 Género *Potexvirus*

5

1.5 Género *Tobamovirus*

5

1.6 Vírus não incluídos em nenhum género

6

2. VÍRUS DETECTADOS EM *OLEA EUROPAEA* L. EM PORTUGAL

7

3. SINTOMAS SUGESTIVOS DA PRESENÇA DE VÍRUS

EM PLANTAS DE *OLEA EUROPAEA* L.

8

4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VÍRUS DE OLIVEIRA

9

4.1. Observação da sintomatologia

9

4.2. Transmissão mecânica

9

4.3. Testes sorológicos

11

4.4. Análise das duplas cadeias de ácido ribonucleico (dsRNA)

12

5. METODOLOGIAS PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS

COM VISTA À PROTECÇÃO CONTRA VÍRUS

14

5.1. Métodos para a obtenção de plantas isentas de vírus

14

5.2. Método directo para a protecção de plantas contra vírus – a protecção cruzada

17

5.3. Métodos directos para a obtenção de plantas resistentes a vírus

19

CAPITULO II. MATERIAIS E MÉTODOS	23
1. ORIGEM DOS VÍRUS	23
2. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA VIRAL	23
2.1. Inoculação e gama de hospedeiros	23
3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	24
3.1. Purificação	24
3.2. Observação das partículas virais	25
3.3. Peptídeos da cápside viral	25
3.4. Isolamento dos ácidos nucleicos virais	27
3.4.1. Tratamento do ácido nucleico viral com Ribonuclease A	30
3.4.2. Infeciosidade do RNA viral	30
3.5. Isolamento dos ácidos nucleicos de cadeia dupla	30
3.5.1. Tratamento enzimático das duplas cadeias de RNA	31
3.5.2. Preparação do gel e electroforese	32
4. SOROLOGIA	33
4.1. Técnica da dupla difusão em agar	33
CAPITULO III. RESULTADOS	34
1. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS VIRAIS	34
1.1. Sintomatologia e gama de hospedeiros	34
2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	38
2.1. Purificação	38
2.2. Morfologia das partículas virais	40
2.3. Proteína da cápside viral	42
2.4. Ácido nucleico das partículas virais	42
2.5. RNAs de cadeia dupla (dsRNA)	44
3. SOROLOGIA	45
3.1. Relações sorológicas com outros vírus	45
CAPITULO IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	47
BIBLIOGRAFIA	50

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Ivone Esteves da Clara, orientadora desta tese de mestrado, por tudo aquilo que me ensinou, assim como pelos seus esclarecimentos, ajuda e pela disponibilidade e incentivo que sempre me demonstrou.

À Maria Mário, Técnica do Laboratório de Sanidade Vegetal, por toda a ajuda ao longo deste trabalho.

Ao José Manuel Martins, por toda a ajuda, incentivo e compreensão, em todas as ocasiões e que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Às minhas colegas Conceição Gomes e Teresa Coelho, pelo seu apoio e boa disposição nalguns momentos menos bons e que me transmitiram sempre a maior força.

Aos meus pais e à minha irmã pelo grande apoio e incentivo que sempre me transmitiram.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

- ArMV** – Arabis mosaic virus (vírus do mosaico do arábis).
- B** – Abreviatura associada à partícula de taxa de sedimentação mais elevada (bottom).
- BYDV** – Barley yellow dwarf virus (vírus do amarelo ananicante da cevada).
- °C** – Grau Centígrado.
- CARNA-5** – Cucumovirus associated RNA (RNA satélite associado ao vírus CMV).
- CLRV** – Cherry leafroll virus (vírus do enrolamento foliar da cerejeira).
- cm** – centímetro.
- CMV** – Cucumber mosaic virus (vírus do mosaico das cucurbitáceas).
- CTV** – Citrus tristeza virus (vírus da tristeza dos citrinos).
- cv.** – Cultivar.
- Da** – Dalton.
- DAS-ELISA** – Double antibody sandwich – ELISA (teste ELISA em dupla camada de anticorpos).
- DNA** – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico).
- DNase(s)** – Enzima(s) desoxirribonuclease(s).
- dsRNA** – Double stranded ribonucleic acid (ácido ribonucleico de cadeia dupla).
- EG** – Tampão da amostra para electroforese.
- ELISA** – Enzyme-linked immunosorbent assay (teste sorológico com enzimas adsorvidas).
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético.
- gr** – grama.
- h** – hora.
- Kb** – kilobase.
- KDa** – Kilodalton.
- M** – Abreviatura associada à partícula de taxa de sedimentação média (middle).
- micRNA** – Messenger interfering complementary RNA (RNA mensageiro complementar).
- min** – minuto.
- ml** – Mililitro.
- mM** – Milimolar.
- mRNA** – RNA mensageiro.
- nm** – nanómetro.

OLRV – Olive latent ringspot virus (vírus latente das manchas em anel da oliveira).

OLV-1 – Olive latent virus – 1 (vírus latente 1 da oliveira).

OLV-2 – Olive latent virus – 2 (vírus latente 2 da oliveira).

OVYaV – Olive vein yellow associated virus (vírus da clorose das nervuras da oliveira).

OYMDV – Olive yellow mottling declining virus (vírus do declínio e do mosaico amarelo da oliveira).

PAGE – Poliacrilamid gel electrophoresis (electroforese em gel de poliacrilamida).

PEG – Polietileno glicol.

PRV – Papaya ringspot virus (vírus das manchas em anel da papaia).

PRV Ha – Estirpe de PRV isolada no Hawai.

p/v – Peso/volume.

RF – Replicative form (forma replicativa).

rpm – Rotações por minuto.

RI – Replicative intermediate (forma replicativa intermédia).

RNA(s) – Ribonucleic(s) acid(es) (ácido ribonucleico).

RNase(s) – Enzima(s) ribonuclease(s).

S – Abreviatura que exprime o coeficiente de sedimentação.

SDS – Sulfato dodecil de sódio.

SLRV – Strawberry latent ringspot virus (vírus latente das manchas em anel do morangueiro).

SSC – Tampão salino de citrato de sódio.

ssRNA – Single stranded RNA (RNA de cadeia simples).

STE – Tampão sódio-tris-EDTA

T – Abreviatura associada à partícula de taxa de sedimentação menor (top).

TBE – Tampão tris-borato-EDTA.

TE – Tampão tris-EDTA

TMV – Tobacco mosaic virus (vírus do mosaico do tabaco).

ToMV – Tomato mosaic virus (vírus do mosaico do tomate).

TSWV – Tomato spotted wilt virus.

V – Volt.

µg – Micrograma.

µl – Microlitro.

ÍNDICE DE QUADROS E DE FIGURAS

Páginas

QUADROS

- Quadro I. Plantas herbáceas indicadoras mais utilizadas no diagnóstico de vírus que afectam *Olea europaea* L. (Adaptado de Clara *et al.*, 1997) 10
- Quadro II. Sintomatologia verificada nas plantas herbáceas inoculadas com os isolados virais, Gl 1 e Vr 10. 36

FIGURAS

- Fig. 1 – Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e sistémicas, inoculada com o isolado viral Gl 1. 34
- Fig. 2 - Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e sistémicas, inoculada com RNA extraído pelo método do perclorato de sódio, da preparação do isolado viral Gl 1. 34
- Fig. 3 – Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e cloroses sistémicas, inoculada com o isolado viral Vr 10. 35
- Fig. 4 – Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e cloroses sistémicas, inoculada com RNA extraído pelo método do fenol-SDS, da preparação do isolado viral Vr 10. 35

- Fig. 5 – Sintomatologia em hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral Gl 1: **A** – Lesões locais em *N. benthamiana*; **B** – Lesões locais em *Gomphrena globosa*; **C** – Lesões locais em *C. murale*; **D** – Lesões locais em *Datura stramonium*; **E** – Lesões locais em *N. paniculata*; **F** – Lesões locais em *C. botrys*; **G** – Lesões locais em *N. tabacum* cv. White Burley; **H** – Lesões locais em *C. ambrosoides*; **I** – Lesões locais em *N. clevelandii*. 37
- Fig. 6 – Sintomatologia em hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral Vr 10: **A** – Lesões locais em *C. botrys*; **B** – Lesões locais em *C. amaranticolor*; **C** – Lesões sistémicas em *N. benthamiana*; **D** – Lesões locais em *Gomphrena globosa*; **E** – Lesões locais em *C. hybridum*; **F** – Lesões locais em *N. benthamiana*; **G** – Lesões locais em *C. murale*; **H** – Lesões locais em *C. quinoa*; **I** – Lesões locais em *C. capitatum*. 39
- Fig. 7 – Banda formada em gradientes de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral Gl 1. 40
- Fig. 8 – Banda formada em gradientes de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral Gl 1. 40
- Fig. 9 – Preparação purificada do isolado viral Gl 1 observado ao microscópio electrónico (Ampliação 36000 x). 41
- Fig. 10 – Preparação purificada do isolado viral Vr 10 observado ao microscópio electrónico (Ampliação 60000 x). 41
- Fig. 11 – Análise electroforética em gel descontínuo de poliacrilamida da proteína da capsíde viral. Poço 1 – marcadores de massa molecular conhecida; Poço 2 – Gl 1; Poço 3 – Vr 10; Poço 4 – OLV-1 (estirpe italiana). 42
- Fig. 12 – Análise electroforética em gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos virais. Poço 1 – marcadores moleculares com número conhecido de nucleotídeos; Poço 3 – Vr 10; Poço 4 – OLV-1 (estirpe italiana). 43

Fig. 13 – Análise electroforética em gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos virais.
Poço 1 – marcadores moleculares com número conhecido de nucleotídeos;
Poço 2 – Gl 1; Poço 4 – OLV-1 (estirpe italiana). 43

Fig. 14 – Análise electroforética em gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos de cadeia dupla extraídos de plantas de *N. benthamiana*. (P1 a P3 – tratados enzimaticamente com DNase, RNase e Proteinase K; P5 a P7 – sem tratamento enzimático). P1 e P5 – OLV-1 (estirpe italiana), P2 e P6 – Gl 1, P3 e P7 – Vr 10. 44

Fig. 15 – Caracterização sorológica através da técnica da dupla difusão em agar. **A** – anti-OLV-1; **B** – OLV-1 purificado; **C** – GL 1 purificada com dois ciclos de centrifugação diferencial; **D** – Gl 1 purificado em gradiente de sacarose; **E** – OLV-1 purificado em gradiente de sacarose; **F** – extracto de *N. benthamiana* sã; **G** – Vr 10 purificada com dois ciclos de centrifugação diferencial. 45

RESUMO

Neste trabalho, efectuou-se a caracterização biológica e físico-química de dois isolados virais obtidos a partir de duas árvores de *Olea europae* L., das cultivares Galega Vulgar e Verdeal Alentejana, do concelho de Serpa. Estas árvores foram inicialmente designadas por Gl 1 e Vr 10, respectivamente.

Ambos os isolados foram obtidos por inoculação mecânica de extractos de frutos em plantas indicadoras, nas quais os sintomas causados se revelaram distintos em alguns casos. Utilizou-se a *Nicotiana benthamiana* Domin para propagação em larga escala, com vista à posterior purificação viral. A purificação foi feita por homogeneização em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, clarificação em butanol-cloroformio, seguida de dois ciclos de centrifugação diferencial e finalmente centrifugação em gradientes de densidade de sacarose. Nestes, ambos os isolados sedimentaram numa única banda, mostrando um coeficiente de sedimentação de cerca de 110 S.

Observações ao microscópio electrónico de amostras virais purificadas e contrastadas negativamente, revelaram a presença de partículas isométricas, com diâmetros aproximados de 28 nm e 20 nm, respectivamente para os isolados Gl 1 e Vr 10.

A análise por electroforese em gel de SDS-poliacrilamida mostrou que as partículas de ambos os isolados eram constituídas por peptídeos com massa molecular de 30 KDa. O ácido nucleico viral, isolado das partículas de Vr 10 pelo método do fenol e das partículas de Gl 1 pelo método do perclorato de sódio, foi tratado por enzimas e analisado por electroforese em gel de agarose, chegando à conclusão de que se tratava de RNA de cadeia simples. No caso do isolado Vr 10, observou-se a presença de um único tipo de molécula de RNA, com massa molecular de cerca de $1,4 \times 10^6$ Da. No caso da Gl 1 se observaram-se duas moléculas de $1,4 \times 10^6$ Da e $0,1 \times 10^6$ Da. Este segundo RNA viral poderá constituir um RNA satélite encapsidado na partícula, pois a maior parte das outras características do Gl 1 aproximam-no do *Necrovirus* conhecido de oliveira, o olive latent virus-1 (OLV-1), que não possui esta espécie de RNA. A análise por electroforese de agarose das cadeias duplas de RNA (dsRNA), isoladas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com cada um dos isolados virais, permitiu a detecção em gel de agarose de quatro bandas de dsRNA com as massas moleculares aproximadas de $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da, $0,94 \times 10^6$ Da e $0,4 \times 10^6$ Da, no caso do isolado Gl 1 e três bandas de dsRNA com as massas moleculares aproximadas de $2,7 \times 10^6$ Da, $1,1 \times 10^6$ Da e $0,9 \times 10^6$ Da no caso do isolado Vr 10.

A utilização de anticorpos específicos para dois vírus de oliveira, (OLV-1) e olive latent ringspot *Nepovirus* (OLRV) em testes de dupla difusão em agar, permitiu observar apenas uma reacção de precipitação entre o isolado viral Gl 1 e o antisoro para o necrovirus OLV-1 (estirpe obtida em Itália), semelhante à verificada entre este vírus e o antisoro homólogo. Nenhuma reacção foi obtida entre aqueles antisoros e o Vr 10.

Tomando em conjunto os resultados referidos foi identificado o isolado Gl 1 como uma estirpe do *Necrovirus* OLV-1. Contudo, as características do isolado Vr 10 não se ajustam às dos outros vírus descritos na literatura, nomeadamente na cultura da oliveira. Sugere-se que seja designado por 'olive latent mottle virus' (vírus latente do mosqueado da oliveira), enquanto prosseguem os estudos que permitam enquadrá-lo num género viral conhecido.

CHARACTERISATION OF VIRAL ISOLATES FROM *OLEA EUROPAEA* L. IN THE FRAMEWORK OF SANITARY SELECTION PROGRAMMES OF OLIVE

ABSTRACT

This study concerns the biological and biochemical characterisation of two virus isolates recovered from two trees of the cultivars Galega Vulgar and Verdeal Alentejana of *Olea europaea* L. (located in Serpa, South Portugal), that were designated Gl 1 and Vr 10.

Both isolates were obtained through mechanical inoculation of olive extracts onto herbaceous indicator species where the symptoms caused were distinct. *Nicotiana benthamiana* plants were used as propagative species for virus purification purposes. This was done by homogenisation in sodium phosphate buffer (0,1 M, pH 6,0), clarification in the presence of butanol/chloroform followed by two cycles of differential centrifugation and finally centrifugation in sucrose density gradients. In these, both isolates sedimented as a single component, with a sedimentation coefficient of ca. 110 S.

Observation under the electron microscope of purified viral samples negatively stained, showed the presence of isometric particles with approximate diameters of 28 nm for Gl 1 and 20 nm for Vr 10.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis showed that particles of both isolates consisted of peptides with molecular mass of 30 KDa.

Viral nucleic acid isolated from Gl 1 by dissociation using sodium perchlorate and from Vr 10 using phenol, followed by treatment with enzymes and analysis by agarose gel electrophoresis showed then to consist of single strand ribonucleic acid (RNA). In the case of Gl 1, viral RNA showed to consist of two types of molecules of molecular mass approximately, $1,4 \times 10^6$ Da and $0,1 \times 10^6$ Da. This second species, because of its small size, could represent an encapsidated RNA satellite, as most of other properties of Gl 1 suggested it to be close to a known *Necrovirus* of *Olea europaea* L., olive latent virus-1, which does not possess that RNA species. In the case of Vr 10, only one type of viral RNA was present, ca. $1,4 \times 10^6$ Da.

Agarose gel electrophoresis of double-stranded (ds) RNA isolated from infected *N. benthamiana*, allowed for the detection, in the case of Gl 1, of four dsRNA with molecular mass ca. $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da, $0,94 \times 10^6$ Da and $0,3 \times 10^6$ Da and, in the case of Vr

10 infection, three dsRNA species with molecular mass $2,7 \times 10^6$ Da, $1,1 \times 10^6$ Da and $0,9 \times 10^6$ Da.

Agar double-diffusion serology test, using antiserum for the olive viruses olive latent-1 *Necrovirus* and olive latent ringspot *Nepovirus*, showed a precipitin line between OLV-1 specific antiserum and Gl 1 isolate, identical and continuous with that formed by OLV-1 isolate when placed side by side in the same plate. Gl 1 isolate did not react with OLRV antiserum and Vr 10 isolate did not react with antiserum against OLV-1 nor OLRV.

Taking into account all these data, Gl 1 isolate was identified as a strain of the OLV-1 *Necrovirus*. On the other hand, the properties of Vr 10 isolate do not match those of other viruses described in the literature, namely those infecting olive crop. As it appears to be a new viral agent, it is suggested to name it 'olive latent mottle virus'.

INTRODUÇÃO

A cultura da oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das mais antigas e conhecidas da Humanidade. Desde sempre, esta espécie tem estado associada a crenças e religiões, tendo por isso uma grande importância cultural. Para além disso, a oliveira está fortemente implantada em todos os países da bacia do mediterrâneo, devido às suas condições edáfo-climáticas (Martelli e Gallitelli, 1985). Constitui assim uma cultura com extrema importância económica para a maior parte destes países, entre os quais Portugal, onde desempenha um papel económico fundamental em algumas regiões do país.

Actualmente, tem-se verificado em Portugal um aumento crescente da área de plantação de olival, no qual se tenta reestruturar e utilizar cultivares de interesse nacional. Para isso, estão actualmente a decorrer muitos projectos de Selecção Clonal e Sanitária, para possibilitar que as futuras implantações de olival disponham de material sã e de elevada produtividade (Leitão *et al.*, 1996).

A oliveira é uma cultura que está sujeita ao ataque de várias pragas e doenças. De entre estas, as viroses têm vindo a assumir uma atenção crescente por parte dos virologistas e melhoradores, uma vez que não se conhecem, ainda, formas de luta do tipo curativo contra os vírus. Para além disso, os sintomas de infecções virais são muitas vezes confundidos com carências nutricionais (Clara, 1996), levando a um aumento do uso de nutrientes, o que faz aumentar desnecessariamente os custos de produção.

Desde há algum tempo que os melhoradores tentam obter plantas resistentes a vírus. Em numerosas espécies herbáceas anuais, isso é uma realidade, mas nas espécies lenhosas ainda há um longo caminho a percorrer, devido sobretudo às características deste tipo de plantas, sendo a principal, a longevidade do seu ciclo vegetativo. No entanto, é de toda a importância conhecer e caracterizar os vírus que as infectam, para que se possa trabalhar, através das inúmeras técnicas actualmente disponíveis, no sentido de obter plantas resistentes, ou mais tolerantes, ao ataque das estirpes virais, as quais podem causar consideráveis prejuízos, podendo mesmo, em casos extremos, levar à morte das plantas.

Neste estudo pretende-se fazer a caracterização biológica e físico-química de dois vírus isolados de oliveiras do Alentejo (concelho de Serpa) e que fazem parte de um estudo de Selecção Clonal e Sanitária de variedades importantes na região, que permita numa fase posterior, diagnosticar esses vírus e seleccionar apenas plantas altamente produtivas e não infectadas por eles.

CAPITULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. A PRESENÇA DE VÍRUS EM *OLEA EUROPAEA* L.

O aparecimento de alterações morfológicas sugestivas de estarem associadas a infecções virais em plantas de oliveira (*Olea europaea* L.) foi referida pela primeira vez por Pesante em 1938 (citado por Mohamed, 1996). Este, descreveu uma sintomatologia caracterizada por anomalias foliares e necroses do floema que, por vezes, conduziam à morte da árvore. No entanto, nenhum teste foi realizado na época para verificar esta hipótese e mais tarde constatou-se mesmo que esta era uma sintomatologia ligada à leptonecrose, uma carência de boro (Mohamed, 1996).

A presença de partículas virais em oliveira só viria a ser observada casualmente mais tarde, aquando da observação ao microscópio electrónico de grãos de pólen em secções ultrafinas (Pacini e Cresti, 1977). Desde 1977 até ao presente momento já foram isolados e descritos, a partir de tecidos de oliveira, dez vírus, embora poucos estejam associados a sintomatologia específica apresentada pela planta.

Quatro dos vírus isolados em oliveira pertencem ao género dos *Nepovirus*: vírus latente das manchas em anel do morangueiro ('strawberry latent ringspot virus' – SLRV), vírus do mosaico do arabis ('arabis mosaic virus' – ArMV), vírus do enrolamento foliar da cerejeira ('cherry leafroll virus' – CLRV) e vírus latente das manchas em anel da oliveira ('olive latent ringspot virus' – OLRV). Outros vírus identificados em oliveira pertencem aos seguintes géneros: *Cucumovirus*, o vírus do mosaico das cucurbitáceas ('cucumber mosaic virus' – CMV); *Necrovirus*, o vírus latente-1 da oliveira ('olive latent virus-1' – OLV-1); *Potexvirus*, o vírus da clorose das nervuras da oliveira ('olive vein yellow associated virus' – OYVaV); e *Tobamovirus*, o vírus do mosaico do tabaco ('tobacco mosaic virus' – TMV). Os restantes dois vírus, identificados e descritos pela primeira vez em oliveira, não se encontram ainda incluídos em nenhum género. Estes são o vírus do declínio e do mosaico amarelo da oliveira ('olive yellow mottling declining virus' – OYMDV) e o vírus latente-2 da oliveira ('olive latent virus-2' – OLV-2), encontrando-se este último provisoriamente classificado no género *Ourmiavirus* (?) (Brunt *et al.*, 1996).

1.1. Género *Nepovirus*

O vírus isolado e identificado como sendo o SLRV, foi obtido a partir de pólen, folhas e frutos de oliveira de duas regiões do centro de Itália. As plantas de oliveira não mostravam no entanto sintomas evidentes de doença, embora mais tarde tivessem sido isoladas partículas virais de SLRV de plantas de oliveira da cultivar 'Ascolana tenera' cujas folhas e frutos apresentavam grandes deformações (Marte *et al.*, 1986). Nas plantas herbáceas indicadoras, a sintomatologia varia consoante o hospedeiro. Na família *Chenopodeaceae* a sintomatologia apresentada resume-se essencialmente a lesões locais, mas as *Solanaceae* podem apresentar zonas de mosaico sistémico e cloroses entre nervuras (Henriques *et al.*, 1992).

As partículas virais são isométricas com contornos angulares, de 30 nm de diâmetro e com três componentes de sedimentação, T (Top), M (Middle) e B (Bottom), às quais correspondem as taxas de sedimentação 62 S, 99 S e 135 S, respectivamente, com teores de RNA de 22% (componente M) correspondente a uma molécula de RNA de cadeia simples com uma massa molecular de $1,6 \times 10^6$ Da, e 37% (componente B) relativo a duas cadeias simples de RNA com massa molecular de $1,6 \times 10^6$ Da e $2,6 \times 10^6$ Da. A componente de sedimentação T não tem ácido nucleico. Para a infecciosidade da partícula viral são necessários os componentes M e B. A cápside proteica é constituída por dois polipeptídeos com massas moleculares de 29 e 44 KDa (Savino *et al.*, 1979).

O vírus identificado como sendo ArMV, é constituído por partículas isométricas com 30 nm de diâmetro e que apresentam três componentes com as seguintes taxas de sedimentação: 50 S (T), 91 S (M) e 126 S (B). Os teores em RNA são de 29% correspondente ao componente M, referente a uma molécula de cadeia simples de RNA com massa molecular de $1,6 \times 10^6$ Da, e de 43% correspondente ao componente B, referente a duas moléculas de cadeias simples de RNA com massa molecular de $2,4 \times 10^6$ Da. A cápside proteica é composta por um único polipeptídeo, com massa molecular de 54 KDa (Savino *et al.*, 1979).

O vírus identificado como sendo CLRV, foi obtido a partir de oliveiras aparentemente sem sintomas perto de Bari, Itália. É um vírus mecanicamente transmissível a vários hospedeiros herbáceos das famílias *Chenopodeaceae* e

Solanaceae e cuja sintomatologia inclui necroses locais e sistêmicas (Savino e Gallitelli, 1981).

As partículas virais são isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro e com dois componentes, M e B. Estes apresentam, respectivamente, taxas de sedimentação de 112 S e 124 S (Savino e Gallitelli, 1981). Estas características são semelhantes às de outros isolamentos de CLR V descritos por Jones e Mayo (1972).

O último vírus do género *Nepovirus* é o OLRV, obtido a partir de oliveiras que apresentavam uma desfoliação parcial (Savino *et al.*, 1983). Este vírus é constituído por três classes de partículas com uma forma isométrica, com cerca de 28 nm de diâmetro e com coeficientes de sedimentação de 52 S (T), 97 S (M) e 132 S (B). A partícula viral contém dois tipos de RNA de cadeia simples com massas moleculares de $1,4 \times 10^6$ Da e $2,65 \times 10^6$ Da, sendo ambos necessários para a infecciosidade da partícula nas células do hospedeiro. A proteína da cápside viral foi separada em vários componentes, 75% apresentando a massa molecular de 57,6 KDa e o restante aparentando serem polímeros de uma forma monomérica com 14,3 KDa (Savino *et al.*, 1983).

1.2. Género *Cucumovirus*

Dentro deste género de vírus foram isoladas, em oliveira, partículas identificadas com sendo CMV. As partículas isoladas são multicomponentes com uma forma isométrica e cerca de 28 nm de diâmetro. O seu genoma é multipartido, constituído por 5 cadeias simples de RNA, que têm as seguintes massas moleculares: $1,2 \times 10^6$ Da (RNA-1), $1,07 \times 10^6$ Da (RNA-2), $0,78 \times 10^6$ Da (RNA-3), $0,39 \times 10^6$ Da (RNA-4) e $0,15 \times 10^6$ Da (RNA-5). A cadeia de massa molecular mais baixa, a RNA-5, foi considerada equivalente ao RNA-satélite do CMV, mais conhecido por CARNA-5 ('cucumovirus associated RNA') (Savino e Gallitelli, 1983).

1.3. Género *Necrovirus*

O vírus OLV-1 foi isolado pela primeira vez a partir de oliveiras sem sintomas, em Apulia, Sul de Itália, por Gallitelli e Savino (1985). Este vírus foi também isolado de oliveiras com e sem sintomas na Turquia (Savino *et al.*, 1996), bem como em plantas do género *Citrus* afectadas pela doença da clorose ananicante (Grieco *et al.*, 1996). O

seu hospedeiro natural são plantas de *Olea europaea* L. e o vírus transmite-se por inoculação mecânica a plantas herbáceas indicadoras (Brunt *et al.*, 1996). Os sintomas induzidos são lesões necróticas locais na sua maioria, mas também mosaico sistêmico em plantas de *Nicotiana benthamiana* Domin (Gallitelli e Savino, 1985).

As partículas virais são isométricas, com cerca de 30 nm de diâmetro, um coeficiente de sedimentação de 111 S e um genoma constituído por uma cadeia de RNA simples com 4100 nucleótidos (Gallitelli e Savino, 1985). No entanto, outros isolamentos de OLV-1 possuem RNA com 3800 nucleótidos e uma massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da (Merciega *et al.*, 1996). A cápside proteica viral é constituída por um polipeptídeo com massa molecular de 32 KDa (Gallitelli e Savino, 1985), embora sejam também referidos isolamentos em que a proteína da cápside tem uma massa molecular de 30 KDa (Merciega *et al.*, 1996). As cadeias duplas de RNA (dsRNA) são três, com massas moleculares estimadas em $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da (Grieco *et al.*, 1996).

1.4. Género *Potexvirus*

Neste género inclui-se o vírus OVYaV, que foi isolado numa oliveira de variedade desconhecida. Este é um vírus filamentososo, que provoca uma redução na produção e um amarelecimento das folhas (Faggioli e Barba, 1994, citados por Mohamed, 1996).

1.5. Género *Tobamovirus*

O vírus que foi descrito e identificado como sendo TMV, foi obtido de uma oliveira da cultivar 'Leccino', na região da Toscana (centro de Itália) no âmbito de um programa de selecção clonal. A árvore mostrava um severo declínio e folhas com deformações e cloroses ao longo das nervuras (Triolo *et al.*, 1996).

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

1.6. Vírus não incluídos em nenhum gênero

O OLV-2 foi, tal como o OLV-1, isolado de oliveiras sem sintomas de Apulia, Sul de Itália, por Savino *et al.* (1984). No entanto, as partículas virais são morfologicamente distintas, apresentando o primeiro uma forma quase baciliforme, com cerca de 26 nm de largura e com comprimentos que variam entre os 37, 43, 48 e 55 nm, sendo um vírus multicomponente. Estas partículas são transmissíveis mecanicamente a plantas herbáceas indicadoras, produzindo uma sintomatologia local variada, que se pode manifestar por cloroses, necroses e mosaico (Brunt *et al.*, 1996). Têm coeficientes de sedimentação, de 82 S e de 77 S. O seu genoma é constituído por quatro tipos de RNA: a cadeia principal de RNA é uma cadeia simples linear com 3300 nucleótidos e os outros três tipos de RNA, com 2800, 2450 e 2100 nucleótidos respectivamente. A sua cápside proteica é constituída por apenas um único polipeptídeo, com massa molecular de 24 KDa (Grieco *et al.*, 1992).

Em 1996, foi descrita por Savino *et al.* uma alteração em oliveiras da cultivar 'Nostrana', encontradas em Trabia (Palermo, Sicília). As árvores mais jovens apresentavam alterações cromáticas foliares, tomando uma coloração amarela, alterações estas que também eram acompanhadas por necroses foliares e por uma intensa desfoliação das árvores (Savino *et al.*, 1996). O vírus associado a esta sintomatologia, designado por 'olive yellow mottling declining virus' - OYMDV, não se encontra ainda classificado, embora já tenha sido feita a sua caracterização.

As partículas virais isoladas são filamentosas e flexuosas, com um comprimento de 650 nm e uma largura de 12 nm. O genoma viral é constituído por três moléculas de RNA de cadeia simples, com massas moleculares de $2,0 \times 10^6$ Da, $0,8 \times 10^6$ Da e $0,6 \times 10^6$ Da. Os dsRNA produzidos nos tecidos infectados de hospedeiros herbáceos são também três, com massas moleculares de $4,0 \times 10^6$ Da, $1,6 \times 10^6$ Da e $1,2 \times 10^6$ Da. No entanto, quando os dsRNA são isolados de tecidos de oliveira apenas aparece uma molécula de dsRNA, com massa molecular de $4,0 \times 10^6$ Da. A proteína da cápside tem uma massa molecular de 27 KDa (Mohamed, 1996).

Este vírus foi testado sorologicamente com antisoros específicos para vírus dos géneros *Closterovirus*, *Potexvirus*, *Potyvirus* e *Trichovirus*, não apresentando qualquer relação sorológica com estes. O OYMDV é também sorologicamente distinto do OVYaV (Mohamed, 1996).

2. VÍRUS DETECTADOS EM *OLEA EUROPAEA* L. EMPORTUGAL

Em Portugal, tal como referido anteriormente, a oliveira é uma cultura fortemente implantada em algumas regiões. A reestruturação de olival já existente em áreas reconhecidamente oleícolas, assim como a instalação de novas áreas de olival, torna necessários programas de selecção sanitária e clonal. No decurso destes programas, foram realizados estudos em oliveiras da região de Trás-os-Montes, abrangendo 125 árvores da cultivar 'Negrinha', repartidas por 5 olivais. Em frutos de algumas das árvores em estudo observaram-se deformações muito semelhantes às observadas por Marte *et al.* (1986) em frutos da cultivar 'Ascolana tenera' naturalmente infectada por SLRV. Em consequência desta observação, procedeu-se à inoculação mecânica em hospedeiros herbáceos e a testes sorológicos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) para se pesquisar a presença de vírus dos géneros *Nepovirus* (SLRV, CLRV e ArMV) e *Cucumovirus* (CMV). Estes estudos foram também alongados a oliveiras de outras cultivares na região do Ribatejo e do Alentejo. Assim, através da técnica sorológica DAS-ELISA (double antibody sandwich - enzyme-linked immunosorbent assay), verificou-se a presença dos vírus acima referidos em cultivares nacionais e mesmo em algumas cultivares espanholas, italianas, francesas e turcas, com percentagens de infecção que muitas vezes ultrapassavam os 20% das plantas testadas (Clara, 1996; Clara *et al.*, 1997; Henriques, 1994; Henriques *et al.*, 1990, 1991 e 1992; Rei *et al.*, 1993).

Além dos testes de diagnóstico envolvendo as inoculações mecânicas em hospedeiros herbáceos e os testes sorológicos DAS-ELISA, foi também aplicado o método de isolamento das cadeias duplas de RNA (dsRNA). Este método foi recentemente aplicado a frutos e folhas de 30 oliveiras de 10 variedades, que se encontravam em estudos de selecção clonal na região de Serpa (Baixo Alentejo). Estes estudos permitiram detectar a presença de moléculas de dsRNA em 10% das amostras analisadas (Rei, 1995).

3. SINTOMAS SUGESTIVOS DA PRESENÇA DE VÍRUS EM PLANTAS DE *OLEA EUROPAEA* L.

Existem várias anomalias que afectam árvores de várias cultivares de *Olea europaea* L., as quais se suspeitam ser de origem viral por causa da sua transmissão através de enxertia (Clara, 1996). A primeira observada foi a ‘paralisia parcial’ (‘partial paralysis’), caracterizada pelo aparecimento de mosaicos nas folhas. Esta doença foi observada pela primeira vez em 1950 na Argentina, tendo nesta altura sido denominada de leptonecrose (Nicolini e Traversi, 1950, citados por Mohamed, 1996).

O sintoma das ‘folhas fauciformes’ (‘sickle leaf’) foi descrito inicialmente na Califórnia (Thomas, 1958) e mais tarde no Chile, Israel, Itália, (Waterworth e Monroe, 1975) Portugal (Almeida, 1967) e mais recentemente na Grécia (Kyriakopoulou, 1993). Esta doença manifesta-se por folhas com os limbos bi, tri, tetra ou pentafoliados ou leptofilicos, folhas com o limbo muito reduzido e uma elevada relação comprimento/largura. Estas deformações nunca são generalizadas a toda a copa, apresentando a restante folhagem um aspecto normal. Esta doença chegou a ser transmitida por enxertia a oliveiras sãs (Waterworth e Monroe, 1975).

A ‘deformação foliar’ (‘leaf malformation’) apresenta um tipo de sintomatologia semelhante ao descrito para as folhas fauciformes, sendo por vezes difícil distingui-los. A característica que permite distingui-los é a sua transmissão por enxertia ao *Lingustrum lucidum* (Barba *et al.*, 1993; Corte *et al.*, 1961).

O ‘amarelecimento infeccioso’ (‘infective yellowing’) foi descrito em 1959 por Ribaldi. Este observou uma planta de uma variedade local ‘Dolce Agogia’ com um amarelecimento parcial das folhas, que mostrava uma redução do rendimento (Ribaldi, 1959, citado por Mohamed, 1996).

A sintomatologia chamada ‘spherosis’ foi observada pela primeira vez em Israel, no final dos anos 50. Algumas árvores da cultivar ‘Manzanillo’ apresentavam um nanismo muito acentuado, acompanhado de um grande aumento de mini-esferoblastos. Ao mesmo tempo, um grande número de árvores da cultivar ‘Nabali’ começou a desenvolver mini-esferoblastos, que nesta cultivar eram acompanhados por um declínio da árvore (Lavee e Tanne, 1984).

É ainda de referir as deformações encontradas nos frutos (‘fruit bumps’) e as manchas dos frutos (‘fruit pox’) na Grécia e que poderão estar associados a vírus (Kyriakopoulou, 1994, citado por Mohamed, 1996).

4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE VÍRUS DE OLIVEIRA

Devido à grande importância económica da cultura da oliveira na maioria dos países mediterrâneos e as perdas que ocorrem em muitas dessas fruteiras devido à presença de vírus, devem ser efectuados todos os esforços para obter e utilizar apenas material vegetal isento de vírus (Clara *et al.*, 1997).

Existem vários métodos para fazer o diagnóstico da presença de vírus e, embora nenhum deles seja universal, a sua utilização individual ou em conjunto é de extrema importância para se efectuar uma correcta avaliação do estado sanitário das plantas em estudo.

4.1. Observação da sintomatologia

A observação da sintomatologia das plantas no campo pode dar-nos algumas indicações, não sendo no entanto, um método muito sensível, específico, ou fiável, pois alguns vírus em certas cultivares de oliveira não causam sintomatologia visível (estirpes latentes). Por outro lado, outros agentes infecciosos podem causar sintomas similares aos dos vírus (Clara *et al.*, 1997).

Apesar disto, é de referir que se isolaram vírus de cultivares de oliveira onde foram observados uma variedade de sintomas como folhas fauciformes e deformações nos frutos (Henriques *et al.*, 1992; Marte *et al.*, 1986) e mais recentemente o amarelecimento foliar e o marmoreado amarelo e enfraquecimento (Savino *et al.*, 1996). Assim, a observação visual serve sobretudo para evitar que se utilize material vegetal para propagação que poderá estar infectado.

4.2. Transmissão mecânica

Os vírus são incapazes de penetrar por si próprios nas células vegetais. A inoculação mecânica consiste na introdução do vírus infeccioso ou do RNA viral nas células, através de uma lesão nas paredes celulares (Matthews, 1992). Para a realização deste teste, utilizam-se plantas herbáceas indicadoras. Estas são inoculadas com extracto vegetal proveniente de tecidos da planta que se pretende testar. O tecido vegetal é macerado na presença de um tampão de extracção apropriado e de um abrasivo para ferir as células da parede celular, para provocar pequenas lesões que possibilitem a

penetração do vírus na planta hospedeira indicadora, a qual poderá posteriormente apresentar alguma sintomatologia.

O leque de plantas herbáceas indicadoras é vasto, abrangendo plantas de quase todas as famílias botânicas. No entanto, como indicadoras de vírus de oliveira, as que aparentam maior sensibilidade são as indicadas no Quadro I.

Quadro I. Plantas herbáceas indicadoras mais utilizadas no diagnóstico de vírus que afectam *Olea europaea* L. (Adaptado de Clara *et al.*, 1997).

FAMÍLIA	ESPÉCIE
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i> L.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn. <i>Chenopodium murale</i> L. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucumis sativus</i> L.
<i>Leguminosae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Vigna unguiculata</i> Walp.
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin <i>Nicotiana clevelandii</i> Gray <i>Nicotiana glutinosa</i> L. <i>Nicotiana tabaccum</i> L. (várias cultivares) <i>Petunia hybrida</i> Vilm

As plantas inoculadas podem apresentar cloroses, necroses, mosaico, manchas e ilhas verdes. Esta sintomatologia pode ser local, quando o seu aparecimento surge nas folhas directamente inoculadas (dois ou três dias pós-inoculação) ou podem ser sintomas sistémicos, quando o seu aparecimento se dá nas folhas que não foram inoculadas (Agrios, 1988; Mathews, 1991).

Este tipo de teste apresenta as vantagens de ter uma grande sensibilidade, requer equipamento simples e ser fácil de executar. As desvantagens são, por outro lado, o tempo que se demora a obter os resultados e a sua não especificidade, isto é, não permite a identificação do vírus no caso da planta apresentar sintomas, nem detecta vírus que não sejam mecanicamente transmissíveis. No entanto, este tipo de teste é de grande importância e utilidade na pesquisa de vírus, sobretudo em oliveira, onde nem sempre é observada sintomatologia indicadora da presença de vírus.

4.3. Testes sorológicos

Estes testes baseiam-se em reacções de ligação entre o antígeno viral e anticorpos específicos. O resultado das ligações antígeno - anticorpo pode ser visualizado em condições apropriadas, sob a forma de um precipitado esbranquiçado em testes de precipitação ou de imunodifusão, ou na mudança de cor como em testes ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Clara *et al.*, 1997).

Os testes de precipitação são efectuados em pequenos tubos. Nestes, o soro contendo os anticorpos é colocado no fundo e o antígeno viral é colocado no topo. A difusão das duas soluções tem lugar durante um período de incubação e, quando existe uma concentração óptima de antígeno e de anticorpo, forma um precipitado (Ball, 1974).

Os testes de imunodifusão são feitos em meio sólido, normalmente na presença de agar. Estes podem ser feitos em tubo ou em placa. Quando feitos em tubo, o anticorpo é misturado juntamente com a solução líquida de agar e deixado solidificar. Por fim, coloca-se no topo da coluna de agar já solidificado o antígeno viral, que se irá difundir pela coluna, formando um precipitado nos locais em que a concentração de antígeno e de anticorpo estiver num óptimo. Na difusão em placa, após a solidificação do agar, são formados pequenos alvéolos, colocando-se num o antígeno viral e noutro o anticorpo. Estes vão migrar e, no caso de serem sorologicamente relacionados e de se encontrarem nas proporções adequadas, forma-se uma linha de precipitado (Ball, 1990).

Este tipo de testes apresentam vantagens como é o caso de nos mostrarem com rapidez a relação sorológica dos vírus, serem de fácil execução e não necessitarem de muito material para serem efectuados nem de equipamento tecnologicamente sofisticado. No entanto, têm desvantagens como a de se poderem produzir reacções não específicas sempre que o antígeno viral não se encontre bem purificado, o agar não se mantenha estéril durante o período de incubação e como a de requererem quantidades relativamente grandes de soro (Ball, 1974).

Há diversas variantes do método ELISA, mas a 'sandwich' dupla de anticorpos (DAS), como foi descrita por Clark e Adams (1977), tem mostrado uma larga aplicação para situações de rotina na detecção de vírus em numerosas culturas, incluindo a oliveira (Henriques *et al.*, 1993). Para a realização de DAS-ELISA, os tecidos vegetais são macerados na presença de um tampão apropriado. Os extractos obtidos são depois colocados nos alvéolos da placa de microtitulação, que foram previamente cobertos com

o anticorpo específico para o vírus. Após a incubação dos extractos e as respectivas lavagens, é adicionado o anticorpo específico marcado com uma enzima e é efectuada uma nova incubação e lavagem. Por fim, é adicionado o substracto enzimático, o qual vai conferir uma coloração nos alvéolos onde houve a formação do complexo anticorpo – vírus – anticorpo marcado com a enzima. A coloração distingue-se visualmente, mas para se fazerem análises mais rigorosas utiliza-se normalmente um espectrofotómetro para medir a absorvância da coloração formada (Clark, 1981; Clark e Adams, 1977).

O método DAS-ELISA apresenta várias vantagens, entre as quais a rapidez de obtenção de resultados, o grande número de amostras que se podem testar simultaneamente, a possibilidade de ser aplicado a qualquer tipo de órgão vegetativo (por exemplo, em oliveira têm sido testadas folhas, flores, frutos e ramos jovens - Clara *et al.*; 1997 Rei *et al.*, 1993), a de utilizar pequenas quantidades de antisoro e a de ser um teste muito sensível e de uma grande especificidade. No entanto, apresenta também algumas desvantagens como por exemplo a de apenas detectar vírus específicos para os antisoros disponíveis (Matthews, 1991).

4.4. Análise das duplas cadeias de ácido ribonucleico (dsRNA)

Este teste baseia-se no facto de os vírus com RNA genómico (90% dos vírus fitopatogénicos) quando se replicam nas células dos hospedeiros, formarem moléculas específicas de dsRNA, as quais podem ser isoladas por cromatografia em celulose e detectadas através de um gel de agarose ou de poliacrilamida. Este facto permite o diagnóstico de infecções devidas a vírus de genoma constituído por RNA de cadeia simples ou dupla, uma vez que plantas isentas de vírus não possuem, regra geral, moléculas de dsRNA com massa molecular elevada (superior a $1,0 \times 10^6$ Da) nas suas células (Dodds *et al.*, 1984). A presença deste tipo de moléculas em tecidos infectados por vírus poderá ser devida a duas causas: uma delas está associada a vírus cujo genoma é constituído por cadeias simples de RNA, sendo as cadeias duplas correspondentes a formas replicativas (RF – Replicative Form) do genoma viral, que se formam na célula infectada. Estas moléculas (RF), formam-se numa fase intermédia do processo de replicação de vírus de genoma ssRNA e correspondem a um par de cadeias de RNA, sendo uma idêntica à do genoma inicial (cadeia de ‘sentido positivo’) e outra complementar desta (cadeia de ‘sentido negativo’). A cadeia de ‘sentido negativo’, simultaneamente ou após se desprender da cadeia de ‘sentido positivo’ vai, juntamente

com a RNA-polimerase, formar novas cadeias de 'sentido positivo'. Outra das causas do aparecimento de moléculas de dsRNA deve-se a que, durante o processo de replicação há a formação de outras moléculas, parcialmente de cadeia dupla e parcialmente de cadeia simples, de RNA, denominadas formas replicativas intermédias (RI). Contudo, a maioria das cadeias dsRNA formadas durante o processo de replicação viral, são do tipo RF (Jones, 1992, citado por Rei, 1995; Valverde *et al.*, 1990).

A metodologia utilizada para a detecção das cadeias dsRNA é constituída por um conjunto de etapas que têm como objectivo a separação e isolamento destas do restante material celular e viral. Primeiro, faz-se a maceração dos tecidos vegetais para a libertação do seu conteúdo celular; esta é efectuada em tampões de extracção, de modo a manter a estabilidade dos ácidos nucleicos. O tampão de extracção tem normalmente um pH elevado e um teor salino médio (0,1 M) a elevado (1,0 M), para minimizar a actividade das ribonucleases (RNases). Para promover a desnaturação das proteínas, utilizam-se normalmente detergentes aniónicos como o sulfato dodecil de sódio (SDS) (Dodds *et al.*, 1984).

A separação dos ácidos nucleicos, das proteínas e do restante conteúdo celular é feita utilizando soluções de fenol e de clorofórmio (Henriques e Morris, 1979). O fraccionamento das cadeias dsRNA dos restantes tipos de ácido nucleico, faz-se por cromatografia em colunas de celulose (Wathman CF11). Esta técnica baseia-se na diferente adsorção das cadeias simples e duplas de RNA e de DNA, na presença de diferentes concentrações de etanol. A utilização de tampões com concentrações de etanol superiores a 30% promove a adsorção da maioria dos ácidos nucleicos às partículas de celulose. Para concentrações de etanol da ordem dos 15-18%, as únicas moléculas a ficarem adsorvidas são as dsRNA. Para a sua remoção da coluna de celulose faz-se uma lavagem com tampão sem etanol (Dodds *et al.*, 1984). A eliminação de eventuais cadeias contaminantes de ssRNA e/ou de DNA faz-se por digestão com enzimas (RNases e DNases) (Saldarelli *et al.*, 1983).

A determinação dos massas moleculares de cada uma das bandas de dsRNA que aparecem no perfil electroforético pode contribuir para identificar o género de vírus que está presente nos tecidos infectados. O cálculo é efectuada por comparação da sua mobilidade com o de outras bandas de dsRNA de massa molecular conhecida.

Este método tem várias vantagens, como por exemplo a sua relativamente fácil execução, a rapidez na obtenção de resultados (após 48 horas da colheita do material no campo) e a possibilidade de ser aplicado a vários tipos de material vegetal. No entanto,

a vantagem principal tem a ver com a detecção de uma larga gama de infecções provocadas por vírus de RNA, quer sejam ou não mecanicamente transmissíveis e para os quais não hajam soros disponíveis (Rei, 1995; Watkins *et al.*, 1990). Como desvantagens, podemos referir a não detecção de vírus cujo genoma seja de DNA e o facto de se necessitar de uma quantidade bastante elevada de tecido vegetal (10 a 30 g) quando se utiliza material de oliveira proveniente do campo (Rei, 1995).

5. METODOLOGIAS PARA O MELHORAMENTO DE PLANTAS COM VISTA À PROTECÇÃO CONTRA VÍRUS

5.1. Métodos para a obtenção de plantas isentas de vírus

Desde há muito tempo que as técnicas de obtenção de plantas isentas de vírus são utilizadas de modo a colocar no campo plantas saudáveis. Essas plantas não ficam protegidas de novas infecções virais, pois o facto de serem instaladas no campo isentas de vírus não as torna imunes, sendo tão susceptíveis como as plantas que lhes deram origem (Augé e Boccon-Gibod, 1989). No entanto, o facto delas serem colocadas no campo isentas de vírus, pode melhorar o seu sucesso de implantação.

Um dos métodos que tem sido utilizado para eliminar vírus é a manipulação da temperatura, quer pela utilização das altas temperaturas, como mais actualmente também pelas baixas temperaturas (Matthews, 1991).

O tratamento utilizando as altas temperaturas, denominado termoterapia, baseia-se na exposição de tecidos vegetais a temperaturas que podem variar entre 35 e 40°C, por períodos de tempo que oscilam entre 1 e 12 meses (Horst, 1988). Existem vírus muito instáveis que, com apenas um tratamento de termoterapia se inactivam nos tecidos do hospedeiro, como por exemplo o vírus da tristeza dos citrinos ('citrus tristeza vírus'—CTV) (Augé e Boccon-Gibod, 1989). O material vegetal mais utilizado, para submeter a tratamentos de termoterapia, é normalmente de dois tipos: bolbos e estacas, pois geralmente podem ser sujeitos àquelas temperaturas sem que os seus tecidos sejam danificados ou de alguma forma afectados (Mathews, 1991). O sucesso do tratamento pelo calor está dependente sobretudo da capacidade ou não do vírus se multiplicar e mover dentro das plantas expostas às temperaturas referidas (Horst, 1988).

Os efeitos das baixas temperaturas na eliminação de vírus de tecidos vegetais infectados ainda não estão muito bem estudados. No entanto, existem já testes laboratoriais que indicam que alguns vírus perdem a estabilidade *in vitro* quando submetidos a temperaturas mais baixas do que as suas temperaturas normais de sobrevivência (Mathews, 1992).

A terapia química não constitui um tratamento eficaz para o controlo de doenças de plantas causadas por vírus. O uso de agentes químicos anti-virais, como por exemplo aribavirina, também chamada virazole, para isentar completamente uma planta infectada, é difícil, presumivelmente porque o metabolismo do vírus está estreitamente integrado com o da planta (Hansen e Lane, 1985). No entanto, o pré-tratamento de plantas de tabaco com virazole, retarda ou evita infecções sistémicas com 'tomato spotted wilt virus' (TSWV). Esta substância química é também introduzida nos meios de cultura de meristemas para obter plantas isentas de vírus (De Frazio *et al.*, 1980 citado por Mathews, 1992).

Além das terapias indicadas, é possível também fazer a regeneração de plantas isentas de vírus a partir de plantas infectadas, por meio da cultura de meristemas ou de protoplastos de plantas infectadas.

A técnica da cultura de meristemas surgiu pela primeira vez em 1952, quando a partir da cultura asséptica de ápices, se obtiveram plantas sãs a partir de indivíduos infectados com vírus (Saldaña, 1990). No entanto, as observações que conduziram à optimização desta técnica, começaram com os trabalhos de White, que observou que as extremidades de raízes de tomateiro viróticas, colocadas em cultura, originavam raízes sem vírus (Augé e Boccon-Gibod, 1989). O sucesso desta técnica deve-se ao facto de se ter comprovado que os tecidos meristemáticos de plantas viróticas estão normalmente isentos de vírus. Várias experiências mostraram que há uma concentração crescente de vírus das partes mais jovens para as partes mais adultas das plantas. Para além disso, outras pesquisas sugerem que o limite de multiplicação dos vírus se situa ao nível das zonas sub-meristemáticas, estando os meristemas isentos de vírus ou, se estes existem, estão numa concentração muito diminuta (Augé e Boccon-Gibod, 1989; Horst, 1988; Mathews, 1992). Esta técnica, quando associada com a termoterapia, permite a obtenção de melhores resultados, isto é, uma maior percentagem de sucesso na regeneração de plantas isentas de vírus (Martin, 1995).

A cultura de meristemas constitui uma importante alternativa para a multiplicação de plantas por via vegetativa, para além de permitir que as espécies de reprodução assexuada se possam multiplicar, isentas de vírus. Assim, podem-se obter plantas mais vigorosas e com uma grande estabilidade genética (Augé e Boccon-Gibod, 1989).

Apesar das grandes vantagens que advêm desta técnica, esta, como qualquer outro tipo de cultura de tecidos utilizada como recurso terapêutico em plantas, só se justifica quando a espécie é cultivável *in vitro*, quando se trata de germoplasma valioso e/ou quando a totalidade da população da espécie se encontra infectada (Saldaña, 1990).

A cultura de protoplastos, que são células vegetais sem parede celular, é um importante meio de se regenerarem plantas completas isentas ou até mesmo resistentes a vírus.

As células vegetais, devido á sua totipotência, têm a capacidade de desenvolver o seu potencial morfo genético, de modo a originarem plantas inteiras. Takebe, em 1971, foi o primeiro a conseguir a regeneração de plantas a partir de protoplastos, utilizando a *Nicotiana tabacum* (Vargas 1990). A partir de então, têm sido feitas várias adaptações desta técnica a numerosas espécies. Uma das que suscita mais interesse por parte dos fitomelhoradores actualmente, é a técnica para obtenção de plantas resistentes a vírus mediante a introdução de genes, quer pelo recurso a tecnologias do DNA recombinante, quer tirando partido de resistências naturais (Loebenstein e Gera, 1993).

A manipulação genética dos protoplastos veio permitir introduzir, nas células vegetais desprovidas de parede celular, alguns genes virais e sequências nucleotídicas para obter plantas resistentes (Hemenway *et al.*, 1990).

Os genes de plantas naturalmente resistentes também podem ser utilizados para obter outras plantas resistentes a vírus. A resistência que se desenvolve na planta após a inoculação, resistência activa, tem sido largamente estudada. O caso das lesões locais é o melhor exemplo da manifestação desta forma de resistência. Após a inoculação, o vírus invade e multiplica-se em várias células vizinhas, mas não se dissemina a outros tecidos, ficando restrito a uma pequena área (lesão local) (Loebenstein *et al.*, 1982 citados por Loebenstein e Gera, 1993). Até ao momento, várias hipóteses têm surgido para explicar este tipo de resistência, embora a mais aceite seja a de que a multiplicação localizada de vírus se deva a substâncias contidas na célula que inibem a sua multiplicação, estando esta inibição normalmente dependente de um gene simples

dominante. Utilizando estas células com este tipo de resistência activa, e através da cultura de protoplastos é possível obter plantas com um certo grau de resistência a vírus (Loebenstein e Gera, 1993).

5.2. Método directo para a protecção de plantas contra vírus - a protecção cruzada

O método da protecção cruzada pode utiliza-se como recurso, quando não é possível obter plantas isentas de vírus. Baseia-se na protecção de plantas dos efeitos dos ataques de estirpes virais severas, através da prévia inoculação de plantas sãs com estirpes virais suaves. Assim, evitam-se elevadas perdas de produção (Fulton, 1986; Mathews, 1992).

Para tentar explicar o mecanismo da protecção cruzada, têm surgido alguns modelos, mas provavelmente não há um mecanismo único. Gibbs (1969) citado por Abel *et al.* (1986), sugeriu que a replicação da estirpe suave esgota, na célula hospedeira, os componentes necessários para a replicação da estirpe severa. Outra hipótese proposta é a de a cápside proteica, produzida pela primeira infecção, encapsidar o ácido nucleico da estirpe severa (segunda inoculação), impedindo assim a sua replicação (Van Doting, 1988). Palukaitis e Zaitlin (1984) por outro lado, sugeriram que o RNA 'sense' (RNA do mesmo 'sentido' do que está encapsidado na partícula viral) ou 'antisense' da estirpe suave, se pode ligar com o RNA da estirpe severa, bloqueando assim a replicação deste (Abel *et al.*, 1986).

A protecção cruzada teve razoável sucesso na minimização dos graves prejuízos causados por doenças como a tristeza dos citrinos, causada pelo 'citrus tristeza *Closterovirus*' (CTV) no Brasil e a doença das manchas em anel da papaia causada pelo 'papaya ringspot *Potyvirus*' (PRV), nas Filipinas.

O CTV foi introduzido na América do Sul por material proveniente de África, em 1920. Esta doença exterminou praticamente a indústria dos citrinos em algumas áreas da Argentina, Brasil e Uruguai. A rápida disseminação do vírus, através da transmissão pelo afídeo *Toxoptera citricidus* Kirk. e por enxertia, tornou a doença num flagelo que alarmou os produtores a nível mundial (Costa e Muller, 1980). Grant e Costa (1951), descobriram que havia complexos virais com vários tipos de patogenezidade. Assim, encontraram no campo plantas infectadas com estirpes suaves, as quais não apresentavam sintomas de doença. A partir do estudo destas, obteve-se

uma estirpe viral protectora isolada em laboratório e utilizada para pré-imunizar plantas de citrinos. O controlo da tristeza dos citrinos por protecção cruzada funcionou muito bem no Brasil, onde o efeito do complexo viral presente na natureza e transmissível por afídeos, é muito severo (Fulton, 1986).

O vírus PRV é transmitido por afídeos e torna limitante a cultura da papaia em algumas áreas como o Hawaii, a Florida, as Caraíbas e certos países da América do Sul, África e a Austrália. Esta doença foi registada pela primeira vez nas Filipinas em 1975, onde em 4 anos reduziu em mais 50% a produção de papaia nos pomares comerciais. (Yeh *et al.*, 1988).

Depois do sucesso verificado com a aplicação da técnica da protecção cruzada no Brasil para minimizar os efeitos do vírus da tristeza, iniciou-se uma insistente procura de estirpes suaves de PRV, ao mesmo tempo que se tentavam algumas medidas de controlo, como por exemplo plantar papaia nas épocas do ano em que não houvessem afídeos alados, intercultivar com uma barreira de plantas milho, erradicar plantas infectadas das plantações, pulverizar as plantas com insecticidas sistémicos e proteger as jovens plantas com sacos de plástico. No entanto, nenhuma destas práticas se mostrou eficaz. Por outro lado, também não foi possível encontrar uma estirpe suave no material de campo (Yeh e Gonsalves, 1984) tentando-se então obter uma estirpe atenuada por mutagenese artificial, utilizando ácido nitroso para induzir mutantes a partir do PRV Ha (estirpe severa de PRV isolada no Hawaii) (Gonsalves e Ishii, 1980). Os mutantes atenuados obtidos, PRV Ha 5-1 e PRV Ha 6-1, foram posteriormente utilizados para inoculação de papaeiras em grande escala, depois de terem sido submetidos a condições de campo e terem provado ser bastante protectores contra estirpes severas de PRV (Yeh *et al.*, 1988) embora a protecção não tivesse sido muito duradoura, ao contrário da protecção obtida nos citrinos, com estirpes virais suaves obtidas de material de campo.

Um dos factores de maior importância a ter em conta antes de considerar a implementação do método de protecção cruzada, é o facto de estarmos a introduzir vírus em plantas de campo, com todas as consequências que daí poderão advir. Assim, a estirpe protectora de vírus poderá infectar outros hospedeiros, nos quais pode causar danos. Para além disso, poderá induzir susceptibilidade da planta inoculada a outros vírus através de interacções sinérgicas, aumentar a susceptibilidade a outros patogenes

não virais, evoluir para uma estirpe mais severa, falhar eventualmente na protecção da planta contra estirpes severas encontradas no campo e perder-se por termoterapia devido à acção da temperatura ambiente, principalmente em regiões quentes, deixando assim de proteger a planta. Nas plantas lenhosas, a protecção cruzada pode ainda ter o inconveniente de não se distribuir uniformemente nestes hospedeiros, deixando partes da planta não protegidas e portanto sujeitas à infecção por estirpes severas, com o consequente desenvolvimento de sintomas e perdas de produção (Fulton, 1986; Hemenway *et al.*, 1990).

5.3. Métodos directos para a obtenção de plantas resistentes a vírus

A obtenção de plantas resistentes a patógenos constitui um dos principais objectivos dos melhoradores de plantas. Quando os genes de resistência podem ser introduzidos em cultivares de interesse agronómico, o melhoramento para resistência relativamente a um determinado vírus proporciona uma das melhores soluções para o problema das doenças causadas por estes (Matthews, 1992).

Existem actualmente vários métodos que permitem obter plantas resistentes a vírus, nomeadamente a introdução de genes por via clássica, isto é, por cruzamento com espécies naturalmente resistentes e a introdução de genes por engenharia genética.

A introdução de genes de plantas cultivadas ou não, por via clássica, ou seja, o cruzamento entre plantas, é um método que pode conferir resistência contra vírus causadores de graves doenças. Segundo Qualset (1987), um exemplo de grande interesse e que mostra a importância do melhoramento clássico é o da aveia, relativamente à doença do amarelo ananicante da cevada, causada pelo vírus 'barley yellow dwarf *Luteovirus*' (BYDV). Os melhoradores desta cultura, há muito que começaram a seleccionar contra a «doença das folhas vermelhas», muitos anos antes desta ter sido reconhecida como sendo devida a um vírus (Burnett, 1990).

Apesar da grande importância do melhoramento clássico, este nem sempre pode responder à exigente e constante procura de plantas resistentes, porque, por vezes, é difícil e moroso encontrar plantas cujo genótipo confira resistência a determinado vírus ou encontrar germoplasma geneticamente resistente compatível com o da planta que se quer melhorar (Hemenway *et al.*, 1990).

A introdução de genes de plantas naturalmente resistentes por engenharia genética constitui uma via possível de transferência de genes de resistência de plantas ‘selvagens’ ou de outras cultivadas, para plantas cultivadas susceptíveis e agronomicamente importantes (Van Doting, 1988). Um dos genes de resistência ao BYDV foi descoberto por Schaller *et al.* (1963) citado por (Burnett, 1990), em cevadas da Etiópia. Esta resistência é conferida por um gene localizado no cromossoma 3 da cevada e designa-se por Yd2. Em geral, a resistência conferida por este gene é fácil de transferir e bastante estável, ressalvando-se o facto do gene Yd2 apresentar algumas limitações aquando da sua transferência para outras variedades de cevada, pois o seu efeito é variável com os diferentes genótipos nos quais é introduzido e também com o ambiente (Burnett, 1990).

Apesar da enorme vantagem que representa a introdução de genes de resistência a vírus em plantas, nem sempre é possível obter esses genes de resistência (Van Doting, 1988). Para além disso, um genótipo pode ser resistente para um vírus particular, mas pode aparecer um mutante desse vírus que venha superar essa resistência (Matthews, 1991).

A introdução de genes provenientes do genoma viral numa planta (planta transgénica) pode torná-la resistente à infecção por esse vírus.

Esta protecção geneticamente ‘construída’, foi inicialmente demonstrada em plantas de tomateiro, nas quais foi introduzido o gene da cápside proteica (coat protein) do vírus do mosaico do tomate (‘tomato mosaic virus’ – ToMV). A aplicabilidade desta técnica tem sido adaptada para muitas outras plantas (Matthews, 1991). O mecanismo que está envolvido na eficiência da mediação do gene da cápside proteica, não está bem definido. Apesar de haver uma correlação entre os níveis de expressão da cápside proteica na célula da planta e o nível da protecção, a inibição do vírus pode ser devida, quer à cápside proteica *per se*, quer ao correspondente RNA mensageiro (mRNA). Este último pode inibir a infecção viral por ligação com a cadeia ‘antisense’ durante a replicação. Por outro lado, aquele mRNA pode também ligar-se à replicase do vírus ou a componentes necessários para a sua replicação, impedindo esta (Hemenway *et al.*, 1990). Para além destas hipóteses, surge ainda outra que refere a possibilidade das proteínas da cápside proteica, expressas nas células, inibirem a desencapsidação da partícula viral infectante. Assim, o ácido nucleico fica impedido de se libertar, não

havendo lugar à conseqüente ligação aos ribossomas celulares nem à replicação viral (Beachy, 1993; Hemenway *et al.*, 1990).

A introdução de genes que expressam anticorpos específicos de vírus ('plantibodies'), foi pela primeira vez referida em 1989 por Hiatt *et al.* (citados por Martin, 1995).

Uma γ -globulina (anticorpo) é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, duas 'leves' (cadeias 'light') e duas 'pesadas' (cadeias 'heavy'). Cada um dos tipos de cadeias polipeptídicas é expresso em plantas diferentes onde se introduz o gene para a cadeia 'leve' e para a cadeia 'pesada', sendo depois estas plantas cruzadas entre si, de modo a obter uma planta que expresse ambos os tipos de cadeias polipeptídicas, isto é, uma γ -globulina completa. Assim, as plantas transgênicas produzem anticorpos específicos para vírus, tornando-se capazes de bloquear as partículas virais que venham a ser inoculadas, por ligação das γ -globulinas à cápside proteica daquelas, impedindo que se dissociem e libertem o genoma viral (Martin, 1995).

A introdução de seqüências nucleotídicas derivadas do genoma viral, como a cadeia RNA 'antisense' ou micRNA (messenger interfering complementary RNA), no genoma das plantas, confere-lhes resistência ao vírus de genoma complementar àquela cadeia. Esta resistência é baseada no bloqueamento da informação do fluxo de RNA, pela cadeia complementar para a totalidade ou parte da seqüência do mRNA alvo (Van Der Krol *et al.*, 1988), uma vez que se forma um duplete entre o mRNA e o RNA viral 'antisense' expresso na célula. Em conseqüência disto, o duplete ou é rapidamente degradado ou o mRNA viral fica boqueado, impedindo assim a sua tradução e a continuação do processo infeccioso (Matthews, 1992).

Outras seqüências nucleotídicas, como seja o RNA satélite de alguns vírus, quando introduzido em plantas pode conferir resistência a vírus dos quais o RNA é satélite. Os satélites de vírus de plantas são entidades que replicam somente com a ajuda de um vírus específico, utilizando a replicase desse vírus para a sua replicação, mas não codificam para qualquer proteína. Aqueles RNA satélite são encapsidados pela cápside proteica do vírus, apesar de não terem qualquer homologia com o genoma viral (Hemenway *et al.*, 1990).

Os satélites têm vários efeitos nas plantas infectadas pelos vírus de que dependem. Tal parece ter particular interesse para os fitopatologistas, uma vez que é atribuído a alguns destes satélites o fenómeno da supressão ou atenuação dos sintomas causados pelo vírus (Tien *et al.*, 1987; Van Doting, 1988). O mecanismo pelo qual o RNA satélite reduz a replicação do vírus de que dependem e/ou a severidade dos seus sintomas, ainda não está esclarecida. Teorias recentes referem a competição pela maquinaria celular necessária para a replicação entre o vírus e o seu satélite como uma das principais causas (Hemenway *et al.*, 1990).

O recurso à utilização de RNA satélite tem sido usada para reduzir a severidade das doenças provocadas pelo vírus do mosaico das cucurbitáceas ('cucumber mosaic virus' - CMV). Este vírus tem uma grande importância pela gravidade das perdas que provoca e pelo grande leque de hospedeiros que abrange: cerca de 775 espécies de plantas pertencentes a 365 géneros dentro de 85 famílias, sendo uma grande parte delas de interesse agronómico (Tien *et al.*, 1987). A utilização de parte do RNA genómico do CMV combinado com o RNA satélite, para o controlo de doenças induzidas por este vírus, origina vários níveis de protecção. Os efeitos protectores estão dependentes de factores tais como o momento da inoculação pelo vírus, a estirpe e virulência do CMV no campo e a variedade da planta (Hemenway *et al.*, 1990; Tien *et al.*, 1987).

Este método de controlo de doenças virais utilizando RNA satélites, apresenta no entanto uma limitação, que se prende com a especificidade das interações dos satélites com os seus vírus auxiliares. Outro factor limitante prende-se com o facto de existirem um número muito limitado de vírus que têm satélite (Matthews, 1991).

Um outro método que se pode considerar indirecto na protecção de plantas contra vírus e que pode vir a ter alguma importância no combate a insectos vectores de vírus, baseia-se na introdução, nas plantas de genes responsáveis pela produção de toxinas contra insectos vectores de vírus (Matthews, 1991).

Vaeck *et al.* (1987) produziram plantas transgénicas capazes de expressar o gene de uma toxina eficaz contra insectos, proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis*. Diferentes estirpes desta bactéria produzem polipeptídeos tóxicos com especificidade para diferente grupos de insectos. No entanto, segundo Matthews (1991), de entre as várias ordens de insectos, apenas os coleópteros parecem ser afectados por esta toxina e, entre estes, não há muitos exemplos de vectores de vírus.

CAPITULO II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ORIGEM DOS VÍRUS

Os dois isolados virais estudados neste trabalho foram obtidos de azeitonas das cultivares Galega Vulgar e Verdeal Alentejana. Estas oliveiras, situadas na Herdade da Abóbada pertencente à Direcção Regional de Agricultura do Alentejo, localizada no concelho de Serpa, fazem parte de um conjunto de trinta árvores de três cultivares diferentes (10 árvores de Galega Vulgar, 10 árvores de Verdeal Alentejana e 10 árvores de Cordovil de Serpa) que foram marcadas no campo para estudos de Selecção Clonal e Sanitária, no âmbito do projecto PAMAF 2064 (“Selecção de clones de cultivares de *Olea europaea* L. utilizados na produção de azeite de Moura para renovação de olivais de Serpa e Moura”).

Utilizou-se também, para efeitos de comparação de características, um isolado de OLV-1 gentilmente cedido pelo Prof. Giovanni P. Martelli (Universidade de Bari, Itália).

2. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA VIRAL

2.1. Inoculação e gama de hospedeiros

Os sintomas observados em *Nicotiana benthamiana* Domin, após inoculação com extractos de frutos da cultivar Galega Vulgar (Gl 1) e com extractos de frutos da cultivar Verdeal Alentejana (Vr 10), revelaram-se suficientemente distintos para levar à suspeita de se tratarem de agentes virais diferentes. Assim, cada uma das plantas com estas sintomatologias foram reinoculadas em plantas daquela espécie para obter material vegetal em quantidade suficiente que permitisse a sua posterior caracterização.

A partir de folhas de *N. benthamiana* esmagadas na presença de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, e do abrasivo carborundo, foram feitas inoculações mecânicas em plantas herbáceas indicadoras.

As plantas utilizadas para este estudo foram as seguintes: *Gomphrena globosa* L.; *Chenopodium amaranticolor* Coste e Reyn; *C. ambrosoides* L.; *C. botrys* L.; *C. capitatum*

(L.) Aschers; *C. giganteum* L.; *C. glaucum* L.; *C. hybridum* L.; *C. murale* L.; *C. polyspermum* L.; *C. quinoa* Willd; *Cucumis sativus* L.; *Datura stramonium* L.; *Nicotiana benthamiana* Domin; *N. clevelandii* Gray; *N. debneyi* Domin; *N. glutinosa* L.; *N. langsdorffii* J. A. Weinm; *N. longiflora* Cav.; *N. paniculata* L.; *N. rustica* L.; *N. sylvestris* Sepg e Comes; *N. tabacum* L. cv. Hawana; *N. tabacum* L. cv. Macrophylla; *N. tabacum* L. cv. Samsun; *N. tabacum* L. cv. White Burley; e *N. tabacum* L. cv. Xanthi.

3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.1. Purificação

A purificação das partículas virais dos isolados Gl 1 e Vr 10 e do vírus OLV-1 foi feita a partir de *N. benthamiana* com sintomas locais e sistêmicos, 15 a 30 dias após a inoculação. O método seguido, no caso dos três vírus, foi o de Merciega *et al.* (1996) modificado.

O material vegetal infectado foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, na proporção de 1:5 (peso/volume) contendo 1% de ascorbato de sódio. A homogeneização foi feita num homogeneizador durante aproximadamente 2 min. O homogeneizado foi filtrado por três camadas de gaze humedecida e centrifugado a cerca de 7000 g durante 15 min. Ao sobrenadante juntou-se 10% de uma mistura de clorofórmio-butanol (1:1), com agitação de cerca de 30 min, no frio. Seguiu-se uma nova centrifugação a 7500 g durante 10 min e, ao sobrenadante obtido, juntou-se 10% de polietileno glicol (PEG 6000) e 1% de cloreto de sódio (p/v), seguindo-se uma agitação no frio até à ressuspensão completa. Após o repouso durante 4 h a 4°C, foi centrifugado a 12000 g durante 30 min para recolha do sedimento contendo o vírus (“pellet”), que se ressuspendeu em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0, a 4°C durante 18 h. A ressuspensão foi centrifugada a 12000 g durante 20 min para separar o vírus do PEG, recolhendo-se então o sobrenadante que se ultracentrifugou a 186000 g durante 2 h. A “pellet” viral obtida foi ressuspensa em 300 µl de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0 (por 50 gr de folhas infectadas usadas inicialmente). Após cerca de 18 h no frio, fez-se uma baixa centrifugação para eliminar os agregados.

Para uma melhor purificação das partículas virais, estas foram sujeitas a centrifugação em gradientes de sacarose. Estes gradientes foram preparados em tubos de polietileno do rotor basculante AH-650 Sorval com 1,2 cm x 5,0 cm. Nestes foram colocadas camadas sucessivas de soluções de sacarose (feita em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0): 1,2 ml de solução 40%, 1 ml de solução 30%, 1 ml de solução 20% e 1 ml de solução 10%. Os gradientes foram colocados no frigorífico durante 18 h, antes de serem utilizados na ultracentrifugação, de modo a formarem um gradiente contínuo. Cerca de 300 µl de preparação viral foram colocados no topo desses gradientes e submetidos a uma ultracentrifugação a 150000 g durante 1 h e 15 min.

A banda correspondente à zona de sedimentação das partículas virais foi visualizada através de um foco luminoso incidente sobre o topo do tubo e retirada com uma seringa esterilizada, através de perfuração lateral do tubo.

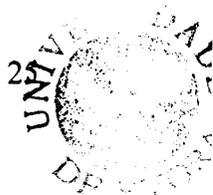
Para obtermos uma preparação viral purificada e concentrada num volume menor, centrifugou-se novamente a suspensão contendo o vírus, durante 4 h a 186000 g. A “pellet” obtida foi ressuspensa em 200 µl de tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0, como anteriormente.

3.2. Observação das partículas virais

A morfologia das partículas virais dos dois isolados foi observada ao microscópio electrónico. Sobre a grelha foi depositada uma gota de suspensão viral purificada e retirou-se o excesso de suspensão, tocando com papel de filtro na borda da grelha. A seguir, depositou-se uma gota de solução aquosa de acetato de uranilo a 2%, tendo-se absorvido o excesso desta solução também com papel de filtro. As grelhas com as preparações assim contrastadas foram observadas ao microscópio electrónico de transmissão, modelo JEOL 200.

3.3. Peptídeos da cápside viral

A caracterização da proteína da cápside dos isolados virais foi feita por electroforese em gel descontínuo de poliacrilamida em presença de SDS (técnica de SDS-PAGE), com o gel de ‘concentração’ a 4% e o gel de ‘separação’ a 12,5%, de acordo com o método de Laemmli (1970) modificado.



O gel de poliacrilamida na concentração de 12,5%, foi obtido do seguinte modo: para um volume de 10 ml de gel juntou-se num copo 4,2 ml de 30% de poliacrilamida, 2,5 ml de tampão Tris 1,5 M, pH 8,8 e 2,3 ml de H₂O destilada. Seguidamente, introduziu-se o copo num excicador submetido a vácuo, durante 10 min, para retirar eventuais bolhas de ar da solução que poderiam interferir na homogeneidade da porosidade do gel. Depois, adicionaram-se 0,1 ml de SDS 10% (p/v), 0,1 ml de persulfato de amónio 10% (p/v) e 0,1% de TEMED, agitando levemente o copo para homogeneizar bem, sem introduzir ar. De imediato colocou-se o gel nas placas de vidro montadas e no topo, colocou-se uma fina camada de butanol saturado com água. Depois do gel solidificar, passados cerca de 15 min, retirou-se o butanol, lavou-se o topo do gel repetidamente com água desionizada e secou-se a parte de cima do gel com papel de filtro, para se poder colocar o gel 'concentrador' (4%). Este foi preparado num copo, onde se juntaram 1,3 ml de 30% de poliacrilamida, 2,5 ml de tampão Tris 0,5 M, pH 6,8 e 6,0 ml de H₂O destilada. Esta mistura foi por sua vez também colocada sob vácuo durante 10 minutos, após o que se adicionaram 0,1 ml de SDS 10% (p/v), 0,1 ml de persulfato de amónio 10% (p/v) e 0,1% de TEMED. Esta solução foi colocada cuidadosamente no topo do gel 'separador' com a ajuda de uma pipeta Pasteur, até cerca de 0,3 cm do topo das placas de vidro. De seguida colocou-se o 'pente', para a formação das cavidades onde iriam ser colocadas as amostras. O pente apenas foi retirado quando o gel estava completamente polimerizado, o que se verificou após um período de tempo de 10 min.

As placas de vidro com o gel descontínuo de poliacrilamida foram colocadas no aparelho de electroforese vertical Mini-V 8.10 de marca GibcoBRL, e o reservatório cheio com o tampão Tris-glicina 1 X (6,0 gr de Tris base; 28,8 gr de glicina; 5,0 ml de SDS 20%; H₂O destilada para perfazer 1l).

As amostras das preparações virais e as amostras padrão de marcadores de peso molecular conhecido, contidas em tubos 'eppendorf', foram colocadas em banho-maria a 100°C durante cerca de 3 min, em presença de tampão das 'amostras' 4 X (0,5 M Tris, pH 6,8, 20% 2-Mercaptoetanol, 1% SDS, 40% Glicerol e 1% Azul de bromofenol), na proporção de 1:3. Após este tratamento, as amostras foram imediatamente arrefecidas em gelo para evitar a reassociação dos peptídeos. Cada uma das amostras, num volume de 12 µl, foi colocada num 'poço' do gel e submetida a electroforese.

Após a introdução das amostras nos respectivos poços, ligou-se o aparelho a uma fonte de alimentação GibcoBRL Life Technologies modelo PS 3002. A electroforese

Caracterização de isolamentos virais de *Olea europaea* L. 26

decorreu à voltagem constante de 120 V, durante cerca de uma hora, tempo ao fim do qual a 'frente' corada de azul se encontrava a 0,5 cm do limite inferior do gel e se desligou a corrente.

Retirou-se o gel das placas de vidro e efectuou-se um corte na extremidade inferior esquerda, para usar como referência do sentido de colocação das amostras. Colocado numa tina com solução 'corante' (40,0% de metanol, 0,025% de coomassie blue R-250 e 7,0% de ácido acético), aí permaneceu durante 18 h. Para descorar o gel foi utilizada a solução 'descorante' (5,0% de metanol e 7,0% de ácido acético) repetidas vezes até o gel se encontrar praticamente transparente, à excepção das bandas correspondentes aos peptídeos.

Os massas moleculares dos peptídeos foram calculados por comparação com massas moleculares de proteínas padrão (Kit SIGMA MW-SDS-70) e que foram:

- . Albumina de bovino 66 KDa
- . Albumina de ovo 45 KDa
- . Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenase 36 KDa
- . Anidrase carbónica 29 KDa
- . Tripsinogénio 24 KDa
- . Inibidor da tripsina 20,1 KDa
- . α -lactoalbumina 14,2 KDa

No gel, foram medidas as distâncias de migração de cada banda corada correspondente a cada uma destas proteínas. Com base nas distâncias de migração e no logaritmo das respectivas massas moleculares traçou-se uma recta que permitiu, com base nas distâncias de migração das amostras desconhecidas (virais) estimar a massa molecular destas.

3.4. Isolamento dos ácidos nucleicos virais

A extracção dos ácidos nucleicos virais foi feita sempre em condições de esterilidade de tampões e recipientes, seguindo dois métodos diferentes, um utilizando fenol e SDS segundo o protocolo de Dinner e Scheneider (1968), e outro utilizando o perclorato de sódio segundo o protocolo de Wilcockson e Hull (1974).

No primeiro método, a preparação viral purificada (50 μ l) foi adicionada a 350 μ l de tampão TE (1,0 mM de Tris, pH 7,5 e 0,1 mM de EDTA) ao que se juntou 20 μ l de SDS

20% agitando-se durante cerca de 15 min á temperatura ambiente. Ao volume anterior adicionou-se idêntico volume de fenol saturado em H₂O/clorofórmio (1:1), agitou-se manualmente durante 1 min, e em Vortex mais 1 min. A solução foi centrifugada durante 10 min a 7500 g. Depois da centrifugação eram visíveis 3 fases diferentes: a da base, fase fenólica, a do meio, uma interfase branca-leitosa onde estavam acumuladas as proteínas desnaturadas e a fase aquosa do topo contendo os ácidos nucleicos. Esta retirou-se com uma micropipeta para tubos ‘eppendorf’, tendo o seu volume sido medido. A este adicionou-se um volume idêntico da mistura de fenol/clorofórmio e repetiu-se o processo referido acima. O volume final foi retirado e lavado duas vezes com 1 volume de clorofórmio, para remover o fenol que ainda pudesse existir na solução, e centrifugado a 7500 g durante 10 min. Por fim retirou-se a fase aquosa, que contém os ácidos nucleicos, e adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto frio e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, para precipitar os ácidos nucleicos, durante uma noite a –20°C. Seguidamente fez-se um centrifugação a 12000 g, durante 30 min e a ‘pellet’ resultante desta centrifugação foi lavada com etanol a 70% por centrifugação a 12000 g durante 5 min. A pellet foi seca sobre papel absorvente e ressuspensa em 20 µl de tampão TE.

No segundo método seguiu-se o protocolo de Wilcockson e Hull (1974). Utilizaram-se 400 µl de suspensão viral purificada, num tubo, aos quais se juntou 100 µl de SDS 20%. Após ter incubado em banho-maria a 55°C durante 3 min, adicionaram-se 1500 µl de uma solução 100% de perclorato de sódio. Esta mistura foi agitada vigorosamente no Vortex durante 1 min e centrifugada a 5000 g durante 10 min. No tubo formaram-se duas fases: a superior, onde se encontram as proteínas desnaturadas, e a fase inferior, que contém os ácidos nucleicos. Esta ultima foi retirada perfurando o tubo pela base com uma agulha de seringa esterilizada e os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando 5 ml de etanol absoluto a –20°C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, durante toda a noite à temperatura de –20°C. No dia seguinte o precipitado de ácidos nucleicos foi recolhido por uma centrifugação a 12000 g durante 30 min e a ‘pellet’ foi ressuspensa em 50 µl de tampão TE.

A preparação das amostras para electroforese foi feita juntando 8µl da suspensão de ácidos nucleicos virais, 1 µl de solução 10% de azul de bromofenol, 1 µl de solução 10% de orange G, 2 µl de glicerol e 3 µl de tampão TE. Após aquecimento a 65°C durante 3 min, as amostras foram colocadas no gel para serem sujeitas a electroforese.

A análise dos ácidos nucleicos foi feita por electroforese num gel de agarose a 1%. Este minigel foi obtido dissolvendo por aquecimento 0,4 gr de agarose (Sigma, low EEO) em 40 ml de tampão TBE (89,0 mM de Tris, pH 8,3, 89,0 mM de ácido bórico e 2,5 mM de EDTA). Depois, deixou-se arrefecer um pouco e colocou-se no molde do aparelho de electroforese horizontal (Hoefer, modelo HE 33), assim como o 'pente' para fazer os poços.

Quando o gel solidificou foi colocado, juntamente com o molde, no aparelho de electroforese, submerso em tampão TBE. Após a colocação das amostras nos 'poços', o aparelho foi ligado á fonte de alimentação (LKB-Bromma, modelo 2301 Macrodrive 1) e esta decorreu a 75 V, durante cerca de duas horas. Ao fim deste tempo, a frente corada encontrava-se a cerca de 0,5 cm do limite inferior do gel.

No final da electroforese, removeu-se o gel do molde para se proceder à sua coloração. Esta foi feita em 100 ml de água esterilizada com 30 µl brometo de etídio de uma solução stock a 10 mg/ml, durante 5 min e à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi descorado por substituição da solução corante por três lavagens com água esterilizada, cada uma com duração de 5 min.

Para observação das bandas dos ácidos nucleicos no gel, este foi colocado num transiluminador (Pharmacia, modelo LKB-Macrodrive), de radiação ultravioleta, a qual permite a visualização das bandas. Estas foram fotografadas com uma máquina Polaroid (modelo DS-34) equipada com películas fotográficas Polaroid (tipo 667). O tempo da exposição fotográfica foi de 11 segundos, com uma abertura de diafragma (f) de 1.

O número de nucleótidos e os respectivos pesos moleculares dos ácidos nucleicos, foram calculados, tendo como referência os nove RNAs marcadores (Promega G319 Marker) que se colocaram no gel e se submeteram a electroforese, a par das amostras virais. Os números de nucleótidos conhecidos destes marcadores eram os seguintes: 6583 Kb, 4981 Kb, 3638 Kb, 2604 Kb, 1908 Kb, 1383 Kb, 955 Kb, 623 Kb e 281 Kb. Mediram-se as distâncias de migração de cada um destes marcadores no gel, relacionando-as com os respectivos números de nucleótidos dos marcadores conhecidos, o que permitiu determinar o número aproximado de nucleótidos das moléculas de ácidos nucleicos desconhecidos, referente às bandas visualizadas no gel.

3.4.1. Tratamento do ácido nucleico viral com Ribonuclease A

O tratamento enzimático do ácido nucleico viral com RNase pancreática tem por objectivo determinar a sua natureza, isto é, se as bandas visíveis no gel são ou não de RNA. Este tratamento foi feito às amostras directamente no gel, depois da electroforese, tendo para isso sido feita a duplicação das amostras no gel. Após a electroforese, o gel foi cortado ao meio, uma parte foi corada com brometo de etídio e a outra metade idêntica foi imersa numa solução com RNase na concentração de 50 µl/ml em água esterilizada, durante 2 h a, 30°C. A enzima RNase foi adquirida à marca Sigma e a sua solução stock era de 10 µg/µl.

Após o tratamento enzimático, o gel foi corado com brometo de etídio e descorado como referido anteriormente.

3.4.2. Infecciosidade do RNA viral

A infecciosidade do RNA isolado das partículas virais e sujeita a electroforese foi paralelamente testada por inoculação em plantas de *N. benthamiana*. Da amostra utilizada para electroforese retiraram-se 10 µl que se diluíram em 200 µl de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0, aos quais se juntou um pouco de abrasivo carborundo. As plantas foram inoculadas e posteriormente observadas durante 4 semanas.

3.5. Isolamento dos ácidos ribonucleicos de cadeia dupla

O método utilizado para a extracção dos ácidos ribonucleicos de cadeia dupla (dsRNA) foi o referido por Morris e Dodds (1979) com algumas modificações.

A 20 gr de tecido vegetal infectado juntaram-se, 45 ml de tampão STE (0,2 M de cloreto de sódio, 0,1 M Tris, pH 7,5 e 1,0 mM de EDTA), 25 ml de clorofórmio, 25 ml de fenol saturado com TE e 17 ml de SDS 10%. A amostra foi esmagada num almofariz de porcelana e agitada durante cerca de 1 h. O homogenado foi centrifugado a 7500 g durante 20 min. Retirou-se a fase aquosa contendo os ácidos nucleicos totais, à qual se juntou 16% de etanol e misturou-se com cuidado. Após a agitação, juntou-se celulose CF 11 (Whatman) na proporção de 1 gr de celulose por 10 gr de tecido vegetal, e voltou-se a agitar durante 1 a 2 h à temperatura ambiente.

Para a Cromatografia em coluna de celulose, montou-se uma coluna (seringa de plástico) de 20 ml, na extremidade da qual se adaptou um pequeno tubo de borracha com uma pinça a funcionar como torneira. No fundo do interior da seringa colocou-se uma pequena quantidade de lã de vidro e por cima verteu-se cuidadosamente a suspensão de celulose e de ácidos nucleicos. A coluna de celulose foi lavada com 10 volumes de tampão STE-16% de etanol, que permitiu o arrastamento das cadeias de DNA e das cadeias simples de RNA (ssRNA). A eluição da coluna de celulose foi efectuada à temperatura ambiente, para evitar que algumas cadeias de ssRNA celulares pudessem ficar adsorvidas à celulose (Dodds *et al.*, 1984).

Após a lavagem, deitaram-se cerca de 2 ml de tampão STE para a remoção do etanol remanescente na celulose. A eluição da fracção contendo dsRNA foi feita com 4 volumes de tampão STE e o 'eluente' recolhido para um tubo ao qual se adicionou 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, para precipitar os dsRNA a -20°C , durante uma noite. O precipitado foi recolhido por centrifugação a 8000 g durante 20 min e a 'pellet' foi ressuspensa em 50 μl de tampão TE, que depois foi novamente centrifugada a 6500 g durante 3 min, para eliminar os vestígios de celulose. O sobrenadante foi recuperado e a este juntaram-se novamente, 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5, após o que ficou a precipitar a -20°C durante 18 h. No dia seguinte fez-se uma nova centrifugação a 12000 g durante 20 min, para que os dsRNA precipitassem no fundo do tubo. O sobrenadante foi desprezado e a 'pellet', depois de escorrer o tubo sobre papel de filtro, foi ressuspensa em 98 μl de água destilada esterilizada.

3.5.1. Tratamento enzimático das duplas cadeias de RNA

Para a realização do tratamento enzimático das dsRNA com DNase, RNase e proteinase K, seguiu-se o protocolo de Saldarelli *et al.* (1994) com algumas modificações.

A 98 μl de dsRNA juntou-se 1 μl de cloreto de magnésio 1 M e 1,7 μl de desoxirribonuclease (DNase, na concentração de 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), incubou-se a 37°C durante 30 min e centrifugou-se a 7500 g durante 20 min. Ao sobrenadante juntaram-se 15 μl de tampão SSC 20 X (3 M cloreto de sódio e 0,3 M de citrato de sódio, pH 7,2), 32 μl de água destilada esterilizada e 1 μl de Ribonuclease A (RNase, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), foi a incubar a 37°C durante 30 min e fez-se uma centrifugação a 7500 g durante 20 min. O

sobrenadante foi recolhido, e adicionou-se 1 µl de proteinase K (na concentração de 20 mg/ml) e foi a incubar a 37°C durante 30 min.

Os dsRNA foram extraídos desta mistura tratando-a por duas vezes com um volume de fenol/clorofórmio (1:1), com agitação manual durante 1 min e no Vortex durante mais 1 min, terminando com uma centrifugação durante 10 min a 7500 g. A fase aquosa foi retirada e lavada duas vezes com 1 volume de clorofórmio, para arrastar o fenol que ainda pudesse existir na suspensão e centrifugou-se a 7500 g durante 10 min. As moléculas de dsRNA ficaram a precipitar durante 18 h a -20°C, em presença de 2,5 volumes de etanol absoluto a -20°C e de 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,5. No dia seguinte fez-se uma centrifugação a 12000 g durante 40 min e a pellet final foi ressuspensa em 30 µl de tampão TE.

3.5.2. Preparação do gel e electroforese

Para a análise dos ácidos nucleicos de cadeia dupla foram utilizados dois tipos de gel: o gel de poliacrilamida na concentração de 6% e o gel de agarose 1%, este ultimo preparado como referido anteriormente, para os ácidos nucleicos virais. Para o gel de poliacrilamida 6%, utilizaram-se 8,0 ml de uma solução 30% de poliacrilamida, 31,36 ml de tampão TBE, 10% de persulfato de amónio e 1% de TEMED. Agitou-se ligeiramente e introduziu-se com cuidado no molde das placas de vidro colocando-se por fim o 'pente' para fazer os 'poços' onde foram colocadas as amostras. O gel estava solidificado ao fim de 15 min. As placas de vidro com o gel de poliacrilamida foram colocadas no aparelho de electroforese vertical Mini-V 8.10 (GibcoBRL).

Às amostras dos ácidos nucleicos de cadeia dupla (8µl) adicionaram-se 4 µl de tampão da amostra, EG (ao tampão da electroforese TBE, junta-se 20% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol). O aparelho de electroforese foi ligado á fonte de alimentação e esta decorreu a 50 V, durante cerca de 2 h, tempo ao fim do qual a frente corada de azul se encontrava a 0,5 cm do limite inferior do gel.

Quando a electroforese terminou, removeu-se o gel das placas para se proceder à sua coloração e observação dos resultados, o que foi feito seguindo o mesmo procedimento referido para os ácidos nucleicos virais.

As massas moleculares das duplas cadeias de RNA foram calculados tendo como referência as cadeias duplas de RNA com massa molecular conhecida do OLV-1 (estirpe

italiana) e que são: $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da e $0,94 \times 10^6$ Da. No gel, foram medidas as distâncias de migração dessas cadeias e com base nas distâncias de migração e no logaritmo da sua massa molecular, foi traçada uma recta que permitiu saber qual a massa aproximada das dsRNA das amostras.

4. SOROLOGIA

4.1. Técnica da dupla difusão em agar

Para este teste foi seguido o protocolo referido por Ball (1990) e para o qual foram utilizadas placas de Petri esterilizadas descartáveis com 10 cm de diâmetro, contendo 15 ml de uma mistura de 1% de Bacto agar e 1% de azida de sódio, em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,0. Após a solidificação do gel, foram feitos vários alvéolos com 0,3 cm de diâmetro, sendo um central e os outros seis colocados à volta deste a uma distância de 5 cm.

No alvéolo central colocou-se o antisoro viral específico, anti-OLV-1 num caso e anti-OLRV noutra, obtidos da Universidade de Bari, Itália, por gentileza do Prof. G. P. Martelli, e cujos títulos eram de 1/256 e 1/512 respectivamente. Nos alvéolos da periferia foram colocados 100 µl das suspensões virais purificadas dos isolados Gl 1, Vr 10, OLV-1 e extractos de plantas infectadas. As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente durante alguns dias, sendo observadas regularmente para a detecção de bandas de precipitação.

CAPITULO III. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS ISOLADOS VIRAIS

1.1. Sintomatologia e gama de hospedeiros

Das inoculações feitas inicialmente com extractos de azeitonas provenientes da árvore Galega 1 do campo, apenas a espécie *N. benthamiana* apresentou sintomatologia demonstrativa da presença de vírus. Quando a inoculação era feita em plantas muito jovens (4 a 6 folhas) observava-se uma rápida e extensa murchidão e necrose, seguida da morte da planta 2 a 3 dias após a inoculação. Quando se reinoculavam estes tecidos mortos em novas plantas de *N. benthamiana* mais adultas, as plantas reagiam com a formação de necroses locais e sistémicas muito intensas (Fig. 1). Sintomas semelhantes observaram-se nesta espécie quando inoculada com uma suspensão viral purificada do isolado viral G1 1 e com o RNA purificado da suspensão viral (Fig. 2).



Fig. 1 - Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e sistémicas, inoculada com o isolado viral G1 1.

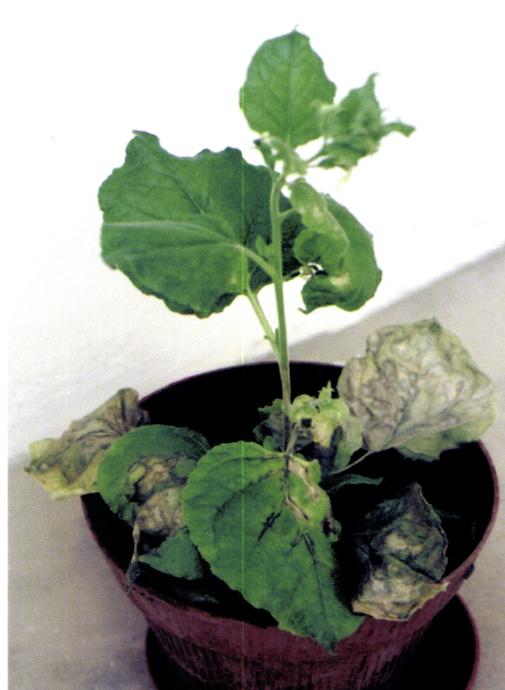


Fig. 2 - Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e sistémicas, inoculada com RNA extraído pelo método do perclorato de sódio, da preparação do isolado viral G1 1.

As inoculações feitas com extractos de frutos provenientes da árvore Verdeal 10 em plantas de *N. benthamiana*, resultaram no aparecimento de lesões locais arredondadas com um tipo de projecções radiais que dava um aspecto de ‘estrela’ à lesão local, inicialmente cloróticas e depois necróticas. Notou-se também abundante mosqueado clorótico sistémico, que mais tarde necrosava e deixava à folha um aspecto enconchado (Fig. 3). Idênticos sintomas foram observados em plantas de *N. benthamiana* quando inoculadas com preparações virais purificadas do isolado viral Vr 10, ou com preparações do RNA viral isolado destas partículas (Fig. 4).



Fig. 3 – Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e cloroses sistémicas, inoculada com o isolado viral Vr 10.



Fig. 4 – Planta de *N. benthamiana* com necroses locais e cloroses sistémicas, inoculada com RNA extraído pelo método do fenol-SDS, da preparação do isolado viral Vr 10.

A indicadora *N. benthamiana*, sendo a única que é invadida sistemicamente, constitui a melhor fonte de material para purificação viral e outros estudos.

Inoculações feitas a partir de um extracto de planta infectada com o isolado Gl 1 em vinte e seis plantas diferentes (Quadro II) demonstrou que a maior parte reagiu com a formação de lesões necróticas locais, variando no entanto a sua intensidade (Fig. 5).

Quadro II. Sintomatologia verificada nas plantas herbáceas inoculadas com os isolados virais Gl 1 e Vr 10.

Plantas testadas	Isolado Gl 1	Isolado Vr 10
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	NL	NL
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste e Reyn	NL	NL
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L.	NL	NL
<i>Chenopodium botrys</i> L.	NL	NL
<i>Chenopodium capitatum</i> (L.) Aschers	NL	NL
<i>Chenopodium giganteum</i> L.	---	---
<i>Chenopodium hybridum</i> L.	NL	NL
<i>Chenopodium murale</i> L.	NL	NL
<i>Chenopodium polispermum</i> L.	NL	NL
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd	NL	NL
Cucurbitaceae		
<i>Cucumis sativus</i> L.	NL	NL
Solanaceae		
<i>Datura stramonium</i> L.	NL	NL
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	NL, NS	NL, MCS
<i>Nicotiana clevelandii</i> Gray	NL	NL
<i>Nicotiana debneyi</i> Domin	NL	---
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	---	---
<i>Nicotiana langsdorffii</i> J.A. Weinm	---	---
<i>Nicotiana longiflora</i> Cav.	---	---
<i>Nicotiana paniculata</i> L.	NL	---
<i>Nicotiana rustica</i> L.	---	---
<i>Nicotiana sylvestris</i> Speg e Comes	---	---
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Hawana	NL	---
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Macrophylla	NL	---
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun	NL	---
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. White Burley	NL	---
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	NL	---

Legenda: NL -- necroses locais; NS -- necroses sistémicas; MCS -- mosaico clorótico sistémico; --- - ausência de sintomas e de infecção, confirmada por inoculação em *N. benthamiana*.

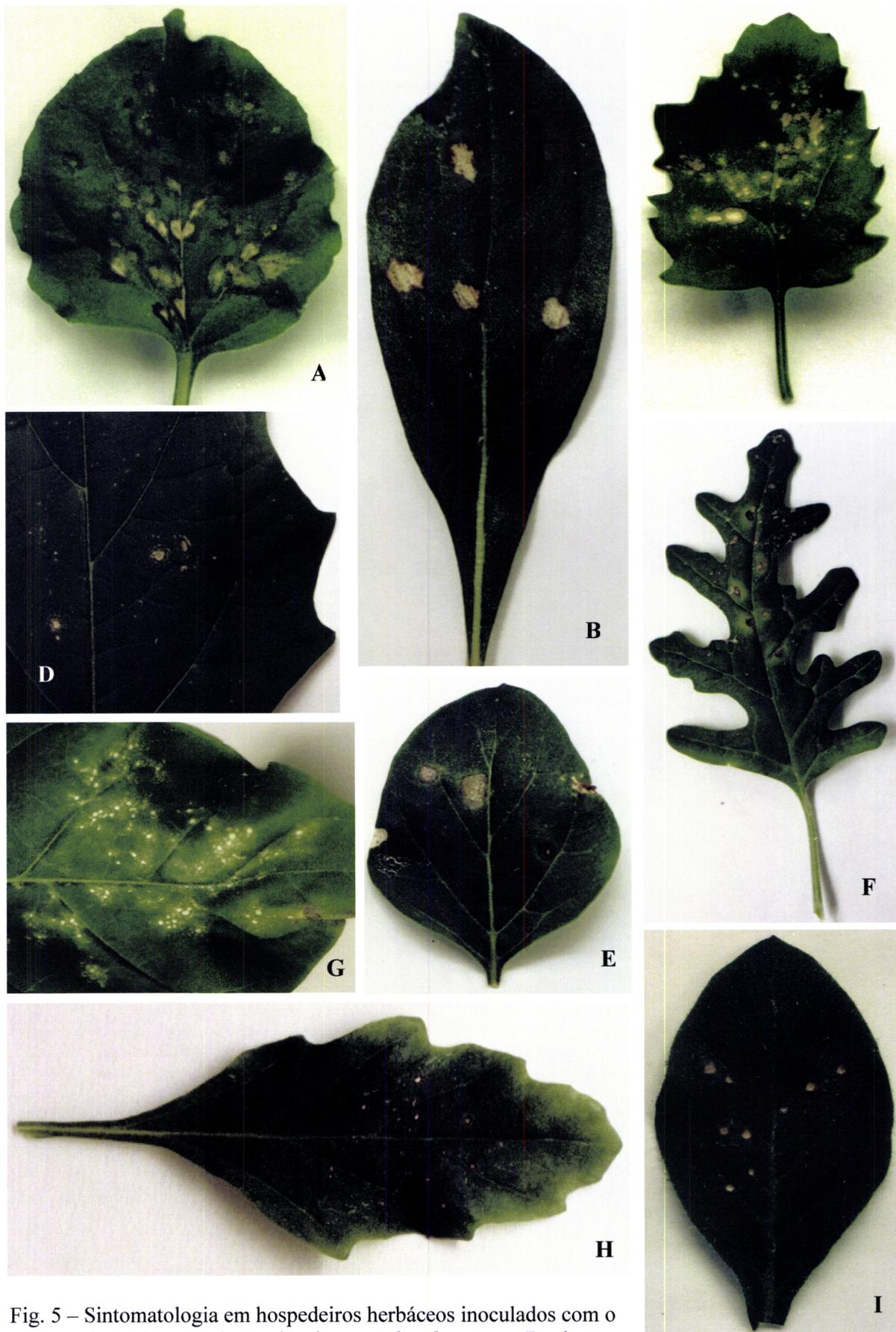


Fig. 5 – Sintomatologia em hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral GI 1: **A** – lesões locais em *N. benthamiana*; **B** – lesões locais em *Gomphrena globosa*; **C** – lesões locais em *C. murale*; **D** – lesões locais em *Datura stramonium*; **E** – lesões locais em *N. paniculata*; **F** – lesões locais em *C. botrys*; **G** – lesões locais em *N. tabacum* cv. White Burley; **H** – lesões locais em *C. ambrosoides*; **I** – lesões locais em *N. clevelandii*.

Só a planta *N. benthamiana* apresentou sintomas sistémicos, além de locais. Apenas cinco espécies de *Nicotiana* e uma de *Chenopodium* não mostraram sintomas e confirmou-se não estarem infectadas, por inoculação em plantas sensíveis de *N. benthamiana*, que não reagiram.

As inoculações feitas com extracto de planta infectada com o isolado Vr 10, revelaram uma gama de hospedeiros limitada. Assim, e com excepção da *N. benthamiana*, não foram infectadas mais nenhuma das plantas testadas da família *Solanaceae* (vide Quadro 2). Os sintomas apresentados são muito semelhantes entre si, variando apenas na severidade da lesão apresentada (Fig. 6). O melhor indicador, pela sua grande sensibilidade e intensidade dos sintomas produzidos é a *N. benthamiana*, que apresentou lesões necróticas locais (vide Fig. 6F) e lesões cloróticas sistémicas (vide Fig. 6C). Das nove *Chenopodiaceae* testadas, apenas uma espécie não apresentou sintomas.

2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

2.1. Purificação

A purificação das partículas virais dos isolados Gl 1 e Vr 10 feitas a partir de plantas infectadas de *N. benthamiana* com sintomas locais e sistémicos, utilizando quer material vegetal fresco quer congelado a -20°C , resultou em ambos os casos em preparações virais altamente infecciosas.

A utilização do clorofórmio/butanol como solventes orgânicos permitiu uma boa clarificação nos dois casos. Verificou-se também que apenas um ciclo de centrifugação diferencial era insuficiente, pelo que quase sempre se optou pela realização de dois ciclos para obter uma preparação menos contaminada por componentes normais da planta.

A centrifugação destas preparações em gradientes de densidade de sacarose revelou que o isolado Gl 1 por um lado, e o Vr 10 por outro, sedimentam numa única banda, na mesma posição no tubo (Figs. 7 e 8). Esta posição era idêntica à ocupada pela banda formada pelo vírus OLV-1 (estirpe italiana) em gradientes de densidade de sacarose centrifugados na mesma altura. Do mesmo modo, quando os isolados virais em estudo eram misturados com preparações virais de OLV-1 notou-se uma co-sedimentação das partículas, revelando que as três preparações (Gl 1, Vr 10 e OLV-1) apresentam a mesma taxa de sedimentação, cerca de $110 S$ (Gallitelli e Savino, 1985).

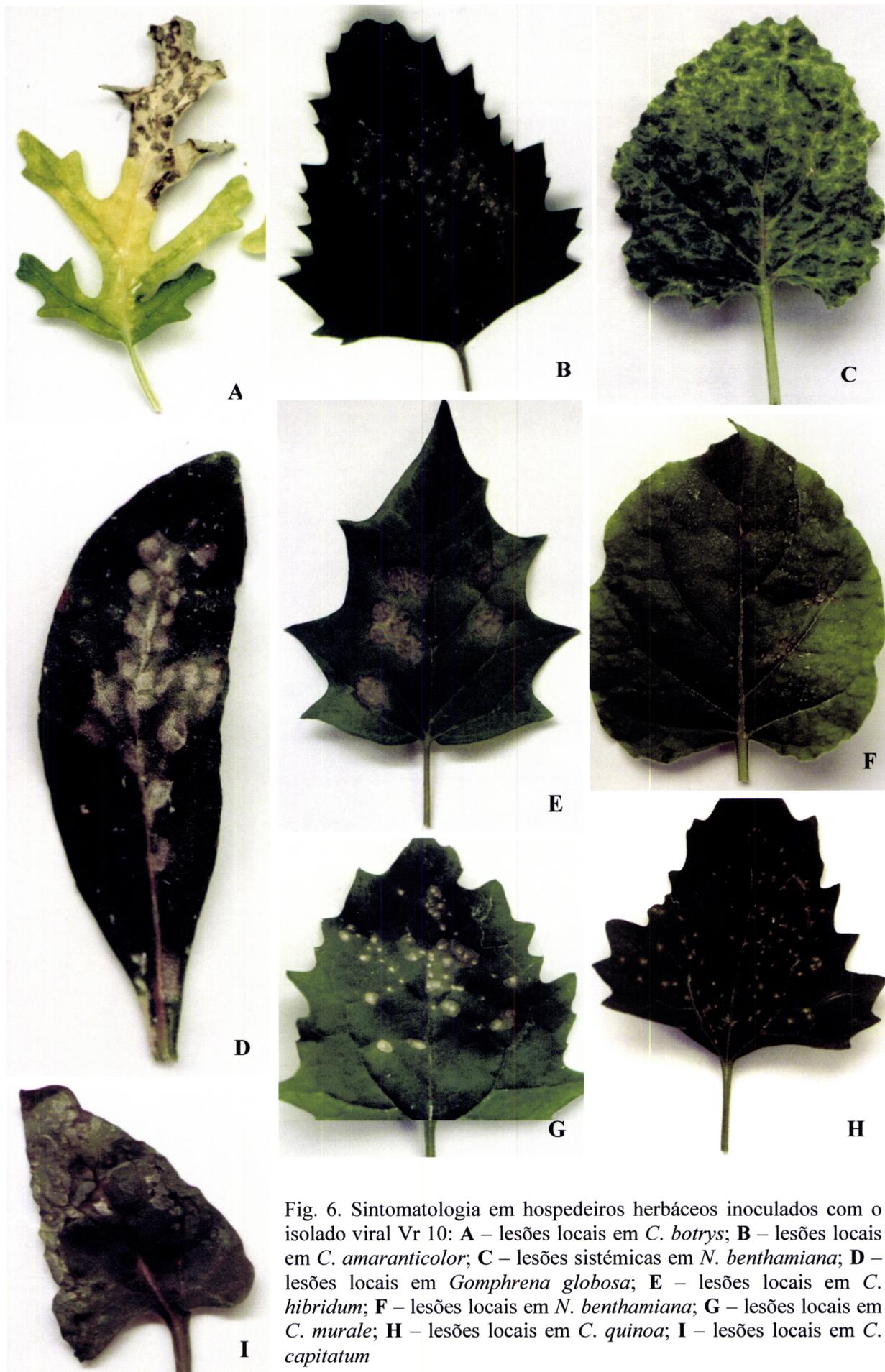


Fig. 6. Sintomatologia em hospedeiros herbáceos inoculados com o isolado viral Vr 10: **A** – lesões locais em *C. botrys*; **B** – lesões locais em *C. amaranticolor*; **C** – lesões sistêmicas em *N. benthamiana*; **D** – lesões locais em *Gomphrena globosa*; **E** – lesões locais em *C. hybridum*; **F** – lesões locais em *N. benthamiana*; **G** – lesões locais em *C. murale*; **H** – lesões locais em *C. quinoa*; **I** – lesões locais em *C. capitatum*

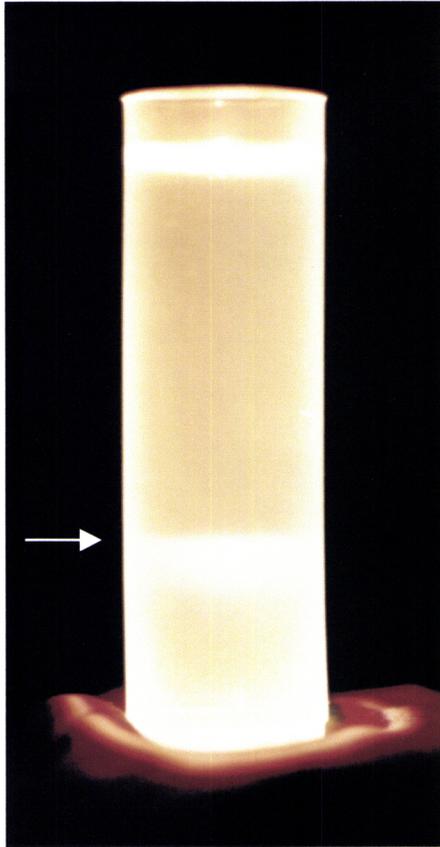


Fig. 7 – Banda formada em gradientes de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral Gl 1.

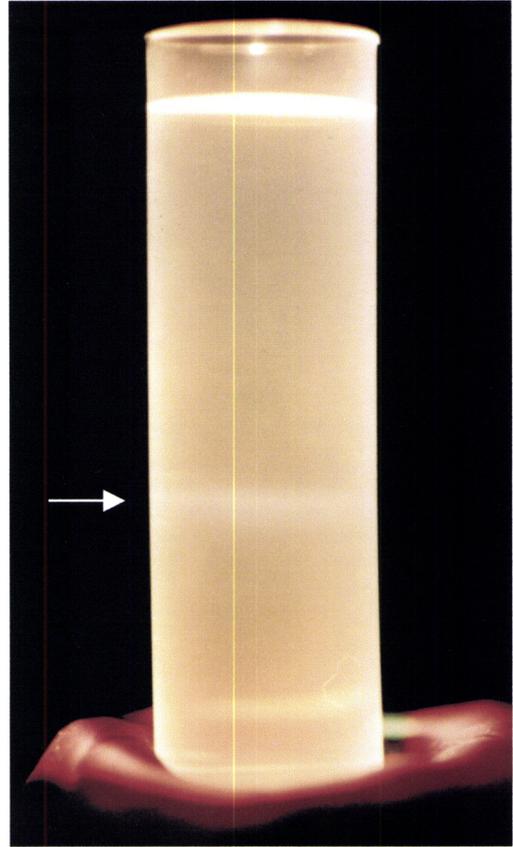


Fig. 8 – Banda formada em gradientes de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral Vr 10.

2.2. Morfologia das partículas virais

A observação ao microscópio electrónico, após contrastação de preparações purificadas de vírus, revelou que ambos os isolados têm uma forma isométrica. No entanto, as partículas do Gl 1 têm um diâmetro aproximado de 28 nm (Fig. 9) e são ligeiramente angulares nos seus contornos, como observado por outros autores para o vírus OLV-1 (Castellano *et al.*, 1987).

As partículas do isolado Vr 10 pareciam absorver o corante acetato de urânio, apresentando-se assim escuras, isto é, relativamente opacas aos electrões. Este facto dificultou a rigorosa medição do diâmetro, que se estimou em cerca de 20 nm (Fig. 10). As partículas agruparam-se num arranjo cristalino, parecendo encaixar-se umas nas outras (vide Fig. 10), ao contrário do observado no isolado Gl 1 (vide Fig. 9).

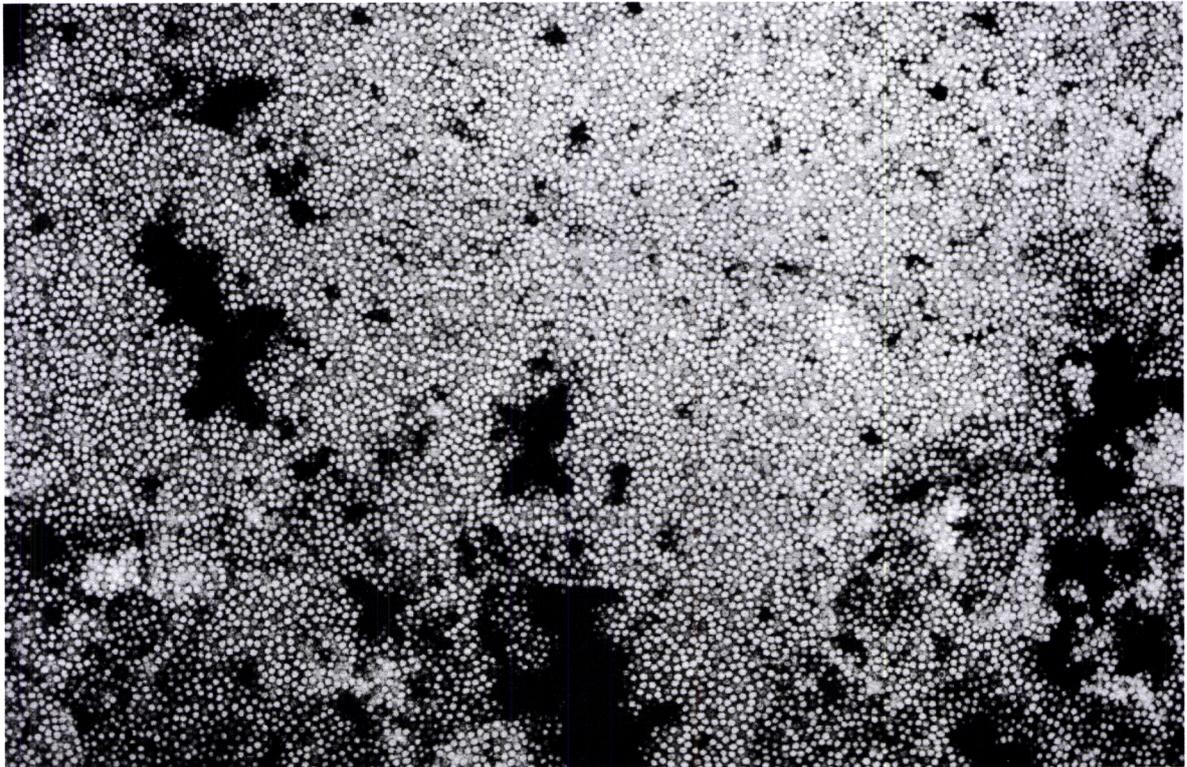


Fig. 9 – Preparação purificada do isolado viral GI 1 observada ao microscópio electrónico (Ampliação 36 000 x).

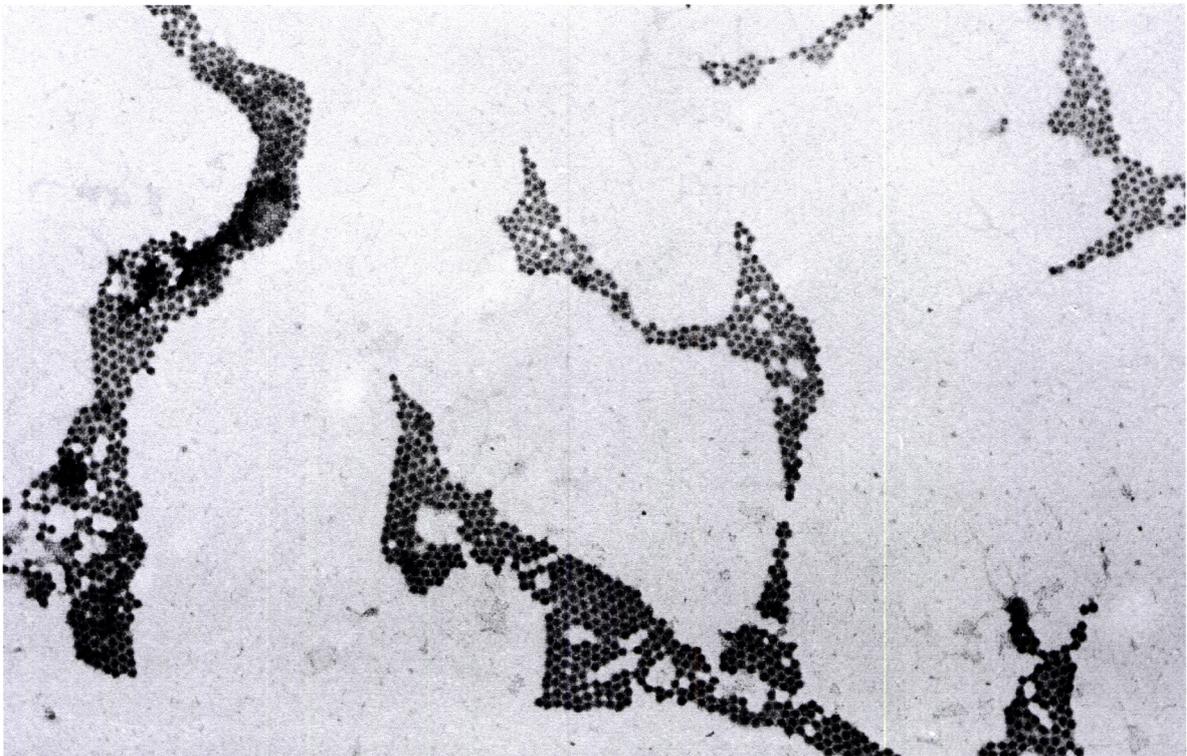


Fig. 10 – Preparação purificada do isolado viral Vr 10 observada ao microscópio electrónico (Ampliação 60 000 x).

2.3. Proteína da cápside viral

A análise por electroforese em SDS-PAGE dos peptídeos dissociados da cápside viral, mostra que ambas as amostras, o isolado Gl 1 e o Vr 10, são constituídas por apenas um peptídeo, com massa molecular aproximada de 30 KDa (Fig. 11). Também a cápside do vírus OLV-1, mostrou ser constituído por um peptídeo de idêntico peso molecular (vide Fig. 11), como referido por Merciega *et al.*, (1996).

As diferenças na intensidade das bandas dos peptídeos isolados, visíveis no gel, podem ser devidas a diferenças de eficácia da dissociação das partículas de cada isolado, em presença do tampão-SDS. Contudo, como não foi possível dispor de espectrofotómetro para medir a absorvância das preparações virais antes da electroforese, também se poderá admitir que a diferença quantitativa dos peptídeos visíveis no gel, seja devida a diferentes teores virais nas preparações.

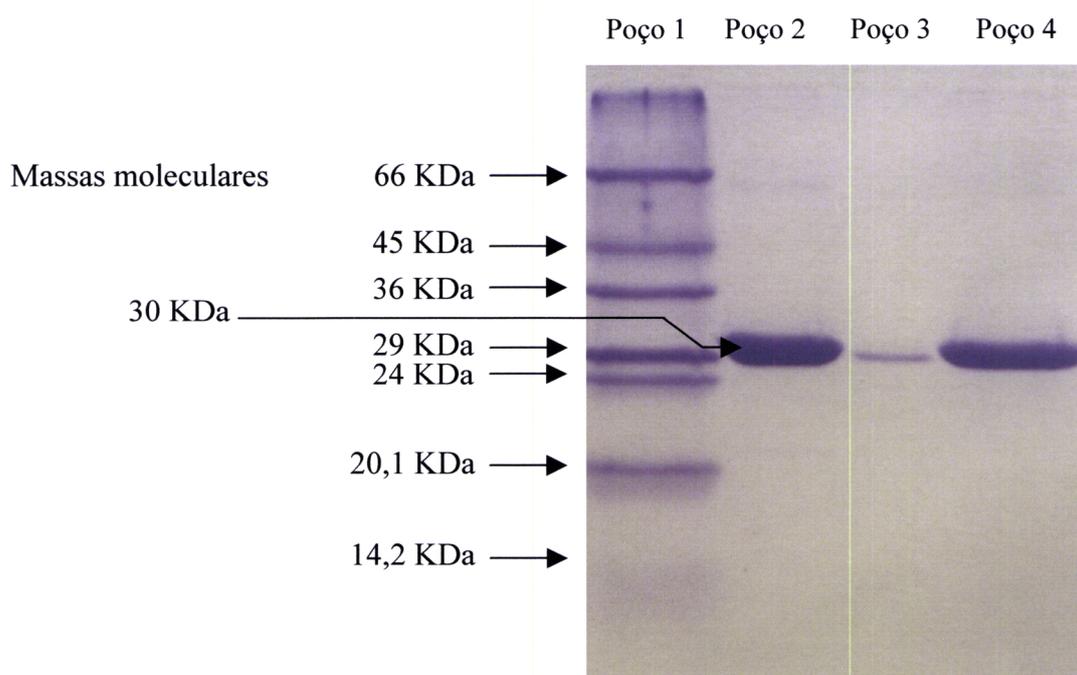


Figura 11 – Análise electroforética em gel descontinuo de SDS-poliacrilamida da proteína da cápside viral: Poço 1- Marcadores de massa molecular conhecida; Poço 2 - Gl 1; Poço 3 - Vr 10; Poço 4 - OLV-1 (estirpe italiana).

2.4. Ácido nucleico das partículas virais

O ácido nucleico viral foi isolado a partir de preparações virais dos isolados Gl 1, Vr 10 e OLV-1. O método baseado na utilização do fenol-SDS (Dinner e Scheneider,

1968) foi bastante eficaz na separação dos ácidos nucleicos das partículas de Vr 10 e OLV-1. Quando analisada por electroforese em gel de agarose 1%, a preparação de Vr 10 permitiu a observação de um único tipo de moléculas com massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da (Fig. 12). O ácido nucleico isolado de OLV-1 mostrou-se também constituído por um tipo de molécula com uma massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da (vide Fig. 12), em concordância com resultados obtidos por outros autores para este vírus (Merciega *et al.*, 1996).

O método baseado no uso do fenol para remover o invólucro proteico das partículas do isolado Gl 1 não se mostrou eficaz, como se verificou por análise electroforética em gel de agarose. Neste, não se visualizou nenhuma banda reveladora de moléculas de ácido nucleico. Assim, tentou-se o método baseado no uso do perclorato de sódio, que demonstrou ser eficaz na libertação do ácido nucleico das partículas. A preparação de Gl 1 revelou conter duas moléculas de ácido nucleico, sendo a principal (mais abundante) constituída por cerca de 3800 nucleótidos (aproximadamente $1,4 \times 10^6$ Da) e outra menor por cerca de 280 nucleótidos (aproximadamente $0,1 \times 10^6$ Da) (Fig. 13).

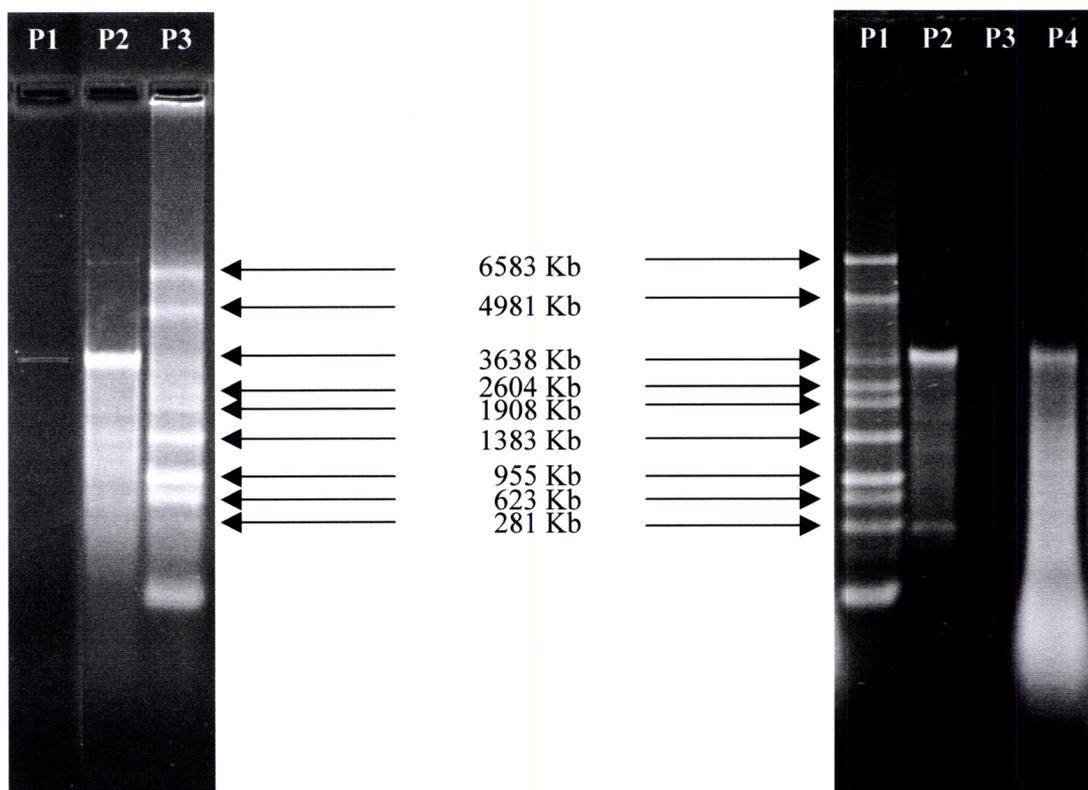


Fig. 12 – Análise electroforética em gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos virais: Poço 1 - Vr 10; Poço 2 - OLV-1; Poço 3 – Marcadores moleculares com número conhecido de nucleótidos.

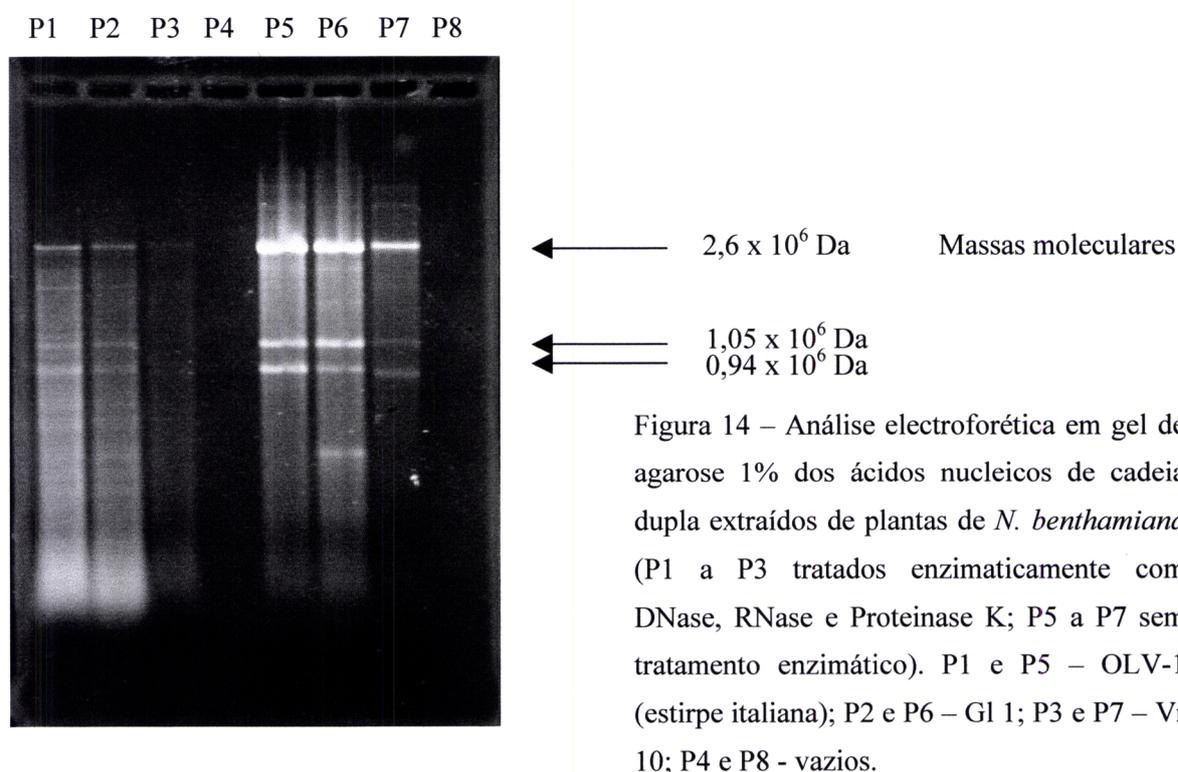
Fig. 13 – Análise electroforética em gel de agarose 1% dos ácidos nucleicos virais: Poço 1 – Marcadores moleculares com número conhecido de nucleótidos; Poço 2 - Gl 1; Poço 4 - OLV-1.

O tratamento dos ácidos nucleicos isolados de Gl 1 e Vr 10 com a enzima RNase resultou na sua digestão enzimática (nenhuma banda visível no gel após electroforese em gel de agarose) indicando assim serem constituídos por RNA.

As fracções de RNA isoladas quer de Gl 1 quer de Vr 10, revelaram-se infecciosas quando inoculadas em plantas de *N. benthamiana*, onde causaram sintomas idênticos aos causados pelas preparações virais de onde tinham sido isolados (vide Figs. 2 e 4).

2.5. RNAs de cadeia dupla (dsRNA)

A extracção dos ácidos nucleicos de cadeia dupla, correspondentes à forma replicativa (RF) dos vírus, foi feita a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas local e sistemicamente. Verificou-se que a extracção dava bons resultados partindo de material vegetal fresco ou congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fracção dos dsRNA isolados de tecidos infectados com Gl 1 foram analisados em gel de agarose 1%, tendo o seu perfil electroforético mostrado a presença de 4 bandas de dsRNA, com massas moleculares de $2,6 \times 10^6$ Da, $1,05 \times 10^6$ Da, $0,94 \times 10^6$ Da e aproximadamente $0,3 \times 10^6$ Da (Fig. 14).



Os resultados obtidos dos dsRNA isolados a partir de tecidos infectados com o vírus OLV-1 foram semelhantes aos obtidos por Merciega *et al.* (1996) (vide Fig. 14).

A fracção dos dsRNA isolados de material vegetal infectado com Vr 10, mostrou ser constituída, quando analisada por electroforese em gel, por 3 tipos de moléculas com massas moleculares de cerca de $2,7 \times 10^6$ Da, $1,1 \times 10^6$ Da e $0,9 \times 10^6$ Da (vide Fig. 14).

Deve notar-se que estes valores são apenas estimativas, eventualmente pouco rigorosas, devido ao facto dos padrões disponíveis para os cálculos, serem apenas os relativos aos dsRNA do OLV-1, o que se revelou insuficiente.

3. SOROLOGIA

3.1. Relações sorológicas com outros vírus

Para averiguar a possível relação sorológica entre os isolamentos virais Gl 1 e Vr 10 e os vírus da oliveira OLV-1 e OLRV, utilizou-se a técnica da dupla difusão em agar, na qual foram utilizados os antisoros policlonais, anti-OLV-1 e anti-OLRV. Os resultados observados após 48 horas de incubação podem ser vistos na Fig. 15.

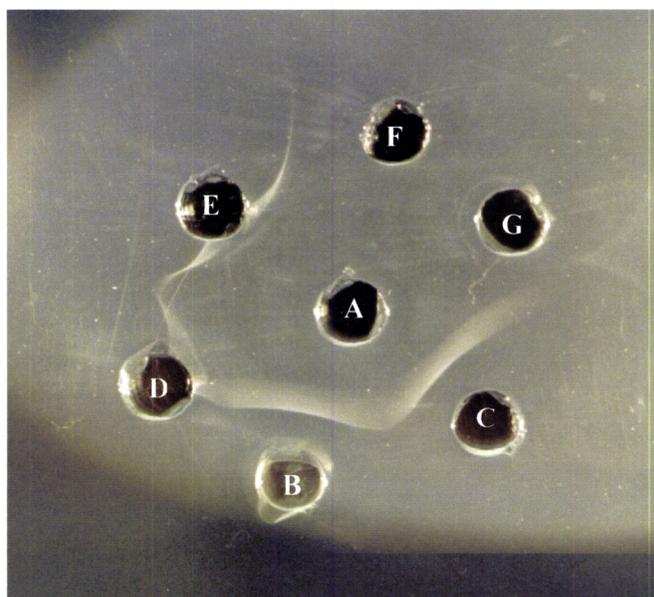


Fig. 15 – Caracterização sorológica através da técnica da dupla difusão em agar: A – anti-OLV-1; B – OLV-1 purificado; C – Gl 1 purificada com dois ciclos de centrifugação diferencial; D – Gl 1 purificada em gradiente de sacarose; E – OLV-1 purificado em gradiente de sacarose; F – extracto de *N. benthamiana* sã; G – Verdeal 10 purificada com dois ciclos de centrifugação diferencial.

A preparação purificada por dois ciclos de centrifugação diferencial de GL 1 (Poço C) forma uma banda de precipitação muito intensa com o anti-OLV-1. Por sua vez, esta banda converge com a banda de precipitação formada entre o antisoro e a preparação purificada de OLV-1 (estirpe italiana) (Poço B), o que indica que ambos os vírus estão sorologicamente relacionados e são muito semelhantes. O mesmo isolamento obtido de gradientes de sacarose não formou uma banda tão nítida (poço D), provavelmente porque a quantidade de partículas virais presente era pequena.

A preparação do isolado purificado de Vr 10, bem como o extracto bruto feito de *N. benthamiana* infectada com Vr 10 (Poço G) não reagiram nem com o soro anti-OLV-1, nem com o anti-OLRV demonstrando que o isolado Vr 10 é um vírus distinto quer do vírus OLV-1 quer do vírus OLRV.

CAPITULO IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram claramente o isolamento, a partir de duas árvores de *Olea europaea* L., das cultivares Galega Vulgar e Verdeal Alentejana, de dois isolados virais, aqui designados por Gl 1 e Vr 10.

Observou-se que ambos os isolados têm algumas características comuns, nomeadamente: apresentarem alguns dos hospedeiros herbáceos em comum apresentarem partículas isométricas, serem vírus simples, com idêntico coeficiente de sedimentação, serem constituídos por subunidades proteicas com massa molecular de 30,0 KDa e possuírem RNA de cadeia simples. No entanto, é possível e relativamente fácil distingui-los, no que se refere a um conjunto de características, como:

1) O tipo de sintomatologia causada em plantas de *N. benthamiana*, na qual o isolado Gl 1 causa necroses locais e sistémicas ao passo que o isolado Vr 10 induz necroses locais e mosaico clorótico sistémico. Além disso, este último tem uma gama de hospedeiros mais restrita não infectando a maioria das plantas do género *Nicotiana*, e também algumas do género *Chenopodium*.

2) A morfologia e dimensão das partículas, sendo as de Gl 1 de contornos ligeiramente angulares e bem definidos, com diâmetro aproximado de 28 nm, e as do Vr 10 mais regulares, formando agregados mais ou menos cristalinos, aparentemente absorvendo o contrastante negativo (acetato de uranilo) e com uma dimensão bastante menor, de cerca de 20 nm. Contudo, neste aspecto das dimensões há que salvaguardar a possibilidade de o Vr 10 ser um pouco maior que o referido, porque o contrastante absorvido pelas partículas dificulta e pode subestimar a sua real dimensão. De facto, conjugando outros resultados como sejam a semelhança das massas moleculares das subunidades proteicas, a massa molecular dos ácidos nucleicos principais e o coeficiente de sedimentação em gradientes de densidade (cerca de 110 S nos dois casos), estes parecem contribuir para reforçar a ideia que as partículas do Vr 10 possam eventualmente ser ligeiramente maiores. Para verificar esta possibilidade haveria que testar o comportamento das partículas com vários outros contrastantes de microscopia electrónica.

3) As espécies de ácido nucleico viral. No caso do Gl 1 observaram-se duas espécies, a principal com $1,4 \times 10^6$ Da e uma outra muito menor com cerca de $0,1 \times 10^6$ Da. Embora o tamanho seja aproximado (dado estar no limite inferior dos padrões de massa molecular conhecida utilizados, que se presta a subestimar de algum modo o tamanho das moléculas) é tão baixo, para os valores das massas moleculares dos RNA virais conhecidos, que permite sugerir tratar-se de um RNA satélite (Matthews, 1991) encapsidado nas partículas de Gl 1. Este satélite poderá influenciar, como outros RNAs satélites de vírus, a severidade dos sintomas causados. Podemos notar por exemplo que alguns *Tombusvirus* têm a característica de “produzirem” RNAs satélites quando propagados em *N. benthamiana* mas não quando propagados em *N. clevelandii* (Gallitelli e Hull, 1985). Contudo, esta matéria terá de ser objecto de estudos posteriores para esclarecimento.

O isolado Vr 10 apenas apresenta uma espécie de RNA viral, com cerca de $1,4 \times 10^6$ Da.

4) As espécies de dsRNA induzidos durante a replicação do genoma viral, nos tecidos infectados, mostrou-se em concordância com os tipos de moléculas de RNA genómico. Das quatro espécies de dsRNA encontrados nos tecidos infectados com o isolado Gl 1, três delas correspondem, em tamanho, às existentes nos tecidos infectados com o vírus OLV-1. As moléculas de massa molecular mais elevada ($2,6 \times 10^6$ Da) corresponderão à forma replicativa do RNA viral do Gl 1, com massa molecular de $1,4 \times 10^6$ Da; duas outras espécies de dsRNA corresponderão a formas replicativas de RNAs subgenómicos (Matthews, 1991) e, finalmente, a restante espécie de dsRNA corresponderá possivelmente à forma replicativa da espécie menor de RNA viral presente nas partículas virais.

No caso das três dsRNA isoladas de plantas infectadas com o isolado Vr 10, a de maior massa molecular ($2,6 \times 10^6$ Da) corresponderá à forma replicativa do RNA genómico e as restantes corresponderão a formas replicativas de RNAs subgenómicos.

5) Sorologicamente, os dois isolados mostraram-se distintos, uma vez que o isolado Gl 1 reagiu sorologicamente com o antisoro para o vírus OLV-1, de modo idêntico à reacção do OLV-1 com o respectivo antisoro, mas o isolado Vr 10 não reagiu, nas condições utilizadas, mostrando assim existirem diferenças no invólucro proteico das partículas virais em estudo.

Os resultados aqui descritos e os conhecimentos disponíveis sobre os vírus que infectam a oliveira (Castellano *et al.*, 1987; Gallitelli e Savino, 1985; Merciega *et al.*, 1996) sugerem que o isolado viral Gl 1 poderá ser uma estirpe do necrovirus OLV-1, que tem associado um RNA satélite encapsidado. O isolado viral Vr 10, difere dos *Nepovirus* e dos *Cucumovirus* de oliveira, por ser um vírus simples e não multicomponente. Distingue-se também morfológicamente do OLV-2, do OVYaV, do TMV e do OYMV, que infectam aquele hospedeiro. Este isolado viral tem várias características comuns com o *Necrovirus* OLV-1, nomeadamente massas moleculares da proteína da capsíde e do RNA genómico, mas não são relacionados sorológicamente, parecendo assim ser distinto deste e dos restantes vírus conhecidos de oliveira. Assim, sugere-se que se lhe atribua a designação de 'olive latent mottle virus' ou vírus latente do mosqueado da oliveira, aguardando-se uma mais completa caracterização para determinar o género viral a que pertence.

BIBLIOGRAFIA

- Abel, Patricia P.; R.S. Nelson; B. De; Nancy Hoffmann; S.G. Rogers; R.T. Fraley; R.N. Beachy (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, **232**, 738-743.
- Agrios, G.N. (1988). *Plant Pathology*. Academic Press (3rd edition), New York.
- Almeida, F.J. (1967). *Das reacções fisiológicas aos estímulos e inibições em Olea europaea L.*. Boletim da Junta Nacional do Azeite, Lisboa, 188 pp.
- Augé, R.; J. Boccon-Gibod (1989). Les applications à l'horticulture. In: *La culture in vitro et ses applications horticoles*. (Editado por H. Vidalie) J.B. Baillière, Lavoisier (3ª edição), Paris, 63-89.
- Ball, Ellen M. (1974). *Serological tests for the identification of plant viruses*. (Editado por The American Phytopathological Society) Minnesota, USA, 31 pp.
- Ball, Ellen M. (1990). Agar double diffusion, plates (ouchterlony): viruses. In: *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens*. (Editado por The American Phytopathological society) Minnesota, USA, 110-120.
- Barba, M. (1993). Viruses and virus-like disease of olive. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23**, 493-497.
- Beachy, R.N. (1993). Virus resistance through expression of coat protein genes. In: *Biotechnology in plant disease control*. (Editado por Ilan Chet) Wiley-Liss, New York, 89-104.
- Brunt, A.A.; K. Crabtree; M.J. Dallwitz; A.J. Gibbs; L. Watson (1996). *Viruses of Plants*. CAB International, Cambridge, UK.

- Burnett, P.A. (1990). Breeding for resistance to barley yellow dwarf. In: *Proceeding: Aphid-plant interactions: Population to molecules*. (Editado por Oklahoma State University), USA, 179-193.
- Castellano, M.A.; A. Di Franco; G.P. Martelli (1987). Electron microscopy of two olive viruses in host tissues. *Journal of Submicroscopy Cytology*, **19**, 495-508.
- Clara, Maria I.E. (1996). *Viruses and their importance on clonal and sanitary selection of Olea europaea L. cultivars in Portugal*. Policopiado. Apresentado na Universidade de Ciedoba (Espanha), 11 pp.
- Clara, Maria I.E.; F.T. Rei; Maria R. Félix; F.A. Leitão; J.F. Serrano; Maria F. Potes (1997). Viruses affecting *Olea europaea* L. crop diagnostic techniques. *Olivae*, **66**, 56-60.
- Clark, M.F. (1981). Immunosorb assay in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, **19**, 83-106.
- Clark, M.F.; A.N. Adams (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, **34**, 475-483.
- Corte, A.; R. Ciferri; D. Rui (1961). Infezioni sul lingustro da malformazioni foliari dell'olivo. *Rivista di Patologia Vegetal*, **1**, 251-260.
- Costa, A.S.; G.W. Muller (1980). Tristeza control by cross protection. *Plant Disease*, **64**, 538-541).
- Dinner, T.O.; I.R. Sheneider (1968). Virus degeneration and nucleic acid release in single-phase phenol system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **124**, 401-412.
- Dodds, J.A.; T.J. Morris; R.L. Jordan (1984). Plant viral double-stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, **22**, 151-168.

- Fraser, R.S.S. (1987). Genetics of plant resistance to viruses. In: *Plant resistance to viruses*. (Editado por John Wiley & Sons Ltd) Chichester, UK, 6-16.
- Fulton, R.W. (1986). Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annual Review of Phytopathology*, **24**, 67-81.
- Gallitelli, D.; R. Hull (1985). Characterization of satellite RNAs associated with tomato bushy stunt virus and five other definitive tombusviruses. *Journal of General Virology*, **66**, 1533-1543.
- Gallitelli, D.; V. Savino (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**, 295-303.
- Gonsalves, D.; M. Ishii (1980). Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopathology*, **70**, 1028-1032.
- Grant, T.J.; A.S. Costa (1951). A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology*, **41**, 114-122.
- Grieco, F.; G.P. Martelli; V. Savino; P. Piazzola (1992). Properties of olive latent virus 2. *Rivista Patologica Vegetal*, **2**, 125-136.
- Grieco, F.; V. Savino; G.P. Martelli (1996). Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of olive latent virus 1. *Archives of Virology*, **141**, 825-838.
- Hansen, A.J.; W.D. Lane (1985). Elimination of apple chlorotic leafspot virus from apple shoot cultures by ribavirin. *Plant Disease*, **69**, 134-135.
- Henriques, Maria I.C. (1978). *Comparative studies on Tombus viruses*. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Pathology. University of California, Berkeley, 128 pp.

- Henriques, Maria I.C. (1994). Virus disease of olive: An overlook. *Acta Horticulturae*, **356**, 379-385.
- Henriques, Maria I.C.; F.A. Leitão; Maria F. Potes; J.F. Serrano (1990). *Virus detectados em Olea europaea L.*. I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas, Lisboa, 245 pp.
- Henriques, Maria I.C.; T.J. Morris (1979). Evidence for different replicative strategies in the plant tombusviruses. *Virology*, **99**, 66-74.
- Henriques, Maria I.C.; F.T. Rei; F.A. Leitão; J.F. Serrano; Maria F. Potes (1991). Occurrence of viruses infecting olive trees in Portugal. *Olea*, **21**, 71.
- Henriques, Maria I.C.; F.T. Rei; F.A. Leitão; J.F. Serrano; Maria F. Potes (1992). Virus diseases in *Olea europaea*. Immunodiagnosis of Strawberry latent ringspot nepovirus. *Phytopathologia mediterranea*, **31**, 127-132.
- Henriques, Maria I.C.; F.T. Rei; F.A. Leitão; J.F. Serrano; Maria F. Potes (1993). A aplicação da técnica ELISA para detecção do nepovirus 'strawberry latent ringspot nepovirus' e do cucumovirus 'cucumber mosaic' em cultivares de *Olea europaea* L.. *Acta Horticulturae*, **9**, 215-220.
- Hemenway, C.; L. Haley; W.K. Kaniewski; E.C. Lawson; K.M. O'Connell; P.R. Sanders; M. P.E. Thomas; N.E. Tumer (1990). Genetically engineered resistance: Transgenic plants. *Plant Viruses*. Volume II (Pathology), (Editado por CRC Press), Florida, USA, 347-367.
- Horst, R.K. (1988). Production of plants free of virus and prevention of reinfection. *Acta Horticulturae*, **234**, 393-401.
- Jones, A.T.; M.A. Mayo (1972). The two nucleoprotein particles of cherry leafroll virus. *Journal of General Virology*, **16**, 349-358.
- Kyriakopoulou, P.E. (1993). Olive sickle leaf symptoms widespread in Greece. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23**, 499-450.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, **227**, 680-683.
- Lavee, S.; E. Tanne (1984). Spherosis – A virus disease of the olive (*Olea europaea*). I. Symptoms, growth, tree development and production. *Olea* FAO/UNDP, **June**, 71-75.
- Leitão, F.A.; J.F. Serrano; Maria F. Potes; Maria I.E. Clara; F.T. Rei; A. Gentil-Pinto (1996). Studies on clonal selection of olive cv. 'Negrinha' in the province of Trás-os-Montes. *Olivae*, **62**, 38-45.
- Loebenstein, G.; A. Gera (1993). The local lesion response to viruses: possibilities for engineering resistant plants. In: *Biotechnology in plant disease control*. (Editado por Ilan Chet) Wiley-Liss, New York, 105-113.
- Marte, M.; F. Gadani; V. Savino; E. Rugini (1986). Strawberry latent ringspot virus associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease*, **70**, 171-172.
- Martelli, G.P.; D. Gallitelli (1996). Virosis dell' olivo. In: *Le virosi delle piante da frutto*. *L' Italia Agricola*, 150-156.
- Martin, R.R. (1995). Alternatives to the use of virus coat protein for engineering virus resistance in plants. *Acta Horticulturae*, **386**, 26-36.
- Matthews, R.E.F. (1991). *Plant virology*. Academic Press (3rd edition), San Diego.
- Matthews, R.E.F. (1992). *Fundamentals of plant virology*. Academic Press, San Diego.
- Merciega, V.; D. Boscia; V. Savino (1996). Comparison of five isolates of olive latent virus 1. *Phytopathologia mediterranea*, **35**, 1-8.

- Moahamed, 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.E.; J.A. Dodds (1979). Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, **69** (8), 854-858.
- Pacini, E.; M. Cresti (1977). Virus particles in developing pollen grains of *Olea europaea* L.. *Planta*, **137**, 1-4.
- Qualset, C.O.; G.F. Lorens; D.E. Ullman; P.E. MacGuire (1987). Genetics of host plant resistance to barley yellow dwarf virus. In: *World perspectives on barley yellow dwarf (Proceeding of the international workshop)*. Udine, Italy, 368-382.
- Rei, F.M.T. (1995). *A aplicação do método de isolamento de cadeias duplas de RNA (double-stranded RNA – dsRNA) no diagnóstico de infecções virais em Olea europaea L.* Tese de Mestrado em Protecção Integrada. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa, 91 pp.
- Rei, F.T.; Maria I.E.C. Henriques; F.A. Leitão; J. F. Serrano; Maria F. Potes (1993). Immunodiagnosis of cucumber mosaic cucumovirus in different olive cultivars. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **23**, 501-504.
- Saldaña, H.L. (1990). Cultivo *in vitro* de ápices para la obtención de plantas libres de patógenos. In: *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. (Editado por C.H. Rossell e V.M. Villalobos) Estudio Produccion y Proteccion Vegetal nº105, F.A.O., Roma, 37-42.
- Saldarelli P.; A. Minafra; G.P. Martelli; B. Walter (1983). Detection of grapevine leaf-associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant Pathology*, **34**, 91-96.
- Savino, V.; M. Barba; G. Galitelli; G.P. Martelli (1979). Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia mediterranea*, **18**, 135-142.

- Savino, V.; D. Gallitelli (1981). Cherry leafroll virus in Olive. *Phytopathologia mediterranea*, **20**, 202-203.
- Savino, V.; D. Gallitelli (1983). Isolation of Cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopathologia mediterranea*, **22**, 76-77.
- Savino, V.; D. Gallitelli; M. Barba (1983). Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Annals of Applied Biology*, **103**, 243-249.
- Savino, V.; P. Piazzola; A. DiFranco; G.P. Martelli (1984). Olive latent virus-2, a newly recognised virus with differently shaped particles. *Proc. 5th. Congr. Un. Phitopath. Medit.*, Cairo, Egypt.
- Savino, V.; S. Sabanadzovic; G. Scarito; C. Laviolo; G.P. Martelli (1996). Due giallumi dell' olivo di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, **5**, 55-59.
- Thomas, H.E. (1958). Sick leaf of olive. *Plant Disease Reporter*, **42**, 1154.
- Tien, P.; X. Zhang; B. Qiu; B. Qin; G. Wu (1987). Satellite RNA for the control of plant disease caused by cucumber mosaic virus. *Annals of Applied Biology*, **111**, 143-152.
- Triolo, E.; A. Materazzi; S. Toni (1996). An isolate of tobacco mosaic tobamovirus from *Olea europaea* L.. *Advances in Horticulture Science*, **10**, 39-45.
- Vaeck, M.; Arlette Reynaerts, H. Hofte; S. Jansens, M. De Beuckeleer, Caroline Dean, M. Zabeau, M. Van Montagu; J. Leemans (1987). Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328**, 33-37.
- Valverde, R.A.; S.T. Nameth; R.L. Jordan (1990). Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant disease*, **74**, 255-258.

- Vargas, V.M.L. (1990). Cultivo y fusión de protoplastos. In: *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. (Editado por C.H. Rossell e V.M. Villalobos) Estudio Produccion y Proteccion Vegetal nº105, F.A.O., Roma, 61-65.
- Van Der Krol, A.R.; J.N.M. Mol; A.R. Stuitje (1988). Antisense genes in plants: an overview. *Gene*, **72**, 45-50.
- Van Doting, L.V. (1988). New perspectives for control of plant virus diseases opened by biotechnology. *Acta Horticulturae*, **234**, 497-503.
- Waterworth, H.E.; R.L. Monroe (1975). Graft transmission of olive sickle leaf disorder. *Plant Disease Reporter*, **59**, 366-367.
- Watkins, C.A.; T.A. Jones; M.A. Mayo; M.J. Mitchell (1990). Double-stranded RNA analysis of strawberry plants affected by June yellows. *Annals of Applied Biology*, **116**, 73-83.
- Wilcockson, J.; R. Hull (1974). The rapid isolation of plant virus RNAs using sodium perchlorate. *Journal of General Virology*, **23**, 107-111.
- Yeh, S.D.; D. Gonsalves; H.L. Wang, R. Namba; R.J. Chiu (1988). Control of papaya ringspot virus by cross protection. *Plant Disease*, **72**, 375-380.
- Yeh, S.D.; D. Gonsalves (1984). Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology*, **74**, 1086-1091.