



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Transmissão de necrovírus de oliveira por *Olpidium*
*virulentus***

Susana de Jesus dos Santos

Orientador: Professora Maria do Rosário Fernandes Félix
Co-Orientador: Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**Transmissão de necrovírus de oliveira por *Olpidium*
*virulentus***

Susana de Jesus dos Santos

Orientador: Professora Maria do Rosário Fernandes Félix
Co-Orientador: Doutora Carla Marisa Reis Varanda

Mestrado em Engenharia Agronómica

Dissertação

Évora, 2015

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Quadros	v
Abreviaturas gerais utilizadas	vii
Abreviaturas dos códigos simples dos aminoácidos	ix
Abreviaturas dos nomes dos vírus	xi
Publicações da tese	xv
Agradecimentos	xvii
Resumo	xix
Abstract	xxi
1 Introdução geral	1
1.1 A cultura da Oliveira	1
1.2 Os vírus na cultura da oliveira	2
1.3 Importância económica	5
1.4 Epidemiologia	5
1.4.1 <i>Alpha-</i> e <i>Betanecrovirus</i> em a oliveira	8
1.5 Transmissão de vírus	12
1.5.1 A transmissão de vírus por fungos	13
1.5.2 Relação vetor-vírus	17
1.6 Objetivos deste estudo	18
2 Materiais e Métodos	19
2.1 Origem dos isolados virais	19
2.2 Inoculação mecânica dos isolados virais em hospedeiros herbáceos	19
2.3 Purificação dos isolados virais	19
2.3.1 Proveniência e identificação molecular de <i>Olpidium virulentus</i>	20
2.4 Quantificação de vírus e fungo	22
2.5 Ensaios de transmissão	22
2.6 Teste DASELISA (Double antibody sandwich-enzyme immunosorbent assay)	24
3 Resultados	27
3.1 Identificação morfológica e molecular de <i>Olpidium</i> spp.	27
3.2 Inoculação mecânica de isolados virais em hospedeiros herbáceos	29

3.3	Purificação dos isolados virais	30
3.4	Transmissão viral por <i>O. virulentus</i>	31
4	Discussão	33
5	Referências bibliográfica	35

Índice de Figuras

- Figura 1 – Estrutura genómica dos *Alpha-* e *Betanecrovirus* (OLV-1: *Olive latent virus 1*; OMMV: *Olive mild mosaic virus*; TNV-D: *Tobacco necrosis virus D*). ORF's são representadas por caixas com os tamanhos das proteínas que originam indicados acima ou abaixo. RT: 'read through'; RdRp: polimerase de RNA dependente de RNA; CP: Cápside Proteica (Adaptado de Varanda, 2011) 11
- Figura 2 – Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da CP dos isolados virais de OMMV, TNV-D e OLV-1. A posição 189 da CP do OMMV está a negrito (Félix, 2005a) 12
- Figura 3 – Esquema do ciclo de vida de *Olpidium* sp. (Adaptado de Varanda, 2011) 15
- Figura 4 – Observação ao microscópio ótico revelando esporângios (sp) de *Olpidium brassicae* dentro de células da raiz do hospedeiro. Esporângios maduros libertam os zoósporos através de tubos (et). São observados vários quistos (cv) na raiz (<http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/chytrid.htm>). 16
- Figura 5 – Produtos obtidos após PCR multiplex utilizando DNA extraído de zoosporos de *Olpidium* sp., com 'primers' específicos para *O. brassicae* e para *O. virulentus*, separados em gel de agarose a 1%. M: marcador '1 kb plus DNA ladder' (Invitrogen); 1: *O. virulentus* (controlo positivo); 2: *O. brassicae* (controlo positivo); 3: cultura de esporângio único usada neste estudo; 4: água (controlo negativo). Os tamanhos dos produtos gerados estão indicados à direita. 28
- Figura 6 – Sintomas observados em hospedeiros inoculados 4 dias após inoculação com isolados virais; A: OLV-1, B: TNV-D e C: OMMV. 29
- Figura 7 – Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de TNV-D. Para o OMMV e OLV-1 a banda obtida foi semelhante à apresentada por esta figura. 30

Índice de Quadros

Quadro 1 - Doenças transmitidas por enxertia em oliveira	2
Quadro 2 - Vírus detetados em oliveiras e a sua distribuição geográfica	3
Quadro 3 – Concentrações de vírus usados nos ensaios de transmissão na ausência e na presença de zoósporos de <i>O. virulentus</i>	23
Quadro 4 - Transmissão viral de OMMV, OLV-1 e TNV-D através do solo em plântulas de couve em diversas concentrações na presença e ausência de zoósporos de <i>O. virulentus</i>	31

Abreviaturas gerais utilizadas

aa – aminoácido

°C – grau centígrado

ca. – *circa*

cDNA – DNA complementar

CP – cápside proteica

cv. – cultivar

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

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – deoxinucleótidos trifosfatados

dsRNA – cadeias duplas de RNA

g – grama

g – aceleração da gravidade

h – hora

IgG – imunoglobina G

kb – kilobase

kDa – kiloDalton

M – Molar

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

ng – nanograma

nm – nanometro

nt – nucleótido

ORF – Grelha de leitura aberta (‘Open Reading Frame’)

PCR – reacção em cadeia da polimerase (‘Polymerase Chain Reaction’)

p/v – peso/volume

pb – pares de bases

RdRp – polimerase de RNA dependente de RNA

rpm – rotações por minuto

RNA – ácido ribonucleico

RT – transcrição reversa

seg – segundo

s l – sensu lato

sp. – espécies

STE – Tampão Sódio/Tris/EDTA

ssRNA – ácido ribonucleico de cadeia simples

TAE – tampão tris/ácido acético/EDTA

Taq – *Thermus aquaticus*

UV – ultra-violeta

V – volt

v/v – volume/volume

Abreviaturas dos códigos simples dos aminoácidos

A - Ala - Alanina

C - Cys - Cisteína

D - Asp - Ácido aspártico

E - Glu - Ácido glutâmico

F - Phe - Fenilalanina

G - Gly - Glicina

H - His - Histidina

I - Ile - Isoleucina

L - Lys - Lisina

L - Leu - Leucina

M - Met - Metionina

N - Asn - Asparagina

P - Pro - Prolina

Q - Gln - Glutamina

R - Arg - Arginina

S - Ser - Serina

T - Thr - Trionina

V - Val - Valina

W - Trp - Triptofano

Y - Tyr - Tyrosina

Abreviaturas dos nomes dos vírus

ArMV - *Arabidopsis mosaic virus*

CLRV - *Cherry leaf roll virus*

CLSV - *Cucumber leaf spot virus*

CMV - *Cucumber mosaic virus*

CNV - *Cucumber necrosis virus*

LBVaV - *Lettuce big-vein associated virus*

MLBVV - *Mirafiori lettuce big-vein virus*

MNSV - *Melon necrotic spot virus*

OLRSV - *Olive latent ringspot virus*

OLV-1 - *Olive latent virus 1*

OLV-2 - *Olive latent virus 2*

OLV-3 - *Olive latent virus 3*

OLYaV - *Olive leaf yellowing associated virus*

OMMV - *Olive mild mosaic virus*

OSLV - *Olive semi-latent virus*

OVYaV - *Olive vein yellowing associated virus*

OYMDaV - *Olive yellow mottling and decline-associated virus*

PepMV - *Pepino mosaic virus*

SLRSV - *Strawberry latent ringspot virus*

TMV - *Tobacco mosaic virus*

TNV - *Tobacco necrosis virus*

TNV-A - *Tobacco necrosis virus A*

TNV-D - *Tobacco necrosis virus D*

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito dos Projetos Estratégicos PEst-C/AGR/UI0115/2011 e PEst-OE/AGR/UI0115/2014.



Publicações da tese

Esta tese resultou na seguinte publicação:

Varanda, C.; Santos, S.; Clara, M. I.; Félix, M. R. (2015) Olive mild mosaic virus transmission by *Olpidium virulentus*. *European Journal of Plant Pathology* 142: 197-201. 10.1007/s10658-015-0593-z. DOI: 10.1007/s10658-015-0593-z

Agradecimentos

Este trabalho realizou-se no Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) e do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, onde me foram proporcionadas todas as condições para a realização do trabalho experimental.

Tenho a agradecer à minha Orientadora, Professora Rosário Félix, por tudo o que me ensinou, pelo apoio e especialmente por sempre me animar e estimular nas alturas de maior pressão, apontando-me sempre para a frente como único caminho a seguir.

Agradeço à minha Co-Orientadora, Dra. Carla Varanda, por toda a paciência e ajuda a responder a todas as minhas dúvidas e em todo o trabalho desenvolvido.

Aos meus companheiros, Helena Gaspar e André Albuquerque, por todos os momentos divertidos dentro e fora do laboratório e pelo apoio que sempre se prontificaram a dar-me.

À Inês Neves, que sempre tem o dom de me acalmar com as suas palavras e conselhos, velha amiga sempre presente. À Carina Barcelos pela sua amizade, alegria e companheirismo ao longo destes anos de percurso académico, cujo apoio indispensável nas piores horas ajudou-me a finalizar esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, sem eles com certeza que não teria conseguido atingir este objetivo.

E a Deus por me dirigir em todos os meus caminhos e por me fazer cruzar com as pessoas certas na altura certa.

Resumo

Neste trabalho determinou-se a capacidade de zoósporos de *Olpidium virulentus* vetorizarem três vírus dos géneros *Alphanecrovirus*: *Olive latent virus 1* (OLV-1), *Olive mild mosaic virus* (OMMV) e *Betanecrovirus, Tobacco necrosis virus D* (TNV-D). Foram realizados ensaios de controlo na ausência de zoósporos obtendo-se 10% de eficiência de transmissão quando se usaram concentrações de 0,26 µg de OLV-1 mL⁻¹, 0,5 µg de TNV-D mL⁻¹ e 0,5 µg de OMMV mL⁻¹. O valor de 100% de eficiência de transmissão foi obtido quando foram usadas as concentrações de 65 µg mL⁻¹, 150 µg mL⁻¹ e 50 µg mL⁻¹ de OLV-1, TNV-D e OMMV, respetivamente. Quando os vírus foram previamente incubados com zoósporos de *O. virulentus*, nas concentrações de OMMV de 0,26 µg mL⁻¹ e 2 µg mL⁻¹, as taxas de transmissão obtidas foram de 10% e 100%, respetivamente, no entanto, as taxas de transmissão do OLV-1 e TNV-D não sofreram alterações quando incubados com o fungo previamente à inoculação.

Abstract

Olive necrovirus transmission by *Olpidium virulentus*

The capability of *Olpidium virulentus* to vector three viruses of genera *Alphanecrovirus*: *Olive latent virus 1* (OLV-1), *Olive mild mosaic virus* (OMMV) and *Betanecrovirus Tobacco necrosis virus D* (TNV-D) was estimated. Controls in the absence of zoospores were used. In the absence of the fungus, when concentrations of 0.26 μg of OLV-1 mL^{-1} , 0.5 μg of TNV-D mL^{-1} and 0.5 μg of OMMV mL^{-1} were used, a 10% of transmission efficiency was obtained. A 100% transmission efficiency was obtained when it was used 65 μg mL^{-1} , 150 μg mL^{-1} and 50 μg mL^{-1} of OLV-1, TNV-D and OMMV respectively. When viruses were incubated with *O. virulentus* zoospores, at OMMV concentrations of 0.26 μg mL^{-1} and 2 μg mL^{-1} transmission rates were 10% and 100%, respectively, however, transmission rates of each OLV-1 and TNV-D did not change when they were incubated with the fungus.

1 Introdução geral

1.1 A cultura da Oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma cultura de extrema importância socio-económica em países do sul da Europa, norte de África e Médio Oriente, sendo que nos últimos anos tem-se estendido o seu cultivo para outros países com clima mediterrâneo, tais como EUA, Chile, África do Sul, Austrália e também para outros países tais como Argentina, China e Índia. (FAO, 2014).

A extensão desta cultura para novos países impôs a exigência de plantas certificadas e isentas de doenças, nomeadamente de doenças não tratáveis no campo como os vírus (Félix *et al.*, 2012). Deste modo, a Diretiva Europeia 93/48 de 23-06-93, *Conformitas Agraria Communitatis* (CAC) exige que a produção e comercialização de material propagativo de oliveira esteja isento de “todos os vírus e organismos semelhantes a vírus”.

A oliveira, como todas as culturas, está sujeita a vários ataques de pragas e doenças, entre os quais estão 15 espécies de vírus de 9 géneros diferentes (Martelli, 2013).

As plantas de oliveira infetadas com vírus por vezes não apresentam sintomas, ou se os apresentam estes podem ser tão variados como, por exemplo, declínio e morte da árvore, queda e deformação das folhas e frutos, cloroses, necrose e baixa capacidade de enraizamento (Félix *et al.*, 2002). Alguns dos vírus que infetam a oliveira encontram também hospedeiros em outras culturas onde causam danos graves e são considerados vírus de quarentena (Félix, 2007; Varanda, 2005). A infeção por vírus em olivais portugueses chega a atingir os 100% das amostras testadas (Varanda *et al.*, 2006), sendo em alguns olivais a infeção com os *Alphanecrovirus Olive latent virus 1* (OLV-1), *Olive mild mosaic virus* (OMMV) e *Betanecrovirus Tobacco necrosis virus D* (TNV-D) de 21% (Varanda *et al.*, 2006).

A utilização de medidas de prevenção é a única maneira de diminuir as infeções virais, no entanto, é indispensável o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sensíveis e confiáveis tanto de deteção como de identificação viral, por forma a certificar o material vegetal obtido como sendo realmente isento de vírus.

1.2 Os vírus na cultura da oliveira

Alterações morfológicas da cultura da oliveira estiveram na origem da primeira alusão a uma ocorrência de infecção viral, em que se notaram árvores com pouco desenvolvimento vegetativo, necrose do floema, anomalias e queda acentuada das folhas levando a um declínio progressivo da árvore (Pesante, 1938; Martelli, 1999), no entanto nenhuma avaliação da sua etiologia foi feita. Material vegetal com os mesmos sintomas descritos anteriormente foi testado recorrendo a ensaios de transmissão, por Flogliani em 1953, no entanto os resultados foram negativos. Vários estudos realizados por Martelli (1999) demonstraram que estes sintomas eram consequência de uma deficiência de boro, a leptonecrose. No Quadro 1 é feita uma referência a doenças com uma possível infecção viral uma vez que eram transmitidas em ensaios de enxertia. Porém, as partículas virais nunca foram observadas nem se conseguiu obter uma transmissão a plantas herbáceas indicadoras (Martelli, 1998 e 1999).

Quadro 1 - Doenças transmitidas por enxertia em oliveira

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

Adaptado de Varanda, 2011

A observação ao microscópio eletrónico de seções ultrafinas de grãos de pólen de oliveira da cv. Corregiolo, em Itália, foi a primeira menção de partículas virais em tecidos de oliveira (Pacini e Cresti, 1977). Até ao momento, já foram isoladas e identificadas em oliveira 15 espécies de vírus pertencentes a 9 géneros diferentes (Martelli, 1999, 2013; Cardoso *et al.*, 2005; Alabdullah *et al.*, 2010) (Quadro 2).

Os primeiros vírus a serem identificados em oliveira foram o *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) e o *Arabis mosaic virus* (ArMV) (Savino *et al.*, 1979). O SLRSV está associado a sintomas como folhas deformadas, ramos com entre-nós curtos e frutos rugosos e com saliências, uma vez que foi repetidamente isolado de árvores da cv. Ascolana tenera com este quadro sintomatológico (Marte *et al.*, 1986). Em Portugal, os mesmos

sintomas do SLRSV foram associados à cv. Negrinha de Freixo (Henriques *et al.*, 1992). A presença de sintomas associados a isolados de SLRSV é variável com o tipo de cultivar de oliveira infetada (Faggioli *et al.*, 2002). Para além dos sintomas descritos anteriormente, este vírus foi também detetado em árvores sem sintomas em Itália (Savino *et al.*, 1979), Portugal (Henriques *et al.*, 1994; Félix *et al.*, 2002) e Espanha (Bertollini *et al.*, 1998).

Quadro 2 - Vírus detetados em oliveira e a sua distribuição geográfica

Vírus	Género	Família	Distribuição geográfica	Primeira Referência
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	<i>Sadwavirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Itália, Portugal, Espanha, Egito, EUA, Líbano, Síria	Savino <i>et al.</i> (1979)
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Itália, Portugal, Egito, EUA, Líbano, Síria	Savino <i>et al.</i> (1979)
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Itália, Portugal, Espanha, Egito, EUA, Líbano, Síria	Savino e Gallitelli (1981)
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Itália, Portugal, Síria	Savino e Gallitelli (1983)
<i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV)	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Itália, Portugal, Espanha, Síria	Savino <i>et al.</i> (1983)
<i>Olive latent virus 1</i> (OLV-1)	<i>Alphanecrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Itália, Jordânia, Turquia, Japão, Portugal, Líbano, Síria	Gallitelli e Savino (1985)
<i>Olive latent virus 2</i> (OLV-2)	<i>Oleavirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Itália, Líbano, Síria	Castellano <i>et al.</i> (1987)
Olive vein yellowing-associated virus (OVYaV)	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	Itália	Faggioli e Barba (1994)
Olive yellow mottling and decline-associated virus (OYMDaV)	<i>Unassigned</i>	<i>Unassigned</i>	Itália	Savino <i>et al.</i> (1996)
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	Itália	Triolo <i>et al.</i> (1996)
Olive semi-latent virus (OSLV)	<i>Unassigned</i>	<i>Unassigned</i>	Itália	Materazzi <i>et al.</i> (1996)
Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)	<i>Unassigned</i>	<i>Closteroviridae</i>	Itália, Líbano, Israel, Egito, EUA, Síria	Sabanadzovic <i>et al.</i> (1999)
<i>Olive mild mosaic virus</i> (OMMV)	<i>Alphanecrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Portugal, Itália	Cardoso <i>et al.</i> (2004)
<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)	<i>Betanecrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Portugal	Cardoso <i>et al.</i> (2009)
<i>Olive latent virus 3</i> (OLV-3)	<i>Marafivirus</i>	<i>Tymoviridae</i>	Portugal, Turquia, Síria, Malta, Líbano, Grécia, Tunísia, Itália	Alabdullah <i>et al.</i> (2009)

Olive vein yellowing-associated virus (OVYaV), Olive yellow mottling and declining-associated virus (OYMDaV) e Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV) estão associados a doenças que demonstram coloração amarela foliar, progressivamente passando a necrótica, seguida de uma intensa desfoliação, clorose dos tecidos vasculares e amarelecimento das folhas, respetivamente (Martelli, 1999). São frequentemente associados a sintomas de fraco vigor ou queda acentuada de folhas o *Arabis mosaic virus* (ArMV)

(Savino *et al.*, 1979), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) (Di Franco *et al.*, 1993). *Tobacco mosaic virus* (TMV) foi detetado em plantas com a doença “vein banding” e o Olive semi-latent virus (OSLV) em oliveiras que demonstravam sinais de clorose das nervuras (Triolo *et al.*, 1996). Em Portugal, o *Olive mild mosaic virus* (OMMV) foi isolado de oliveiras da cv. Galega vulgar com sintomas de mosaico clorótico nas folhas (Cardoso *et al.*, 2005). Os mesmos autores sequenciaram o genoma completo de um isolado de TNV de uma oliveira sem sintomas da cv. Verdeal Alentejana, identificado como TNV-D, isolado português (Cardoso *et al.*, 2009). O *Olive latent virus 1* (OLV-1) foi também isolado e identificado em árvores com amarelecimento das folhas (Savino *et al.*, 1996). O mais recente vírus isolado de oliveira designa-se por *Olive latent virus 3* (OLV-3) e foi descoberto numa árvore aparentemente saudável em Itália (Alabdullah *et al.*, 2009). No entanto, existem outros casos em que as árvores infetadas com os vírus não apresentaram sintomatologia, como acontece com o *Cherry leaf roll virus* (CLRV) (Savino e Gallitelli, 1981), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Savino e Gallitelli, 1983), *Olive latent virus 2* (OLV-2) (Castellano *et al.*, 1987) e *Olive latent virus 1* (OLV-1) (Gallitelli e Savino, 1985; Martelli *et al.*, 1995; Félix e Clara, 1998). OLV-1 foi recolhido de oliveiras que mostravam um quadro sintomatológico caracterizado por plantas pouco vigorosas, com desfoliação e deformação dos ramos, bem como de plantas sem sintomas (Gallitelli e Savino 1985; Martelli *et al.*, 1996; Merciega *et al.*, 1996). Adicionalmente, este vírus pode infetar outros hospedeiros onde foi experimentalmente inoculado, tendo causado necroses locais. Sintomas sistémicos foram manifestados por *Nicotiana benthamiana* e *N. occidentalis*, após a inoculação de todos os isolados de OLV-1 com a exceção do isolado português GM6 que não invade sistemicamente estas plantas hospedeiras (Félix *et al.*, 2005a; Félix *et al.*, 2007).

SLRSV, ArMV, CLRV, SLRSV, TNV-D, TMV e CMV são vírus polífagos e de alta relevância também em outras culturas. OLV-1 foi também isolado em citrinos (Martelli *et al.*, 1996), tulipa (Kanematsu *et al.*, 2001) e tomate (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2011); OLV-2 foi isolado de ricino na Grécia (Grieco *et al.*, 2002) e OMMV foi isolado a partir de tulipas na Holanda (Pham *et al.*, unpublished). Isto obriga a uma visão mais alargada dos vírus, não apenas em contexto de cultura, mas de todo o ecossistema circundante, uma vez que podem ser encontrados noutras plantas as quais apresentam um papel de hospedeiros eventualmente secundários e servem como fonte de inóculo para a cultura da oliveira ou até mesmo para outras culturas onde podem causar graves doenças.

1.3 Importância económica

Não é conhecido o verdadeiro impacto das infeções virais na indústria olivícola (Saponari *et al.*, 2002a). Alguns destes agentes patogénicos são classificados com “organismos de quarentena” e certos países importadores de jovens plantas de oliveira como a Austrália, a Argentina e a China exigem plantas certificadas com a isenção de vírus (Grieco *et al.*, 2000a). Em relação ao SLRSV no caso das cvs. Ascolana tenera e Negrinha de Freixo existem perdas económicas relacionadas com a baixa qualidade dos frutos, uma vez que afetam a homogeneidade e calibre da azeitona com aptidão para conserva e azeitona de mesa (Marte *et al.*, 1986; Henriques *et al.*, 1992).

Estudos preliminares especialmente concebidos para avaliar a importância das infeções virais na capacidade de enraizamento de cinco cultivares revelaram que as estacas provenientes de oliveiras infetadas apresentavam percentagens de enraizamento inferiores às provenientes de oliveiras sem vírus (Serrano *et al.*, 1995). Este aspeto tem particular importância, considerando que esta é a principal forma de multiplicação de material vegetal de oliveira em Portugal.

No caso concreto de CLRV estudos recentes concluíram que tanto a qualidade como a quantidade do azeite virgem resultante de oliveiras infetadas por este vírus apresentavam alterações na qualidade, quando comparado com o produzido a partir de árvores isentas de vírus para as cvs *Frantoio* e *Ascolana tenera*. Azeite proveniente de frutos infetados apresentou valores significativamente menores de K_{232} e K_{270} (indicadores de qualidade do azeite, o seu estado de conservação e modificações ocorridas com o processamento) e teor muito elevado de fenóis totais em comparação com aqueles obtidos a partir de azeitonas sãs. (Godena *et al.*, 2012).

Certamente que as perdas devido a infeções virais são maiores do que aquelas que geralmente se reconhecem. Na verdade, estudos realizados apontam para situações em que plantas infetadas podem produzir metade ou menos do que produzem plantas isentas de vírus (Waterworth e Hadidi, 1998).

1.4 Epidemiologia

A rápida deteção e mitigação dos efeitos dos vírus conduzem a uma maior produção de qualidade da cultura da oliveira. A prática de técnicas culturais de manutenção que

incluam a prevenção, como a remoção de inóculo do terreno e a desinfecção do material de corte utilizado e a utilização de material de propagação isento de vírus, são procedimentos essenciais.

O investimento na investigação da epidemiologia de doenças patológicas, como as causadas pelos vírus, tem sido um recurso importante na melhoria da qualidade da cultura da oliveira. A intensificação da área de olival, bem como a sua forma de produção vem exercer pressão no sentido de se produzir mais e melhores plantas. Em Portugal, tal como em outros países, como a Itália, a alta frequência com que se encontram infeções virais sugerem a grande eficiência com que os mecanismos de disseminação funcionam na natureza (Félix *et al.*, 2002; Saponari *et al.*, 2002a).

Pensa-se que os vírus de oliveira são disseminados na natureza através da utilização de material vegetal contaminado, como a utilização de estacas e plântulas que receberam vírus da planta mãe. Pouco se sabe em relação aos vetores e o seu papel na transmissão viral na cultura da oliveira. Existem, no entanto alguns estudos que nos dão uma indicação de que estes podem também ter um papel preponderante na disseminação viral. Trabalhos realizados por Sabanadzovic *et al.* (1999), Lobão *et al.* (2002), e Alabdullah *et al.* (2009) referem que OLYaV, OLV-1 e OLV-3, respetivamente, podem ser transmitidos por insetos vetores. Uma sequência específica de RNA de OLYaV foi encontrada em *Euphyllura olivina* e em *Pseudococcus* sp. encontrados em plantas infetadas com este vírus, no entanto nenhuma conclusão definitiva foi determinada (Sabanadzovic *et al.*, 1999). OLV-1 foi amplificado com os ‘primers’ específicos de diagnóstico deste vírus (Martelli *et al.*, 1996) em amostras de *Saissetia olea* obtidas de oliveiras infetadas (Lobão *et al.*, 2002), no entanto, não foi comprovada a transmissão em testes com plantas e insetos. Não há indicação que a transmissão viral de OLV-1 possa ser efetuada por vetores biológicos (Félix *et al.*, 2007). Alabdullah *et al.* (2009) testou *E. olivina* e *Saissetia oleae* para a transmissão de OLV-3 sem sucesso. SLRSV pode ser transmitido através de: inoculação mecânica, sementes infetadas, pólen e no solo através de nematodes por exemplo *Xiphinema diversicaudatum* (Kumari, 2009). CLRV e OLV-1 foram identificados em flores e pólen, sendo mostrado que o OLV-1 é passível de ser transmitido por semente (Lobão *et al.*, 2002; Saponari *et al.*, 2002b). O fungo do solo *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang., tem sido encontrado frequentemente em associação de proximidade com as raízes de plantas infetadas com TNV *sensu lato* (*s l*) (Félix e Clara, 2001). Este fungo é conhecido como sendo um vetor do vírus TNV *s l* (Teakle, 1962; Adams, 1991). Existe a possibilidade de que este vírus possa ser também transmitido por *O. brassicae* na cultura da oliveira, dado que no solo onde crescem oliveiras

infetadas com TNV *s l* foi recuperado tanto esporos como partículas virais através de plantas de alface utilizadas como ‘plantas isco’ (Félix e Clara, 2001). A transmissão de OLV-1 através do solo e na ausência de vetores biológicos foi demonstrada em plantas herbáceas, no entanto, verificou-se que a disseminação do vírus apenas se restringe à raiz e não à parte aérea das plantas (Martelli *et al.*, 1996; Félix *et al.*, 2006).

O OLV-1 é facilmente transmitido mecanicamente a plantas indicadoras causando lesões necróticas e pode ser também transmitido pelo solo na ausência de vetores biológicos (Félix *et al.*, 2012).

Em testes *in vitro* quando utilizadas altas concentrações virais na inoculação verificou-se que o OMMV é naturalmente transmitido pelo solo para as raízes de hospedeiros herbáceos (Félix *et al.*, 2006). Quando plantas saudáveis foram colocadas a crescer em vasos onde anteriormente plantas infetadas cresceram, nenhuma transmissão foi observada. Contudo é sugerida uma possível sinergia entre OMMV e OLV-1, uma vez que foi observado que após a colocação de plantas saudáveis a crescer onde anteriormente estiveram plantas infetadas com ambos os vírus estes eram transmitidos às plantas sãs e estas apresentavam sintomas. Neste caso para além de ambos os vírus não permaneceram restringidos às raízes, o OMMV não necessitou de grandes concentrações para infetar a planta, como observado anteriormente (Félix *et al.*, 2006). A avaliação de *O. brassicae* como um possível vetor deste vírus foi desencadeada pelo facto do OMMV partilhar 86% de identidade da sequência de aminoácidos da cápside proteica comparada com o TNV-D (Cardoso *et al.*, 2005) que é conhecido por ser vetorizado por um isolado de *O. brassicae* recolhido de alface (Kassanis e Macfarlane, 1964; Temmink *et al.* 1970). O resultado desta avaliação mostrou que a transmissão de OMMV é altamente facilitada, mais de o dobro das plantas ficavam infetadas, na presença de *O. brassicae* (Varanda *et al.*, 2011). Os mesmos autores observaram que em variantes do vírus que apresentavam certas mutações na cápside proteica, o fungo perdia a função de vetor (Varanda *et al.*, 2011) reforçando o pressuposto de a relação vetor-vírus ser altamente limitada pela compatibilidade com a cápside proteica do vírus.

Existem estudos referentes aos meios de transmissão em outros hospedeiros, que não a oliveira, como é o caso da transmissão do SLRSV, CLRV e ArMV por nemátodes e a transmissão do CMV por insetos (Murant, 1981). A transmissão realizada através de semente ou de pólen de outras plantas foi relatado para os vírus SLRSV, CLRV, ArMV, CMV e TMV (Murant, 1981; Eppler, 1983; Yang *et al.*, 1997; Okapa *et al.*, 2000).

1.4.1 *Alpha- e Betanecrovirus em oliveira*

O anterior género Necrovirus, família *Tombusviridae*, era composto por sete espécies, entre elas encontravam-se o OMMV, OLV-1 e TNV-D. São vírus constituídos por partículas virais esféricas com cerca de 28 nm que encapsidam aproximadamente 3,7 kb de RNA genómico, cuja molécula é uma cadeia simples e de sentido positivo (van Regenmortel *et al.*, 2000; ICTV, 2011).

No entanto, e tendo em conta as diferenças nas polimerases entre os membros do anterior género necrovirus foi necessário separá-los em dois novos géneros: *Alpha-* e *Betanecrovirus*. Desta forma, OMMV e OLV-1 foram inseridos no género *Alphanecrovirus* e TNV-D no *Betanecrovirus*. (ICTV, 2011).

Isolados da espécie OLV-1 foram pela primeira vez detetados em oliveiras por Gallitelli e Savino (1985), mas a sua sequência genómica foi determinada por um isolado obtido de citrinos na Turquia, com isto foi possível classificar-se como sendo uma espécie do género Necrovirus, (Grieco *et al.*, 1996). Posteriormente um isolado de OLV-1 obtido de oliveira foi completamente sequenciado e caracterizado (Félix *et al.*, 2005). OMMV e TNV-D foram identificados e caracterizados molecularmente por Cardoso *et al.*, em 2005 e 2009, como vírus presentes em oliveiras, respetivamente. Estes vírus partilham características genómicas interessantes e ocorrem frequentemente em conjunto nos olivais portugueses (Félix *et al.*, 2012).

1.4.1.1 *Olive latent virus 1*

O vírus OLV-1 pertence ao género *Alphanecrovirus*, família *Tombusviridae* já identificado em oliveira, citrino, tília e tomate (Felix *et al.*, 2005; Gallitelli e Savino, 1985; Grieco *et al.*, 1996; Hasów-Jaroszewska *et al.*, 2011; Kanematsu *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 1994).

O isolado de OLV-1 de oliveira (GM6), consiste numa molécula de RNA de cadeia simples e de sentido positivo 3702 nts ('Accession number': DQ083996), sendo três nucleótidos maior do que os isolados de citrino e tomate ('Accession numbers': NC_001721 e GU326337, respetivamente). Existe semelhança na organização genómica dos três isolados, sendo que contêm cinco grelhas de leitura aberta (Open reading frames - ORF's)

que codificam cinco proteínas. As estratégias aplicadas na expressão genômica incluem a supressão do codão stop, sobreposição de ORFs e RNAs mensageiros subgenômicos (Figura 1) (Félix *et al.*, 2012).

A ORF1 começa no primeiro codão AUG e segue uma sequência 5' na posição 61 que se estende até ao codão de terminação na posição 666. Esta sequência codifica um polipéptido com uma massa molecular estimada em 23 kDa (p23). A leitura contínua ('read through') do codão de terminação 'amber' da ORF1 gera um produto de 82 kDa (p82). Tanto o p23 como o p82 são expressos diretamente do RNA genômico e são indispensáveis para a replicação viral, como demonstrado por estudos de mutagênese dirigida (Pantaleo *et al.*, 1999). ORF 2 e 3 codificam dois pequenos péptidos com 8 kDa (p8) e 6 kDa (p6), respetivamente. Estes estão envolvidos no movimento do vírus célula-a-célula e no movimento sistémico (Pantaleo *et al.*, 1999). A ORF 4 ocupa a extremidade 3' do genoma e codifica a CP com um tamanho de 30 kDa. Para além da sua função na formação da CP, p30 parece assistir na disseminação sistémica do isolado de critinos em plantas *N. benthamiana*, como mostrado em estudos de mutagênese dirigida (Pantaleo *et al.*, 2006).

1.4.1.2 *Tobacco necrosis virus D*

Utilizando um antisoro de largo espectro foi possível identificar o TNV *s l* de entre vários isolados mecanicamente transmissíveis de oliveira com base em testes serológicos aplicados a preparações de vírus purificado (Félix e Clara, 2002). Este antisoro comercial consiste numa mistura artificial de antissoros que lhe confere o largo espectro de atuação para cada um dos seguintes antigénios: TNV-A (Kassanis), PV180; TNV-A type (tomato); TNV (apple); TNV (bell pepper), PV 197; TNV (cherry); TNV Grogan, PV 198; TNV-D (Kassanis), PV192; TNV-D (soil, Germany), PV 219; TNV-E (Aschersleben); TNV (Paul), PV 218 e TNV (tulip), PV 44. Estes vírus distinguiram-se no passado pela amplitude de hospedeiros e apresentarem a capacidade de suportar a replicação de vírus satélite. Mais tarde, o uso de testes sorológicos levou a agrupar os TNV's baseado nas epítopes da CP (Babos e Kassanis, 1963).

A sequência completa do genoma do TNV-D^P apresenta um comprimento de 3761 nts de comprimento (FJ666328), e identidade em 94,8% da informação genética com a da estirpe inglesa TNV-D e 82,9% com a da estirpe húngara TNV-D^H (NC_003487), enquanto

que a identidade de informação genética é inferior a 50% em relação ao genoma de outros necrovírus (Cardoso *et al.*, 2009). É esperado que a espécie TNV-D apresente seis ORFs (Figura 1), como é detetado nos isolados inglês e húngaro. A ORF1 começa no lugar 39 na sequência de nucleótidos e termina no lugar 647 codificando um péptido com 202 aa e 22 kDa (p22). A leitura contínua do codão terminação, localizado no 645-647 até ao 725 nt, gera uma proteína com 725 aa com 82 kDa, identificada como sendo RdRp (p82) (Cardoso *et al.*, 2009). As ORFs 2,3 e 4 codificam pequenos péptidos com cerca de 7 kDa designado por p7₁ (62 aa), p7a (65 aa) e p7b (66 aa) respetivamente, os quais estão associados aos movimentos virais de célula-a-célula. A ORF5 codifica, por sua vez, uma proteína com 29 kDa com 268 aa, identificada como sendo a CP do vírus, já que contem a sequência ‘S’ característica de vírus de plantas icosaédricos (Cardoso *et al.*, 2009). Os mesmos autores verificaram que os três isolados de TNV-D, o português, o inglês e o húngaro, apresentam uma notória capacidade de conservação da sequência genética, apesar da diferente localização geográfica e hospedeiros dos vários isolados.

1.4.1.3 *Olive mild mosaic virus*

OMMV é o mais recente *Alphanecrovirus* e foi caracterizado por Cardoso *et al.* (2005). Inicialmente foi identificado como TNV *s l* por reações serológicas usando um antisoro de largo espectro (TNV ‘broad range’ da Loewe Phytodiagnostic, Alemanha) (Louro, 2004) e como TNV-D pela sequenciação apenas do gene da cápside proteica viral (Cardoso *et al.*, 2004). Mas com a sequenciação do restante genoma verificou-se ser diferente do TNV-D, tendo sido proposto como uma nova espécie (Cardoso *et al.*, 2005).

O OMMV (AY616760) tem aproximadamente 3683 nts e 5 ORFs (Figura 1). A ORF 1 tem início no codão AUG na posição 60, termina no codão terminação UAG na posição 666 e codifica um polipéptido com 202 aa e uma massa molecular de 23 kDa (p23). A ORF 2 resulta da leitura contínua do codão terminação da ORF 1 até ao codão terminação seguinte 2232 – 2234 codificando um polipéptido com massa molecular de 82 kDa (p82) identificado como sendo RdRp. Na zona central do genoma encontram-se as ORF 3 e ORF 4. A primeira sobrepõe-se à ORF 2 em 17 nts e situa-se entre os nucleótidos 2218 e 2439, codificando um polipéptido com 73 aa e com massa molecular de 8 kDa (p8). A segunda está entre os nucleótidos 2443 e 2613, com capacidade para codificar um polipeptídeo com

56 aa e massa molecular de 6 kDa (p6) (Cardoso *et al.*, 2005). A ORF 5, situada entre os nucleótidos 2636 e 3443, próximo da extremidade 3' do RNA viral, codifica um polipéptido com 269 aa e massa molecular de 29 kDa (p29), identificado como sendo a cápside proteica viral (Cardoso *et al.*, 2004).

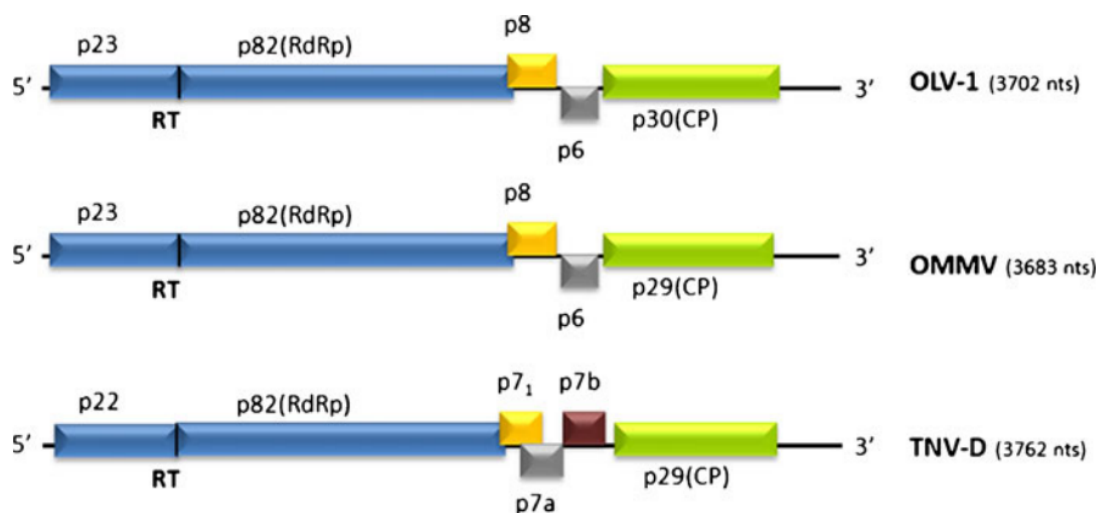


Figura 1 - Estrutura genômica dos Alpha- e Betanecrovirus (OLV-1: Olive latent virus 1; OMMV: Olive mild mosaic virus; TNV-D: Tobacco necrosis virus D). ORF's são representadas por caixas com os tamanhos das proteínas que originam indicados acima ou abaixo. RT: 'read through'; RdRp: polimerase de RNA dependente de RNA; CP: Cápside Proteica (Adaptado de Varanda, 2011)

Com base na sequência deduzida de aminoácidos da CP, o OMMV mostrou ter 86,2% de identidade com a CP do TNV-D e 40,7% com a do OLV-1 (Cardoso *et al.*, 2004). A RdRp de OMMV revelou uma identidade elevada, 91,2%, com a RdRp do OLV-1 e muito baixa com o do TNV-D, de 33,6%. A p6 e p8 do OMMV mostraram uma elevada identidade com as homólogas do OLV-1 (Cardoso *et al.*, 2005). Devido à alta identidade de sequências genômicas com as dos outros dois vírus, estes autores propuseram que a origem de OMMV pode ter resultado de um evento de recombinação ocorrido durante a replicação simultânea de TNV-D e OLV-1 numa célula hospedeira.

Estudos recentes demonstraram que uma única mutação na sequência de aa da cápside proteica numa variante de OMMV foi suficiente para que a especificidade da ligação entre vírus e fungo fosse comprometida (Varanda, 2011). Testes de transmissão realizados *in vitro* com variantes mutantes naturais, demonstraram que uma substituição na sequência de aa, de Asn para Tyr na posição 189 nas subunidades da cápside proteica de OMMV, foi a

responsável pela redução da transmissão viral pelo fungo, devido à fraca ligação entre vírus e vetor, causada pela alteração da configuração da CP do vírus impedindo o reconhecimento pelo zoósporo do fungo (Varanda, 2011). A sequência de aminoácidos dos vírus TNV-D e OLV-1 permite observar que o aminoácido na posição correspondente ao aa 189 da CP OMMV não é em nenhum dos casos a Asn (figura 2), aa que se revelou essencial na ligação de OMMV ao fungo vector *O. brassicae*.

OMMV	173	TFPPYAGYGG	ASALNSNSSG	GESLVSTLDT	NRVDKKWYST	IGNAAFTALT	SIDKNQFCPA	232
TNV-D	172	TFPPYAGYGG	ASALNHKGSG	GESLVSTLDT	NRVDKRWYST	IGNAAFTALT	SIDKNQFCPA	231
OLV-1 (GM6)	174	TFPPYAGYDG	AMALSSFGNI	PGMVVVDVDC	ARMDKLWYPN	VTLATFLAMA	TNIQNGYCGV	233

Figura 2- Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da CP dos isolados virais de OMMV, TNV-D e OLV-1. A posição 189 da CP do OMMV está a negrito (Félix, 2005a)

1.5 Transmissão de vírus

Os vírus podem ser transmitidos por semente, pólen e material vegetativo infetado, mas a transmissão viral em plantas ocorre predominante através de vetores como os artrópodes, nematodes, fungos e ‘plasmodiophorids’. (Gray e Banerjee, 1999; Rochon *et al.*, 2004; Andret-Link e Fuchs, 2005; Ng e Falk, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008; Raccah e Fereres, 2009). Para garantir o sucesso da transmissão viral, e por conseguinte a sobrevivência e manutenção da espécie, os vírus necessitam em alguns casos de vetores para ultrapassar a cutícula, para serem transportados entre hospedeiros e para proteção na ausência de hospedeiros adequados (Hull, 2002; Andret-Link e Fuchs, 2005; Raccah e Fereres, 2009).

Os vírus dentro de um mesmo género, salvo poucas exceções, são transmitidos por vetores semelhantes (por exemplo *Potyvirus* são transmitidos por afídios) (Ng *et al.*, 2004). De entre várias características, uma que intervém na transmissão é o reconhecimento entre a partícula viral e o local de retenção no vetor (Brown e Weislher, 1998), demonstrando que um vírus pode ser transmitido por uns vetores e não por outros, e por conseguinte que a transmissão viral requer um nível de especificidade (Andret-Link e Fuchs, 2005). Este facto sugere que o grande fator de especificidade aqui retratado é a cápside proteica (Hull, 2002), e explica porque vírus dentro de um mesmo género são normalmente transmitidos pelo

mesmo tipo de vetor, uma vez que a sequência da CP tem sido considerado o critério mais relevante na taxonomia viral (van Regenmortel *et al.*, 2000). A transmissão é também facilitada por componentes codificados pelo vírus conhecidos como ‘componentes ajudantes’ / ‘helper components’ (Rochon, 2007).

Várias etapas consecutivas caracterizam o processo de transmissão viral. Primeiramente ocorre a aquisição de vírus de uma fonte de inóculo; retenção estável do vírus em locais específicos através da ligação a recetores no potencial vetor; libertação do vírus do vetor para o local de infeção num hospedeiro suscetível (Andret-Link e Fuchs, 2005; Rochon, 2007). Tendo como base estes princípios, existem diferentes modos de transmissão mediada por vetores (Gray e Banerjee, 1999; Hull, 2002; Rochon, 2007). Watson e Roberts (1939) propuseram os termos “não persistente” e “persistente” consoante o tempo de aquisição do vírus, duração da retenção do vírus ao vetor, de minutos a horas ou de horas a tempo indeterminado, respetivamente. Vírus “semipersistentes” são todos aqueles que demonstram encontrar-se numa situação intermédia. Os vírus não persistentes e semipersistentes são referidos como ‘não circulativos’ já que o seu processo de transmissão não envolve circulação extensiva no trato digestivo ou circulatório do vetor. Os vírus que se replicam no vetor são designados de “propagativos” e os circulativos que não se replicam no vetor de “não propagativos” (Gray e Banerjee, 1999). Apesar de estes estudos terem sido realizados com afídeos, tripses e cicadelídeos, eles aplicam-se à maioria dos artrópodes vetores com armaduras bucais picadoras sugadoras, mas também, a nemátodes, fungos e outros organismos semelhantes a fungos (Rochon, 2007).

1.5.1 A transmissão de vírus por fungos

São conhecidas três espécies de *Olpidium* sp. que apresentam capacidade de transmitirem vírus de plantas. Os fungos do género *Olpidium* são fungos verdadeiros dentro do filo *Chytridiomycota* e os vetores estes são *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae* e *O. virulentus*, tendo o último sido primeiramente e durante muito tempo identificado como sendo *O. brassicae* (Sasaya e Koganezawa, 2006; Rochon, 2007).

Verificou-se que dentro da espécie de *O. brassicae* existiam dois grupos distintos tendo em conta a especificidade do hospedeiro e a capacidade de transmitir determinados vírus de plantas pelo que deveriam ser classificados como espécies distintas. Ao contrário

das que infetam plantas não-crucíferas, a que infeta crucíferas necessita do cruzamento de zoósporos para formar estruturas de resistência (Sahtiyanci, 1962; Koganezawa *et al.*, 2005; Sasaya e Koganezawa, 2006). Com base nestas diferenças foi proposta a divisão de *Pelotrachelus* (= *Olpidium*) *brassicae* em duas espécies distintas, *P. brassicae* para plantas crucíferas e *P. virulentus* para plantas não-crucíferas, mas esta proposta não foi aceite inicialmente (Sahtiyanci, 1962), porém, mais tarde Koganezawa (2005) reformulou a mesma proposta de alteração de nomenclatura.

Tendo em conta a necessidade de se distinguir as espécies de *Olpidium*, foi desenvolvido um teste de PCR multiplex para discriminar as diferenças fiavelmente (Herrera-Vásquez *et al.*, 2009). Após eletroforese em gel do respetivo DNA, foi possível identificar facilmente os diferentes tamanhos de produtos amplificados por PCR: 579 pb para *O. virulentus*, 204 pb para *O. brassicae* e 977 pb para *O. bornovanus*. Desde que foi possível a identificação molecular das espécies de *Olpidium* já se demonstrou: *O. virulentus* como fungo vetor de um dianthovirus causador da doença ‘necrotic streak of fiquê’ (Gonzalez *et al.*, 2010), do *Pepino mosaic virus* (PepMV) (Alfaro-Fernandez *et al.*, de 2010) e de *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV) e *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) (Maccarone *et al.*, 2010). Neste trabalho, *O. brassicae s l* será usado para referir artigos anteriores a 2009, para designar *O. brassicae* e *O. virulentus*.

Olpidium spp. produz zoósporos móveis como meio de dispersão. A estratégia de sobrevivência a longo prazo e por condições adversas consiste na formação de estruturas de resistência (Figura 3).

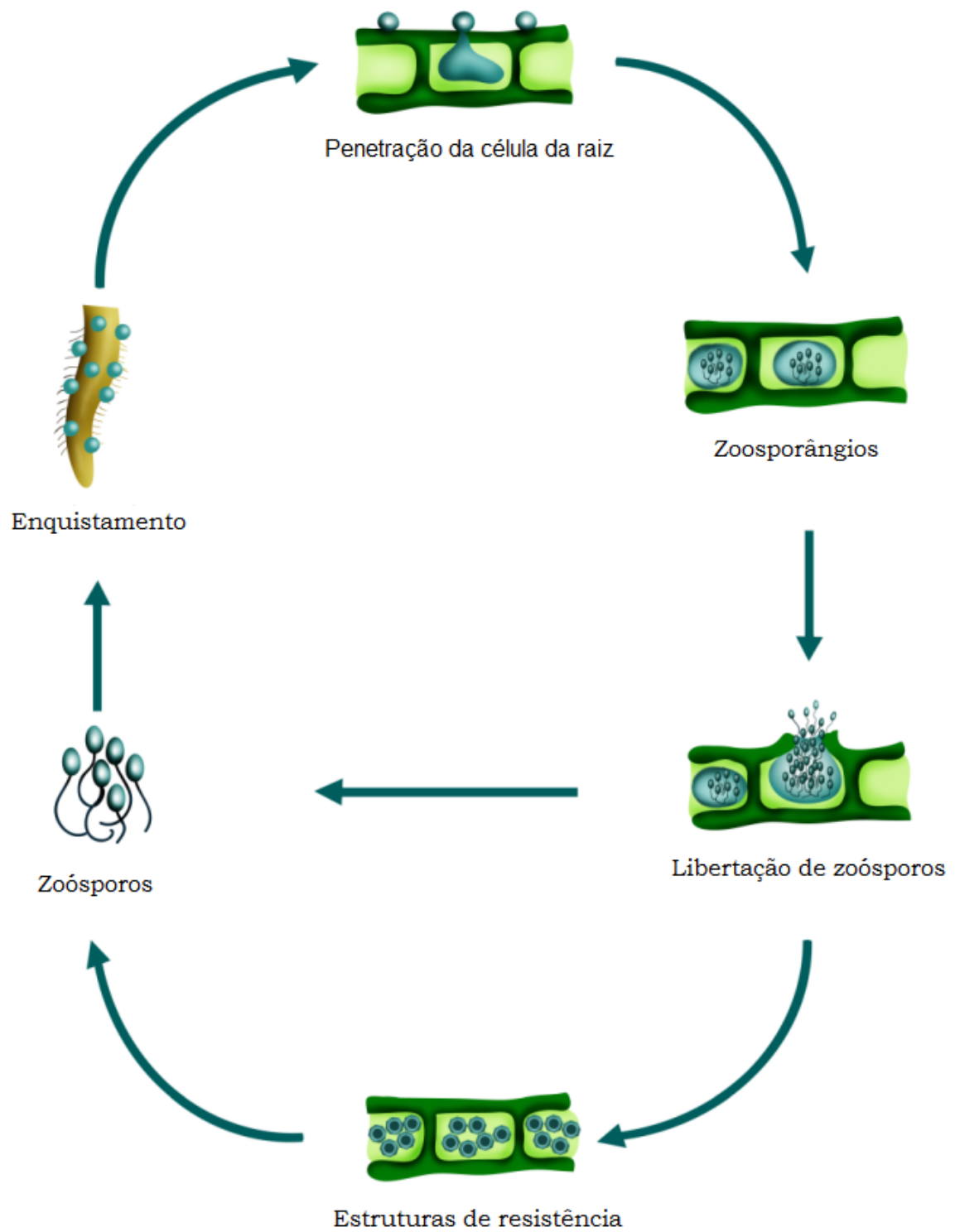


Figura 3 - Esquema do ciclo de vida de *Olpidium* sp. (Adaptado de Varanda, 2011)

O corpo do zoósporo de *O. bornovanus* é elipsoidal e tem cerca de 4,5 por 8 μm , enquanto que o zoósporo de *O. brassicae* s 1 é esférico e apresenta um tamanho de 3,3 por 5,6 μm . Os zoósporos de *O. bornovanus* e de *O. brassicae* s 1 têm um único flagelo posterior

que confere um padrão irregular de nado. Os zoósporos de *O. bornovanus* apresentam um flagelo maior, os zoosporângios são também maiores, e os esporos são lisos em vez de apresentarem forma de estrela (Barr, 1968).

Existem duas fases no processo de infecção por *O. brassicae*, como demonstrado por estudos de microscopia eletrônica (Temminck e Campbell, 1969). Após a aquisição do vírus, que pode ser transportado ou externa (transmissão *in vitro*) ou internamente (transmissão *in vivo*), a fase inicial de enquistamento do zoósporo, aquando da sua aproximação à raiz, envolve a perda do flagelo o qual será 'recolhido' para o interior do zoósporo ou ficará a envolve-lo externamente. Em seguida, o zoósporo secreta uma parede fina exterior (Matthews, 1970; Gibbs e Harrison, 1976). Na segunda fase, cada zoósporo produz vários tipos de enzimas que lhe permitem degradar a parede da célula da raiz mais próxima, penetrá-la sem romper o plasmalema de célula vegetal (Gibbs e Harrison, 1976), e transferir o citoplasma do zoósporo para dentro da célula do hospedeiro (Matthews, 1970) (Figura 4).

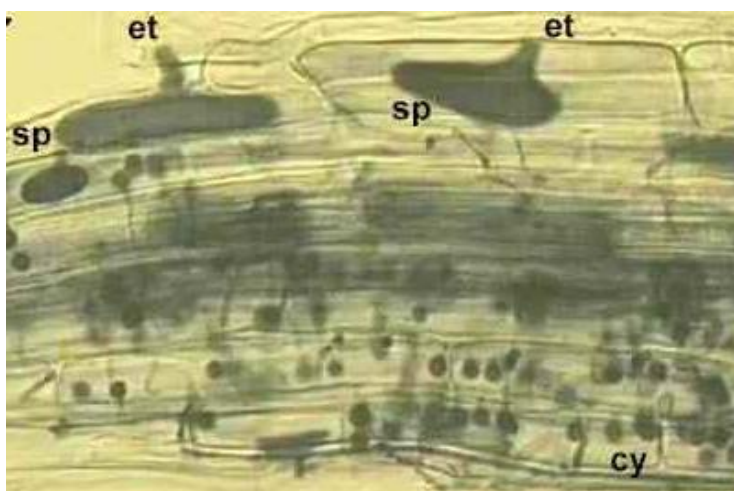


Figura 4 - Observação ao microscópio óptico revelando esporângios (sp) de *Olpidium brassicae* dentro de células da raiz do hospedeiro. Esporângios maduros libertam os zoósporos através de tubos (et). São observados vários quistos (cy) na raiz (<http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/chytrid.htm>).

Neste processo que é complexo, o plasmalema, o tonoplasto e a membrana exterior do quisto é deixado para trás (Matthews, 1970; Gibbs e Harrison, 1976; Rochon *et al.*, 2004), não entrando na célula vegetal. O citoplasma do quisto vai ser limitado por um novo plasmalema produzido no interior da célula hospedeira, designando-se por 'thallus', e cresce durante um ou dois dias. Desenvolve-se uma parede grossa fora do plasmalema, formando zoosporângios dentro dos quais, mais tarde, se diferenciarão zoósporos. Os zoósporos são depois libertados para o solo através de um tubo formado pelo zoosporângio maduro (Gibbs

e Harrison, 1976) (Figura 4). Os ‘thalli’ podem desenvolver estruturas de resistência, que se libertarão para o solo ou água circundantes à raiz, e podendo permanecer viáveis durante muitos anos.

1.5.2 Relação vetor-vírus

Os vírus transmitidos por *Olpidium* spp. pertencem aos gêneros *Alphanecrovirus*, *Betanecrovirus*, *Tombusvirus*, *Aureusvirus*, *Dianthovirus* e *Carmovirus*, todos pertencentes à família *Tombusviridae*. O modo de aquisição do vírus pelo vetor e a localização do vírus em relação ao esporo permite classificar dois tipos de relação vetor-vírus: *in vitro* e *in vivo* (Campbell e Fry, 1966; Campbell, 1996). Tanto *O. bornovanus* como *O. brassicae s l* transmitem vírus do modo *in vitro*, que abordaremos neste trabalho.

Altas concentrações de partículas de TNV *s l* podem detetar se associadas a um isolado de *O. brassicae* que é vetor eficiente, no entanto nenhuma partícula viral de TNV *s l* é observada quando se incuba com um isolado sem função de vetor (Temminck *et al.*, 1970) sugerindo que diferentes isolados de uma mesma espécie de fungo podem mostrar uma grande variabilidade na capacidade transmissora. Também *O. bornovanus* possui uma relação de especificidade com o *Cucumber necrosis virus* (CNV) do qual é vetor, no entanto este mesmo vírus não possui essa relação com o *O. brassicae* (Stobbs *et al.*, 1982; Kakani *et al.*, 2001; Kakani *et al.*, 2003). A ocorrência da associação entre vírus e vetor é altamente específica e isso reflete as associações biológicas observadas na natureza (Adams, 1991; Campbell, 1996).

Na transmissão *in vitro* ocorre, por parte da raiz de plantas, a libertação independente, quer de zoósporos quer de vírus no meio circundante aquoso ou constituído por solo, seguido pela adsorção do vírus à superfície do zoósporo, no exterior e fora do sistema radicular da planta (Campbell, 1988; Rochon *et al.*, 2004). Para que a transmissão ocorra de forma bem sucedida, ocorrem duas fases separadas: a primeira consiste na adsorção do vírus à membrana e flagelo do zoósporo num curto período de tempo, que pode ir de 5 a 15 min (Temminck *et al.*, 1970; Gibbs e Harrison, 1976) e a segunda fase consiste no ‘arrastamento’ do vírus para dentro da célula da planta para que ocorra transmissão, através

da migração do citoplasma do quisto para o interior da célula hospedeira (Rochon *et al.*, 2004).

Uma vez que neste processo de infecção da planta pelo fungo, a parede exterior e a membrana do zoósporo são deixadas para trás, impõe-se uma questão ainda por esclarecer inequivocamente que se refere ao modo como o vírus adsorvido na superfície do zoósporo consegue entrar no citoplasma da célula da raiz da planta. Uma das hipóteses explica que no momento da retração do flagelo, o vírus entra no protoplasma do fungo, sendo posteriormente transferido para o citoplasma da célula hospedeira (Temminck, 1971; Stobbs *et al.*, 1982; Campbell, 1996). A reforçar esta hipótese existem estudos que retratam a formação de ‘espirais de membranas’ dentro do quisto formado pelo zoósporo após a retração flagelar, na transmissão de CNV por *O. bornovanus* (Stobbs *et al.*, 1982).

Ainda não é bem claro o modo como se dá a transferência do vírus de dentro do protoplasma do fungo para o citoplasma da célula da planta. É possível que esta deslocação ocorra na forma de ácido nucleico viral que poderá atravessar a membrana ficando assim em contacto com o citoplasma da célula vegetal e, uma vez aí começar a replicação viral (Rochon *et al.*, 2004); ou esta transferência ocorre antes da delimitação feita pelo ‘thallus’ a partir da zona de contato entre zoósporo e parede da célula vegetal (Temminck, 1971).

1.6 Objetivos deste estudo

O objetivo principal deste estudo foi determinar em que medida o fungo *Olpidium virulentus* intervém como vetor na transmissão de vírus obtidos de oliveira, TNV-D, OMMV, OLV-1, determinando os níveis de transmissão a plantas de *Brassica pekinensis* na presença e na ausência de zoósporos deste fungo.

Adicionalmente pretendeu-se verificar se a taxa de transmissão nos vírus em estudo é semelhante, ou se pelo contrário, existem diferenças quantitativas na capacidade deste fungo atuar como vetor para cada um dos vírus.

2 Materiais e Métodos

2.1 Origem dos isolados virais

Neste trabalho utilizaram-se três isolados virais já existentes no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade de Évora/ICAAM inicialmente obtidos através de inoculação de extratos de azeitonas de 2 cultivares nacionais de oliveira, Galega vulgar (OMMV e OLV-1) e Verdeal alentejana (TNV-D), em plantas herbáceas indicadoras de vírus. Os isolados virais foram mantidos em plantas herbáceas indicadoras da espécie *Chenopodium murale* no caso de OMMV e TNV-D e de *Nicotiana benthamiana* no caso de OLV-1. As plantas inoculadas foram mantidas em ambiente de temperatura controlada (22-25 °C) e um fotoperíodo de 14h.

2.2 Inoculação mecânica dos isolados virais em hospedeiros herbáceos

Para a inoculação mecânica dos isolados virais foram escolhidas folhas de plantas sintomáticas e que tinham sido previamente inoculadas e que se encontravam congeladas a -20°C.

As folhas sintomáticas foram esmagadas na presença de tampão 0,05 M fosfato de sódio, pH 6,0, e do abrasivo carborundo. O extrato resultante foi inoculado mecanicamente nas folhas de plantas indicadoras.

Os sintomas foram observados passado num período de 3 a 4 dias. No quinto ou sexto dia após a inoculação as plantas foram retiradas dos vasos e congeladas a -20 °C.

2.3 Purificação dos isolados virais

A purificação das partículas virais foi feita a partir de material vegetal das plantas indicadoras *N. benthamiana* e *C. murale* previamente inoculadas com os isolados virais, segundo o protocolo descrito por Félix *et al.* (2005) adaptado. Para isso utilizaram-se 150 g de plantas infetadas com cada um dos vírus OLV-1, TNV-D e OMMV, e que apresentavam

sintomas. A homogeneização do material vegetal foi feita na presença de tampão 0,1 M fosfato de sódio pH6,0, na proporção de 1:3 (p/v) e 1% de ascorbato de sódio. O homogeneizado obtido foi passado por uma gaze humedecida para um copo de forma a retirar os compostos mais grosseiros das plantas e posteriormente colocado em banho de gelo sob agitação. Ao volume obtido foram adicionados 10% de clorofórmio e butanol na proporção de 1:1 e deixado a agitar durante 30 min.

Após a homogeneização passou-se à fase de clarificação, em que o homogenado foi transferido para tubos de centrífuga de alta velocidade e centrifugado a 10000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante recolhido foi distribuído e equilibrado em tubos e ultracentrifugado a 150000 g durante 2h a 4°C. Descartou-se o sobrenadante deixando secar ligeiramente o precipitado, depois este foi ressuspense em cerca de 1 mL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0.

A ressuspensão obtida foi sujeita a um ciclo de centrifugação diferencial, primeiro a 12000 g durante 25 min a 4°C e o sobrenadante resultante a 150000 g durante 2h. O precipitado obtido foi ressuspense com 300 µL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH6, e deixado durante a noite a 4°C.

A ressuspensão final foi sujeita a uma centrifugação a 15700 g durante 5 min, seguindo-se uma ultracentrifugação a 150000 g durante 40 min em gradientes de densidade de sacarose (10% a 40% de sacarose em tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0). A banda de dispersão de luz correspondente à zona de sedimentação de vírus foi visualizada sob um foco de iluminação e retirada lateralmente por perfuração com uma agulha e seringa. Por fim, as partículas virais foram concentradas por ultracentrifugação a 186000 g durante 4 h e ressuspensas em 300 µL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0.

2.3.1 Proveniência e identificação molecular de *Olpidium virulentus*

Neste trabalho foi utilizado um isolado resultante de esporo único de *O. virulentus* já existente no Laboratório de Virologia Vegetal da Universidade de Évora/ICAAM.

Na recuperação e manutenção de *Olpidium* foram utilizadas plântulas de couve chinesa (*Brassica pekinensis*) a crescer em ambiente controlado entre 16 a 22 °C com 14 h de fotoperíodo. O isolado de esporo único existente no laboratório de Virologia Vegetal era

proveniente de um campo de produção hortícola situado na Póvoa do Varzim, no norte de Portugal.

A distinção de duas das espécies de *Olpidium* (*O. brassicae* e *O. virulentus*) com base na morfologia não é possível devido à enorme semelhança das suas estruturas pelo que a espécie foi confirmada neste trabalho com recurso à identificação molecular, utilizando testes de Reação em cadeia da polimerase (PCR), em que se utilizaram ‘primers’ específicos, desenhados por Herrera-Vasquez *et al.* (2009). Os controlos positivos utilizados nestas reações de PCR foram gentilmente cedidos por Herrera-Vásquez (Universidad Politécnica de Valencia, Espanha).

2.3.1.1 Extração e quantificação de DNA do fungo

Precedentemente à recolha de zoósporos de plantas de couve, estas foram deixadas sem rega durante três dias, de modo a induzir algum *stress* hídrico. Após a primeira fase, as raízes das plantas foram colocadas em água destilada durante 30 min, o que permitiu a recolha de uma suspensão contendo zoósporos. A suspensão foi depois filtrada recorrendo a papel Whatman No 4 e posteriormente centrifugada a 1000 g por 10 min. O precipitado resultante foi ressuspenso em água destilada esterilizada e a quantidade de zoósporos foi determinada através de uma câmara de contagem Fuchs-Rosenthal (como descrito em 2.4). Cerca de 5×10^6 de zoósporos foram lisados e o DNA total foi extraído recorrendo ao DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), seguindo o procedimento do fabricante.

A quantificação do DNA extraído de fungo foi determinada recorrendo a um espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific).

2.3.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A confirmação da espécie de fungo *O. virulentus* foi realizada por PCR utilizando os ‘primers’ diretos específicos OLPvirF e OLPbraF, para *O. virulentus* e *O. brassicae*, respetivamente e o ‘primer’ reverso OLPR comum a ambas as espécies de *Olpidium* (Herrera-Vasquez *et al.*, 2009)

Para a reação de amplificação foram usados 10 ng de DNA de fungo, ao qual se juntaram 1X tampão Dream Taq (ThermoScientific), 0,2 mM dNTP's, 0,2 μ M de cada um dos 'primers' e 2,5 U de enzima DreamTaq DNA Polimerase (ThermoScientific), num volume total de 50 μ L. A reação foi realizada num termociclador MyCycler (BioRad) programado para 5min iniciais de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 45s, 55°C durante 1min e 72°C durante 10 min.

Os produtos resultantes da amplificação foram separados por eletroforese em gel de 1% agarose em tampão TBE 1x (0,1 M Tris, 0,09 M ácido bórico, 1mM EDTA, a pH 8,4) a 80V e corados com 0,2 μ g mL⁻¹ de brometo de etídio e observados num transiluminador com lâmpadas UV SXT-20.M (Uvitec). Os produtos de amplificação esperados eram de 579 pb para *O. virulentus* e de 204 bp para *O. brassicae*. Para estimativa da massa molecular, foi utilizado como marcador o DNA Ladder 1kb plus (Invitrogen).

2.4 Quantificação de vírus e fungo

Para a quantificação de cada um dos três vírus recorreu-se a um espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific) tendo-se aplicado a relação referida por Babos e Kassanis (1963) em que 1mg/mL de vírus apresenta uma absorvância entre 5,0 e 5,5 D.O., no comprimento de onda de 260 nm.

Por forma a determinar a quantidade de zoósporos presentes estes foram contados numa camara de Fuchs-Rosenthal. A quantidade de zoósporos existentes numa quadrícula corresponde à quantidade existente em 200 μ l. Para este trabalho determinou-se a quantidade de 1×10^6 de zoósporos como sendo a quantidade referência utilizada nos ensaios de transmissão realizados neste trabalho.

2.5 Ensaios de transmissão

Para avaliar a capacidade de transmissão de vírus pelo fungo *O. virulentus* foram realizados ensaios de transmissão para cada um dos vírus isoladamente e em associação a zoósporos do fungo.

Nestes ensaios foram utilizadas diferentes quantidades dos vírus OMMV, TNV-D e OLV-1 (Quadro 3). Para avaliar a capacidade de transmissão dos vírus na ausência de vetor, estes foram colocados individualmente em 10 mL de água, tendo-se depois distribuído 1 mL dessa suspensão por 10 copos de 100 mL, que continham plântulas de couve com 5 dias pós-germinação crescendo em substrato estéril, composto por uma mistura de areia e vermiculite na proporção de 2:1 (v/v).

Quadro 3 – Concentrações de vírus usados nos ensaios de transmissão na ausência e na presença de zoósporos de *O. virulentus*

Concentrações (ug/mL)	OMMV	OMMV + fungo	OLV-1	OLV-1 + fungo	TNV-D	TNV-D + fungo
0,07				X		
0,13	X	X	X	X		
0,26	X	X	X	X	X	
0,5	X	X	X	X	X	X
1	X	X	X			
2	X		X	X	X	X
3	X		X	X	X	
5	X		X	X	X	X
7	X		X			
10	X		X	X	X	
15	X		X	X	X	
17					X	
20	X		X			
25			X		X	
30			X		X	X
50	X		X	X	X	X
65			X	X	X	X
70			X	X	X	
75			X	X	X	
90					X	X
110					X	X
150					X	X
200					X	
250					X	X
500						X

Para avaliar a capacidade de transmissão do vírus pelo fungo *O. virulentus*, foram utilizadas as quantidades de vírus referidas no Quadro 3, aos quais se juntaram zoósporos do fungo, numa concentração de 1×10^6 zoósporos mL^{-1} . Esta mistura foi deixada a incubar

durante 20 min de modo a permitir a ligação do vírus ao fungo e de seguida foi aplicada nos copos como já descrito.

Após 6 dias, as plantas foram colhidas e as raízes foram cuidadosamente lavadas com uma solução de SDS a 1% para desnaturar e remover as partículas virais adsorvidas à superfície da raiz. De seguida, foram lavadas abundantemente com água e testadas por DAS-ELISA (como descrito em 2.6) para avaliar a presença viral dentro das células das raízes das plantas.

2.6 Teste DAS-ELISA (Double antibody sandwich-enzyme immunosorbent assay)

DAS-ELISA é um teste de diagnóstico e o procedimento experimental realizado neste trabalho foi feito de acordo com o desenvolvido pela empresa Loewe-Phytodiagnostica. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 alvéolos e de fundo plano (C.E.B. France). Todas as amostras, incluindo os controlos positivos e negativos, foram duplicadas na placa por forma a obter-se a maior fiabilidade possível dos resultados.

O primeiro passo neste procedimento passou pela cobertura dos alvéolos com 200 µl de uma solução de IgG simples diluída em tampão de cobertura (0,015M Na₂CO₃, 0,035M NaHCO₃, pH 9,6) na proporção de 1:200. As placas foram posteriormente colocadas numa estufa onde incubaram a uma temperatura de 37°C durante 4 h. Depois da incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem (0,137 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCL e 0,05% Tween 20, pH7,4) durante 3 minutos, tendo esta operação sido repetida 3 vezes. Em cada uma das lavagens as placas foram secas em papel absorvente.

Cada amostra de planta testada consistiu em cerca de 0,5 g de tecido vegetal proveniente de raízes de plântulas de *Brassica pekinensis*, que foram maceradas, num almofariz de porcelana em presença de tampão de extração (2% PVP MW 40000, 0,2% BSA em tampão de lavagem, pH 7,4) e centrifugadas a 8000 g durante 8 min, de modo a clarificar o extrato. Cada uma das amostras, foi colocada nos respetivos alvéolos 190 µl e deixada a incubar durante a noite a 4°C em caixas de plástico. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens de 3 min cada como descrito anteriormente.

Seguidamente colocou-se 190 µl de IgG conjugada com o enzima fosfatase alcalina diluído em tampão do conjugado (o mesmo utilizado para tampão de extração) na proporção

de 1:200. As placas foram depois a incubar a 37°C durante 4 h. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos como descrito anteriormente.

Para a revelação, colocaram-se em cada alvéolo, 190 µL de substrato enzimático p-nitrofenilfosfato (SIGMA), diluído em tampão do substrato (9,7% dietanolamina, 1 mM MgCl₂.6H₂O, pH 9,8) na proporção de 1 mg/mL e incubou-se durante 1 a 2 h à temperatura ambiente. A leitura da reação final foi feita visualmente e num leitor de microplacas Modelo 680 (BIO-RAD), a funcionar num comprimento de onda de 405 nm.

Foram consideradas amostras positivas todas as que apresentavam valores de absorvância iguais ou superiores a 2 vezes a média dos valores dos controlos negativos. Os controlos negativos consistiram em plantas saudáveis, processadas da mesma forma que as amostras, e água destilada esterilizada.

3 Resultados

3.1 Identificação morfológica e molecular de *Olpidium* spp.

As raízes das plantas de couve foram observadas ao microscópio ótico, 2 meses após inoculação com o fungo, para confirmar a sua presença.

Foi possível observar zoósporos de forma esférica que apresentavam um movimento de nado irregular. Por vezes pode ser observado um flagelo nos zoósporos. Observaram-se estruturas redondas, identificadas como zoosporângios, que, quando ocupavam toda uma célula radicular tomavam a forma desta devido à sua parede fina. Por vezes foi observado um tubo a sair dos zoosporângios, identificado como o tubo de saída dos zoósporos. Foram ainda observados esporos de parede grossa e em forma de estrela, identificados como esporos de resistência típicos das espécies de *O. brassicae* e *O. virulentus*.

No entanto, todas as estruturas acima referidas não esclarecem qual a espécie de *Olpidium* observada, embora a forma dos esporos de resistência possa considerar-se, para excluir a espécie *O. bornovanus*, cujos esporos têm uma superfície lisa e não em forma de estrela. Para fazer a diferenciação entre a espécie *O. virulentus* e *O. brassicae* foram usados testes moleculares.

Os 'primers' específicos para *O. brassicae* e *O. virulentus* utilizados nos ensaios de PCR usando o DNA total extraído de raízes das plantas de couve, permitiram a amplificação de um produto com cerca de 579 pb observado após eletroforese em gel de agarose (Figura 5), identificando o isolado como *O. virulentus*.

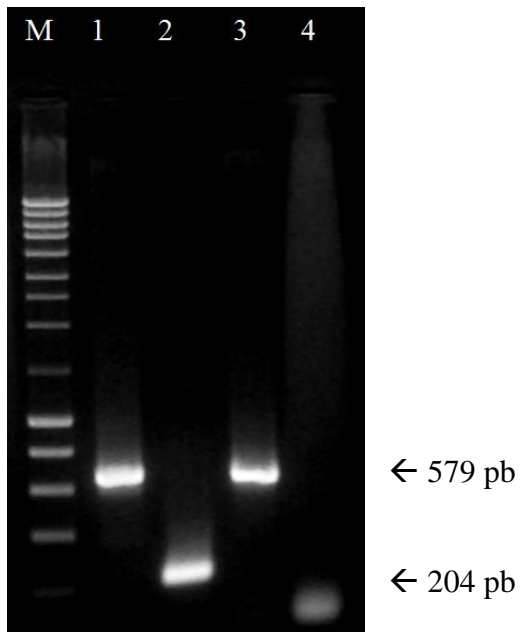


Figura 5 - Produtos obtidos após PCR multiplex utilizando DNA extraído de zoosporos de *Olpidium* sp., com ‘primers’ específicos para *O. brassicae* e para *O. virulentus*, separados em gel de agarose a 1%. M: marcador ‘1 kb plus DNA ladder’ (Invitrogen); 1: *O. virulentus* (controlo positivo); 2: *O. brassicae* (controlo positivo); 3: cultura de esporângio único usada neste estudo; 4: água (controlo negativo). Os tamanhos dos produtos gerados estão indicados à direita.

3.2 Inoculação mecânica de isolados virais em hospedeiros herbáceos

A inoculação do extrato de plantas infetadas com cada um dos vírus, em plantas hospedeiras, provocou a formação de cloroses locais 3 a 4 dias após a inoculação que passavam a necroses ao fim de 5 dias (Figura 6). Os sintomas causados pelos 3 vírus foram semelhantes, no entanto no caso do OLV-1 as lesões, com o mesmo número de dias após inoculação, eram ligeiramente maiores que no caso dos outros vírus, o que pode também ser devido ao facto de ter sido usado um hospedeiro diferente (*N. benthamiana*).

As plantas sintomáticas foram recolhidas cerca de 8 dias após inoculação e conservadas a -20°C até serem usadas para purificação viral.

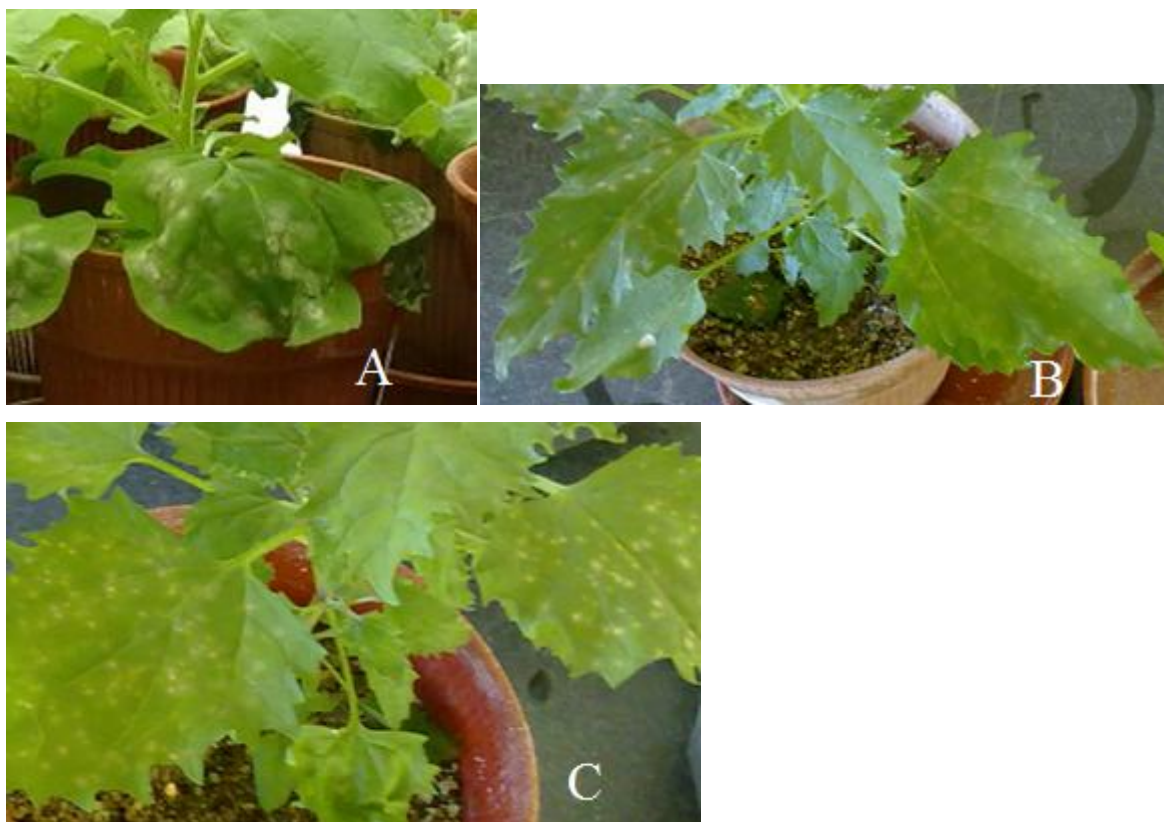
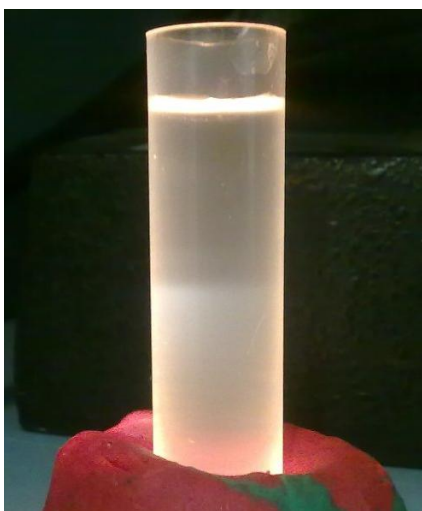


Figura 6 - Sintomas observados em hospedeiros inoculados 4 dias após inoculação com isolados virais; A: OLV-1, B: TNV-D e C: OMMV

3.3 Purificação dos isolados virais

A purificação de partículas virais dos isolados de TNV-D, OMMV e OLV-1 feita a partir de plantas de *N. benthamiana* e *C. murale* infetadas com os respectivos vírus resultou nos três casos, na formação de uma única banda após centrifugação das preparações virais em gradientes de densidade de sacarose (Figura 7). A boa clarificação da preparação resultou da utilização de clorofórmio e butanol como solventes orgânicos.



← Banda formada após sedimentação

Figura 7 - Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de TNV-D. Para o OMMV e OLV-1 a banda obtida foi semelhante à apresentada por esta figura.

De modo geral, 100g de tecido infetado com vírus produziu aproximadamente a mesma quantidade, cerca de 0,3mg de vírus purificado, como observado anteriormente (Félix, 2007; Varanda, 2011).

A inoculação em plantas hospedeiras jovens e saudáveis, usando suspensões de vírus purificados mostrou a presença de sintomas cloróticos e necróticos após 3 a 4 dias da inoculação, demonstrando a preservação da alta infecciosidade das preparações usadas experimentalmente neste trabalho.

3.4 Transmissão viral por *O. virulentus*

Para os ensaios de transmissão viral recorreu-se a uma cultura de esporo único já confirmada neste trabalho como pertencendo à espécie *O. virulentus*. Plântulas de couve contidas em pequenos copos foram inoculadas com os vírus na zona das raízes, com e sem adição de zoósporos de *O. virulentus*, e foram testadas 5 dias após a inoculação para a presença de vírus através do método DAS-ELISA. A eficiência de transmissão foi calculada dividindo o número de amostras (uma amostra corresponde ao conjunto de plântulas contidas num mesmo copo) contendo plantas infetadas, pelo número total de amostras (numero de copos) usadas.

O Quadro 4 representa de uma forma sucinta as concentrações de vírus que originaram resultados relevantes nos ensaios de transmissão na ausência e na presença de zoósporos de *O. virulentus*, como referido no ponto 2.5.

Quadro 4 - Transmissão viral de OMMV, OLV-1 e TNV-D em diferentes concentrações na presença e ausência de zoósporos de *O. virulentus* usando plântulas de couve

Concentração viral ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Eficiência da transmissão (%) ^(a)					
	OMMV	OMMV + fungo	OLV-1	OLV-1 + fungo	TNV-D	TNV-D + fungo
0,13	0	0	0	0	0	0
0,26	0	10	10	10	0	0
0,5	10	30	10	10	10	10
2	50	100	30	30	20	20
50	100	100	60	60	20	20
65	100	100	100	100	30	30
150	100	100	100	100	100	100

(a) Percentagem de amostras (copos) que contêm plantas de couve infetadas por vírus. Dez amostras, cada uma constituída por 10 plantas, foram usadas em cada ensaio de transmissão. Os valores foram consistentes em 3 repetições.

Os resultados dos ensaios de transmissão foram repetidos 3 vezes e demonstram que administrando uma concentração de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OMMV e TNV-D e $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OLV-1, na ausência de *O. virulentus*, cada vírus pode ser transmitido com uma eficiência de 10%, ou seja, em média em 1 das 10 amostras (copos) as plantas estavam infetadas com o vírus. A máxima eficiência de transmissão foi atingida quando foram usadas as concentrações de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OMMV, $65 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OLV-1 e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TNV-D.

Os resultados na presença de *O. virulentus* demonstram que a eficiência de transmissão viral de OMMV na concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ subiu de 50% para 100%

(Quadro 4), sugerindo que a transmissão de OMMV é altamente facilitada na presença de zoósporos de *O. virulentus*. Como é possível observar pelos resultados do mesmo quadro, o nível de transmissão não aumentou na presença de zoósporos de *O. virulentus* para o OLV-1 e o TNV-D, indicando que este fungo não tem um papel de vetor destes dois vírus.

4 Discussão

Os vírus OMMV, TNV-D e OLV-1 são frequentemente encontrados nos olivais portugueses. Estudos anteriores mostraram que também os fungos do género *Olpidium* estão muito disseminados e são vetores de vários vírus (Maccarone *et al.*, 2010; Varanda, 2011). O vírus TNV *s l* foi descrito como sendo transmitido por *O. brassicae* e mais OMMV também mostrou ser transmitido por *O. brassicae* (Varanda *et al.*, 2011). No seguimento destes trabalhos avaliou-se, no presente estudo, se o fungo *O. virulentus* atua como vector daqueles vírus estando assim a contribuir para a sua disseminação.

A espécie de *Olpidium* utilizada neste estudo, *O. virulentus*, foi identificada morfológicamente e molecularmente e é referida na literatura como uma espécie com isolados favoráveis à infeção de plantas não crucíferas, contrariamente a *O. brassicae* que é favorável à infeção de plantas crucíferas (Herrera-Vasquez *et al.*, 2009; Sasaya e Koganezawa, 2006). No entanto, o presente estudo revelou que *O. virulentus* infetou facilmente as raízes da crucífera utilizada, *B. pekinensis*, o que demonstra a necessidade de identificação prévia de isolados destas espécies, não recorrendo exclusivamente aos seus hospedeiros como critério de identificação.

Pelos ensaios realizados sem a presença de zoósporos ficou claro que os três vírus em análise são transmissíveis pelo solo na ausência de vetor biológico no caso desta espécie de hospedeiro. Na ausência de zoósporos foi necessário $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OMMV para atingir 100% da eficiência de transmissão, porém na presença deste vetor apenas $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de OMMV foram suficientes para que a mesma eficiência fosse atingida, mostrando assim que na presença de zoósporos de *O. virulentus* aumenta grandemente a eficiência de transmissão, de OMMV, ao contrário da dos restantes dois vírus. De facto, *O. virulentus* parece ser ainda mais eficaz como vetor do OMMV do que o *O. brassicae*, uma vez que este último necessita de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de vírus para se obter 86% de eficiência de transmissão (Varanda *et al.*, 2011). É também muito importante assinalar que OMMV é o primeiro vírus em que se verificou a transmissibilidade por duas espécies diferentes de *Olpidium*.

Apesar dos mecanismos de transmissão na maioria dos casos ainda não serem completamente compreendidos, já há muito tempo que se conhece que a cápside proteica possui um papel importante na transmissão viral em plantas (Brown *et al.*, 1995; van den Heuvel *et al.*, 1999; Varanda *et al.*, 2011a). Outros estudos recentes sugerem que a interação entre OMMV e *O. virulentus* tenha origem em um reconhecimento entre ligando-recetor

(Kakani *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 1997). Uma vez que OMMV e TNV-D possuem uma identidade de 81% no gene que codifica para a CP seria de esperar resultados semelhantes de transmissão para estes dois vírus, no entanto isso não se verifica. Só com maior aprofundamento sobre o funcionamento dos mecanismos de transmissão será possível relevar mais informação.

Tendo em conta que uma única mutação na posição 189, de Asn para Tyr, da CP do OMMV resultou na ineficiência da ligação entre o vírus e o respetivo vetor (Varanda, 2011) e sabendo que existe uma semelhança de 86,2% com a CP de TNV-D (Cardoso *et al.*, 2004) averiguou-se qual o aa presente na posição 189, verificando-se que na posição homóloga ao OMMV a CP do TNV-D apresenta o aa Lys. Tal pode explicar a não eficiência na ligação entre o vetor e o TNV-D mostrando que o aa Asn pode ser fundamental para a ligação do vírus ao vetor e conseqüente transmissão, ou fundamental na forma como tal mutação afeta a conformação da CP ‘escondendo’, tornando assim indisponível, o ‘sítio’ onde o vírus se liga à CP viral. A sequência de aa da CP de OLV-1 em relação à de OMMV, apresenta uma menor semelhança do que com TNV-D, incluindo na posição 189 que contém o aa Phe. Estas diferenças poderão ser o motivo do não reconhecimento do vírus pelo fungo, impedindo a ligação necessária para que ocorra a transmissão pelo fungo como observado no caso do OMMV.

Sendo o OMMV transmitido por *O. virulentus*, assim como por *O. brassicae*, poderá sugerir-se ser esta a razão pela qual este vírus apresenta os maiores níveis de infeção, de entre os três em estudo, em olivais portugueses (Varanda *et al.*, 2010).

Este estudo contribui para o conhecimento da epidemiologia dos vírus o que é essencial para que se tomem as corretas medidas de prevenção e limitação das doenças por eles causadas. É essencial um constante controlo das condições sanitárias dos de plantas de oliveira de modo a evitar a propagação destes vírus, em especial OMMV que, em associação a *O. virulentus* ou a *O. brassicae* acarreta maiores conseqüências para o estado sanitário da cultura.

5 Referências bibliográfica

- Adams, M. J. (1991). Transmission of plant vírus by fungi. *Annals of Applied Biology*, **118**: 479-492.
- Alabdullah, A.; Elbeaino, T.; Minafra, A.; Digiario, M.; Martelli, G.P. (2009). Detection and variability of *Olive latent virus 3* in the mediterranean region. *Journal of Plant Pathology* **91(3)**: 521-525.
- Alabdullah, A.; Minafra, A.; Elabeaino, T.; Saponari, M.; Savino, V.; Martelli, G.P. (2010). Complete nucleotide sequence and genome organization of *Olive latent vírus 3*, a new putative member of the family *Tymoviridae*. *Virus Research*, **152** (1-2): 10-18.
- Alfaro-Fernandez, A.; Córroba-Sellés, M. C.; Herrera-Vásquez, J. A.; Cebrián, M. C.; Jordá, C. (2010). Transmission of *Pepino mosaic vírus* by the fungal vector *Olpidium virulentus*. *Journal of Phytopathology*, **158**: 217-226.
- Barr, D.J.S. (1968). A new species of *Olpidium* parasitic on cucumber roots. *Canadian Journal of Botany*, **46**: 1087-1091.
- Andret-Link P.; Fuchs., M. (2005). Transmission specificity of plant viroses by vectors. *Journal of Plant Pathology*, **87**:153-165.
- Babos, P. e Kassanis, B., (1963). Serological relationships and some properties of *Tobacco necrosis virus* strains. *Journal of General Microbiology* **32**, 135-144.
- Bertolini, E.; Fadda, Z.; Garcia, F.; Celada, B.; Olmos, A.; Gorris, M.T.; Del Rio, C.; Caballero, J.; Duran-Vila, N.; Cambra, M. (1998). Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma*, **102**: 191-193.
- Brown D.J.F.; Weischer B. (1998). Specificity and complementarity in the transmission of plant viruses by plant parasitic nematodes: an annotated terminology. *Fundamental Applied Nematology* **21**: 1-11.

- Campbell, R.N. (1988). Cultural characteristics and manipulative methods. In: *Developments in Applied Biology 2: Viruses with Fungal Vectors*. Association of Applied Biologists. 153–165.
- Campbell, R.N. (1996). Fungal transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, **34**: 87-108.
- Campbell, R. N.; Fry., P.R. (1966). The nature of the associations between *Oplidium brassicae* and lettuce big vein and tobacco necrosis viruses. *Virology*, **29**:222-233.
- Cardoso, J.M.S.; Félix, M.R.; Oliveira, S.; Clara, M.I.E. (2004). A *Tobacco necrosis virus D* isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Archives of Virology*, **149**: 1129-1138.
- Cardoso, J.M.S.; Félix, M.R.; Clara, M.I.E.; Oliveira, S. (2005). The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L.. *Archives of Virology*, **150**: 815-823.
- Cardoso, J.M.S.; Félix, M.R.; Clara, M.I.E.; Oliveira, S. (2009). Complete genome sequence of a *Tobacco necrosis virus D* isolate from olive trees. *Archives of Virology*, **154**: 1169-1172.
- Castellano, M.A.; Di Franco, A.; Martelli, G.P. (1987). Electron microscopy of two olive viruses in host tissues. *Journal of Submicroscopic Cytology*, **19** (3): 495-508.
- Castellano, M.A.; Loconsole, G.; Grieco, F.; Di Sansebastiano; G.P., Martelli, G.P. (2005). Subcellular localization and immunodetection of movement proteins of *Olive latent virus I*. *Archives of Virology*, **150**: 1369-1381
- Deacon, J. *The Microbial World: Fungal zoospores II. Chytrids and plasmodiophorids*. Institute of Cell and Molecular Biology, The University of Edinburgh. Consultado a 14 de Janeiro de 2015. Disponível em: <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/chytrid.htm>

- Di Franco, A.; Martelli, G.P.; Russo, M. (1983). An ultrastructural study of *Olive latent ringspot virus* in *Gomphrena globosa*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, **15** (2): 539-548.
- Eppler, A. (1983). Transmission of hop viruses and the role of wild and escaped hops as sources of virus spread. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent*, **48**: 883-892.
- Faggioli, F.; Ferretti, L.; Pasquini, G.; Barba, M. (2002). Detection of *Strawberry latent ring spot virus* in leaves of olive trees in Italy using a one-step RT-PCR. *Journal of Phytopathology*, **150**: 636-639.
- FAO (2014). Consultado a 14 de Janeiro de 2015. Disponível em <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>
- Félix, M.R.; Clara, M.I.E. (2001). Detection of *Tobacco necrosis virus* and of *Olpidium brassicae* in *Olea europaea* L. in soil and in field trees. *Proceedings of 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 40-42.
- Félix, M.R., 2007. Caracterização biomolecular de *Olive latent virus 1* isolado de *Olea europaea* L. Dissertação de Grau de Doutor em Agronomia, Universidade de Évora, Évora, Portugal
- Félix, M.R.; Clara, M.I.; Leitão, F.; Serrano, J. (2002). Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. *Acta Horticulturae*, **586** (2): 721-724.
- Félix, M.R.; Clara, M.I.E. (1998). Características biológicas e bioquímicas da estirpe G1 do Necrovirus *Olive latent virus 1* isolado de *Olea europaea* L.. In: *Actas da 2º Reunião Bienal da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 67.

- Félix, M.R.; Clara, M.I.E. (2002). Two Necrovirus isolates with properties of *Olive latent virus 1* and of *Tobacco necrosis virus* from olive in Portugal. *Acta Horticulturae*, **586** (2): 725-728.
- Félix, M.R.; Varanda, C. M. R.; Clara, M.I.E. (2012). Biology and molecular characterization of necrovirus affecting *Olea europaea* L.: a review. *European Journal of Plant Pathology*, **133**: 247-259
- Félix, M. R., Cardoso, J. M. S., Oliveira, S., & Clara, M. I. E. (2005^a). Viral properties, primary structure and phylogenetic analysis of the coat protein of an *olive latent virus 1* isolate from *Olea europaea* L. *Virus Research*, **108**, 195-198.
- Félix, M.R., Varanda, C.M.R, Cardoso, J.M.S, Clara, M.I.E. (2006). Plant root uptake of *Olive latent virus 1* and *Olive mild mosaic virus* in single and mixed infections. *Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Greece*, 516-517.
- Gallitelli, D.; Savino, V. (1985). *Olive latent virus 1*, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annual of Applied Biology*, **106**: 295-303.
- Gibbs, A.; Harrison, B. (1976). *Plant Virology – The Principles*, Edward Arnold, London.
- Gonzalez, C., Osorio, D.L., Cepero de Garcia, M.C., Sastoque, L., Beltrán, C., Cotes, A.M. (2010). Morphological and molecular characterization of *Olpidium virulentus*, the fungal vector of the Macana virus disease in Colombia. *Phytopathology*, **100**:S42
- Gray, S. M.; Banerjee, N. (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**: 128-48.
- Godena S.; Bendini A.; Giambanelli E.; Cerretani L.; Dermic D.; Dermic E. (2012). *Cherry Leafroll virus*: impact on olive fruit and virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*

- Grieco, F.; Parrella, G.; Vovlas, C. (2002). An isolate of *Olive latent virus 2* infecting castor bean in Greece. *Journal of Plant Pathology*, **84**: 129-131
- Grieco, F., Savino, V. and Martelli, G.P., (1996). Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of *Olive latent virus 1*. *Archives of Virology*, **141**, 825-838
- Grieco, F.; M. Saponari; R. Alkowni; V. Savino; G. P. Martelli (2002^a). Progressi nella diagnosi dei virus dell' olivo. *Informatore Fitopatologico*, **11**, 49-52
- Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Pospieszny, H. (2011). Molecular characterization of the full-length genome of *Olive latent virus 1* isolated from tomato. *Journal of Applied Genetics*, **52**(2): 245-247
- Henriques, M.I.C.; Rei, F.T.; Leitão, F.A.; Serrano, J.F.; Potes, M.F. (1992). Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. I. Immunodiagnosis of *Strawberry latent ringspot nepovirus*. *Phytopathologia Mediterranea*, **31**: 127-132
- Henriques, M.I.C.(1994). Virus diseases of olive: an overlook. *Acta Horticulturae*, **356**: 379-385.
- Herrera-Vásquez, J.A.; Cebrián, M.C.; Alfaro-Fernández, A.; Córdoba-Sellés, M.C.; Jordá, C. (2009). Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological research*, **113**: 602-610.
- Hull, R. (2002). Nomenclature and classification of plant viruses pp.13-45. In: *Plant Virology*. Academic Press, London NW1 7BY, UK.
- Hogenhout S. A.; Ammar E.; Whitefield A. E.; Redinbaugh M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viroses. The annual Review of *Phytopathology*, **46**: 327-359
- ICTV, (2011). Divide the genus Necrovirus into 2 new genera, *Alphanecrovirus* and *Betanecrovirus*

- Kanematsu, S.; Taga, Y.; Morikawa, T. (2001). Isolation of *Olive latent virus 1* from tulip in Toyama Prefecture. *Journal of General Plant Pathology*, **67**: 333-334.
- Koganezawa, H.; Inoue, H.; Sasaya, T. (2005). Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bull. Natl. Agric. Res. Cent. West Reg.*, **4**: 39-59
- Kassanis, B., & Macfarlane, I. (1964). Transmission of *Tobacco Necrosis Virus* by zoospores of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Microbiology*, **36**, 79-93
- Kumari, S. (2009). Detection of *Cherry Leaf Roll Virus* and *Strawberry Latent Ring Spot Virus* by One-Step RT-PCR. *Plant Protect. Sci.*, **45**: 140-143
- Lin, M. T.; Campbell, R. N.; Smith, P. R.; Temmink, J. H. M. (1970). Lettuce big-vein virus transmission by single-sporangium isolates of *Olpidium brassicae*. *Phytopathology*, **60**: 1630-1634
- Lobão, D.L.; Félix, M.R.; Clara, M.I.E.; Oliveira, S.; Leitão, F.A.; Serrano, J.F. (2002). Detection of *Olive latent virus 1* in *Olea europaea* L. tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction. XIII Congresso Nacional de Bioquímica, pp 102.
- Louro, T. J. F. M. (2004). Caracterização de um isolado viral de *Olea europaea* L., produção de anticorpos policlonais específicos, e aplicação de métodos de diagnóstico. Tese de Mestrado Luso-Brasileiro em Gestão e Políticas Ambientais, Universidade de Évora, Évora, 91 pp.
- Maccarone, L. D.; Barbetti, M. J.; Sivasithamparam, K.; Jones, R. A. C. (2010). Molecular genetic characterization of *Olpidium virulentus* isolates associated with big-vein diseased lettuce plants. *Plant Disease*, **94**: 563-569.
- Marte, M.; Gadani, F.; Savino, V.; Rugini, E. (1986). *Strawberry latent ringspot virus* associated with a new disease of olive in central Italy. *Plant Disease*, **70** (2): 171-172.

- Martelli, G.P. (1998). Enfermedades infecciosas y certificación del olivo: Panorama general. *Phytoma*, **102**: 180-186.
- Martelli, G.P. (1999). Infectious disease and certification of olive: an overview. *Bulletin OEPP/EPPO*, **29**: 127-133.
- Martelli, G.P.; Sabanadzovic, S.; Savino, V.; Abu-Zurayk, A.R.; Masannat, M. (1995). Virus-like disease and viruses of olive in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea*, **34**: 133-136.
- Martelli, G.P.; Yilmaz, M.A.; Savino, V.; Baloglu, S.; Grieco, F.; Güldür, M.E.; Greco, N.; Laforteza, R. (1996). Properties of a citrus isolate of *olive latent virus 1*, a new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology*, **102**: 527-536.
- Matthews, R. E. F. (1970). *Plant Virology – Student Edition*. Academic Press, New York.
- Murant, A.F. (1981). Nepoviruses. In: *Plant virus infections* (Ed. by Kurstak, E.), pp. 197-238. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands.
- Ng, J. C.; Tian, T.; Falk, B.W. (2004). Quantitative parameters determining whitefly (*Bemisia tabaci*) transmission of Lettuce infectious yellows virus and an engineered defective RNA. *Journal of General Virology*, **85**: 2697-2707.
- Merciega, V.; D. Boscia; V. Savino (1996). Comparison of five isolates of olive latent virus 1. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**, 1-8.
- Okada, K.; Kusakari, S-i; Kawaratani, M.; Negoro, J-i; T. Ohki, S.; Osak, T. (2000). *Tobacco mosaic virus* is transmissible from tomato to tomato by pollinating bumblebees. *Journal of General Pathology*, **66**: 71-74.
- Pacini, E; M. Cresti (1977). Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, **173**, 1- 4

- Pantaleo, V.; Grieco, A.; Di Franco, G. P.; Martelli (2006). The role of the C-terminal region of *olive latent virus I* coat protein in the host systemic infection. *Archives of virology*, **151**, 1973-1983.
- Pantaleo, V.; Grieco, F.; Castellano, M.A.; Martelli, G.P. (1999). Synthesis of infectious transcripts of *olive latent virus I*: genes required for RNA replication and virus movement. *Archives of Virology*, **144**: 1071-1079.
- Pesante, A. (1938). On an unknown disease of olive. *Bollettino della Stazione di Patologia Vegetale*, Roma, **18**:401-428.
- Pham, K.T.K., Lemmers, M.E.C., van Doorn, J. and Derks, A.F.L.M. (unpublished). Revision of taxonomy of the virus causing Augusta disease in tulips in the Netherlands.
- Phillip, J.M.; Hayman, D.S. (1970). Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscula mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, **55**: 158.
- Poch, O.; Sauvaget, M.; Delarue, N.; Tordo (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO Journal*, **8**, 3867-3874.
- Raccah, B.; Fereres A. (2009). Plant virus transmission by insects. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Rochon, D. (2007). Transmission of plant viruses: Recent insights into molecular aspects of virus-vector interactions. In: *Biotechnology and Plant Disease Management*. CABI, Inc., Canada.
- Rochon, D'Ann; Kakani, K.; Robbins, M.; Reade, Ron. (2004) Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and *Plasmodiophorid* vectors. *Annual Review of Phytopathology*, **42**: 211-241.

- Sabanadzovic, S.; Abou-Ghanem, N.; La Notte, P.; Savino, V.; Martelli, G.P. (1999). Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, **81** (1): 37-45.
- Sahtiyanci, S. (1962). Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. *Arch Mikrobiol*, **41**: 187-228
- Saponari, M.; Savino, V.; Martelli, G.P. (2002b). Trasmissioni per seme dei virus dell'olivo. *Frutticoltura*, 4: 103-105.
- Saponari, M.; S. Murolo; T. El Beaino; V. Savino; G.P. Martelli (2002a). Clonal and sanitary selection of olive in Abruzzo and Apúlia. *Journal of Plant Pathology*, **84**, 194.
- Sasaya, T.; Koganezawa, H. (2006). Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology*, **72**: 20-25.
- Savino, V.; Barba, M.; Galitelli, D.; Martelli, G.P. (1979). Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **18**: 135-142.
- Savino, V.; Sabanadzovic, S.; Sacrito, G.; Laviola, C.; Martelli, G.P. (1996). Due giallumi dell' olivo di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, **5**: 55-59.
- Savino, V.; Gallitelli, D. (1981). *Cherry leafroll virus* in olive. *Phytopathologia Mediterranea*, **20**:202-203.
- Savino, V.; Gallitelli, D. (1983). Isolation of *Cucumber mosaic virus* from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **22**: 76-77
- Serrano, J. M. F.; F. Leitão; M. F. Potes; M. I. E. Clara; F. T. Rei; L. Amaral (1995). Studies on rooting ability of vírus-infected vegetative material of *Olea europaea* L. cultivars. *Olea*, **23**, 37-38.

- Stobbs, L. W.; Cross, G.W.; Manocha, M.S. (1982). Specificity and methods of transmission of cucumber necrosis virus by *Olpidium* radical zoospores. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **4**: 134-142
- Teackle, D.S. (1962). Transmission of Tobacco necrosis virus by a fungus *Olpidium brassicae*. *Virology*, **18**: 224-231.
- Temmink, J., H. M. (1971). An ultrastructural study of *Olpidium brassicae* and its transmission of tobacco necrosis virus. Agricultural University/University of California, Wageningen, The Netherlands/Davis, California.
- Temmink, J.H.M.; Campbell, R.N. (1969). The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. *Canadian Journal of Botany*, **47**: 421-424
- Temmink, J. H. M., Campbell, R. N., & Smith, P. R. (1970). Specificity and site of *in vitro* acquisition of *Tobacco necrosis virus* by zoospores of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Virology*, **9**, 201–213
- Triolo, E.; Materazzi, A.; Toni, S. (1996). An isolate of *Tobacco mosaic virus* from *Olea europaea* L.. *Horticulture Science*, **10**: 39-45.
- Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet C.M.; Bishop D.H.L.; Carstens E. B.; Estes M. K.; Lemon S. M.; Maniloff J.; Mayo M. A.; McGeach D. J.; Pringle C.R.; Wckner R. B. (2000). *Virus Taxonomy*. Academic Press, San Diego, Califórnia, USA
- Varanda, C.M.R. (2005). Avaliação das técnicas de diagnóstico viral baseadas em isolamento de dsRNA e RT-PCR, para certificação de uma colecção de clones da cv. ‘Negrinha de Freixo’ (D.O.) de *Olea europaea* L. Tese de Mestrado em Biologia de Pragas e Doenças das Plantas. Universidade de Évora, 65 pp.
- Varanda, C.M.R.; Félix, M.R.F.; Leitão, F.; Sismeiro, R.; Clara, M.I.E (2006). Application of Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction to screen a collection of clones of *Olea europaea* L. for the presence of necroviruses (*Tombusviridae*).

“8th Conference of the European Foundation for Plant Pathology & British Society of Plant Pathology Presidential Meeting 2006”, Copenhagen, Denmark.

Varanda, C. M. R.; Silva, M. S. M. R.; Felix, M. R.; & Clara, M. I. E. (2011). Evidence of *Olive mild mosaic virus* transmission by *Olpidium brassicae*. *J Plant Pathol*, **130**, 165–172

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

Watson, M. A.; Roberts, F.M. (1939). A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus 3, Potato virus Y and Cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflex* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London. Ser. B* **127**: 543-576.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press. **38**: 315-322.

Yang, Y.; Kim, K. S.; Anderson, E. J. (1997). Seed transmission of *cucumber mosaic virus* in spinach. *Phytopathology*, **87**: 924-931.