



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo de um isolado de *Olive latent virus 1*:**

**I. Caracterização molecular e**

**II. Resposta à presença de bactérias promotoras  
de fitossanidade**

**Helena Isabel Dias Gaspar**

Orientação:

Doutora Margarida Maria Cabral Lages Azevedo Santana

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2014





**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudo de um isolado de *Olive latent virus 1*:**

**I. Caracterização molecular e**

**II. Resposta à presença de bactérias promotoras  
de fitossanidade**

**Helena Isabel Dias Gaspar**

Orientação:

Doutora Margarida Maria Cabral Lages Azevedo Santana

Doutora Carla Marisa Reis Varanda

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2014



*“À memória da minha avó, Maria do Céu dos Santos Gaspar.*

*Eterna saudade.”*



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.







## AGRADECIMENTOS

---

Este trabalho realizou-se no Laboratório de Virologia Vegetal do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas (ICAAM), Unidade de Investigação e Desenvolvimento (I&D) do Departamento de Fitotecnia da Universidade de Évora, localizado no Campus da Mitra, o qual me proporcionou todas as condições para a realização deste projeto experimental.

Em poucas palavras, gostaria de deixar aqui presente os meus agradecimentos às pessoas que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho de dissertação, quer pelo incentivo quer pela disponibilidade e apoio técnico.

À minha orientadora, doutora Margarida Santana, por tudo aquilo que me ensinou, por todo o apoio e incentivo que sempre demonstrou ao longo de todo o trabalho, pelos conselhos, pela paciência e pela dedicação e incentivo ao longo do trabalho.

À minha co-orientadora, doutora Carla Varanda, por toda a amizade, ajuda e prontificação para esclarecer todas as minhas dúvidas e questões, sobretudo pelo grande apoio na realização da parte de virologia vegetal deste trabalho.

Ao diretor do mestrado em Bioquímica, professor Rui Ferreira, por toda a ajuda, incentivo e dedicação que prestou aos alunos do mestrado em Bioquímica do ano letivo 2012/2014.

À professora Maria Ivone Clara, por me ter dado a oportunidade de integrar este projeto no laboratório de Virologia Vegetal, pelo apoio científico e pela simpatia sempre presente durante todo o percurso de trabalho.

À professora Maria do Rosário Félix, por todo o apoio científico e toda a ajuda e dedicação sempre presente ao longo do percurso deste trabalho e pela amizade e simpatia que despontava sempre um sorriso e um rumo melhor aos dias de trabalho.

À doutora Marta Laranjo e ao professor José Manuel Martins pelo apoio científico, pelo incentivo e simpatia que revelaram durante todo o percurso deste trabalho.

À D. Maria Mário Azedo e à D. Luizeta Palma, técnicas do laboratório de Virologia Vegetal, por toda a ajuda em detalhes durante a realização deste trabalho experimental e pela amizade e simpatia que sempre demonstraram.

Aos docentes e equipa do laboratório de Microbiologia do Solo, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao meu colega André Albuquerque por todo o apoio e incentivo que trocámos ao longo deste ano de trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Virologia Vegetal, Mônica Oliveira, Susana Santos, Miguel Landum, Mohamed Salem Zellama e Danielle Martinha, pela disponibilidade, entreaajuda e simpatia.

Aos meus pais e ao meu irmão pela educação, carinho, apoio, compreensão e conselhos. Como pilar da minha vida dão-me razões, força e incentivo para nunca desistir de mim e dos meus objetivos, ultrapassando todos os obstáculos com um sorriso.

Ao Pedro Reis pelo carinho, compreensão e apoio em tudo, quando enxugava as minhas lágrimas nos momentos maus e quando chorávamos a rir nos momentos bons, mas principalmente por estar sempre ao meu lado e nunca me deixar desistir.

Aos meus amigos, por todo o apoio e energia que me transmitem e por não me deixarem ir abaixo nos momentos mais difíceis e de maior aperto.

Este trabalho incidiu na caracterização molecular de um isolado de *Olive latent virus 1* (OLV-1), denominado G1A, obtido de *Olea europaea* L.. O isolado G1A foi transmitido mecanicamente a *Nicotiana benthamiana* na qual produziu necroses locais e sistêmicas. A sequência parcial do genoma do isolado G1A tem 3668 nucleótidos e apresenta elevada identidade com outras sequências de OLV-1 existentes na base de dados. O isolado G1A apresenta a encapsidação de uma pequena molécula de RNA com cerca de 600 nucleótidos, previamente identificada como um RNA satélite (satRNA).

Paralelamente, foi analisada a resposta de *N. benthamiana* à infecção por parte do isolado G1A, na presença de um isolado bacteriano termofílico 18UE/10, este obtido a partir de solo de olival do Alentejo. Esta bactéria é capaz de produzir sulfato e amónio, nutrientes importantes para o crescimento das plantas. As plantas previamente regadas com uma suspensão de 18UE/10 apresentaram sintomas retardados de infecção viral em comparação a plantas controlo. Este resultado foi um exemplo de resistência induzida pelo enxofre, devido ao sulfato produzido pelo isolado bacteriano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias termofílicas, interação planta-vírus, *Olea europaea* L., OLV-1, resistência induzida pelo enxofre, RNA satélite.



### **Study of an isolate of *Olive latent virus 1*: I. Molecular characterization and II. Response to the presence of plant health-promoting bacteria**

This work focused on the molecular characterisation of an isolate of *Olive latent virus 1* (OLV-1), G1A, obtained from *Olea europaea* L.. Isolate G1A was mechanically transmitted to *Nicotiana benthamiana* plants producing local and systemic necrotic symptoms. The partial genome sequence of G1A isolate is 3668 nucleotides and has high identity with the OLV-1 sequences available in GenBank. The G1A isolate shows the encapsidation of a small RNA molecule of about 600 nucleotides, previously identified as a satellite RNA (satRNA).

In addition, the response of *N. benthamiana* plants to G1A infection, in the presence of a bacterial thermophilic isolate 18UE/10 obtained from an olive orchard soil in Alentejo, was evaluated. This bacterial isolate produces sulphate and ammonium, important nutrients for plant growth. The plants that were watered with the bacterial suspension prior to virus inoculation showed delayed symptoms of viral infection when compared to control plants. This result was an example of the resistance induced by sulphur due to the sulphate produced by the bacterial isolate.

**KEY WORDS:** Plant-virus interaction, *Olea europaea* L., OLV-1, satellite RNA, sulphur-induced resistance, thermophilic bacteria.



AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE QUADROS.....	xiii
ABREVIATURAS GERAIS UTILIZADAS .....	xvii
ABREVIATURAS DOS NOMES DOS VÍRUS .....	xxi
ABREVIATURAS DOS CÓDIGOS SIMPLES DOS AMINOÁCIDOS .....	xxiii
<b>CAPÍTULO 1: Introdução Geral</b> .....	<b>1</b>
1.1. A cultura da oliveira .....	3
1.2. Os vírus na cultura de oliveira em Portugal .....	4
1.2.1. Os <i>Alpha-</i> e <i>Betaneocrovirus</i> que infetam a oliveira .....	7
1.2.1.1. <i>Olive latent virus 1</i> .....	8
1.3. Propriedades moleculares e biológicas dos vírus com RNA satélite associado .....	11
1.4. Métodos de diagnóstico viral usados em oliveira.....	12
1.4.1. Testes biológicos .....	13
1.4.2. Análise de cadeias duplas de RNA.....	13
1.4.3. Testes de RT-PCR.....	15
1.5. Interação entre plantas e bactérias .....	17
1.6. Bactérias termofílicas do solo .....	20
1.6.1. Papel e impacto das bactérias termofílicas.....	21
1.7. Metabolismo do enxofre.....	24
1.8. Resistência induzida pelo enxofre.....	25
1.9. Objetivos deste estudo .....	27

<b>CAPÍTULO 2: Materiais e Métodos</b> .....	29
A. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM ISOLADO VIRAL DE <i>OLIVE LATENT VIRUS 1</i> .....	31
2.1. Origem do isolado viral .....	31
2.2. Inoculação mecânica .....	31
2.3. Purificação viral .....	31
2.4. Extração e análise dos ácidos nucleicos .....	32
2.4.1. Extração e visualização do RNA viral e total .....	32
2.4.2. Extração e análise de cadeias duplas de RNA (dsRNA) .....	33
2.5. Amplificação e sequenciação do RNA genómico do isolado viral G1A .....	34
2.5.1. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	34
2.5.2. Otimização da Amplificação por PCR .....	35
2.5.3. Amplificação por PCR .....	36
2.5.4. Clonagem.....	38
2.5.4.1. Vetor plasmídico .....	38
2.5.4.2. Ligação.....	39
2.5.4.3. Transformação .....	39
2.5.4.4. Extração do DNA plasmídico .....	40
2.5.4.5. Restrição dos fragmentos clonados .....	40
2.5.5. Sequenciação .....	41
2.5.6. Amplificação, clonagem e sequenciação das extremidades 5' e 3' do RNA genómico do isolado viral G1A.....	41
2.5.6.1. Síntese do cDNA .....	41
2.5.6.2. Amplificação por PCR .....	43
2.5.6.3. Amplificação por um segundo PCR .....	44
2.5.6.4. Clonagem.....	45
2.5.6.5. Sequenciação .....	45



2.5.7. Otimização das reações de amplificação, clonagem e sequenciação do RNA satélite do isolado viral G1A.....	45
2.5.7.1. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	46
2.5.7.2. Otimização da Amplificação por PCR .....	47
2.5.8. Análise bioinformática .....	48
<b>B. ESTUDO DA RESPOSTA À PRESENÇA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE FITOSSANIDADE .....</b>	<b>49</b>
2.1. Isolamento bacteriano .....	49
2.2. Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciação.....	49
2.3. Material vegetal .....	50
2.4. Ensaio de resposta à presença do isolado bacteriano.....	51
2.4.1. Preparação do inóculo bacteriano .....	51
2.4.2. Preparação do inóculo viral G1A.....	51
2.4.3. Registo de observações.....	52
2.4.4. Análise estatística.....	52
2.5. Quantificação de sulfato .....	53
<b>CAPÍTULO 3: Resultados .....</b>	<b>55</b>
<b>A. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM ISOLADO VIRAL DE <i>OLIVE LATENT VIRUS 1</i> .....</b>	<b>57</b>
3.1. Hospedeiro herbáceo .....	57
3.2. Purificação viral .....	58
3.3. Análise do ácido nucleico viral .....	58
3.4. Análise das dsRNA nos tecidos infetados.....	59
3.5. Caracterização molecular do isolado G1A de OLV-1.....	60
3.5.1. Amplificação e clonagem dos fragmentos e extremidades do RNA genómico .....	60
3.5.2. Sequência nucleotídica do RNA genómico.....	64
3.5.3. Organização do genoma.....	68

3.5.4. Proteínas hipotéticas codificadas no genoma e identidade com as de outros vírus de oliveira.....	69
3.5.4.1. Proteína p82.....	69
3.5.4.2. Proteína p30.....	69
3.5.4.3. Proteínas p8 e p6 .....	71
<b>B. ESTUDO DA RESPOSTA À PRESENÇA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE FITOSSANIDADE .....</b>	<b>72</b>
3.1. Identificação do isolado bacteriano e análise filogenética .....	72
3.2. Produção de sulfato e viabilidade celular a 24°C.....	73
3.3. Ensaio de resposta à presença do isolado bacteriano.....	74
3.3.1. Análise do efeito de resposta à presença do isolado nos ensaios .....	74
3.3.2. Análise da anatomia radicular.....	78
3.3.2.1. Observações macroscópicas .....	78
3.3.2.2. Observações microscópicas .....	79
<b>CAPÍTULO 4: Discussão Geral .....</b>	<b>82</b>
4.1. Caracterização molecular do isolado viral G1A de OLV-1 obtido de oliveira.....	83
4.2. Estudo da resposta à presença de bactérias promotoras de fitossanidade .....	84
4.3. Perspetivas futuras.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
ANEXOS .....	103

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> – Representação da densidade de olival em Portugal, em 2009.....	3
<b>Figura 2</b> – Estruturas do genoma de diversos vírus pertencentes aos géneros <i>Alphanecrovirus</i> e <i>Betanecrovirus</i> (OMMV – <i>Olive mild mosaic virus</i> ; TNV-A – <i>Tobacco necrosis virus A</i> ; BBSV – <i>Beet black scorch virus</i> ; LWSV – <i>Leek white stripe virus</i> ; TNV-D - <i>Tobacco necrosis virus D</i> ). As caixas representam as ORFs que codificam as proteínas. RT – ‘read through’, RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica.....	8
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo da organização do genoma de <i>Olive latent virus 1</i> . As caixas representam as ORFs que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. RT – ‘read through’, RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica. ....	9
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática da interação entre as plantas hospedeiras, os vírus auxiliares, os satRNAs e os vírus satélite, e o mecanismo de silenciamento de RNA do hospedeiro. ....	12
<b>Figura 5</b> – Interações na rizosfera. As plantas são capazes de influenciar a composição e atividade dos microrganismos da rizosfera através da exsudação de compostos que estimulam (setas a verde) ou os inibem (setas de bloqueio a vermelho), e vice-versa. ....	18
<b>Figura 6</b> - Modelo de recrutamento e ativação de microrganismos benéficos pela planta quando infetada. As plantas infetadas percebem a invasão de agentes patogénicos de forma radicular ou aérea e, posteriormente, aumentam a secreção de compostos estimuladores de microrganismos recrutando e ativando microrganismos benéficos da planta. Os microrganismos benéficos podem induzir uma resistência (RI) direta ou indireta pela produção de compostos inibidores de patogénicos. ....	19
<b>Figura 7</b> - Ciclo do enxofre. ....	23
<b>Figura 8</b> – Assimilação de sulfato como plataforma para a biossíntese de compostos de defesa que contêm enxofre, representados nas caixas a verde. 1 – transportadores de sulfato; 2 – ATP sulfurilase; 3 – APS redutase; 4 – APS cinase; PAPS – 3’-fosfoadenililsulfato; 5 – sulfito oxidase; 6 – sulfito redutase; 8 – O-acetil(tiol)liase; 9 – ação de desulfidrases.....	25
<b>Figura 9</b> - Metabolitos que contêm enxofre envolvidos na SIR. ....	26

<b>Figura 10</b> - Esquema da estratégia de amplificação, clonagem e sequenciação do genoma viral. .....	34
<b>Figura 11</b> - Localização no genoma, dos locais de complementaridade dos <i>primers</i> utilizados para amplificar cada um dos fragmentos A, B, C e D. ....	37
<b>Figura 12</b> - Esquema do vetor pGEM®-T Easy utilizado para clonar os vários fragmentos do genoma viral do isolado G1A. ....	39
<b>Figura 13</b> - Esquema de amplificação da extremidade 5' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE. ....	42
<b>Figura 14</b> - Esquema de amplificação da extremidade 3' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE. ....	43
<b>Figura 15</b> - Esquema do plano de ensaios durante a experiência otimizada.....	51
<b>Figura 16</b> - Sintomas observados no hospedeiro herbáceo inoculado com o isolado viral G1A. A, B e C: lesões locais em <i>N. benthamiana</i> . ....	57
<b>Figura 17</b> - Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de G1A.....	58
<b>Figura 18</b> – Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do ácido nucleico viral extraído da preparação purificada de vírus. M: marcador ‘RNA Ladder High Range’ (Thermo Scientific), 1: Ácido nucleico viral extraído com o ‘RNeasy Plant Mini Kit’ (Qiagen). As setas indicam as posições do RNA genômico com cerca de 3700 pares de bases e do RNA satélite com cerca de 600 pares de bases.....	59
<b>Figura 19</b> - Análise eletroforética em gel de 0,8% de agarose dos ácidos nucleicos de cadeia dupla isolados de plantas de <i>N. benthamiana</i> infetadas. M – marcador ‘NZY DNA Ladder III’ (NZYTech); 1 – Bandas correspondentes às formas replicativas do isolado G1A. As setas indicam a posição de cada uma das 4 bandas obtidas. ....	60
<b>Figura 20</b> – Análise eletroforética em gel de 1% de agarose dos produtos amplificados por PCR, de cada um dos fragmentos, para identificação do genoma do isolado viral G1A. M - marcador ‘NZY DNA Ladder III’ (NZYTech). A - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 563 pb. B - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 1259 pb. C - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 2068 pb. D - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 722 pb.....	61

**Figura 21** - Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do DNA plasmídico digerido, de cada um dos fragmentos utilizados na sequenciação do genoma do isolado viral G1A. M - marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech). B - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento B. C - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento C. D - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento D. As setas indicam a posição do vetor plasmídico p-GEM® T-Easy (Promega) a 3015 pb e as posições dos produtos digeridos respeitantes a cada fragmento. ... 62

**Figura 22** - Análise eletroforética em gel de 1% de agarose dos produtos amplificados da extremidade 5'. A - 1: produto do 1º PCR, com fragmento amplificado de aproximadamente 330 pb; B - 2: produto do 2º PCR, com fragmento amplificado de aproximadamente 170 pb. M - marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech). ..... 63

**Figura 23** - Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do produto digerido da extremidade 5' do genoma do isolado viral G1A. M - marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech); 1 - DNA plasmídico digerido correspondente à extremidade 5'. As setas indicam a posição do vetor plasmídico p-GEM® T-Easy (Promega) a 3015 pb e a posição do produto digerido..... 63

**Figura 24** - Sequência parcial de bases do genoma do isolado viral G1A. A sequência de aminoácidos deduzida para as proteínas codificadas pelo RNA viral é apresentada na parte inferior da sequência, com diferentes cores para cada provável proteína. Os asteriscos (\*) correspondem ao codão *stop*. ..... 67

**Figura 25** - Organização do genoma do isolado viral G1A. As caixas representam as proteínas codificadas por cada uma das ORFs: p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. RT - leitura contínua ('read through'), RdRp - RNA polimerase dependente de RNA, CP - cápside proteica. .... 68

**Figura 26** - Alinhamento da sequência de aminoácidos da CP do isolado de G1A, com as de OLV-1 GM6 de oliveira (Número de acesso ao 'GenBank': DQ\_083996), OLV-1 de citrino (Número de acesso ao 'GenBank': NC\_001721.1) e OLV-1 CM1 de tomate (Número de acesso ao 'GenBank': GU\_326337.2). Os resíduos idênticos estão a negrito. A região sublinhada corresponde ao domínio S da cápside proteica, os resíduos a cinzento correspondem ao padrão de consenso do domínio S e a seta indica o aminoácido leucina na 17ª posição deste consenso. Os locais de ligação ao cálcio (Ca<sup>2+</sup>) estão indicados abaixo das sequências, junto dos aminoácidos que favorecem a ligação). ..... 71

**Figura 27** - Visualização do isolado bacteriano 18 UE/10 ao microscópio ótico Olympus BX41 (ampliação 1000X) após coloração diferencial de *Gram*. ..... 72

<b>Figura 28</b> - Valores de produção de sulfato, unidades formadoras de colónias por mL e densidade ótica (600 nm), registados para o isolado 18 UE/10, a partir de uma suspensão deste em meio nutricional sem sulfato.....	73
<b>Figura 29</b> - Valores relativos ao número médio e máximo de lesões necróticas, bem como a percentagem de plantas infetadas para as diferentes condições de rega utilizadas no dia da inoculação bacteriana (ver Figura 15). A - 3 dias após inoculação com G1A. B - 6 dias após inoculação com G1A.....	75
<b>Figura 30</b> - Valores relativos ao número médio e máximo de lesões necróticas, bem como a média da percentagem de plantas infetadas para as diferentes condições de rega utilizadas em duas experiências. Os valores foram registados 6 dias após inoculação com G1A. ....	76
<b>Figura 31</b> - Revelações fotográficas dos ensaios de plantas aquando inoculação bacteriana e posterior inoculação viral. A – rega sem sulfato, B - rega sem sulfato mais inóculo bacteriano, C - rega com sulfato.....	77
<b>Figura 32</b> - Revelações fotográficas dos ensaios de plantas aquando rega com soluções nutricionais sem e com sulfato e posterior inoculação viral. A – vista lateral e de topo de rega sem sulfato; B - vista lateral e de topo de rega com sulfato.....	77
<b>Figura 33</b> – Visualização das raízes de cada ensaio. A – planta regada com solução nutricional com sulfato e infetada com G1A. B – planta regada com solução nutricional com sulfato mais bactéria e infetada com G1A.....	78
<b>Figura 34</b> - Fotografias de fragmentos radiculares de uma planta sujeita a rega com sulfato e com adição do isolado bacteriano 18 UE/10, após coloração Gram. A – pêlos radiculares que emergem da superfície da raiz (ampliação 100X). B – superfície de um pêlo radicular após lavagem para remoção bacteriana (ampliação 1000X). C – superfície de um pêlo radicular sem lavagem para remoção bacteriana, sendo visíveis as bactérias coradas à superfície deste.....	79

## ÍNDICE DE QUADROS

---

<b>Quadro 1</b> - Doenças da oliveira transmitidas por enxertia, mas não transmissíveis mecanicamente.....	5
<b>Quadro 2</b> - Vírus detetados em <i>Olea europaea</i> L., a sua distribuição mundial e classificação taxonómica.....	6
<b>Quadro 3</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados na otimização da amplificação os fragmentos A, B, C e D do genoma do isolado G1A.....	36
<b>Quadro 4</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar os fragmentos A, B, C e D do genoma do isolado G1A. ....	37
<b>Quadro 5</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a síntese do cDNA da extremidade 5' e 3' do RNA isolado de G1A. ....	42
<b>Quadro 6</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar as extremidades 5' e 3' do RNA viral do isolado G1A. ....	44
<b>Quadro 7</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificar por um segundo PCR as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado G1A. ....	45
<b>Quadro 8</b> - Sequências dos <i>primers</i> utilizados na otimização da amplificação de PCR de um fragmento RNA satélite.....	47
<b>Quadro 9</b> - Percentagem de identidade das duas maiores proteínas (RdRp e CP) codificadas pelo genoma do isolado G1A com outros isolados de OLV-1. ....	69
<b>Quadro 10</b> – Percentagem de identidade das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 codificadas pelo genoma do isolado G1A, com as proteínas de outros isolados OLV-1. ....	71





## ABREVIATURAS GERAIS UTILIZADAS

---

≈	aproximadamente
>	maior que
aa	aminoácido
BSA	albumina de soro de bovino
°C	grau centígrado
<i>ca.</i>	<i>circa</i>
cDNA	DNA complementar
CP	cápside proteica
cv.	cultivar
Da	Dalton
dATP	deoxiadenosina trifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DNase	desoxiribonuclease
dNTPs	deoxinucleótidos trifosfatados
D.O.	densidade ótica
dsRNA	cadeias duplas de RNA
DTT	ditiotretiol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	grama
<i>g</i>	aceleração da gravidade
GSH	glutationo
h	hora
HR	reação de hipersensibilidade ('Hypersensitive response')
ICR	regiões intercistrónicas ('Intercistronic Regions')
ICTV	'International Committee on Taxonomy of Viruses'

IPTG	Isopropil-[beta]-D-tiogalactopiranosídeo
ISR	resistência sistêmica induzida ('induced systemic resistance')
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NCR	região não codificante ('Non Coding Region')
ng	nanograma
nm	nanómetro
nt	nucleótido
ORF	grelha de leitura aberta ('Open Reading Frame')
pb	pares de bases
PHPB	bactérias promotoras de fitossanidade ('Plant Health Promoting Bacteria')
PCR	reação em cadeia da polimerase ('Polymerase Chain Reaction')
p/v	peso/volume
RACE	'Rapid Amplification of cDNA Ends'
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
S	coeficiente de sedimentação

SAR	resistência sistêmica adquirida ('Systemic Acquired Resistance')
seg	segundo
sgRNA	RNA subgenômico
SIR	resistência induzida pelo enxofre ('Sulphur-Induced Resistance')
ssRNA	ácido ribonucleico de cadeia simples
TAE	tampão Tris/ácido acético/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris/ácido bórico/EDTA
TE	tampão Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N' – Tetrametiletenadiamina
TdT	terminal deoxinucleotido Transferase
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade
UV	ultra-violeta
V	Volt
Vis	vísivel
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-[beta]-D-galactopiranosídeo
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrómetro

## **Bases nucleotídicas**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo

## ABREVIATURAS DOS NOMES DOS VÍRUS

---

ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
BBSV	<i>Beet black scorch virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
CarMV	<i>Carnation mottle virus</i>
ChNV	<i>Chenopodium necrosis virus</i>
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
LWSV	<i>Leek white streak virus</i>
OLRSV	<i>Olive latent ringspot virus</i>
OLV-1	<i>Olive latent virus 1</i>
OLV-2	<i>Olive latent virus 2</i>
OLV-3	<i>Olive latent virus 3</i>
OLYaV	Olive leaf yellowing-associated virus
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>
OSLV	Olive semi-latent virus
OYVaV	Olive vein yellowing associated virus
OYMDaV	Olive yellowing mottling and decline-associated virus
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TNV s. l.	<i>Tobacco necrosis virus sensu lato</i>
TNV-A	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
TNV-D	<i>Tobacco necrosis virus D</i>



## 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
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
O	Pyl	Pirrolisina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Trionina
U	Sec	Selenocisteína
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina





# CAPÍTULO 1

---

## Introdução Geral



## 1.1. A cultura da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das culturas de maior importância em todo o mundo, nomeadamente em países mediterrâneos, ocupando em Portugal uma área cultivada de cerca de trezentos e trinta e seis mil hectares (INE, 2011), assumindo maior importância em determinadas zonas do país (Figura 1), cultivando-se em cada uma delas uma ou mais variedades características (MADRP, 2008).

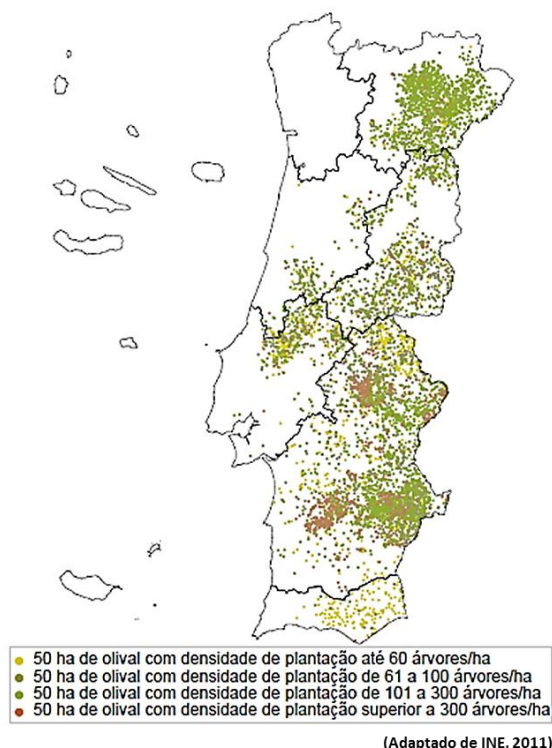


Figura 1 – Representação da densidade de olival em Portugal, em 2009.

A oliveira é maioritariamente reconhecida pelos seus benefícios para a saúde humana, associados ao consumo de azeite, mas também pela utilidade de outros produtos derivados como as azeitonas, os cosméticos e, até certo ponto, os microrganismos e metabolitos presentes na salmoura do processo de preservação da azeitona demonstram um grande potencial para aplicações farmacêuticas e outras aplicações industriais (Félix et al., 2012).

Estas amplas utilizações dos produtos derivados da oliveira demonstram o grande impacto desta cultura, não só a nível económico, como a nível social. Nas últimas décadas a

cultura da oliveira estendeu-se a países sem tradição olivícola, como a Argentina, Índia, China, Austrália e Nova Zelândia (Félix et al., 2012). Estes países constituem atualmente os grandes mercados importadores de material vegetativo, exigindo que o material seja certificado e isento de doenças, nomeadamente vírus.

Por outro lado, a União Europeia instituiu regras na comercialização e qualidade do material vegetal para propagação (Diretiva Europeia 93/48 de 13.06.93, *Conformitas Agraria Communitatis*), que impõem a avaliação fitossanitária das cultivares de modo a assegurar a produção de *stocks* de plantas saudáveis e impedir a circulação de material infetado.

## 1.2. Os vírus na cultura de oliveira em Portugal

A oliveira é afetada por um elevado número de agentes patogénicos, onde se incluem os vírus. A primeira vez que alterações morfológicas na oliveira foram sugeridas como tendo origem viral, foi em 1938, por Pesante. Os relatos deste autor descrevem uma sintomatologia caracterizada por anomalias foliares e necrose do floema por vezes acompanhada por declínio progressivo da árvore (Martelli, 1999b). Posteriormente, material vegetal com sintomas idênticos aos referidos por Pesante foi testado por Fogliani em 1953 para a presença de vírus, tendo este obtido resultados negativos. Estudos subsequentes demonstraram que aquela sintomatologia estava relacionada com a leptonecrose, uma carência de boro (Martelli, 1999b).

A partir da década de 1950 voltou a haver referências a várias doenças de possível origem viral (Quadro 1), suportadas principalmente por serem transmitidas por enxertia. Contudo, nunca foi possível a transmissão a plantas herbáceas indicadoras, nem se observaram partículas semelhantes a vírus (Martelli, 1999b).

A primeira referência à presença de partículas virais em tecidos de oliveira data de 1977, quando Pacini e Cresti observaram por microscopia eletrónica secções ultrafinas de grãos de pólen de oliveira da cv. *Corregiolo*, em Itália (Pacini & Cresti, 1977).

Desde então, já foram isoladas e identificadas quinze espécies de vírus pertencentes a oito géneros diferentes, com uma distribuição mundial praticamente coincidente com a da cultura da oliveira (Quadro 2).

Quadro 1 - Doenças da oliveira transmitidas por enxertia, mas não transmissíveis mecanicamente.

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

(Adaptado de Martelli et al., 1999b)

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 foi isolado de árvores da cultivar italiana *Ascolana tenera*, as quais apresentavam folhas deformadas, frutos rugosos e com saliências, bem como ramos com entre-nós curtos (Marte et al., 1986). Os mesmos sintomas foram encontrados em Portugal, na cv. *Negrinha de Freixo* e também associados ao SLRSV (Henriques et al., 1992). Este vírus foi também detetado em árvores que não apresentavam qualquer tipo de sintomas, em Itália (Savino et al., 1979), Portugal (Félix et al., 2000, Henriques et al., 1992) e em Espanha (Bertolini, 1998).

Outros vírus foram isolados de árvores sem sintomas como *Cherry leaf roll virus* (CLRV) (Savino & Gallitelli, 1981), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Savino & Gallitelli, 1983), *Olive latent virus 1* (OLV-1) (Felix & Clara, 2000, Gallitelli & Savino, 1985, Martelli et al., 1995) e *Olive latent virus 2* (OLV-2) (Castellano et al., 1987). O OLV-1 também foi isolado de árvores de oliveira com acentuado amarelecimento (Savino et al., 1996). Por sua vez, os vírus *Arabis mosaic virus* (ArMV) (Savino et al., 1979), *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) (Di Franco et al., 1983) e *Tobacco necrosis virus sensu lato* (TNV s. l.) (Felix & Clara, 2000) foram detetados em árvores enfraquecidas e com desfoliação.

Os vírus *Olive yellowing mottling and decline-associated virus* (OYMDaV), *Olive vein yellowing associated virus* (OYVaV) e *Olive leaf yellowing-associated virus* (OLYaV) foram isolados de oliveira associados a coloração amarela seguida de uma intensa desfoliação, amarelecimento nas nervuras e amarelecimento foliar respetivamente (Martelli, 1999a). O vírus *Olive semi-latent virus* (OSLV) foi isolado de plantas jovens que apresentavam folhas com nervuras claras e o *Tobacco mosaic virus* (TMV) foi isolado de oliveira associado a declínio e as folhas que tinham nervuras com bandas verdes claras ou amarelo brilhante (Triolo et al., 1996)

Quadro 2 - Vírus detetados em *Olea europaea* L., a sua distribuição mundial e classificação taxonómica.

Vírus	Classificação taxonómica		Primeira referência bibliográfica	Distribuição geográfica
	Família	Género		
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	<i>Secoviridae</i>	Não determinado	Savino et al. (1979)	Itália, Portugal, Espanha, Egito, USA, Egito, Turquia, Líbano, Síria, Croácia, Tunísia, Albânia
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMv)	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	Savino et al. (1979)	Itália, Portugal, Egito, USA, Líbano, Síria
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	Savino & Gallitelli (1981)	Itália, Portugal, Espanha, Croácia, EUA, Egito, Líbano, Síria, Tunísia
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	Savino & Gallitelli (1983)	Itália, Portugal, Espanha, USA, Síria, Tunísia, Argélia, Austrália, França, Chipre, Chile, Israel, Marrocos
<i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV)	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>	Savino et al. (1983)	Itália, Portugal, Síria, Tunísia
<i>Olive latent virus 1</i> (OLV-1)	<i>Tombusviridae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>	Gallitelli & Savino (1985)	Itália, Japão, Jordânia, Turquia, Portugal, USA, Egito, Líbano, Síria, Tunísia
<i>Olive latent virus 2</i> (OLV-2)	<i>Bromoviridae</i>	<i>Oleavirus</i>	Castellano et al. (1987)	Itália, Líbano, Síria, Tunísia
Olive vein yellowing-associated virus (OVYaV)	Não determinado	Não determinado	Faggioli & Barba (1994)	Itália
Olive yellow motting and decline associated virus (OYMDaV)	Não determinado	Não determinado	Savino et al. (1996)	Itália
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobamovirus</i>	Triolo et al. (1996)	Itália
<i>Olive semi-latent virus</i> (OSLV)	Não determinado	Não determinado	Materazzi et al. (1996)	Itália
Olive leaf yellowing-associated virus (OLYaV)	<i>Closteroviridae</i>	Não determinado	Sabanadzovic et al. (1999)	Itália, Albânia, Espanha, Croácia, Israel, Egito, Líbano, USA, Síria, Tunísia, Chipre, Chile, Austrália, Grécia, França, Argélia, Palestina, Marrocos
<i>Olive mild mosaic virus</i> (OMMV)	<i>Tombusviridae</i>	<i>Alphanecrovirus</i>	Cardoso et al. (2004)	Portugal
<i>Tobacco necrosis virus D</i> (TNV-D)	<i>Tombusviridae</i>	<i>Betanecrovirus</i>	Cardoso et al. (2009)	Portugal
<i>Olive latent virus 3</i> (OLV-3)	<i>Tymoviridae</i>	<i>Marafivirus</i>	Alabdullah et al. (2009)	Itália, Portugal, Grécia, Malta, Tunísia, Líbano, Síria, Turquia.

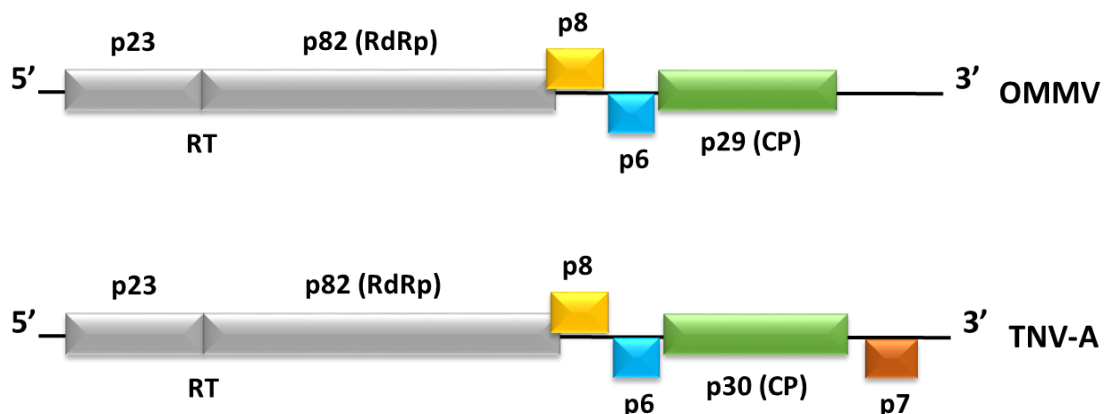
(Adaptado de Martelli, 2013)

O vírus *Olive mild mosaic virus* (OMMV) foi obtido de uma oliveira da cv. *Galega vulgar*, em Portugal, que apresentava mosaico suave nas folhas (Cardoso et al., 2005). Os mesmos autores caracterizaram a sequência completa de um isolado do vírus *Tobacco necrosis virus D* a partir de uma oliveira da cv. *Verdeal Alentejana* assintomática (TNV-D<sup>p</sup>) (Cardoso et al., 2009). Um dos últimos vírus descritos que infetam a oliveira é o *Olive latent virus 3* (OLV-3) que foi isolado a partir de árvores aparentemente saudáveis, em Itália (Alabdullah et al., 2009).

### 1.2.1. Os Alpha- e Betanecrovirus que infetam a oliveira

O anterior género *Necrovirus* incluía sete espécies: *Tobacco necrosis virus A* (TNV-A), *Olive mild mosaic virus* (OMMV), *Olive latent virus 1* (OLV-1), *Leek white stripe virus* (LWSV), *Tobacco necrosis virus D* (TNV-D), *Beet black scorch virus* (BBSV) e *Chenopodium necrosis virus* (ChNV). Este género era caracterizado por vírus com partículas virais com  $\approx 28$  nm de diâmetro e um RNA genómico com aproximadamente 3700 nts (King et al., 2012) (Figura 2). Todas estas espécies têm o seu genoma completamente sequenciado à exceção de ChNV.

Em 2011 foi proposta a divisão do género *Necrovirus* em dois: *Alphanecrovirus* e *Betanecrovirus*, baseada no nível de diversidade da polimerase (ICTV alteration proposal, 2011). Em 2012 a nova classificação passou a incluir os vírus OLV-1, OMMV e TNV-A no género *Alphanecrovirus* e os vírus BBSV, LWSV e TNV-D no género *Betanecrovirus*. Com esta nova classificação o vírus ChNV passou a género não determinado (ICTV, 2013).



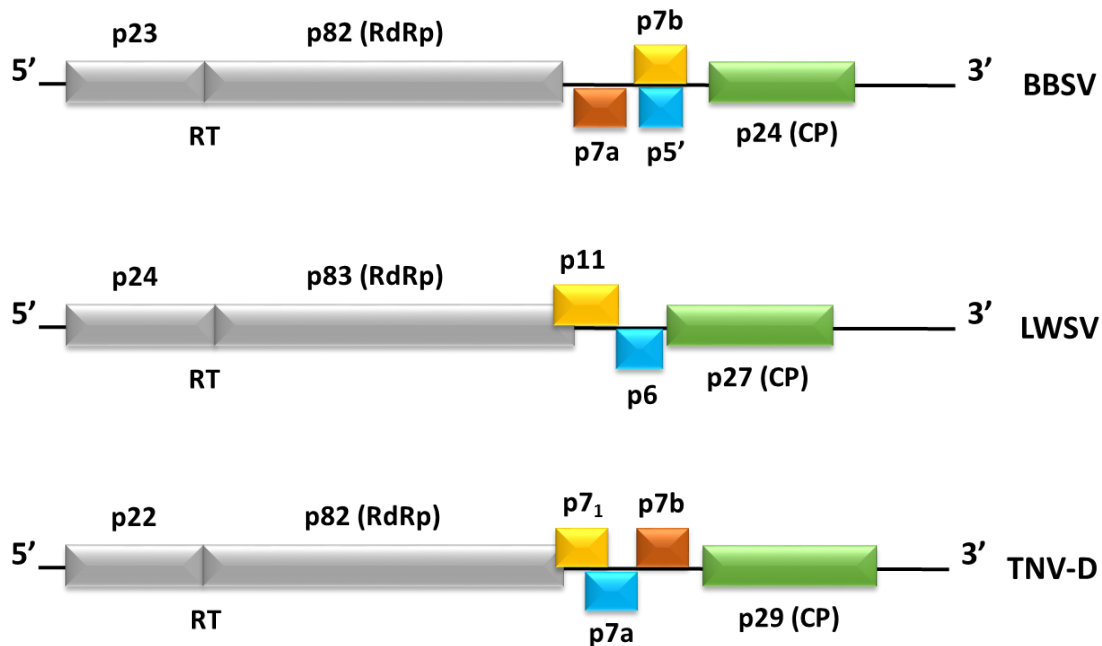


Figura 2 – Estruturas do genoma de diversos vírus pertencentes aos géneros *Aphanecrovirus* e *Betanecrovirus* (OMMV – *Olive mild mosaic virus*; TNV-A – *Tobacco necrosis virus A*; BBSV – *Beet black scorch virus*; LWSV – *Leek white stripe virus*; TNV-D – *Tobacco necrosis virus D*). As caixas representam as ORFs que codificam as proteínas. RT – ‘read through’, RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica.

São vários os vírus já detetados em oliveira em Portugal (Quadro 2). No entanto, os vírus mais disseminados nos olivais nacionais são os vírus do género *Aphanecrovirus* OLV-1 e OMMV e o vírus do género *Betanecrovirus* TNV-D como predominante, atingindo níveis de infeção de 31% (Félix et al., 2012).

#### 1.2.1.1. Olive latent virus 1

O vírus OLV-1 pertencente ao género *Aphanecrovirus*, família *Tombusviridae* já foi identificado em oliveira, citrino, tília e tomate (Felix et al., 2005, Gallitelli & Savino, 1985, Grieco et al., 1996b, Hasiów-Jaroszewska et al., 2011, Kanematsu et al., 2001, Russo et al., 1994).

A importância económica de OLV-1, não é ainda muito clara apesar da sua abundância nos olivais portugueses. A transmissão mecânica a partir de frutos de oliveira induz apenas necroses locais nos hospedeiros *Celosia cristata*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Momordica balsamina*, *Nicotiana cavicola*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. occidentalis*, *N.*



*rotundifolia*, *N. rustica*, *N. tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Petunia hybrida*, *Phaseolus aureus*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. A maioria dos isolados de OLV-1 causam lesões locais e sistêmicas em plantas de *Nicotiana benthamiana*, com exceção do isolado GM6 que apenas causa lesões locais (Félix et al., 2007). *N. benthamiana* e *C. murale* são as espécies mais utilizadas para a propagação de isolados de OLV-1. As partículas virais têm um coeficiente de sedimentação de 111 S e um conteúdo em ácido nucleico de cerca de 17% (Gallitelli & Savino, 1985).

*Olive latent virus 1* (OLV-1) foi isolado pela primeira vez no sul de Itália a partir de oliveiras assintomáticas, por Gallitelli e Savino (1985). Este vírus voltou a ser detetado em oliveiras sem sintomas na Jordânia (Martelli et al., 1995) e em Portugal (Felix & Clara, 2000), mas também em oliveiras com um acentuado amarelecimento (Savino et al., 1996). Este vírus foi também encontrado em associação com a doença da clorose ananicante dos citrinos ('Citrus chlorosis dwarf') na Turquia e em Itália, onde afeta diferentes variedades de citrinos (Martelli et al., 1996). O OLV-1 foi também detetado em túlipas no Japão, as quais apresentavam sintomas de mosaico foliar e listas amarelas (Kanematsu et al., 2001) e em plantas de tomate, na Polónia, as quais apresentavam manchas necróticas foliares (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

O genoma do primeiro isolado de OLV-1 de oliveira, caracterizado por Félix et al. (2005), consiste numa molécula de RNA de cadeia simples e sentido mensageiro com 3702 nt, com cinco ORFs (Figura 3). As estratégias utilizadas para a expressão do genoma incluem a supressão do codão STOP, sobreposição de ORFs e RNAs mensageiros subgenómicos (Felix et al., 2005).

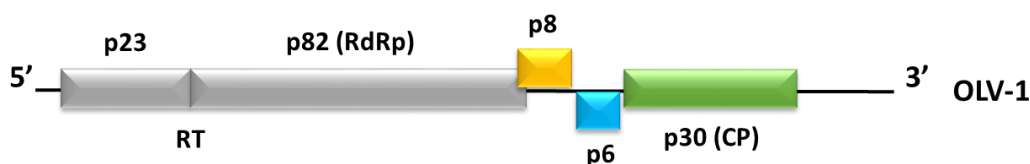


Figura 3 – Esquema representativo da organização do genoma de *Olive latent virus 1*. As caixas representam as ORFs que codificam as proteínas p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. RT – ‘read through’, RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica.

O RNA do isolado GM6 possui 3702 nt de comprimento, enquanto que o RNA dos isolados de citrino e de tomate possuem 3699 nt de comprimento (Grieco et al., 1996b, Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

No isolado GM6 de oliveira, a ORF 1 começa no primeiro codão AUG na posição 61 e termina no codão stop UAG na posição 666, que codifica um polipéptido de 23 kDa (p23). A leitura contínua ('read through') do codão stop 'amber' da ORF 1 gera um polipéptido com uma massa molecular estimada de 82 kDa (p82), designada ORF 1 RT. De seguida, aparecem, na região central do genoma viral, duas ORFs pequenas, a ORF 2 e a ORF 3 que codificam dois polipéptidos com massa molecular de 8 kDa (p8) e 6 kDa (p6), respetivamente, enquanto, a ORF 4 ocupa a extremidade 3' do genoma e codifica uma proteína com massa molecular de 30 kDa (p30).

A proteína p82 é provavelmente uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), pois possui o motivo altamente conservado constituído por uma sequência de três aminoácidos GDD (uma glicina e dois ácidos aspárticos) e outras sequências típicas das polimerases (Félix et al., 2007, Grieco et al., 1996b). As proteínas p23 e p82 são expressas diretamente pelo RNA genómico e ambos os polipéptidos são necessários para a replicação viral. Os polipéptidos p8 e p6 são expressos por um RNA subgenómico (sg1) bicistrónico com 1519 nts e estão envolvidos no movimento do vírus de célula para célula (Castellano et al., 2005). A proteína p30 corresponde à cápside proteica e é expressa por um RNA subgenómico (sg2) com 1237 nts, estando também relacionada com o movimento do vírus a longa distância (Pantaleo et al., 1999).

Em termos de comparação com o isolado de OLV-1 de citrino, a proteína p82 (RdRp) tem uma identidade de sequência de 97,3%, as proteínas p8 e p6 têm uma identidade de sequência de 93,2% e 100%, respetivamente e a cápside proteica tem uma identidade de sequência de 87,7% (Felix et al., 2005). Em comparação com o isolado de OLV-1 de tulpia, a cápside proteica tem uma identidade de sequência de 98,5% (Kanematsu et al., 2001). Por fim, em comparação com o isolado CM1 de OLV-1 identificado em tomate, a RdRp tem uma identidade de sequência de 98,4%, as proteínas p8 e p6 têm uma identidade de sequência de 100% e a cápside proteica tem uma identidade de sequência de 92,2% (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

Em comparação com os restantes *Alpha-* e *Betaneocrovirus*, a RdRp, correspondente à RdRp, tem uma identidade da sequência de 92,1% com o OMMV, 90,7% com o TNV-A, 34,1% com o TNV-D, 33,3% com o LWSV e 34,8% com o BBSV, enquanto a cápside proteica, tem uma identidade de sequência de 43,3% com o OMMV, 41,5% com o TNV-A, 42,5% com o TNV-D, 28,2% com o LWSV e 36,3% com o BBSV (Félix et al., 2007).

### 1.3. Propriedades moleculares e biológicas dos vírus com RNA satélite associado

Os RNAs satélite (satRNAs) e os vírus satélite foram durante muito tempo considerados apenas como parasitas moleculares dos seus vírus auxiliares. Este conceito evoluiu recentemente com a revelação da capacidade destas moléculas modularem os sintomas manifestados pelas plantas infetadas.

O primeiro vírus satélite, descrito, foi associado ao *Tobacco necrosis virus*, (Kassanis, 1962), sendo serologicamente distinto do vírus hospedeiro e codificando a sua própria cápside proteica. Em 1969, surgiu o termo RNA satélite ao se verificar que o RNA satélite era encapsulado pelo vírus auxiliar, o *Tobacco ringspot virus* (TobrV) (Schneider, 1969). Nos últimos anos, tem sido relatado um grande número de RNAs satélite associados a vários grupos de vírus de plantas, como por exemplo o mais recente satRNA identificado, associado ao vírus *Beet black scorch virus* (BBSV) (Guo et al., 2005).

Este tipo de RNAs de pequena dimensão, com menos de 1500 nts de tamanho, que dependem do vírus auxiliar para a sua replicação, encapsidação, movimento e transmissão, geralmente partilham pouca ou nenhuma homologia de sequência com o vírus auxiliar (Murant & Mayo, 1982).

Os satRNAs são classificados em três subgrupos: o subgrupo 1 que inclui os satRNA lineares de maior dimensão, com 0,7 a 1,5 kb, que codificam pelo menos uma proteína não-estrutural, o subgrupo 2 que inclui os satRNA lineares de menor dimensão e o subgrupo 3 que inclui os satRNA circulares (Hu et al., 2009).

A função dos satRNAs não está completamente estudada. Existem muitos exemplos em virologia, que demonstram que existem alguns satRNAs que atenuam os sintomas causados pelos seus vírus auxiliares, reduzindo a acumulação do vírus através da utilização de vias de silenciamento do RNA hospedeiro que fornecem resistência ao vírus, como, por exemplo, o caso do satRNA associado com *Cucumber mosaic virus* (CMV) que pode proteger as plantas do tomate contra infeções virais (Gallitelli et al., 1991). Também o satRNA B10 associado ao CymRSV tem uma função importante na atenuação dos sintomas causados pelo vírus (Rubino & Russo, 2010). Por outro lado, foram descritos também exemplos de exacerbação de sintomas, como os causados por *Turnip crinkle virus* (TCV) quando em presença do seu satC RNA (Thomas et al., 2003).

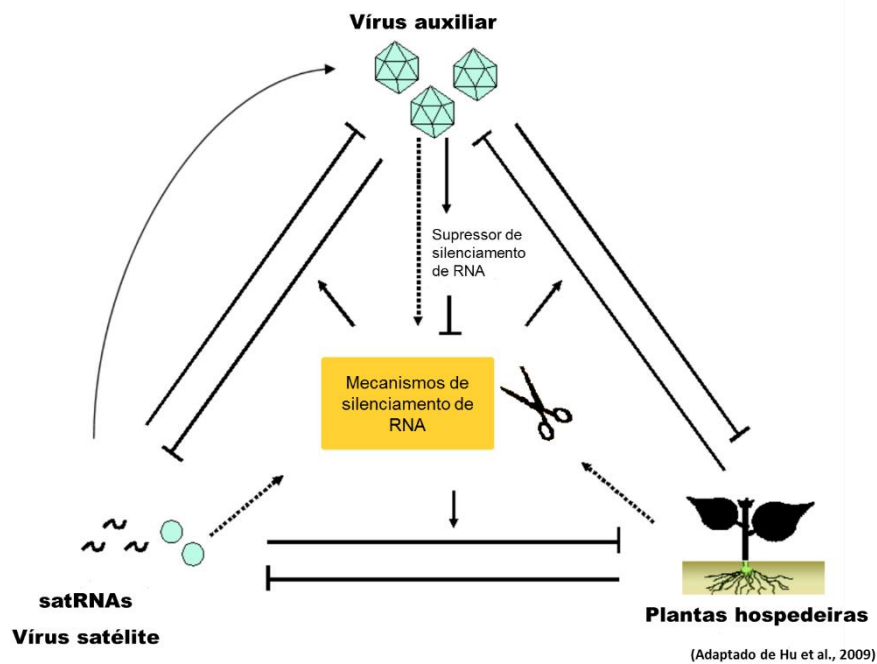


Figura 4 – Representação esquemática da interação entre as plantas hospedeiras, os vírus auxiliares, os satRNAs e os vírus satélite, e o mecanismo de silenciamento de RNA do hospedeiro.

Recentemente, este tipo de moléculas tem sido usado para compreender os mecanismos de silenciamento de RNA (Simon et al., 2004) e como ferramenta molecular para o desenvolvimento de estratégias de resistência. Os sistemas de controlo de doenças baseados em satRNAs podem ser aplicados diretamente, com satRNAs usados como agentes de controlo biológico, ou indiretamente através de plantas transgênicas que expressem sequências de satRNAs (Hu et al., 2009).

#### 1.4. Métodos de diagnóstico viral usados em oliveira

A utilização de métodos de deteção e identificação viral é essencial em programas de seleção sanitária da oliveira de modo a selecionar e produzir plantas isentas de vírus.

Existem atualmente vários métodos que são utilizados para detetar e/ou caracterizar os vírus associados à oliveira tais como métodos biológicos, métodos serológicos, como o teste DAS-ELISA ('Double antibody sandwich - Enzyme linked immunosorbent assay'), ou moleculares, como testes de RT-PCR, análise de dsRNA e hibridação 'dot blot'.

Neste capítulo, serão focados alguns exemplos do uso de métodos para o diagnóstico de vírus associados à cultura de oliveira, particularmente utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

#### **1.4.1. Testes biológicos**

O único teste biológico utilizado para avaliar material vegetal da oliveira é o de inoculação mecânica em hospedeiros herbáceos, uma vez que até ao momento não foram encontrados indicadores lenhosos que possam ser utilizados na deteção de vírus da oliveira (Grieco et al., 2000, Martelli, 1999b). A inoculação mecânica é atualmente muito utilizada para recuperar isolados virais a partir de árvores no campo e como técnica complementar no trabalho de seleção sanitária de oliveiras (Félix et al., 2000, Grieco, 2000).

Os frutos, flores, folhas e raízes jovens, bem como os ramos de oliveira são uma boa fonte de vírus (Grieco et al., 2000, Martelli, 2013). As plantas herbáceas mais utilizadas como indicadoras, pela sua sensibilidade, são *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucurbita pepo*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. langsdorffii*, *N. occidentalis*, *N. tabacum* e *Vigna unguiculata*.

A inoculação mecânica apresenta como vantagens ser um teste simples, fácil de realizar e pouco dispendioso. No entanto, tem relevantes desvantagens, como a morosidade na obtenção dos resultados e baixa sensibilidade quando comparada com outros testes recentemente desenvolvidos. Para além disso, o facto dos tecidos de oliveira conterem inibidores, pode conduzir à obtenção de resultados incoerentes, sendo que apenas o uso deste método dificilmente pode ser recomendado para avaliação do estado sanitário de oliveiras (Félix et al., 2008, Martelli, 2013).

#### **1.4.2. Análise de cadeias duplas de RNA**

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

Tal depende do genoma do vírus ser ou não multipartido ou de um genoma monopartido originar RNAs subgenômicos. Em ambos os casos, são produzidos na célula hospedeira dsRNAs específicas para cada RNA genômico ou RNA subgenômico (Dodds et al., 1984, Valverde et al., 1990).

A técnica experimental descrita por Morris e Dodds, (Morris & Dodds, 1979) foi adaptada para a extração de dsRNA de tecidos de oliveira através do tratamento com fenol e cromatografia em colunas de celulose (Grieco, 2000, Rei, 1995, Saponari et al., 2001).

A análise das dsRNA por eletroforese em gel é uma técnica muito útil, pois permite detetar e também caracterizar vírus que não possam ser estudados por outros meios, como por exemplo os vírus não transmissíveis mecanicamente ou que se encontram em baixa concentração no seu hospedeiro, como é o caso dos vírus de oliveira. Outra vantagem do isolamento e análise das frações de dsRNA é ser uma técnica mais sensível e que não é afetada pelos componentes normalmente presentes nos tecidos da oliveira, como componentes fenólicos (De Nino et al., 1997) e óleos, que normalmente interferem com outros métodos de diagnóstico viral.

O tamanho e o padrão das dsRNA observadas em gel após eletroforese dão uma valiosa indicação acerca da eventual natureza viral de uma determinada doença (Martelli, 1999b). No entanto, a interpretação dos perfis das dsRNA pode apresentar algumas dificuldades, nomeadamente quando existem infeções virais múltiplas ou quando as amostras de plantas estão contaminadas com artrópodes (Gunasinghe & German, 1988) ou com fungos (Tooley et al., 1989) infetados pelos seus próprios vírus de RNA.

As dsRNA, após desnaturação, têm sido utilizadas também como material de partida para as técnicas moleculares, tais como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e a hibridação molecular (Félix et al., 2008, Martelli, 2013, Martelli, 1999b, Varanda et al., 2006), apresentando várias vantagens: i) permite a eliminação de componentes que podem interferir com a amplificação do genoma viral (Alabdullah et al., 2009, Nolasco et al., 2000, Saldarelli et al., 1994), ii) permite o uso de uma amostra maior (ca. 10g) quando comparado com a extração de RNA (ca. 100 mg) aumentando assim a possibilidade de detetar vírus que não estão uniformemente distribuídos na planta (Bertolini et al., 2003), iii) permite detetar vírus que estão em baixa concentração nos tecidos, como acontece frequentemente em oliveira. A sua aplicação em oliveiras demonstrou que as frações de dsRNAs extraídas de ramos e frutos de 161 árvores não revelaram a presença de tais moléculas quando analisadas por gel de eletroforese, mas a sua aplicação em RT-PCR demonstrou claramente a sua presença de

*Alphanecrovirus* OLV-1 e OMMV e *Betanecrovirus* TNV-D em 35 dessas árvores, mostrando assim que a análise de dsRNA, por si só, não é suficientemente sensível na detecção destes vírus em oliveira (Varanda et al., 2010, Varanda et al., 2008).

### 1.4.3. Testes de RT-PCR

A amplificação *in vitro* por RT-PCR de porções de DNA, tornou-se uma técnica fundamental no diagnóstico de vírus em plantas (Hull, 2001). Uma vez que a maioria dos vírus de plantas e todos os vírus de oliveira conhecidos até ao momento têm genoma do tipo RNA, torna-se necessário proceder à transcrição reversa (RT) desse RNA por ação de um enzima transcriptase reversa, de modo a converter o RNA em DNA complementar (cDNA). Uma dada região deste cDNA pode então ser amplificada através de uma reação de PCR, com a utilização de um enzima polimerase de DNA e de *primers* específicos, complementares de certos locais do genoma. O produto de amplificação é depois observado em gel após eletroforese ou por hibridação.

O material vegetal recolhido de oliveira contém elevadas quantidades de substâncias consideradas inibidoras das reações de RT-PCR, tais como óleos, polissacáridos, fenóis, entre outras (De Nino et al., 1997, Wilson, 1997). Por esta razão, estudos elaborados por Grieco et al. (2000) testaram vários substratos utilizados em reações de RT-PCR, como extratos de tecidos de oliveira, ácidos nucleicos totais extraídos de tecidos vegetais com auxílio de *kits* comerciais, ou frações de dsRNA desnaturadas antes da reação de RT como já referido no ponto anterior. Estes autores verificaram que apenas os vírus de OLV-1 e OLYaV eram detetáveis diretamente a partir de extratos de tecidos de oliveira macerados (Grieco, 2000, Grieco et al., 2000).

Os ensaios de RT-PCR têm demonstrado ser uma técnica mais rápida, sensível e fiável para detetar vírus em plantas, e nos últimos anos, diferentes protocolos foram desenvolvidos para a detecção de vírus em oliveira. Até ao momento foram desenvolvidos vários formatos de testes baseados em RT-PCR para diagnóstico de vírus da oliveira, como RT-PCR monoespecífico e RT-PCR 'multiplex', consoante se deteta apenas um vírus ou vários em simultâneo, as reações de RT e de PCR em separado (RT-PCR convencional) ou na mesma reação num só passo (RT-PCR 'single-step') e também o *nested* PCR, quando o produto de amplificação obtido numa primeira reação de PCR é re-amplificado numa segunda reação de PCR, com recurso a um segundo par de *primers* internos à primeira sequência amplificada (Bertolini et al., 2003, Bertolini et al., 2001, Faggioli et al., 2005, Faggioli et al., 2002, Grieco et al., 2000, Pantaleo et al., 2001).

Os testes de RT-PCR monoespecíficos têm sido amplamente utilizados no diagnóstico dos vírus ArMV, CLRV, SLRSV, OLRV, OLYaV, CMV, OLV-1, OLV-2, TNV-D e/ou OMMV (Cardoso et al., 2005, Cardoso et al., 2004, Grieco, 2000, Grieco et al., 2000, Varanda et al., 2006). É de salientar que os *primers* que foram utilizados para diagnosticar o TNV *s.l.* por RT-PCR detetavam quer o TNV-D quer o OMMV, uma vez que permitiam a amplificação de uma sequência localizada no gene da cápside proteica, o qual tem elevada similaridade nos dois vírus (Cardoso et al., 2005, Cardoso et al., 2004). A subsequente discriminação entre TNV-D e OMMV foi possível através da aplicação de RT-PCR com *primers* específicos desenhados noutra região do genoma dos vírus (Varanda et al., 2010). Os testes de RT-PCR 'single-step' já foram otimizados para a deteção de SLRSV, ArMV, CLRV, CMV, OLYaV, OLRV, OLV-1 e OLV-2 (Faggioli et al., 2005, Faggioli et al., 2002).

Os testes de RT-PCR monoespecíficos anteriormente descritos apresentam um maior consumo de tempo e de reagentes principalmente quando utilizados em programas de rotina para certificação sanitária de material vegetal para verificação de vários vírus. Para minorar estes inconvenientes foram desenvolvidos testes de RT-PCR 'multiplex' para o diagnóstico simultâneo de seis vírus de oliveira (CMV, CLRV, SLRSV, ArMV, OLV-1 e OLV-2) (Bertolini et al., 2001) e também para o diagnóstico simultâneo dos três vírus mais frequente nos olivais portugueses (OLV-1, TNV-D e OMMV) (Varanda et al., 2010). Mais recentemente, o uso em RT-PCR de um par de *primers* degenerados mostrou ser sensível na deteção de OMMV, TNV-D, OLV-1 e TNV-A, sendo mais uma ferramenta em programas de seleção e certificação de material isento de vírus (Varanda et al., 2014).

A técnica de RT-'nested'-PCR (RT-n-PCR) veio incrementar a sensibilidade dos testes de RT-PCR, atenuando os efeitos negativos de alguns fatores como a irregular distribuição e concentração de vírus na oliveira. Esta técnica permitiu a deteção de vírus em amostras que tinham revelado resultados negativos por testes de RT-PCR (Pantaleo et al., 2001). Os testes de RT-n-PCR têm sido utilizados com sucesso na deteção de OLV-1, OLV-2, OLRV, ArMV, SLRSV e CLRV a partir de preparações de ácido nucleico total (TNA) extraído de tecidos de oliveira naturalmente infetados (Pantaleo et al., 1999). Apesar dos bons resultados obtidos por RT-n-PCR, este teste apresenta elevadas possibilidades de contaminação, podendo levar à ocorrência de falsos positivos (Bertolini et al., 2003). Posteriormente, foi desenvolvido um teste RT-n-PCR 'single-step multiplex' para o diagnóstico de CMV, CLRV, SLRSV e ArMV e da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. em material vegetal de oliveira. Este teste mostrou-se cem vezes mais sensível que o RT-PCR 'single-step multiplex', o que reforça as afirmações sobre a importância destes testes no diagnóstico de vírus da oliveira (Pantaleo et al., 2001).

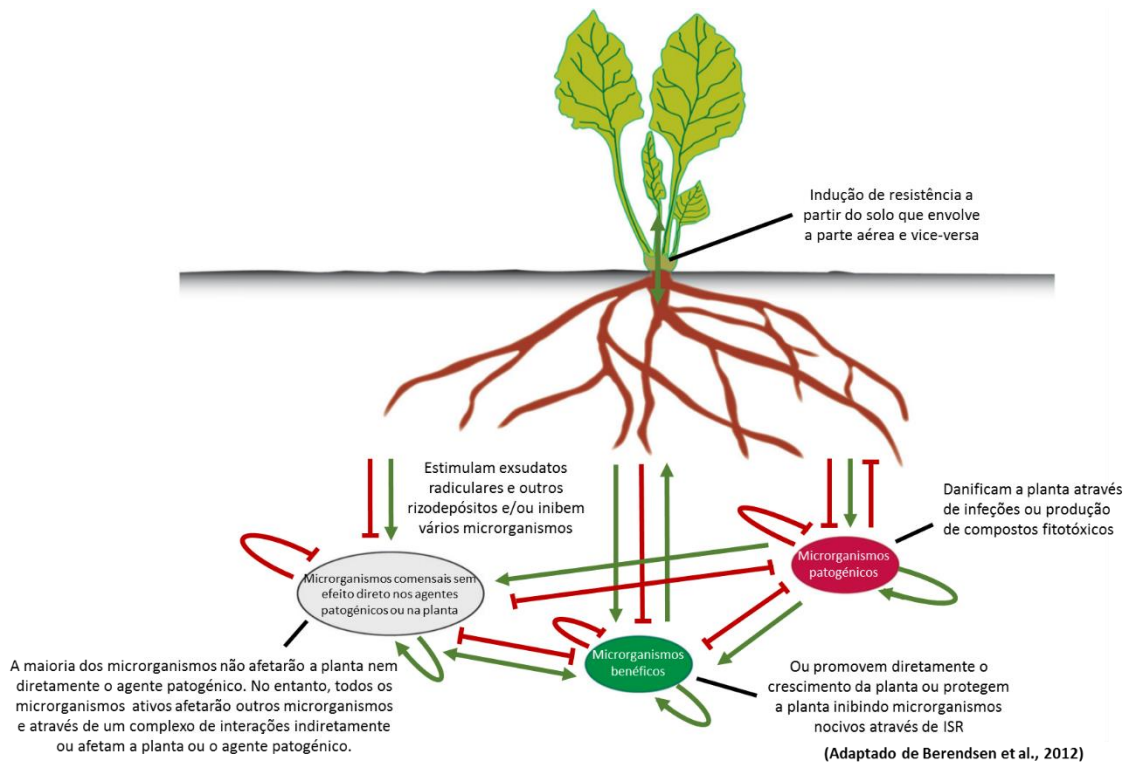


## 1.5. Interação entre plantas e bactérias

As plantas vivem em associação estreita com os microrganismos que habitam o solo na sua proximidade, incluindo bactérias, actinomicetes, fungos, algas e protozoários. As comunidades microbianas no solo representam o maior reservatório de diversidade biológica conhecido até ao momento. A rizosfera, a zona estreita do solo que é influenciada pelas secreções da raiz, pode conter até  $10^{11}$  células microbianas por grama de raiz e mais de 30 000 espécies de procariontes. (Berendsen et al., 2012). As bactérias da rizosfera estão entre esses microrganismos, enquanto muitas bactérias estão dispersas no solo, frequentemente ligadas a partículas deste, outras interagem com as raízes das plantas, sendo muito comum que a concentração de bactérias encontradas em torno da raiz, seja muito maior que a no resto do solo (Glick, 2014). Neste nicho, as rizobactérias têm a capacidade de utilizar uma vasta gama de diferentes substâncias como fonte de nutrientes, proliferando rapidamente (Berendsen et al., 2012, Glick, 2014).

Existem estudos que evidenciam as comunidades microbianas na rizosfera, com ênfase em bactérias, as quais afetam as plantas e vice-versa (Berendsen et al., 2012). A interação entre as bactérias do solo e as raízes das plantas pode ser identificada com base no seu modo de ação e na resposta da planta, sendo classificada de benéfica, nociva ou neutra para a planta (Figura 5). As bactérias deletérias inibem ou prejudicam o crescimento e desenvolvimento vegetal, por exemplo pela produção de fitotoxinas, enquanto as bactérias benéficas podem promover o crescimento das plantas, seja através do aumento da disponibilidade de nutrientes, produção de fitohormonas ou redução dos efeitos negativos dos agentes patogénicos (Montesinos et al., 2002).

As plantas, durante a sua evolução, têm desenvolvido várias estratégias de adaptação e resistência a condições bióticas adversas (Margis-Pinheiro et al., 1999). Os mecanismos de defesa são classificados em constitutivos, isto é, expressos como uma característica inerente ao desenvolvimento do organismo, ou induzidos, ou seja, expressos em função do contacto com o agente invasor.

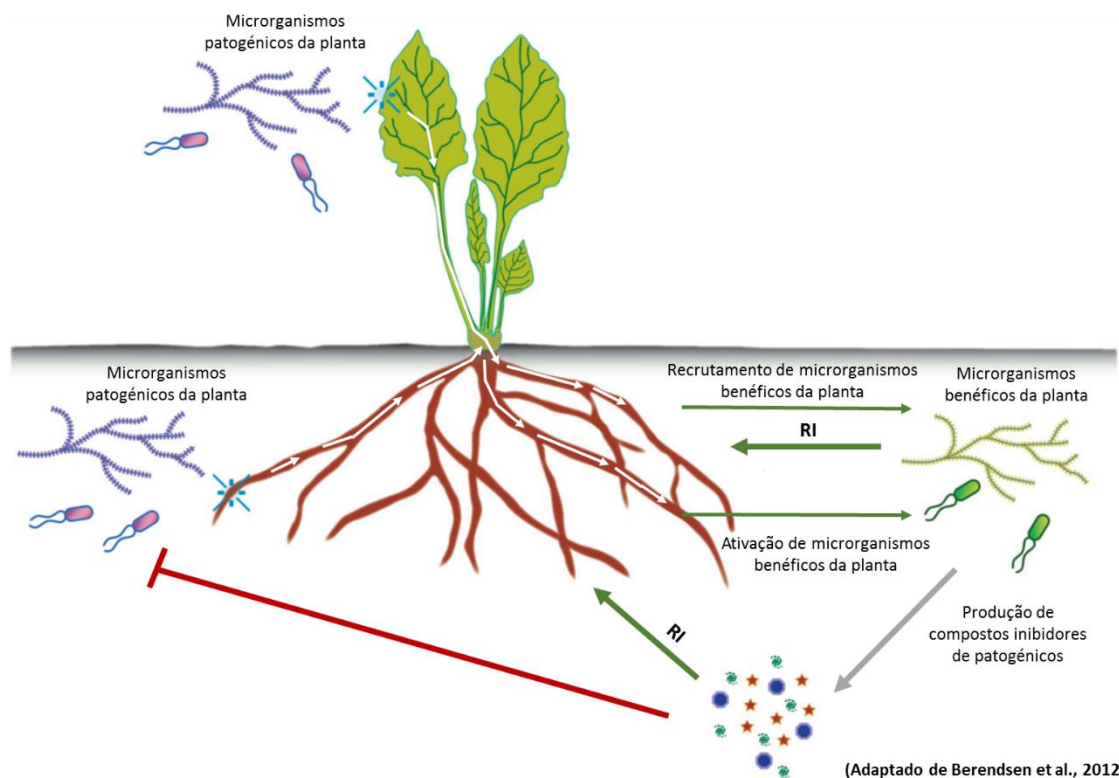


**Figura 5 – Interações na rizosfera. As plantas são capazes de influenciar a composição e atividade dos microrganismos da rizosfera através da exsudação de compostos que estimulam (setas a verde) ou os inibem (setas de bloqueio a vermelho), e vice-versa.**

As defesas constitutivas ou preexistentes variam conforme a espécie vegetal, pois estão relacionadas com as características de cada planta (Kerstiens, 1996). Os caracteres anatómicos da planta, tais como a organização da parede periclinal externa da epiderme ou dos apêndices epidérmicos podem dificultar a infecção, colonização e reprodução do agente patogênico na planta. Também a presença de diversos metabolitos secundários como saponinas (glicósidos do metabolismo secundário vegetal) (Osbourn, 1996), compostos fenólicos (Beckman, 2000) e proteínas constitutivas (Shewry & Lucas, 1997) que possuem atividade antimicrobiana constituem defesas preexistentes. Os taninos, por exemplo, um tipo de composto fenólico frequentemente encontrado em tecidos vegetais, inibem enzimas extracelulares microbianas e diminuem as fontes nutricionais dos agentes patogênicos, por meio da formação de complexos com iões metálicos necessários para esses agentes (Scalbert, 1991).

A defesa induzida pode ser local ou sistêmica. A defesa local é desenvolvida com base na exibição de mecanismos de defesa que ocorrem na reação de hipersensibilidade (HR), ativados pelo reconhecimento de agentes patogênicos. Na HR, a morte rápida das células vegetais situadas no local da infecção, limita a proliferação do agente patogênico e

adicionalmente, são produzidas moléculas sinalizadoras que induzem a ação de diversos genes relacionados com a defesa da planta (Cohn et al., 2001, De Gara et al., 2003, Margis-Pinheiro et al., 1999, van Loon et al., 1998). A defesa induzida também pode ser sistêmica, quer através de resistência adquirida ou resistência induzida. A resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês 'Systemic Acquired Resistance') é um mecanismo que confere proteção duradoura à planta contra um largo espectro de agentes patogênicos despoletado por uma antecedente exposição local do agente patogênico. A acumulação intracelular de ácido salicílico, uma fitohormona, é necessária à ativação da SAR. A resistência sistêmica induzida (ISR, do inglês 'Induced Systemic Resistance') é também uma forma de resistência na qual as defesas da planta são preconditionadas por tratamento prévio e requer a presença de alguns microrganismos (Mauch-Mani & Métraux, 1998, Sticher et al., 1997, Tuzun, 2001) (Figura 6). É o caso de algumas rizobactérias que despoletam na planta mecanismos de defesa independentes do ácido salicílico.



**Figura 6 - Modelo de recrutamento e ativação de microrganismos benéficos pela planta quando infetada. As plantas infetadas percebem a invasão de agentes patogênicos de forma radicular ou aérea e, posteriormente, aumentam a secreção de compostos estimuladores de microrganismos recrutando e ativando microrganismos benéficos da planta. Os microrganismos benéficos podem induzir uma resistência (RI) direta ou indireta pela produção de compostos inibidores de patogênicos.**

A resistência sistêmica induzida consiste assim num mecanismo alternativo para o controlo biológico através de metabolitos produzidos por algumas bactérias que interagem com o sistema radicular vegetal e afetam a planta induzindo a sua resistência a alguns agentes patogénicos tais como fungos ou vírus (van Loon et al., 1998).

## 1.6. Bactérias termofílicas do solo

Um das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é a sua habilidade em adaptarem-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão, concentração salina e outros parâmetros ultrapassam os valores considerados como padrões para a proliferação da maioria dos seres vivos. A existência de ambientes geotermicamente estáveis tem permitido a seleção de microrganismos que não apenas resistem, mas também requerem altas temperaturas para sobreviver. Estes microrganismos são denominados de termofílicos e são classificados em termofílicos moderados com temperaturas ótimas de crescimento entre os 40 e 50°C, e termofílicos extremos capazes de crescer otimamente a temperaturas entre os 65 e 85°C. No primeiro grupo, estão incluídos procariontes dos domínios Bacteria e Archaea e eucariotes (domínio Eukarya – fungos filamentosos). O segundo grupo inclui procariontes dos domínios Bacteria e Archaea (Singleton & Amelunxen, 1973). Portanto, as espécies termofílicas são encontradas na maioria dos géneros bacterianos e têm semelhanças com características mesofílicas, pois fermentam hidratos de carbono similares, utilizam fontes de azoto semelhantes, e têm vias oxidativas similares (Marchant et al., 2002). Podem existir como aeróbios, anaeróbios ou como aeróbios facultativos, existindo espécies autotróficas e heterotróficas (Marchant et al., 2002).

A distribuição biogeográfica de bactérias termofílicas tem sido alvo de diversos estudos (Mutzel et al., 1996, Rahman et al., 2004, Wiegel et al., 1979). Há cerca de uma década, isolados bacterianos do género *Geobacillus*, com temperatura ótima de crescimento de 70°C foram isolados a partir de solos frios na Irlanda do Norte (Marchant et al., 2002, Marchant et al., 2008), que não apresentavam qualquer característica geotérmica. A análise de amostras de solos oriundos de vários pontos do globo permitiu a recolha de termofílicos de solos temperados e mesmo de sedimentos do Ártico (Hubert et al., 2010, Hubert et al., 2009), sugerindo que estes organismos estão em todos os solos. Vários estudos sugerem que a origem de bactérias termofílicas em solos temperados estará na dispersão pelo vento e correntes de água a partir de ambientes de temperatura elevada (Portillo & Gonzalez, 2008). Independentemente dos

mecanismos que permitiram estes termofílicos de alcançar solos temperados e frios, eles constituem presentemente taxas endémicas.

O mecanismo de sobrevivência das bactérias termofílicas em solos temperados permanece largamente desconhecido. Bactérias *gram*-positivas termofílicas que produzem endósporos, por exemplo, do género *Bacillus*, podem sobreviver por longos períodos de tempo, resistindo a condições extremas de seca e frio, bem como a radiações UV (Saffary et al., 2002). Contudo, estudos recentes confirmam que uma fração dos microrganismos termofílicos está presente no solo sob forma vegetativa e com a possibilidade de o seu crescimento ser muito lento mas contínuo (Marchant et al., 2008, Portillo et al., 2012). Deste modo, é possível que em ambientes terrestres temperados como aqueles presentes a latitudes mais próximas dos polos, um crescimento bacteriano lento resulte num aumento de células viáveis. Porém, em locais de temperaturas mais elevadas, por exemplo nos países do sul da Europa onde a temperatura de camadas superficiais do solo pode facilmente ultrapassar os 40°C durante o Verão (Portillo et al., 2012), as bactérias termofílicas poderão ter oportunidade de crescimento a taxas elevadas durante as estações mais quentes.

As bactérias termofílicas que têm sido isoladas a partir de diversos solos, incluindo solos agrícolas, pertencem ao *phylum Firmicutes*, ordem Bacillales e compreendem os géneros *Brevibacillus*, *Geobacillus*, *Ureibacillus* e *Bacillus*. Apesar de o *phylum Firmicutes* apresentar uma minoria entre as comunidades bacterianas do solo (Janssen, 2006), estas bactérias termofílicas são metabolicamente ativas em particular durante períodos de temperatura elevada. Estudos de quantificação relativa do RNA ribossomal por transcrição reversa em tempo real (RT-PCR ‘real time’) sobre amostras ambientais, e visando os géneros *Brevibacillus*, *Geobacillus* e *Ureibacillus* permitiu detetar frações metabólicas de RNA bacteriano termofílico até um máximo de 3,14% da comunidade bacteriana, sendo que foi observada uma relação exponencial entre o RNA destes termofílicos e a temperatura do solo (Portillo et al., 2012). Conclui-se assim que estas bactérias termofílicas poderão desempenhar um papel metabolicamente ativo em alguns solos temperados, pelo menos dentro de um período sazonal mais quente.

### **1.6.1. Papel e impacto das bactérias termofílicas**

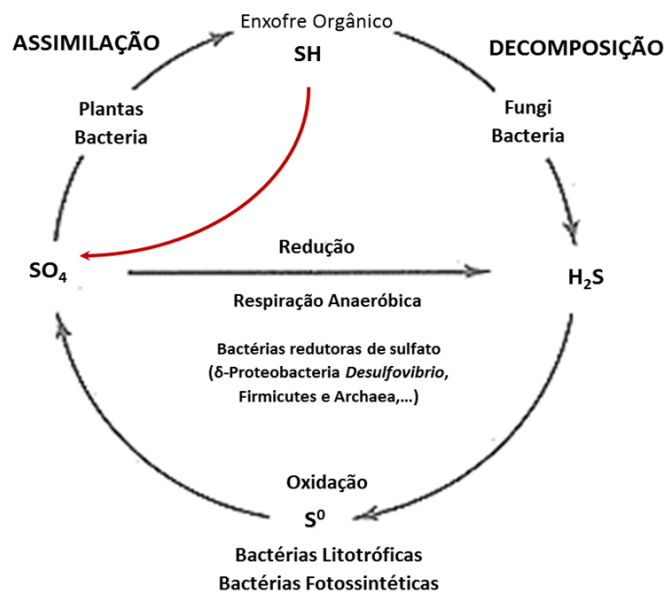
Vários estudos efetuados sobre o isolamento e cultivo de estirpes termofílicas restringem o seu interesse a processos e produtos passíveis de uso em processos industriais, pelo facto destes microrganismos possuírem enzimas termoestáveis (Mutzel et al., 1996,

Rahman et al., 2004, Wiegel et al., 1979). Porém, a recente descoberta de isolados termofílicos em solos temperados vem colocar questões sobre o potencial metabólico destas bactérias.

Alguns estudos recentes propõem, pela primeira vez, um papel na mobilização de enxofre e azoto orgânico, como sulfato e amónia, respetivamente, pelas bactérias termofílicas do *phylum Firmicutes*, pertencentes à ordem Bacillales, géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Geobacillus* e *Ureibacillus*, sob temperaturas elevadas. Nesses estudos foram efetuados enriquecimentos seletivos a partir de solos recolhidos em diferentes locais, por incubação em meio nutritivo a diferentes temperaturas (25°C e 50°C) (Portillo et al., 2012). A monitorização de amónio e sulfato produzidos ao longo do tempo revelou uma produção superior destes iões a 50°C.

Foram isoladas bactérias mesofílicas e termofílicas a partir dos enriquecimentos a 25°C e 50°C, respetivamente, e efetuadas culturas destes microrganismos, pertencentes às comunidades microbianas sob estudo. Também para as culturas dos isolados verificou-se um aumento significativo da produção de sulfato, sendo que em algumas estirpes, o conteúdo em sulfato libertado para o meio de cultura era superior a cinco vezes o valor produzido pelos isolados mesofílicos, o qual nunca foi superior a *ca.* 0,2 mM, este registado para um isolado do género *Paenibacillus*. No caso do amónio, as concentrações obtidas em culturas de isolados termofílicos do solo pertencentes aos géneros referidos, são similares àquelas produzidas por bactérias produtoras de altas concentrações de amónia, designadas como “super-produtoras de amónia” (Portillo et al., 2012, Willey et al., 2009).

Verificou-se também que as culturas dos isolados termofílicos suplementadas com tiosulfato ou não suplementadas apresentavam valores similares de concentração de sulfato solúvel. O tiosulfato é um intermediário da oxidação do enxofre inorgânico e a maioria das bactérias que a efetuam são capazes de oxidar o tiosulfato a sulfato (Madigan, 2003). Este resultado mostra que a produção de sulfato pelos isolados termofílicos é independente da oxidação de fontes de enxofre inorgânico. Pelo contrário, trata-se de uma oxidação dissimilativa do enxofre orgânico, tendo os autores observado uma proporcionalidade na concentração de sulfato com a disponibilidade de nutrientes orgânicos. Essa oxidação dissimilativa constitui uma nova via de mineralização do enxofre orgânico, e está representada na Figura 7 pela seta vermelha.



(Adaptado de Madigan et al., 2003)

Figura 7 - Ciclo do enxofre.

Assim, as bactérias termofílicas de solos temperados terão um papel na mineralização de biomassa com consequente produção de sulfato, sendo capazes de explorar nichos espaciais e temporais para participar no ciclo biogeoquímico do enxofre. Além do mais, fica refutada a afirmação sobre o papel limitante das bactérias na mineralização do S-orgânico, afirmação baseada em estudos prévios, efetuados a temperatura moderada (20°C) (Ghani et al., 1993). Adicionalmente, têm um papel na mineralização de azoto, a amónia produzida pelos isolados termofílicos estudados, será proveniente da decomposição da matéria orgânica do solo, por exemplo, proteínas, tal como acontece com as bactérias heterotróficas mesofílicas produtoras de amónia (Portillo et al., 2012)

Atendendo a que o enxofre e azoto orgânicos constituem frações maioritárias destes elementos em ambientes terrestres e que o sulfato é a principal fonte de enxofre para as plantas, a descoberta da capacidade das bactérias termofílicas dos solos na mineralização do enxofre reveste-se da maior importância para o estabelecimento de modelos agrícolas mais produtivos e sustentáveis. Nestes modelos é possível a aplicação destas bactérias como adjuvantes na fertilização dos solos com carência em enxofre e/ou azoto (Santana et al., 2013).

## 1.7. Metabolismo do enxofre

O enxofre é um dos elementos mais importantes nos sistemas biológicos e é necessário para maximizar o rendimento e qualidade das culturas agrícolas. A maioria dos fertilizantes resulta em adições de enxofre elementar no solo, apesar do sulfato solúvel ser a principal fonte de enxofre para as plantas. A mineralização do enxofre é a conversão de ligações de enxofre orgânico a sulfato inorgânico, que está disponível para o uso das plantas. A imobilização do enxofre é o processo inverso, em que o enxofre inorgânico é assimilado pela biota e incorporado na matéria orgânica, tornando-se indisponível para as raízes das plantas. Os processos responsáveis pelas transformações de enxofre em solos, tais como a mineralização, imobilização, oxidação e redução, são mediados, principalmente, por agentes microbianos. Os fatores que afetam a atividade microbiana envolvidos nestes processos têm sido pouco averiguados, tais como pH, temperatura e disponibilidade de nutrientes.

Na natureza, o enxofre orgânico representa a maior parte de enxofre em solos, constituindo mais de 90% do total (Anandham et al., 2008, Schlesinger, 1997) O enxofre orgânico, SH, é encontrado no solo em resíduos de biomassa, por exemplo, como parte de aminoácidos (cisteína e metionina) e em moléculas complexas, tais como ácidos húmicos que não podem ser utilizados por organismos superiores. Considerava-se o papel microbiano na mineralização do enxofre orgânico limitado, pelo que a maioria dos estudos no ciclo do enxofre englobava as transformações microbianas de enxofre inorgânico, incluindo a atividade de bactérias oxidativas do enxofre e bactérias redutoras de sulfato. Contudo, a mineralização do enxofre orgânico em sulfato inorgânico (SO<sub>4</sub>) foi considerada o maior contribuinte para o crescimento das plantas em solos não fertilizados. Neste processo era considerada a decomposição efetuada organismos tais como fungos, do enxofre orgânico em sulfureto de hidrogénio (SH<sub>2</sub>), seguida de oxidação do sulfureto a enxofre e tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Esta oxidação é realizada por bactérias quimiolitotróficas oxidativas do enxofre (ver Figura 7). As *β-Proteobacteria* são exemplo de bactérias que incluem bactérias oxidativas do enxofre, por exemplo as bactérias quimiolitotróficas do género *Thiobacillus* oxidam o sulfureto de hidrogénio (SH<sub>2</sub>), tiosulfato ou o enxofre elementar a sulfato.

Nas plantas, o metabolismo do enxofre oferece várias opções para combater a exposição ao *stress* biótico e/ou abiótico, incluindo a síntese de compostos de defesa que contêm enxofre (SDCs, do inglês ‘Sulphur Defence Compounds’), tais como H<sub>2</sub>S, glutationo, glucosinolatos e fitoalexinas (Haneklaus et al., 2004, 2001, Schnug et al., 1995).



De acordo com a exposição esquemática da Figura 8, a integração de enxofre nas plantas ocorre com a absorção de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) a partir do solo e amplamente transportado para a parte aérea, e assimilado em cisteína, um aminoácido incluído no metabolismo primário, na síntese de proteínas e na formação de compostos de defesa contendo enxofre (SDCs) (Rausch & Wachter, 2005).

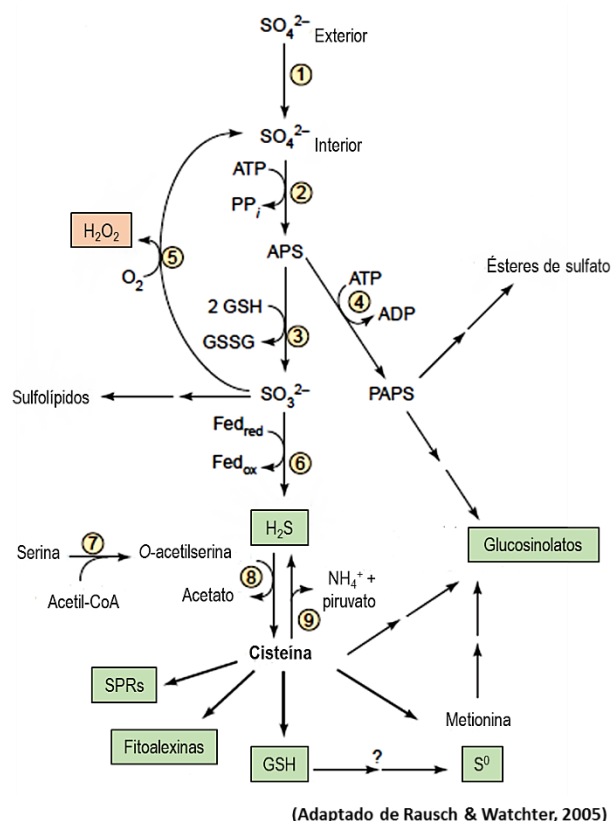


Figura 8 – Assimilação de sulfato como plataforma para a biossíntese de compostos de defesa que contêm enxofre, representados nas caixas a verde. 1 – transportadores de sulfato; 2 – ATP sulfurilase; 3 – APS redutase; 4 – APS cinase; PAPS – 3'-fosfoadenililsulfato; 5 – sulfito oxidase; 6 – sulfito redutase; 8 – O-acetil(tiol)liase; 9 – ação de desulfidrases.

## 1.8. Resistência induzida pelo enxofre

O termo resistência induzida pelo enxofre (SIR, do inglês 'Sulphur Induced Resistance') denota o reforço da resistência natural das plantas a agentes patogênicos, pelo estímulo de processos metabólicos que envolvem o enxofre. Nestes processos, representados na Figura 8, a cisteína, o glutathione e os glucosinolatos são os compostos centrais, pois as suas concentrações em partes e tecidos das plantas provaram estar estreitamente relacionados com o fornecimento de enxofre (Rausch & Wachter, 2005) (Figura 9).

A partir da cisteína, vários passos levam à síntese de enxofre elementar ( $S^0$ ),  $H_2S$ , glutationo, fitoalexinas, proteínas ricas em enxofre e vários metabolitos secundários, como acima referido (Király et al., 2012, Rausch & Wachter, 2005). Estes compostos intervêm em processos celulares, tais como a sinalização redox, a regulação de atividades enzimáticas, modulação da expressão de genes, a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), de metais pesados e xenobióticos, e no metabolismo de produtos secundários (Király et al., 2012).

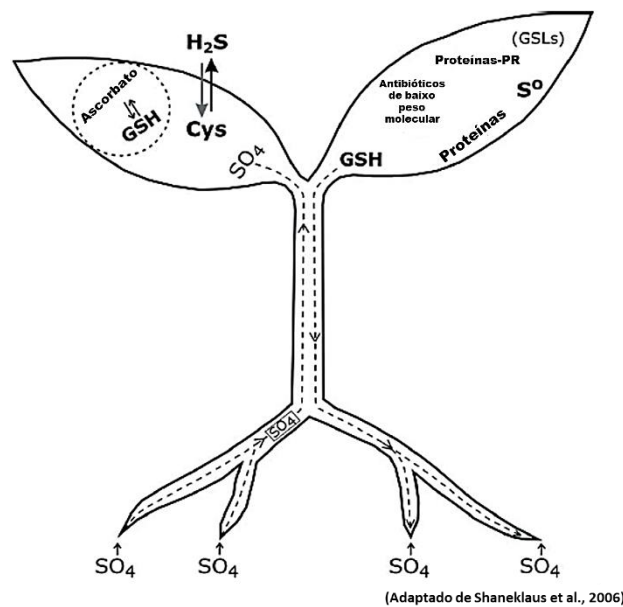


Figura 9 - Metabolitos que contêm enxofre envolvidos na SIR.

O estado nutricional da planta quanto ao enxofre regula a absorção, translocação e distribuição intracelular do sulfato por via de transportadores de sulfato (Rausch & Wachter, 2005) e é um aspeto fundamental na SIR. Na regulação da assimilação de enxofre, o glutationo (GSH) tem um papel importante, visto constituir uma forma de transporte a longa distância, por toda a planta (Haneklaus et al., 2006) (Figura 9) e é responsável pela diminuição do nível do enzima ATP sulfurilase (enzima 2 da Figura 9) na raiz (Lappartient et al., 1999). Além disso, o glutationo protege o citoplasma e outros compartimentos celulares contra espécies reativas de oxigênio (ROS) que se acumulam em resposta a *stress* biótico e abiótico.

Exemplos de SIR incluem o efeito fungicida resultante de aplicação foliar de enxofre elementar, entre outros. O enxofre elementar tem sido usado, desde o final do século XIX, de forma eficiente contra infeções em videiras contra o fungo oídio (*Erysiphe necator*). Estudos

feitos por Boubos et al. (2000) indicaram que, além do efeito fungicida direto de aplicação foliar do enxofre, ocorre um efeito nutritivo pelo enxofre no solo, que resulta numa menor taxa de infecção da folha da videira e das uvas (Bourbos et al., 2000). Recentemente, estudos demonstraram que o fornecimento de sulfato está relacionado com o aumento de resistência das plantas *Nicotiana tabacum* cv. *Samsum* à infecção pelo vírus do mosaico do tabaco (TMV, *Tobacco mosaic virus*) (Höller et al., 2010, Király et al., 2012).

## 1.9. Objetivos deste estudo

Um dos principais objetivos deste estudo incidiu na caracterização molecular de um isolado viral de *Olive latent virus 1* de oliveira, a fim de ampliar o conhecimento sobre as populações de vírus que afetam a oliveira. Deste modo, pretende-se contribuir para o maior entendimento acerca da epidemiologia dos vírus que infetam a oliveira, permitindo assim o desenvolvimento de medidas preventivas e de controlo mais eficientes, especialmente importante no caso de vírus muito disseminados, como é o caso de OLV-1.

Adicionalmente pretendeu-se testar a possibilidade de um isolado bacteriano termofílico, produtor de sulfato, induzir tolerância de plantas *Nicotiana benthamiana* à infecção viral pelo isolado G1A de *Olive latent virus 1* e avaliar se existe resistência induzida pelo enxofre.

Os objetivos específicos compreendidos na elaboração deste estudo foram:

1. Efetuar a caracterização molecular e a análise da sequência de um isolado de OLV-1 de oliveira, o G1A, e a sua comparação com outros isolados de OLV-1 conhecidos e completamente sequenciados, de citrino, de oliveira e de tomate.
2. Efetuar a caracterização de um RNA satélite associado ao isolado G1A de OLV-1.
3. Averiguar se um isolado termofílico produtor de sulfato à temperatura ótima de crescimento (ca. 50°C) é capaz de sobreviver e produzir sulfato à temperatura ambiente.
4. Testar o isolado bacteriano termofílico selecionado quanto à capacidade de provocar o atraso de sintomas de infecção viral causados por OLV-1 em plantas de *Nicotiana benthamiana*, após tratamentos das plantas com suspensão bacteriana.



# CAPÍTULO 2

---

## Materiais e Métodos



## **A. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM ISOLADO VIRAL DE *OLIVE LATENT VIRUS 1***

### **2.1. Origem do isolado viral**

O isolado viral utilizado neste trabalho foi obtido a partir da inoculação de extratos de azeitonas de oliveira cv. *Galega vulgar* em 1995. Este isolado foi mantido em plantas herbáceas indicadoras da espécie *Nicotiana benthamiana* Domin, pertencentes à família botânica *Solanaceae*, congeladas a -20°C.

### **2.2. Inoculação mecânica**

Para a propagação do vírus, necessária para a realização deste trabalho, as folhas de plantas da espécie *Nicotiana benthamiana* previamente inoculadas com o isolado viral e congeladas, como referido no ponto anterior, 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 novas plantas de *N. benthamiana*. Estas foram mantidas durante quatro a cinco dias numa sala com temperatura controlada (22-25°C) e com um regime de luz de 14 h e as sintomatologias foram sendo regularmente registadas.

### **2.3. Purificação viral**

A purificação do isolado viral G1A foi feita segundo um protocolo que se demonstrou eficaz em termos de quantidade de vírus obtido.

Utilizaram-se 100 g de plantas de *N. benthamiana*, previamente inoculadas com o isolado viral G1A, e que apresentavam sintomas. Estes tecidos foram homogeneizados na presença de tampão 0,1 M fosfato de sódio e 1% de ascorbato de sódio, pH 6,0, na proporção 1:3 (p/v). Este homogeneizado foi emulsionado com 10% de uma mistura de butanol-clorofórmio 1:1 (v/v) por agitação durante 30 min em banho de gelo e depois clarificado por centrifugação a 12000 g durante 10 min a 4°C (Merciega et al., 1996). O sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a 186000 g durante 2 horas a 4°C e o precipitado obtido foi ressuspenso em 1 mL de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0, e mantido 4 h a 4°C. A ressuspenção foi posteriormente centrifugada a 12000 g durante 10 min e o sobrenadante novamente

ultracentrifugado a 186000 *g* durante 2 horas. O precipitado resultante foi ressuspenso em 300  $\mu$ L de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0. A ressusensão 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 horas e ressusensas em 200  $\mu$ L de tampão 0,02 M fosfato de sódio, pH 6,0.

A quantificação do vírus foi feita num espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), no comprimento de onda 260 nm, usando o coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{260}^{1\%} = 5.0$ .

## 2.4. Extração e análise dos ácidos nucleicos

### 2.4.1. Extração e visualização do RNA viral e total

A extração do RNA viral a partir de preparações virais purificadas, foi feita com a utilização das colunas do 'RNeasy Plant Mini Kit' e seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Qiagen). Para a obtenção do RNA total de planta, esmagaram-se 100 mg de material vegetal em azoto líquido e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante do *kit*. Para a eluição do RNA utilizaram-se 30  $\mu$ L de água isenta de RNases.

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

Cinco  $\mu$ L de amostra de ácido nucleico viral obtidos pelo método acima referido, foram analisados num mini gel de 1% de agarose preparado em tampão TBE 0,5X (1X: 1 M Tris-HCl, 0,83 M ácido bórico, 10 mM EDTA, pH 7,5) feito com água tratada com DEPC e como referência, utilizou-se o marcador de RNA 'RNA Ladder High Range' (Thermo Scientific). A eletroforese decorreu à voltagem constante de 80 V, durante 1 hora. Para a visualização das bandas correspondentes aos ácidos nucleicos, o gel foi corado por imersão numa solução de 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio (Sambrook et al., 1989) e depois observado num transiluminador com lâmpadas UV SXT-20.M (Uvitec®).



### 2.4.2. Extração e análise de cadeias duplas de RNA (dsRNA)

As dsRNA foram extraídas de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o isolado viral G1A e depois fracionadas por cromatografia em colunas de celulose, seguido o protocolo de Morris e Dodds (1979), com as modificações que a seguir se descrevem (Morris & Dodds, 1979).

Foram utilizados 10 g de tecido vegetal infetados de plantas herbáceas previamente macerados em azoto líquido. O pó resultante da maceração foi homogeneizado em tampão de extração arrefecido a 4°C, constituído por 30 mL STE 2X (1X: 0,2 M NaCl, 0,1 M Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5), 17 mL de solução SDS a 10%, 1 mL de suspensão de bentonite (40 mg de bentonite em 1 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 mL de 2-mercaptoetanol, 12 mL de fenol saturado com água contendo 0,1% de 8-hidroxiquinolina (o fenol foi previamente neutralizado com 0,1 mL de NH<sub>4</sub>OH por cada 25 mL) e 12 mL de clorofórmio. Agitou-se esta mistura durante 45 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se a 10000 g durante 15 min. O sobrenadante foi recolhido e ajustado para 17% de etanol absoluto, ao qual se juntou celulose CF 11 (Whatman), na proporção de 1 g por 10 g de tecido vegetal, e agitou-se lentamente durante 2 h à temperatura ambiente. Esta suspensão foi depois transferida através de uma coluna consistindo em uma seringa de plástico descartável, no fundo da qual se colocou uma rodela de entretela para evitar o escoamento da celulose. A coluna de celulose foi lavada com 15 volumes de tampão STE-17% de etanol, para permitir a eluição do DNA e das cadeias simples de RNA ('single stranded' RNA/ssRNA). Esta eluição foi feita à temperatura ambiente, para evitar que algumas cadeias de ssRNA pudessem ficar adsorvidas à celulose (Dodds et al., 1984). A eluição da fração contendo as dsRNA foi feita com 4 volumes de tampão STE 1X, e o eluído recolhido foi precipitado na presença de 2,5 volumes de etanol absoluto frio e 1/10 de volume de 3 M acetato de sódio, pH 5,5, durante a noite a -20°C. O precipitado foi depois centrifugado a 12000 g durante 45 min a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e os *pellets* ressuspensos em 50 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) e centrifugou-se a 10000 g durante 4 min à temperatura ambiente. O sobrenadante anterior foi retirado e novamente ressuspensão em 2,5 volumes de etanol absoluto frio e 1/10 de volume de 3 M acetato de sódio, pH 5,5, durante 2 h a -80°C. O precipitado foi depois centrifugado a 15700 g durante 30 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado em 500 µL de etanol a 70%. Após nova centrifugação a 15700 g durante 5 min à temperatura ambiente, o precipitado foi seco em vácuo e ressuspensão em 30 µL de água previamente tratada com DEPC.

A fração correspondente à amostra de dsRNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE 0,5 X. Para estimativa da massa molecular, foi utilizado

como marcador o 'NZYDNA Ladder III' (Nzytech). A eletroforese foi realizada a 80 V durante 1 h e 30 min. Após esse tempo o gel foi corado e observado como referido no ponto anterior.

## 2.5. Amplificação e sequenciação do RNA genómico do isolado viral G1A

De modo a obter a sequência do RNA genómico do isolado G1A optou-se por uma estratégia que consistiu em amplificar e clonar o genoma viral em fragmentos parciais A, B, C e D (Figura 10), uma vez que as reações de sequenciação têm um tamanho aproximado de 900 pb. Desta forma, todos os fragmentos foram sequenciados em ambos os sentidos.

Para a amplificação e clonagem das extremidades 3' e 5', utilizou-se a técnica RACE ('Rapid Amplification of cDNA End's') (Frohman et al., 1988, Grieco et al., 1996a) com as modificações descritas no ponto 2.5.6..

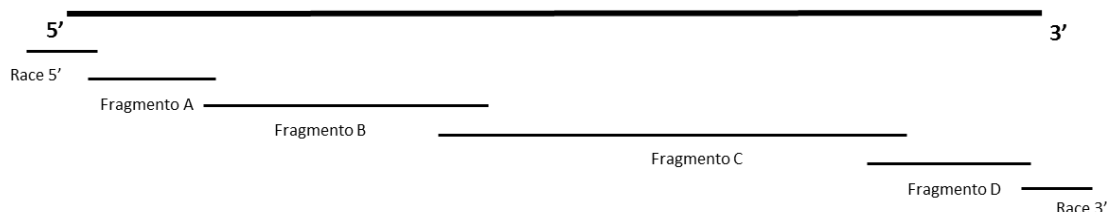


Figura 10 - Esquema da estratégia de amplificação, clonagem e sequenciação do genoma viral.

### 2.5.1. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA seguiu-se o protocolo otimizado descrito em Martelli et al. (1996), onde a 1 µL de RNA total se juntou 150 ng de *random hexamers* (Promega), desnaturou-se durante 10 min a 70°C e depois incubou-se 15 min em gelo. A reação de RT foi feita na presença de 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs e 200 U de enzima Transcriptase Reversa, Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MLV) (Invitrogen), num volume total de 20 µL, durante 1 h a 37°C.

### 2.5.2. Otimização da Amplificação por PCR

Tal como referido anteriormente, foi utilizada a estratégia de sequenciar o genoma do isolado G1A por fragmentos. O protocolo utilizado na amplificação de cada fragmento resultou da otimização prévia de vários parâmetros. Para a otimização das amplificações por PCR foram usados *primers* já existentes no laboratório (Quadro 3).

O fragmento C foi amplificado com os *primers* degenerados par RdRp5' e par Coat3'. Este par de *primers* permite uma larga amplificação do genoma do isolado viral. A otimização do PCR usando este par de *primers* consistiu na utilização de diferentes temperaturas de emparelhamento (55 e 54°C) e diferentes concentrações de *primers* (0,2 a 0,5 µM).

Para o fragmento B foram utilizados vários pares de *primers* (G6Cint5' e G6C3'; G6Cint5' e G6Cint3'; G6C5' e G6C3') na tentativa de obter o melhor produto amplificado. Como tal, foi também necessário analisar todos os parâmetros de forma a melhorar o protocolo utilizado, tais como, a quantidade de RNA total (2, 3 e 5µL), a concentração de *primers* (0,2 µM a 0,5 µM), a temperatura e duração da etapa de emparelhamento dos *primers* (entre 52 a 65°C e 30 seg a 50 seg, respetivamente).

Para o fragmento A, a otimização do protocolo incidiu na temperatura de emparelhamento dos *primers* (55, 60 e 65°C).

Finalmente, para o fragmento D, tal como ocorreu para o fragmento C, foram testados vários pares de *primers* (Comum5' e Comum3'; G6int5' e G6int3'; G6int5' e Comum3'). A otimização do protocolo a utilizar na amplificação desta porção do genoma incidiu na quantidade de RNA total (1 e 2µL), na temperatura de emparelhamento dos *primers* (entre 52 a 65°C), na duração da etapa de emparelhamento dos *primers* (30 seg a 1 min) e na duração da etapa de extensão (1 min e 30 seg a 2 min).

Quadro 3 - Sequências dos *primers* utilizados na otimização da amplificação os fragmentos A, B, C e D do genoma do isolado G1A.

	Designação	Posição no genoma	Sequência 5' → 3'
FRAG. A	G6C5'	16 – 34	GTATACGGATATCGGTGCG
	G6Cd3'	579 – 598	CTTGGAGGTTGTCCATACCA
	G6Cint5'	394 – 412	GCTACAGAGGCCAATCGAC
FRAG. B	G6C5'	16 – 34	GTATACGGATATCGGTGCG
	G6Cint3'	1242 – 1260	GACCGTGATCTCCCCAAG
	G6C3'	1633 – 1652	CAGACAATGACGCAGTCATC
FRAG. C	par RdRp5'	1119 – 1140	CCWGCWCCSMGGGKATWCARC
	par Coat3'	3164 – 3186	TATCCSGCGTAWGGWGGGAAWKT
FRAG. D	G6int5'	2970 – 2987	CCTCTCATGGTTGGCAGG
	Comum5'	2584 – 2606	tttttgcggccgcAAGACTCAACACATTTTCGATCGC
	Comum3'	3671 – 3691	tttttgcggccgcGGCAAAGGCCCTCAATCTGG
	G6int3'	3341 – 3359	CCTTGATCACTTGCAGTGG

### 2.5.3. Amplificação por PCR

Para a amplificação de cada um dos fragmentos A, B, C e D utilizou-se 1 µL da reação de transcrição reversa anterior (ver ponto 2.5.1.), ao qual se juntaram 1X tampão Dream Taq (Thermo Scientific), 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada um dos *primers* (direto e reverso) e 2,5 U de enzima para PCR Dream Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific), num volume total de 50 µL. Os *primers* utilizados foram os seguintes: G6C5' e G6Cd3' para a amplificação do fragmento A, G6Cint5' e G6C3' para a amplificação do fragmento B, *primers* degenerados par RdRp5' e par Coat3' para a amplificação do fragmento C e G6int5' e Comum3' para a amplificação do fragmento D (Figura 11 e Quadro 4).

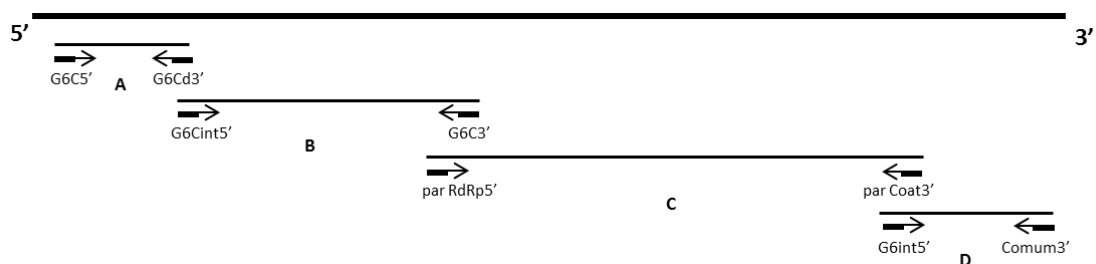


Figura 11 - Localização no genoma, dos locais de complementaridade dos *primers* utilizados para amplificar cada um dos fragmentos A, B, C e D.

Quadro 4 - Sequências dos *primers* utilizados para amplificar os fragmentos A, B, C e D do genoma do isolado G1A.

	Designação	Posição no genoma	Sequência 5' → 3'
FRAG. A	G6C5'	16 – 34	GTATACGGATATCGGTGCG
	G6Cd3'	579 – 598	CTTGGAGGTTGTCCATACCA
FRAG. B	G6Cint5'	394 – 412	GCTACAGAGGCCAATCGAC
	G6C3'	1633 – 1652	CAGACAATGACGCAGTCATC
FRAG. C	par RdRp5'	1119 – 1140	CCWGCWCCSMGGGKATWCARC
	par Coat3'	3164 – 3186	TATCCSGCGTAWGGWGGGAAWKT
FRAG. D	G6int5'	2970 – 2987	CCTCTCATGGTTGGCAGG
	Comum3'	3671 – 3691	tttttgcggccgcGGCAAAGGCCCTCAATCTGG

As reações de amplificação foram realizadas num termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Os programas de amplificação foram ajustados às condições exigidas pelo tamanho do fragmento e pelos *primers* utilizados. Assim, para o fragmento A o programa otimizado consistiu em 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C e 1 min a 72°C, tendo a extensão final sido de 10 min a 72°C; para o fragmento B, 2 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 52°C e 3 min e 30 seg a 72°C, tendo a extensão final sido de 5 min a 72°C; para o fragmento C, 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 2 min e 30 seg a 72°C, e a extensão final durante 10 min a 72°C e para o fragmento D, 1 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C e 2 min a 72°C,

tendo a extensão final sido de 10 min a 72°C. Os produtos de amplificação, foram submetidos a eletroforese num gel de 1% agarose preparado em tampão TBE 0,5X e posteriormente corados e observados como descrito em 2.4.1.. As bandas correspondentes aos produtos de amplificação esperados de cerca de 563 pb para o fragmento A, 1259 pb para o fragmento B, 2068 pb para o fragmento C e 722 pb para o fragmento D foram cortadas do gel e o DNA purificado com 'Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit' (GE Healthcare Biosciences) seguindo-se as instruções do fabricante. O DNA foi eluído usando 30 µL de água isenta de RNases e fez-se uma nova eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TBE 0,5X para uma quantificação aproximada do DNA.

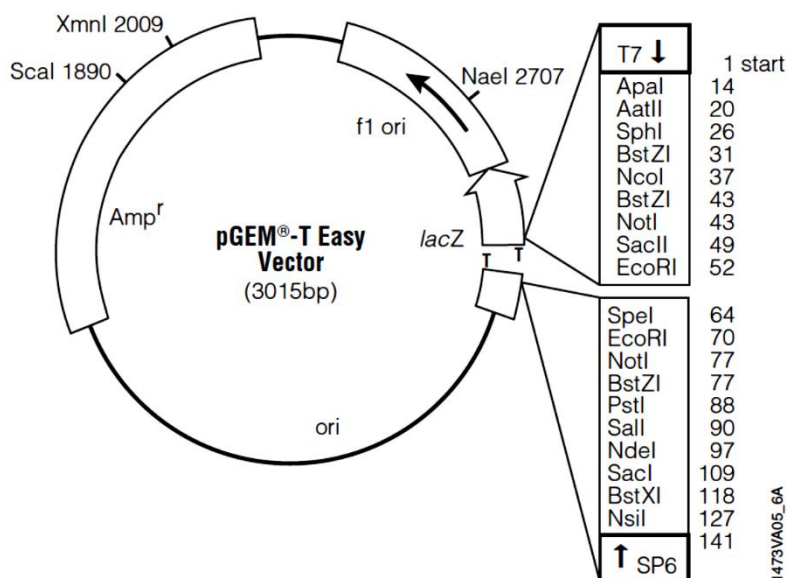
À exceção do fragmento A cujo produto amplificado foi diretamente sequenciado, todos os outros fragmentos foram clonados antes da sua sequenciação.

## 2.5.4. Clonagem

### 2.5.4.1. Vetor plasmídico

Como vetor de clonagem utilizou-se o plasmídeo p-GEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (Figura 12). Este plasmídeo já é linearizado e contém extremidades 3'-T no local de inserção. Estas extremidades 3'-T individuais melhoram a eficiência da ligação por inserção, prevenindo a recircularização do vetor e proporcionando uma extremidade compatível para os produtos de PCR gerados por certas polimerases termoestáveis como é o caso da utilizada neste estudo. Este plasmídeo tem cerca de 3000 pb e tem a capacidade de fazer um elevado número de cópias do plasmídeo na célula. Contém o gene de resistência à ampicilina e uma região do operão *lac* de *E. coli* que contém uma extremidade 5' terminal do gene *lacZ* que codifica o fragmento N terminal do β-galactosidase (*lacZ*) e complementa um fragmento C terminal codificado pelo cromossoma bacteriano. Quando os dois fragmentos se juntam formam um enzima plenamente funcional que degrada o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-[beta]-D-galactopiranosídeo) resultando numa coloração azul.

A expressão do gene *lacZ* é induzida pelo IPTG (Isopropil-[beta]-D-tiogalactopiranosídeo), um análogo da lactose. A rutura do gene *lacZ* por inserção do DNA leva ao aparecimento de colónias brancas devido à ausência da atividade do enzima, permitindo a seleção dos recombinantes positivos por rastreio da coloração branco/azul. Os locais para os *primers* universais M13 direto e reverso que permitem a sequenciação do fragmento inserido também estão incluídos.



Adaptado do manual técnico 'pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems' (Promega)

Figura 12 - Esquema do vetor pGEM®-T Easy utilizado para clonar os vários fragmentos do genoma viral do isolado G1A.

### 2.5.4.2. Ligaçãõ

Para as reações de ligaçãõ entre cada um dos fragmentos e o vetor plasmídico, foi utilizada a proporçãõ molar 3:1 (fragmento:vetor). As reações de ligaçãõ constituídas por 3 U de T4 DNA Ligase (Invitrogen) e tampãõ de ligaçãõ 1X (Invitrogen), e 50 ng de vetor, num volume total de 10 µL, foram incubadas durante a noite a 4°C.

### 2.5.4.3. Transformaçãõ

Para a introduçãõ do plasmídeo recombinante em células de *Escherichia coli* utilizou-se a transformaçãõ por choque térmico de células competentes *E. coli* JM109 (Promega). Na transformaçãõ usaram-se 50 µL de células competentes, às quais se juntaram 5 µL da reaçãõ de ligaçãõ, seguida de homogeneizaçãõ suave e incubaçãõ durante 20 min em banho de gelo, após a qual se efetuou um choque térmico a 42°C durante 45 seg. Por fim, adicionaram-se às células 950 µL de meio de cultura SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM glucose, pH 7,5) à temperatura ambiente, e a mistura incubou durante 1 hora e 30 min a 37°C com agitaçãõ a 150 rpm num agitador orbital Aerotron® (Infors AG). As células foram depois recolhidas num microtubo, por centrifugaçãõ a 1000 g durante 10 min, à temperatura ambiente. Descartou-se um volume de cerca de 950 µL do sobrenadante e as

células foram ressuspensas nos restantes 50 µL. A suspensão de bactérias foi cuidadosamente espalhada em placas de Petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB)-Agar (1% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% NaCl, 1,5% agar, pH 7,5), com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich), 0,5 mM IPTG e 80 µg/mL X-Gal, para a seleção dos clones recombinantes. As placas foram depois invertidas e mantidas durante a noite a 37°C.

#### **2.5.4.4. Extração do DNA plasmídico**

As colónias selecionadas foram inoculadas em 3 mL de meio de cultura LB (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,5), com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e incubadas durante a noite a 37°C com agitação entre 175 a 200 rpm.

O DNA plasmídico recombinante foi purificado usando o 'GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit' (Thermo Scientific) segundo o protocolo do fabricante.

#### **2.5.4.5. Restrição dos fragmentos clonados**

É de notar que tanto o enzima EcoRI como o Not I (Thermo Scientific) cortam o vetor plasmídico p-GEM®-T Easy (Promega) em dois locais, permitindo soltar o fragmento clonado. Através do programa Restriction Mapper, foi efetuada a análise comparativa com a sequência conhecida do isolado OLV-1 GM6 de oliveira e verificou-se que o enzima EcoRI corta o genoma deste isolado de OLV-1 na posição 2660 nt. Por essa razão, para a restrição do DNA plasmídico no caso do fragmento C optou-se pela utilização do enzima Not I, que não corta em nenhuma zona do genoma de OLV-1.

No caso do fragmento C, a reação de restrição consistiu em 1 µg de DNA plasmídico, tampão 10X FastDigest™ Green (Thermo Scientific) e 5 U do enzima FastDigest™ Not I (Thermo Scientific) num volume total de 20 µL a 37°C, durante cerca de 30 min, tendo sido posteriormente sujeita a 80°C durante 5 min para a inativação do enzima.

No caso dos fragmentos B e D, a reação de restrição consistiu em 1 µg de DNA plasmídico, tampão 10X FastDigest™ Green (Thermo Scientific) e 5 U do enzima FastDigest™ EcoRI (Thermo Scientific), num volume total de 20 µL a 37°C, durante cerca de 5 min, tendo sido posteriormente sujeita a 80°C durante 5 min para a inativação do enzima.

Os produtos da restrição foram analisados por eletroforese em géis de 1% de agarose preparado em tampão TBE 0,5X realizada a 80 V durante 1 h a 1h 30 min e visualizados como descrito no ponto 2.4.1..



### 2.5.5. Sequenciação

A sequenciação de cada um dos fragmentos foi feita na empresa MacroGen® usando os *primers* M13 (direto e reverso), exceto no caso do fragmento A em que foram usados os *primers* específicos G6C5' e G6Cd3' usados na sua amplificação.

### 2.5.6. Amplificação, clonagem e sequenciação das extremidades 5' e 3' do RNA genômico do isolado viral G1A

Para a sequenciação das extremidades 5' e 3' do RNA genômico do isolado G1A, utilizou-se a técnica RACE. Esta técnica permite a amplificação da extremidade de uma sequência genômica a partir de uma pequena porção interna, sobre a qual é desenhado um *primer* específico com orientação da sequência a determinar. Este *primer* específico permite sintetizar o cDNA que contém toda a sequência desconhecida, sendo na extremidade 3' deste cDNA adicionado um polímero de adenina ou citosina, de modo a criar uma 'cauda' na extremidade 3' da sequência e assim se poder amplificar, clonar e sequenciar os extremos de uma sequência nucleotídica. Após esta adição procede-se à amplificação do fragmento por PCR, em que se utiliza o *primer* usado para a síntese do cDNA ou outro específico, mais interno na sequência, e um *primer* constituído por um polímero de timina ou guanina, complementar à 'cauda' junta ao cDNA, e por uma sequência complementar a um *primer anchor*.

#### 2.5.6.1. Síntese do cDNA

Para a sequenciação da extremidade 5' (Figura 13) do RNA genômico, utilizaram-se dsRNA que se extraíram de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o isolado viral G1A, como descrito no ponto 2.4.2.. Assim, a fração das dsRNA correspondente à totalidade do RNA genômico do genoma viral, foi cortada do gel e purificada usando 'Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit' (GE Healthcare) seguindo-se as instruções do fabricante. Após a desnaturação destas duas cadeias e com a utilização de um *primer* específico reverso, obteve-se o cDNA com a extremidade 3' livre para a ligação de adeninas. Uma porção de 8 µL de dsRNA foi desnaturada durante 5 min a 95°C sendo imediatamente após colocada em banho de gelo. Juntaram-se 5 µM do *primer* específico reverso G6Sp1 (Quadro 5) e incubou-se durante 5 min a 70°C, seguido de banho gelo durante 10 min. A reação de transcrição reversa foi feita num volume total de 20 µL com 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 40 U de RNaseOUT™ (Invitrogen) e 200 U de Transcriptase Reversa M-MLV

(Invitrogen), durante 1 h a 37°C, sendo de seguida incubada durante 10 min a 70°C para inativação do enzima. A cadeia de RNA foi depois degradada usando 5 U de Ribonuclease H (Thermo Scientific) durante 30 min a 37°C, seguidos de 10 min a 65°C para inativação do enzima. Para a separação do cDNA sintetizado dos restantes componentes das reações anteriores, tais como *primers*, dNTP's não incorporados e proteínas, foi utilizado o 'DNA Clean & Concentration™ Kit' (Zymo Research) seguindo-se as instruções do fabricante.

Quadro 5 - Sequências dos *primers* utilizados para a síntese do cDNA da extremidade 5' e 3' do RNA isolado de G1A.

<i>Primer</i>	Posição no genoma	Sequência 5' → 3'
G6Sp1	412 – 394	GTCGATTGGCCTCTGTAGC
G6Sp4	2970 – 2987	CCTCTCATGGTTGGCAGG

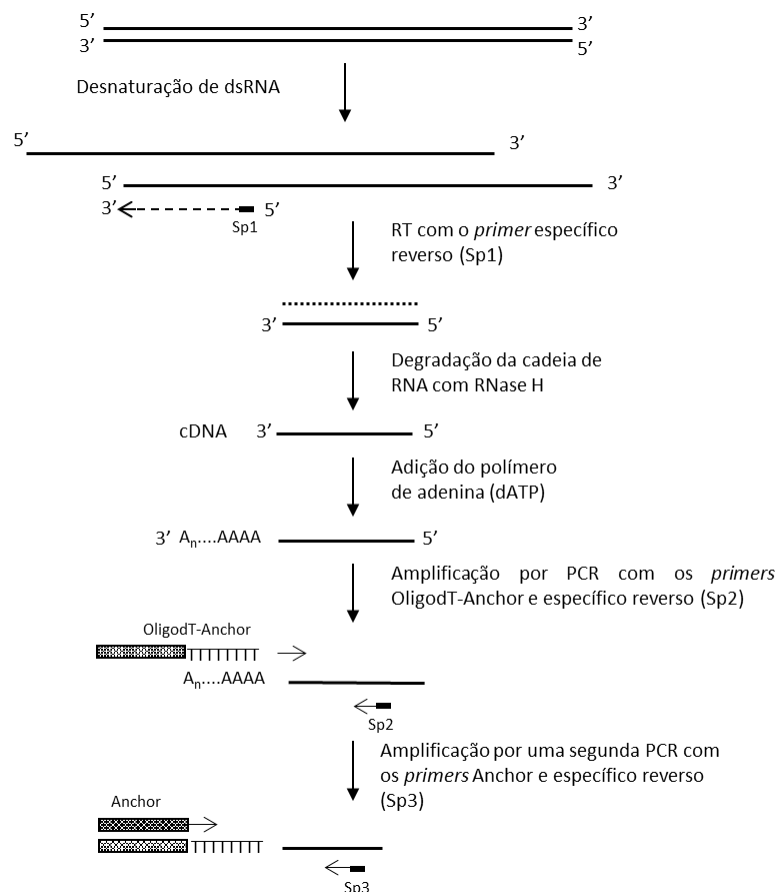


Figura 13 - Esquema de amplificação da extremidade 5' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.

O cDNA purificado foi modificado na extremidade 3' por adição de adeninas num volume total de reação de 20 µL contendo, 40 U de Terminal deoxinucleotidase Transferase (Tdt) (Thermo Scientific), tampão de reação 1X (Thermo Scientific) e 50 µM de dATP. A reação foi incubada durante 10 min a 37°C e depois durante 10 min a 70°C para a inativação do enzima.

Para clonar e sequenciar a extremidade 3' (Figura 14) do RNA genómico do isolado viral, procedeu-se de forma análoga do procedimento para a clonagem e sequenciação da extremidade 5', sendo a única diferença apontada a adição do *primer* específico G6Sp4 (Quadro 5) à porção de dsRNA desnaturada na síntese do DNA complementar.

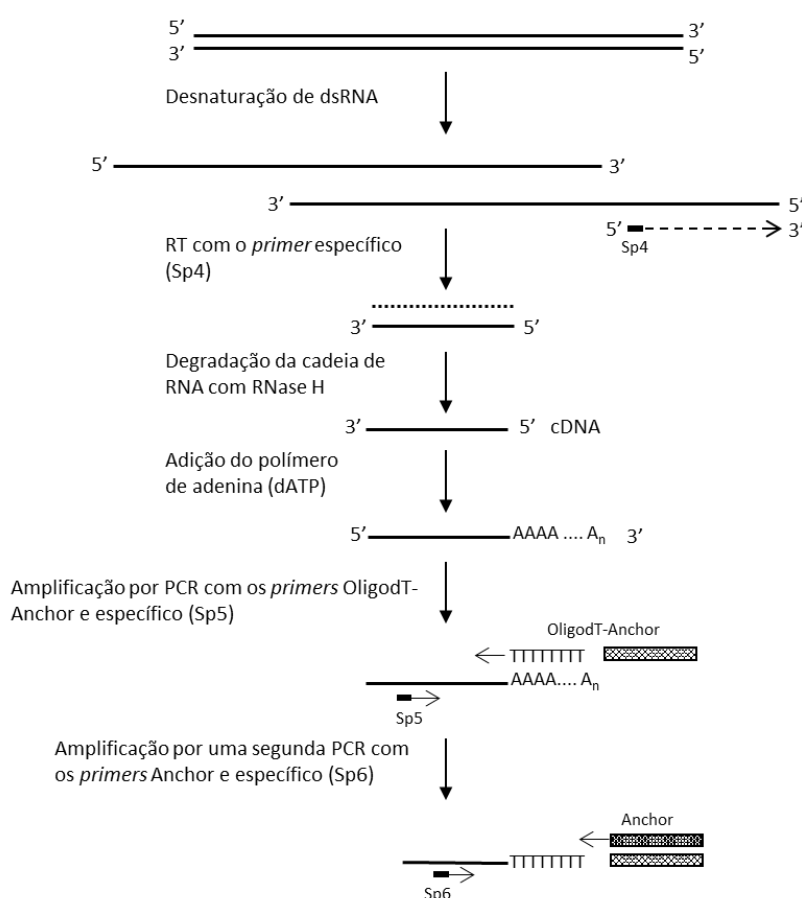


Figura 14 - Esquema de amplificação da extremidade 3' do RNA viral em que se seguiu a técnica RACE.

### 2.5.6.2. Amplificação por PCR

Para a amplificação da região correspondente à extremidade 5' (Figura 13), utilizou-se o cDNA sintetizado e com a extremidade 3' modificada como descrito no ponto anterior. As

condições utilizadas para a reação de PCR foram as seguintes: 200 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/mL BSA, 10 mM dNTPs, 0,2 μM de *primer* específico G6Sp2, 0,6 μM de *primer* Oligo(dT)-Not I (Quadro 6) e 2,5 U de *Pfu* DNA polimerase (Thermo Scientific), num volume total de reação de 50 μL. A amplificação foi realizada com o seguinte programa: 2 min a 94°C, seguido de 10 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 40 seg a 72°C, 25 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 40 seg a 72°C (neste segundo conjunto de ciclos, a extensão fez-se com um incremento de 20 seg por ciclo), tendo a extensão final sido de 10 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado num gel de 1% de agarose e correu à voltagem constante de 80 V durante 1h 15 min. As bandas correspondentes ao marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech) e ao produto de amplificação foram coradas e visualizadas como referido em 2.4.1.. A zona correspondente ao tamanho do produto esperado, cerca de 330 pb, foi cortada do gel e o DNA foi extraído com o 'QIAquick® Gel Extraction Kit' (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante.

Para a amplificação da região correspondente à extremidade 3' (Figura 14) utilizou-se o cDNA sintetizado e com a extremidade 3' modificada. As condições utilizadas para a reação de PCR foram as mesmas descritas anteriormente tendo-se apenas modificado os *primers* utilizados, que para a amplificação desta região do genoma foram: 0,2 μM de *primer* específico G6Sp5 e 0,6 μM de *primer* Oligo(dT)-Not I (Quadro 6).

Quadro 6 - Sequências dos *primers* utilizados para amplificar as extremidades 5' e 3' do RNA viral do isolado G1A.

<i>Primer</i>	Posição no genoma	Sequência 5' → 3'
G6Sp2	263 – 246	CGCTGCGATTGGCCTCCA
Oligo(dT)/Not I	-	AACCCGGCTCGAGCGCCGCT <sub>18</sub>
G6Sp5	3418 – 3437	GAACCAGTGAACCCAAGTGT

### 2.5.6.3. Amplificação por um segundo PCR

Para aumentar a concentração do produto amplificado pelo primeiro PCR, realizou-se um segundo PCR em que se utilizou um *primer* mais interno à sequência amplificada na reação anterior e um *primer anchor*. Assim, para a reação de PCR que iria amplificar a extremidade 5', utilizaram-se 2 μL do DNA obtido como descrito no ponto anterior, após eluição da coluna. As condições utilizadas para a reação de PCR foram as mesmas descritas no ponto anterior, mas utilizando 0,2 μM de *primer anchor* (Quadro 7). O produto amplificado foi analisado em gel de

1% de agarose e a zona correspondente ao tamanho do produto esperado, de aproximadamente 170 pb, foi cortada do gel e o DNA foi extraído com o 'QIAquick® Gel Extraction Kit' (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante.

**Quadro 7 - Sequências dos primers utilizados para amplificar por um segundo PCR as extremidades 5' e 3' do RNA do isolado G1A.**

<i>Primer</i>	Posição no genoma	Sequência 5' → 3'
G6Sp3	100 - 80	CTTCAGCAGCAGTTTGCTTAT
<i>Anchor T</i>	-	AACCCGGCTCGAGCGGCCGC
G6Sp6	3531 - 3548	CGAATGGACAAGTTGTGGTA

Para a extremidade 3' do RNA genómico do genoma viral também se realizou uma segunda reacção de amplificação, idêntica à realizada para a extremidade 5', mas utilizando 0,2 µM do *primer* específico G6Sp6 e 0,6 µM de *primer* Anchor T (Quadro 7). O programa de amplificação foi modificado na temperatura de hibridação dos *primers*, que neste caso foi de 53°C. O produto amplificado, com o tamanho esperado de aproximadamente 170 pb, foi analisado e purificado como referido acima.

#### 2.5.6.4. Clonagem

A clonagem foi efetuada seguindo o mesmo procedimento usado para os fragmentos B e D, referido na secção 2.5.4..

#### 2.5.6.5. Sequenciação

A sequenciação de cada uma das extremidades foi realizada como referido na secção 2.5.5. com os *primers* M13 (direto e reverso).

### 2.5.7. Otimização das reacções de amplificação, clonagem e sequenciação do RNA satélite do isolado viral G1A

Para a caracterização do RNA satélite, utilizaram-se dsRNA que se extraíram de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o isolado viral G1A, como descrito no ponto 2.4.2..

Após a análise das dsRNA por eletroforese, a banda correspondente ao RNA satélite do isolado viral foi cortada do gel e o dsRNA foi extraído com o 'QIAquick® Gel Extraction Kit' (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante.

É de referir que ainda se encontram em processo estudos com vista à sequenciação do RNA satélite associado ao isolado, sendo os protocolos abaixo indicados otimizações para esse efeito.

#### **2.5.7.1. Síntese do DNA complementar (cDNA)**

A síntese do cDNA a partir do RNA satélite foi realizada recorrendo a duas estratégias diferentes: i) adicionando uma extremidade de poly(A) polimerase ao RNA antes da reação de transcriptase reversa seguida da adição de uma extremidade de citosinas ao cDNA; ii) reação da transcriptase reversa com recurso a *random hexamers*.

Na primeira estratégia, foi adicionada uma cauda de poly(A) à extremidade 3' do satRNA. Assim, foi efetuada a reação com o enzima poly(A) (BioLabs), onde a 10 µL de RNA satélite juntou-se 2 U do enzima *E. coli* poly(A) polimerase (BioLabs), 50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,9 a 25°C) e 1 mM de ATP (BioLabs), num volume total de 20 µL, durante 20 min a 37°C. A reação poly(A) foi precipitada com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 3 volumes de etanol e incubada a -20°C durante a noite. No dia seguinte foi efetuada uma centrifugação a 15700 *g* a 4°C durante 20 min, sendo descartado o sobrenadante e lavado o *pellet* com etanol a 70% (*ca.* 500 µL). Após nova centrifugação a 15700 *g* durante 15 min à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e todo o etanol foi retirado com uma pipeta, o *pellet* seco em vácuo a 45°C durante *ca.* de 25 min e ressuspenso em 10 µL de água previamente tratada com DEPC. A reação de transcrição reversa foi feita num volume total de 20 µL com 6 µL de RNA poly(A) com 0,6 µM de *primer* Oligo(dT)/Not I, incubada a 65°C durante 5 min e em gelo durante *ca.* 5 min. Adicionou-se posteriormente 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 40 U de RNaseOUT™ (Invitrogen) a 37°C durante 2 min e adicionados 200 U de Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen) para incubação durante 1 h a 37°C, sendo de seguida incubada durante 10 min a 70°C para inativação do enzima. A cadeia de RNA usada como molde foi degradada após a adição de 5 U de Ribonuclease H (Thermo Scientific) durante 30 min a 37°C. O cDNA purificado foi modificado na extremidade 3' por adição de citosinas num volume total de reação de 20 µL contendo, 30 U de Terminal deoxinucleotide Transferase (Tdt) (Thermo Scientific), tampão de reação 1X (Thermo Scientific) e 0,6 ng de dCTP. A reação foi incubada durante 15 min a 37°C e depois durante 10 min a 70°C para a inativação do enzima.

A segunda estratégia consistiu na síntese do cDNA usando o protocolo otimizado descrito em Martelli et al. (1996), onde a 1 µL de RNA satélite juntou-se 150 ng de *random hexamers* (Promega), desnaturou-se durante 10 min a 70°C e depois incubou-se 15 min em gelo. A reação de RT foi feita na presença de 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs e 200 U do enzima Transcriptase Reversa, Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MLV) (Invitrogen), num volume total de 20 µL, durante 1 h a 37°C.

### 2.5.7.2. Otimização da Amplificação por PCR

A amplificação por PCR do fragmento correspondente ao RNA satélite através da reação de TdT com a adição de citosinas ao cDNA foi efetuada utilizando os *primers* Oligo(dG)-anchor e anchor T (Quadro 8).

Quadro 8 - Sequências dos *primers* utilizados na otimização da amplificação de PCR de um fragmento RNA satélite.

<i>Primer</i>	Sequência 5' → 3'
Oligo(dG)- <i>anchor</i>	GACCACGCGTATCGAACTGCAG <sub>(15)</sub>
<i>anchor</i> T	AACCCGGCTCGAGCGGCCGC
<i>anchor</i> G	GACCACGCGTATCGAACTGCAG

As condições utilizadas para a primeira reação de PCR foram as seguintes: 200 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1 mg/mL BSA, 10 mM dNTPs, 0,2 µM de *primer* específico G6Sp2, 0,6 µM de *primer* Oligo(dG)-*anchor* (Quadro 8) e 2,5 U de *Pfu* DNA polimerase (Thermo Scientific), num volume total de reação de 50 µL. Nesta otimização também foi testado o enzima Dream Taq DNA polimerase (Thermo Scientific). A amplificação foi realizada com o seguinte programa: 2 min a 94°C, seguido de 10 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 65°C e 40 seg a 72°C, 25 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg a 65°C e 1 min a 72°C (neste segundo conjunto de ciclos, a extensão fez-se com um incremento de 20 seg por ciclo), tendo a extensão final sido de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado num gel de 0,8% de agarose em TBE 0,5X e correu à voltagem constante de 80 V durante 1h 15 min. As bandas correspondentes ao marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech) e ao produto de amplificação foram coradas e visualizadas como referido em 2.4.1.. A zona correspondente ao tamanho do produto esperado, cerca de 600 pb, foi cortada do gel e o DNA foi extraído com o 'QIAquick® Gel Extraction Kit' (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Para aumentar a concentração do produto amplificado pelo primeiro PCR, realizou-se um segundo PCR em que

se utilizaram os *primers anchor G* e *anchor T* (Quadro 8), com as condições anteriormente referidas.

A amplificação do fragmento de RNA satélite a partir da reação de transcrição reversa efetuada com *random hexamers* (Promega) (ver ponto 2.5.7.2.) consistiu na utilização de 1 µL da reação de transcrição reversa, com dois pares de *primers* (Comum5' e Comum 3'; G6int5' e Comum 3'), otimizada como em 2.5.2., utilizando dois enzimas, *Pfu* DNA polimerase (Thermo Scientific) e Dream Taq DNA Polimerase (Thermo Scientific) de forma a obter os melhores resultados amplificados.

### **2.5.8. Análise bioinformática**

A análise das sequências obtidas por sequenciação foi feita com o programa BioEdit (versão 7.2.5.) (Hall, 1999). O programa ClustalW (Thompson et al., 1994) foi utilizado para o alinhamento das sequências de aminoácidos dos polipéptidos prováveis codificados pelas ORFs do isolado G1A, com sequências de outros isolados de OLV-1 conhecidos, obtidos após uma pesquisa BLAST (Altschul et al., 1997).



## B. ESTUDO DA RESPOSTA À PRESENÇA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE FITOSSANIDADE

### 2.1. Isolamento bacteriano

O isolado bacteriano foi obtido de uma amostra recolhida da superfície de solo de olival em Évora, (38°53' Norte, 08°02' Oeste). A amostra foi recolhida a cerca de 3 a 4 cm de profundidade, durante a estação da Primavera (a temperatura do solo a 3 cm de profundidade era de 13°C). A amostra de solo foi mantida em gelo durante o transporte para o laboratório, onde foram adicionados  $\approx 0,2$  g da amostra de solo a cerca de 300  $\mu$ L de meio nutritivo NB ('Nutrient Broth') (Oxoid), de modo a obter-se uma suspensão homogeneizada. Foram efetuadas diluições seriadas em meio NB e plaqueadas no mesmo meio contendo 15% (p/v) de agar. Subsequentemente, colónias isoladas foram escolhidas para crescimento em meio NB e alíquotas de cada crescimento foram retiradas para congelamento com glicerol a 15% (v/v) e mantidas a -80°C. As diluições seriadas foram repetidas após crescimento de cada colónia em NB até obter-se uma cultura pura, testada por observação microscópica e coloração de *Gram*.

Para as condições padrão de crescimento, o isolado bacteriano foi incubado em meio nutritivo NB ('Nutrient Broth') (Oxoid) à temperatura de 50°C e com agitação a 180 rpm. O crescimento foi monitorizado pela medição da densidade ótica a 600nm pelo espectrofotómetro (Cecil Instruments CE 1021, 1000 series).

Foi também determinado o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (*ufc*/mL) durante o cultivo em meio NB e em meio nutricional sem sulfato, por plaqueamento de diluições seriadas em meio NB com agar.

### 2.2. Extração do DNA, amplificação por PCR e sequenciação

A extração do DNA genómico a partir do isolado bacteriano foi feita através da utilização do 'NucleoSpin Food DNA Extraction Kit' (Macherey-Nagel) e seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante.

A fim de obter a identificação filogenética do isolado bacteriano foi feita a amplificação dos genes de 16S RNA ribossomal, com os *primers* bacterianos universais 341F e 907R (Muyzer et al., 1998, Muyzer et al., 1993). A reação foi efetuada num volume total de 50  $\mu$ L, contendo

tampão de PCR 1X, 0,2 mM dNTPs, 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, aproximadamente 30 ng de DNA genômico e 0,3  $\mu$ L do enzima Fidelity DNA polimerase 5U/ $\mu$ L (USB®). As reações de amplificação foram realizadas num termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad). O programa de amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 2 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, uma temperatura de emparelhamento de 54°C por 50 seg e uma extensão a 68°C por 50 seg, tendo sido realizada uma extensão final de 5 min a 68°C.

O fragmento de aproximadamente 600 pb, produzido pela amplificação por PCR, foi purificado com as colunas do *kit* 'DNA Clean & Concentrator' (Zymo Research, USA) e sequenciado utilizando o *primer* direto 314F e o *primer* reverso 907R, pela empresa Macrogen®.

### 2.3. Material vegetal

Para a realização dos ensaios deste estudo foram utilizadas sementes de plantas *Nicotiana benthamiana* Domin, pertencentes à família botânica *Solanaceae*. As sementes de *N. benthamiana* foram desinfetadas através de lavagens sequenciais em 75% (v/v) de etanol por 2 min, quatro lavagens com água bidestilada estéril e uma lavagem com lixívia comercial diluída (aproximadamente 2% de cloreto ativo), sob agitação por 20 min. Por fim, foram efetuadas quatro lavagens adicionais com água bidestilada, de forma a remover os resíduos formados.

As sementes de *N. benthamiana* desinfetadas foram posteriormente colocadas a germinar em placas de *Petri* com ca. 15 mL de agarose 1% (Seakem® LE agarose – Lonza, com um conteúdo de sulfato inferior a 0,15%) e 2 mL de uma solução nutricional contendo sulfato (ver Anexo III), espaçadas entre si  $\approx$  1 cm de distância.

Após três semanas as plantas foram transferidas para uma mistura de vermiculite e agarose (Seakem® LE agarose – Lonza), na proporção de 3:1, regadas com 5 mL de solução nutricional com sulfato e mantidas em câmaras de crescimento sob fotoperíodo de 16 h, com temperaturas de dia e noite de 24 e 22°C, respetivamente, e uma humidade relativa de 70%, tal como efetuado com as sementes para germinação.

É de notar que a mistura foi feita com vermiculite autoclavada e arejada e a transplantação feita em caixas com tampas (Combiness Microbox, EcoBox) previamente esterilizadas. Cada caixa no final continha 4 plantas com um espaçamento de  $\approx$  3 cm entre si.

## 2.4. Ensaios de resposta à presença do isolado bacteriano

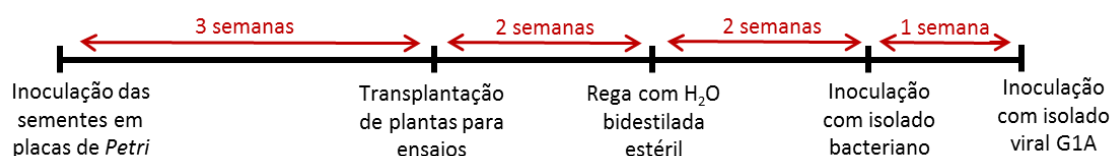


Figura 15 - Esquema do plano de ensaios durante a experiência otimizada.

### 2.4.1. Preparação do inóculo bacteriano

Cerca de duas semanas após o transplante, as plantas foram regadas com 5 mL de água bidestilada estéril e após o mesmo período foram estabelecidos grupos de plantas para os ensaios, onde cada grupo recebeu um tratamento distinto por rega de 5 mL com diferentes soluções: i) solução nutricional sem sulfato, ii) solução nutricional com sulfato, iii) suspensão bacteriana do isolado a O.D. 600 nm a 0,5 (*ca.*  $10^6$  *ufc*/mL) em solução nutricional sem sulfato e iv) suspensão bacteriana do isolado a O.D. 600 nm a 0,5 em solução nutricional com sulfato.

Para realizar a suspensão bacteriana, o isolado foi cultivado em meio NB até atingir a fase estacionária de crescimento. As células foram centrifugadas a 12000 *g* durante 10 min a 20°C e ressuspensas na solução nutricional com ou sem sulfato. Alíquotas do sobrenadante do cultivo bacteriano foram também recolhidas para quantificação do sulfato produzido pelo isolado no momento da recolha (ver ponto 2.5.).

### 2.4.2. Preparação do inóculo viral G1A

A inoculação viral foi feita uma semana após a inoculação bacteriana. Previamente, foram retiradas as lesões com uma dimensão média de  $\approx 0,5$  cm, a partir de folhas de plantas da espécie *Nicotiana benthamiana* Domin anteriormente inoculadas com o isolado viral e que apresentavam necroses locais. As lesões foram recortadas das plantas infetadas e os cortes foram guardados a -20°C por cerca de trinta dias, no máximo. Aquando a inoculação viral, os cortes foram colocados, em ambiente estéril, num almofariz e macerados na presença de tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0. Para garantir uma suspensão relativamente homogénea, foram utilizados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio para cada conjunto de vinte lesões. O homogenado resultante foi espalhado com o auxílio de um cotonete nas cinco folhas superiores

de cada planta, sendo especificamente utilizado um cotonete por cada grupo de quatro plantas. Nas plantas controlo as cinco folhas superiores foram friccionadas apenas com tampão fosfato de sódio 0,5 M a pH 7,0.

É de referir que os protocolos estabelecidos em 2.3. e 2.4. foram conseguidos após vários ensaios preliminares, onde foi procurado que as plantas a inocular estivessem saudáveis, sem outros sintomas, tais como cloroses causadas por deficiência nutricional, seca, entre outros. Foram alterados parâmetros iniciais, incluindo o período de germinação, os intervalos de tempo entre as regas, o número de células bacterianas e a proporção de vermiculite:agarose nas caixas de transplantação.

### **2.4.3. Registo de observações**

Após o procedimento, descrito no ponto 2.4. os ensaios foram seguidos de três em três dias, durante quinze dias, tendo sido observado que após o sexto dia não há aumento do número de lesões em qualquer das condições, apenas se visualiza um aumento da dimensão das lesões. Foram efetuados registos completos ao sexto dia relativos ao número médio e máximo de lesões obtidos em cada planta. A percentagem de plantas infetadas foi também anotada.

Foram também efetuadas observações macroscópicas e microscópicas das características anatómicas das plantas não infetadas e infetadas, em particular foi registada a anatomia radicular. As observações microscópicas foram feitas antes e depois da lavagem de fragmentos radiculares. Esta lavagem teve como principal objetivo remover as bactérias da superfície radicular, consistindo no tratamento dos fragmentos com etanol a 70% durante 1 min, seguido da imersão com ligeira agitação numa solução de lixívia 1% durante 10 min e, por fim numa série de seis lavagens com água bidestilada estéril.

### **2.4.4. Análise estatística**

A análise ANOVA (Sokal & Rohlf, 1981) foi efetuada de modo a comparar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos realizados. Sendo conhecido que o número de lesões locais em diferentes folhas, quando inoculadas com a mesma preparação viral, não apresenta uma distribuição normal, foi efetuada a transformação desse número de acordo com a formulação de Kleczkowski et al. (1955), a qual é aplicada na análise estatística de ensaios com vírus de plantas (Kleczkowski, 1955).

## 2.5. Quantificação de sulfato

Na determinação da concentração de sulfato presente em cada amostra de sobrenadante bacteriano, utilizou-se o ensaio turbidimétrico descrito por Kolmet et al. (2000). Este ensaio turbidimétrico é baseado na precipitação de íões  $\text{SO}_4^{2-}$  com íões  $\text{Ba}^{2+}$  após a adição de cloreto de bário. Essa precipitação é seguida por espectrofotometria da suspensão resultante.

Para a curva de calibração, prepararam-se soluções de concentração conhecida de sulfato de potássio em água bidestilada. Após a adição de 1 mL de cada solução de calibração a 1 mL de reagente condicionante (1L: 150g NaCl, 100 mL glicerol, 60 mL HCl concentrado e 200 mL etanol a 95%), a mistura foi homogeneizada. De seguida, cerca de 60 mg de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck®) foram adicionados. As misturas foram homogeneizadas durante cerca de 30 segundos. Após esta agitação, foram transferidas de imediato para *cuvettes* de 1.5 mL e foram feitas leituras a 320 nm, com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific, EUA). Um mL de água bidestilada, tratado do mesmo modo, foi usado como branco.

Para determinação da concentração de sulfato nas amostras de sobrenadante, foram adicionados 1 mL de reagente condicionante a cada uma e procedeu-se de forma análoga à referida para as soluções de calibração. Neste caso, foram utilizados como branco, o meio de cultivo ou o de manutenção do isolado.



# CAPÍTULO 3

---

## Resultados





## A. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UM ISOLADO VIRAL DE *OLIVE LATENT VIRUS 1*

### 3.1. Hospedeiro herbáceo

As inoculações do extrato de planta infetada com o isolado G1A na espécie herbácea indicadora *Nicotiana benthamiana* mostraram a sua suscetibilidade e reação com a formação de necroses locais e sistêmicas. O tipo de necroses observadas em plantas de *N. benthamiana* eram extensas e rapidamente invadiam e alastravam na folha inoculada. Deste modo, esta planta passou a ser utilizada para a multiplicação do vírus em larga escala e foi sempre a utilizada nos trabalhos subsequentes.



Figura 16 - Sintomas observados no hospedeiro herbáceo inoculado com o isolado viral G1A. A, B e C: lesões locais em *N. benthamiana*.

### 3.2. Purificação viral

A purificação das partículas virais do isolado G1A, feita a partir de plantas de *N. benthamiana* infetadas e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , resultou em preparações infecciosas. A utilização do clorofórmio e butanol como solventes orgânicos, permitiu uma boa clarificação do homogenado. O procedimento permitiu obter a quantidade de vírus purificado de cerca de 0,1142 mg/mL.

A centrifugação da preparação viral em gradientes de densidade de sacarose, revelou que o isolado G1A sedimenta numa única banda (Figura 17).

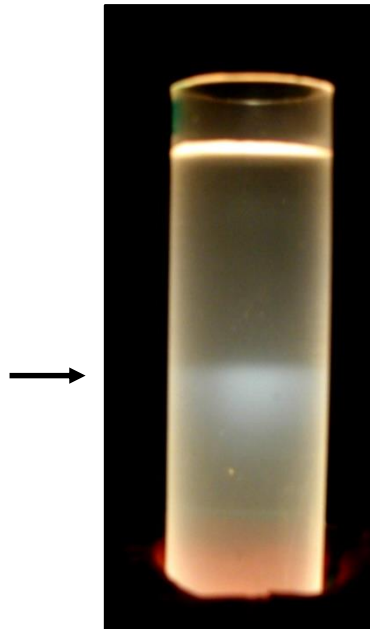


Figura 17 - Banda formada em gradiente de sacarose após ultracentrifugação da suspensão viral de G1A.

### 3.3. Análise do ácido nucleico viral

O método de extração baseado no uso do 'RNeasy Plant Mini Kit' (Qiagen) resultou na visualização em gel de agarose de duas bandas correspondentes ao ácido nucleico do isolado viral, uma banda correspondente ao RNA genómico com a dimensão de cerca de 3700 pb e a outra banda correspondente ao RNA satélite de cerca de 600 pb (Figura 18).

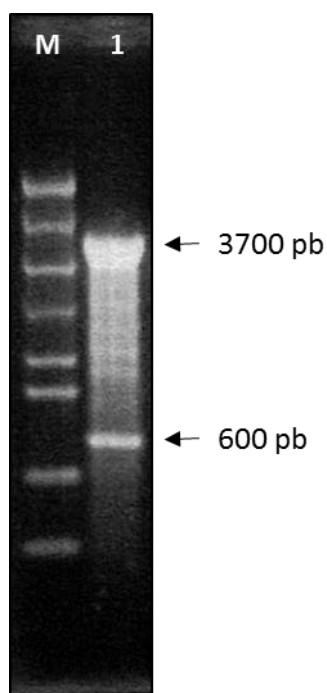


Figura 18 – Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do ácido nucleico viral extraído da preparação purificada de vírus. M: marcador ‘RNA Ladder High Range’ (Thermo Scientific), 1: Ácido nucleico viral extraído com o ‘RNeasy Plant Mini Kit’ (Qiagen). As setas indicam as posições do RNA genômico com cerca de 3700 pares de bases e do RNA satélite com cerca de 600 pares de bases.

### 3.4. Análise das dsRNA nos tecidos infetados

A fração correspondente às cadeias duplas de RNA obtida a partir de plantas de *Nicotiana benthamiana* infetadas, mostrou em gel de agarose, um perfil eletroforético constituído por 4 bandas, correspondentes a quatro espécies de dsRNA com cerca de 3700 pb, 1600 pb, 1300 pb e 600 pb (Figura 19), interpretadas, a primeira, como sendo as formas replicativas do RNA viral inteiro, as duas seguintes como sendo os dois RNAs subgenômicos e a quarta como o RNA satélite associado ao isolado G1A de OLV-1.

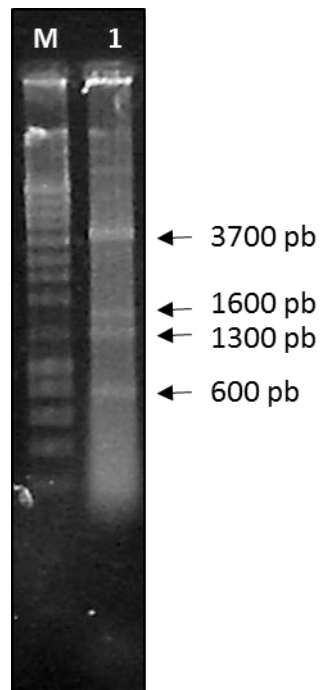


Figura 19 - Análise eletroforética em gel de 0,8% de agarose dos ácidos nucleicos de cadeia dupla isolados de plantas de *N. benthamiana* infetadas. M – marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech); 1 – Bandas correspondentes às formas replicativas do isolado G1A. As setas indicam a posição de cada uma das 4 bandas obtidas.

### 3.5. Caracterização molecular do isolado G1A de OLV-1

#### 3.5.1. Amplificação e clonagem dos fragmentos e extremidades do RNA genômico

A amplificação por PCR de cada um dos fragmentos do genoma viral, designados por A, B, C e D resultou em produtos de amplificação com os tamanhos esperados de cerca de 563 pb, 1259 pb, 2068 pb e 722 pb, respetivamente.

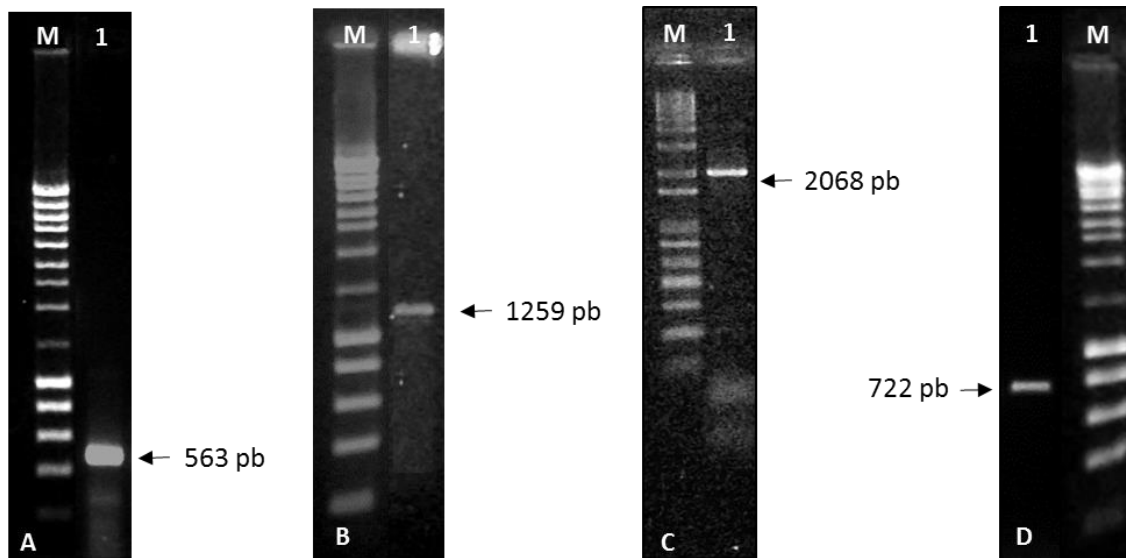
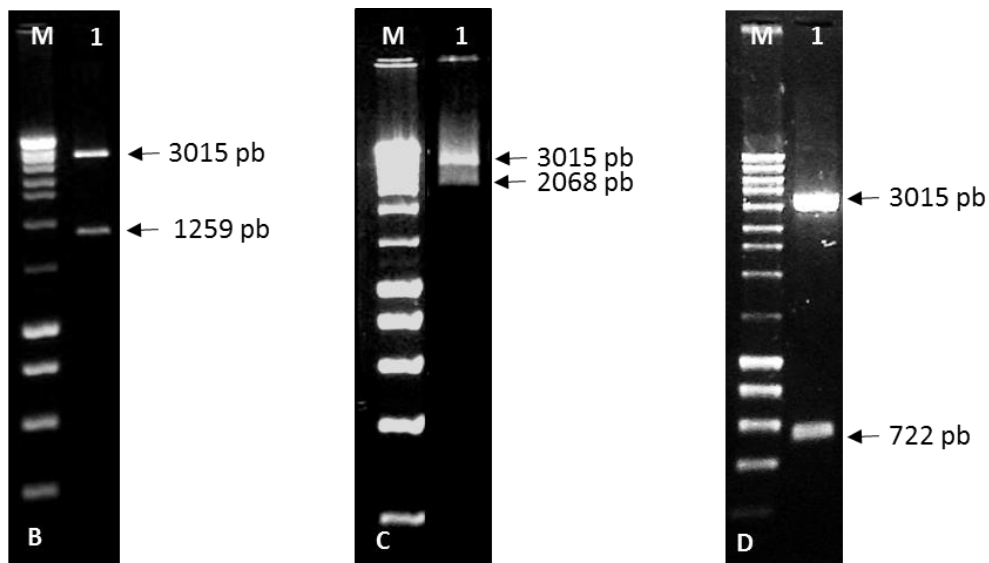


Figura 20 – Análise eletroforética em gel de 1% de agarose dos produtos amplificados por PCR, de cada um dos fragmentos, para identificação do genoma do isolado viral G1A. M - marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech). A - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 563 pb. B - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 1259 pb. C - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 2068 pb. D - 1: fragmento amplificado com aproximadamente 722 pb.

Os produtos amplificados correspondentes aos fragmentos B, C e D foram clonados no vetor p-GEM<sup>®</sup> T-Easy (Promega), enquanto o produto amplificado respectivo ao fragmento A foi enviado diretamente para sequenciar, obtendo-se assim quatro diferentes fragmentos cujas sequências se sobrepunham parcialmente, correspondendo a aproximadamente 99% da sequência genómica do isolado G1A, por analogia ao isolado GM6 de OLV-1 de oliveira.



**Figura 21 -** Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do DNA plasmídico digerido, de cada um dos fragmentos utilizados na sequenciação do genoma do isolado viral G1A. M - marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech). B - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento B. C - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento C. D - 1: DNA plasmídico digerido correspondente ao fragmento D. As setas indicam a posição do vetor plasmídico p-GEM® T-Easy (Promega) a 3015 pb e as posições dos produtos digeridos respeitantes a cada fragmento.

Os restantes 1% do genoma correspondem a cerca de 34 nts da extremidade 5' e 3', calculados por analogia à sequência do isolado GM6 de OLV-1 de oliveira e foram amplificados através da técnica RACE.

Tanto a extremidade 5' como a extremidade 3' do RNA viral foi amplificada recorrendo à utilização de dsRNA proveniente da desnaturação da molécula de dsRNA correspondente ao RNA genómico completo do isolado G1A.

Para a extremidade 5', numa primeira reação de PCR, foi amplificado um fragmento com cerca de 330 pb, o qual se utilizou como molde para fazer um segundo PCR em que se obteve um fragmento para clonar com cerca de 170 pb (Figura 22).

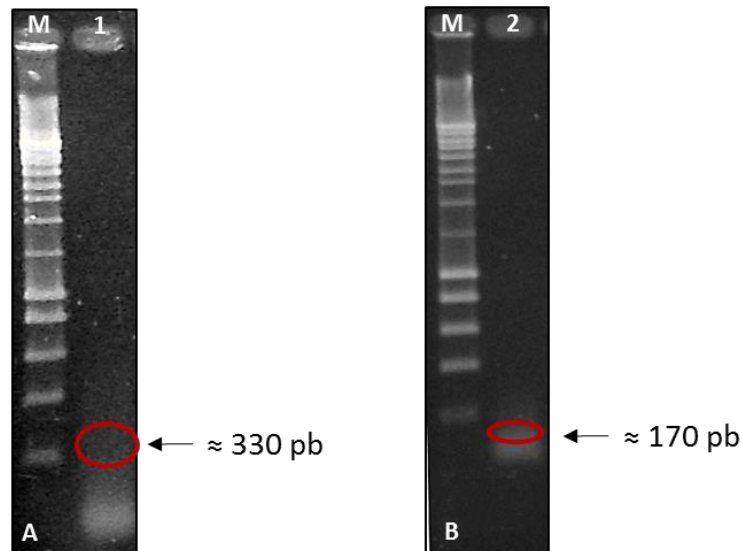


Figura 22 - Análise eletroforética em gel de 1% de agarose dos produtos amplificados da extremidade 5'. A – 1: produto do 1º PCR, com fragmento amplificado de aproximadamente 330 pb; B – 2: produto do 2º PCR, com fragmento amplificado de aproximadamente 170 pb. M – marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech).

O produto amplificado da extremidade 5' foi clonado no vetor p-GEM® T-Easy (Promega). O DNA plasmídico obtido após restrição consistiu em dois fragmentos, um correspondente ao vetor e o outro ao fragmento clonado (Figura 23).

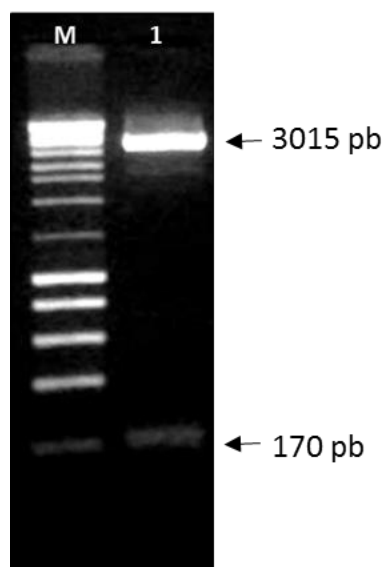


Figura 23 – Análise eletroforética em gel de 1% de agarose do produto digerido da extremidade 5' do genoma do isolado viral G1A. M – marcador 'NZY DNA Ladder III' (NZYTech); 1 – DNA plasmídico digerido correspondente à extremidade 5'. As setas indicam a posição do vetor plasmídico p-GEM® T-Easy (Promega) a 3015 pb e a posição do produto digerido.

### 3.5.2. Sequência nucleotídica do RNA genômico

A sequência de 3668 nts que compõem o genoma parcial do isolado viral G1A (Figura 24 e Anexo I) foi determinada em ambas as direções. Esta sequência nucleotídica tem um conteúdo estimado de 51,61% de A+U e 48,69% de G+C, sendo a composição por bases de 26,99% de A, 23,66% de C, 24,73% de G e 24,62% de U.

1	-----	TATCGGTGCGAGCCCCGTACACAGCTAAGTGTCTAAA	59
61	ATG GAG TTA CCC AAC CAA CAT AAG CAA ACT GCT GCT GAA GGT TTC		105
1	M E L P N Q H K Q T A A E G F		15
106	GTT TCT TTC CTT AAC TGG CTT TGT AAT CCC TGG AGA CGT CAA CGT		150
16	V S F L N W L C N P W R R Q R		30
151	ACA GTC AAC GCT GCT GTC GCT TTT CAG AAT AGC ATT CTT GCT ATT		195
31	T V N A A V A F Q N S I L A I		45
196	GAG GAC GTG GAA CAT CTC GAA GAT ATC AAC GAG TGT TTC GAG GAA		240
46	E D V E H L E D I N E C F E E		60
241	TCA TCT GGA GGT CAA TCG CAG CGC ACT AAG GTT GTC GCT GAA GGG		285
61	S S G G Q S Q R T K V V A E G		75
286	GCT TAT TCT CCC GTA AAA TCC GAA CGC ACC CGC CGA GTC CGC AAG		330
76	A Y S P V K S E R T R R V R K		90
331	CAA AAG AAG GCC AAA TTC GTC AAA TAT TTG GTT AAT GAG GCT CGT		375
91	Q K K A K F V K Y L V N E A R		105
376	GCC GAG TTT GGT CTC CCC AAA GCT ACA GAG GCC AAT CGA CTC ATG		420
106	A E F G L P K A T E A N R L M		120
421	GTG CAA CAC TTC CTG CTC CGA AGG TGT AAG GAT TGG GGG GTT GTC		465
121	V Q H F L L R R C K D W G V V		135
466	ACA TCC CAG TGC CAC AAC AAT GTT GCA CTC GCC TTG ACT CTC GTG		510
136	T S Q C H N N V A L A L T L V		150
511	TTT GTC CCA ACA GAG GAT GAT TTG CTG GCG CGA GCT ATG ATG AAC		555
151	F V P T E D D L L A R A M M N		165
556	ACG CAC AAG ACG AGG TCT GCG GTT CGT GGT ATG GAC AAC CTC CAA		600
166	T H K T R S A V R G M D N L Q		180
601	GGT GAA GGG TGG TGG AAC AAC AGG CTT GGC GTA GGT GGC CAG GCC		645
181	G E G W W N N R L G V G G Q A		195
646	GGC TTG GCC TTT CGG GCC AAG TAG GGG TGC CTA GAG AGG AGG CCG		690
196	G L A F R A K * G C L E R R P		210
691	GGG TTT TCC ACG TCT GTT TCG CGT GGA AAC CAC CCC GAT CTG GTG		735
211	G F S T S V S R G N H P D L V		225
736	GTC AAA CCA TCA GGA CAC CCC GAG AAA CAG CGT CAG TTG TTA CGC		780
226	V K P S G H P E K Q R Q L L R		240
781	TAT AGT GGA ATT GGC GGC CAT TTA TTA ATC GGC ATC CAC AAC AAC		825
241	Y S G I G G H L L I G I H N N		255



826	TCT	CTC	TCC	AAC	TTG	CGT	AGG	GGC	TTA	ATA	GAG	AGA	GTA	TTC	TAC	870
256	S	L	S	N	L	R	R	G	L	I	E	R	V	F	Y	270
871	GTT	GAG	GGA	CCC	AAT	GGG	CTC	CAA	GAC	GCC	CCT	AAA	CCC	GTT	CGG	915
271	V	E	G	P	N	G	L	Q	D	A	P	K	P	V	R	285
916	GGG	GCA	TTC	AAC	TCC	CTG	AAT	AAG	TTT	CGA	GAC	CTA	TAT	ACC	AAA	960
286	G	A	F	N	S	L	N	K	F	R	D	L	Y	T	K	300
961	AAT	AGT	TGG	CGT	CAT	TCC	CCT	GTA	ACC	AAT	GAA	CAA	TTC	TTG	ATG	1005
301	N	S	W	R	H	S	P	V	T	N	E	Q	F	L	M	315
1006	AAT	TAC	TCG	GGC	AGG	AAA	CTA	ACT	ATT	TAC	AAA	GAA	GCG	GTT	GAT	1050
316	N	Y	S	G	R	K	L	T	I	Y	K	E	A	V	D	330
1051	AGT	TTG	TCG	CAT	CAA	CCA	CTT	AGC	TTA	CGG	GAC	TCG	AGG	CTG	AAG	1095
331	S	L	S	H	Q	P	L	S	L	R	D	S	R	L	K	345
1096	ACT	TTC	GTT	AAG	GCC	GAA	AAA	CTT	AAT	CTG	AGC	AAG	AAG	CCA	GAT	1140
346	T	F	V	K	A	E	K	L	N	L	S	K	K	P	D	360
1141	CCA	GCA	CCC	CGG	GTC	ATT	CAA	CCC	AGG	TCA	CCT	CGG	TAC	AAC	GTT	1185
361	P	A	P	R	V	I	Q	P	R	S	P	R	Y	N	V	375
1186	TGT	TTG	GGT	CGT	TAT	CTA	CGT	CAC	TAT	GAA	CAC	CAC	GCG	TTC	AAA	1230
376	C	L	G	R	Y	L	R	H	Y	E	H	H	A	F	K	390
1231	ACC	ATT	GCT	AAA	TGC	TTT	GGG	GAG	ATC	ACG	GTC	TTT	AAA	GGG	TTT	1275
391	T	I	A	K	C	F	G	E	I	T	V	F	K	G	F	405
1276	ACT	CTA	GAG	CAA	CAA	GGC	GAA	ATC	ATG	TTT	TCG	AAG	TGG	AAG	AAA	1320
406	T	L	E	Q	Q	G	E	I	M	F	S	K	W	K	K	420
1321	TAT	GTT	AAT	CCC	GTC	GCC	GTT	GGA	CTC	GAT	GCA	AGT	CGG	TTC	GAC	1365
421	Y	V	N	P	V	A	V	G	L	D	A	S	R	F	D	435
1366	CAA	CAC	GTG	TCA	GTT	GAA	GCA	CTT	CAA	TAT	GAG	CAT	GAA	TTT	TAC	1410
436	Q	H	V	S	V	E	A	L	Q	Y	E	H	E	F	Y	450
1411	ATT	AGA	GAT	TAC	CCG	AAT	GAT	AAA	CAG	CTA	AAA	TGG	TTG	TTA	AAG	1455
451	I	R	D	Y	P	N	D	K	Q	L	K	W	L	L	K	465
1456	CAA	CAA	CTG	AGC	AAT	ATT	GGC	ACA	GCG	TTT	GCT	AGT	GAT	GGC	ATC	1500
466	Q	Q	L	S	N	I	G	T	A	F	A	S	D	G	I	480
1501	ATA	AAG	TAC	AAG	AAG	GAG	GGT	TGT	CGT	ATG	AGT	GGA	GAT	ATG	AAC	1545
481	I	K	Y	K	K	E	G	C	R	M	S	G	D	M	N	495
1546	ACC	AGT	TTG	GGC	AAT	TGC	ATT	CTC	ATG	TGT	GCG	ATG	GTC	TAC	GGG	1590
496	T	S	L	G	N	C	I	L	M	C	A	M	V	Y	G	510
1591	TTG	AAG	GAA	CAC	CTG	GGC	ATA	AAT	TTA	TCC	CTT	GCC	AAT	AAT	GGG	1635
511	L	K	E	H	L	G	I	N	L	S	L	A	N	N	G	525
1636	GAT	GAC	TGC	GTC	ATT	GTC	TGT	GAG	AAA	GCG	GAT	TTG	AAG	AAA	TTG	1680
526	D	D	C	V	I	V	C	E	K	A	D	L	K	K	L	540
1681	ACG	AGC	AGC	ATC	GAA	CCA	TAT	TTT	AGG	CAA	TTT	GGA	TTC	AAG	ATG	1725
541	T	S	S	I	E	P	Y	F	R	Q	F	G	F	K	M	555
1726	GAG	GTG	GAA	CAA	CCC	GTA	GAT	ATA	TTT	GAG	CGC	ATT	GAG	TTT	TGT	1770
556	E	V	E	Q	P	V	D	I	F	E	R	I	E	F	C	570
1771	CAA	ACC	CAA	CCT	GTG	TTC	GAT	GGC	TAC	CAA	TAC	ATC	ATG	GTT	CGA	1815

571	Q	T	Q	P	V	F	D	G	Y	Q	Y	I	M	V	R	585
1816	AAA	CCC	TCG	GTA	GTC	ACT	TCG	AAG	GAT	GTC	ACT	AGC	TTA	ATC	CCA	1860
586	K	P	S	V	V	T	S	K	D	V	T	S	L	I	P	600
1861	TGC	CAG	AAT	CAG	GCT	CAA	TAT	GCA	GAA	TGG	CTG	CAA	GCT	GTG	GGT	1905
601	C	Q	N	Q	A	Q	Y	A	E	W	L	Q	A	V	G	615
1906	GAG	TGC	GGA	ATG	AGT	ATC	AAT	GGT	GGA	ATA	CCT	GTT	ATG	CAG	AAC	1950
616	E	C	G	M	S	I	N	G	G	I	P	V	M	Q	N	630
1951	TTT	TAC	CAT	ATG	CTC	CAA	ACT	GGA	GTT	AAA	CGC	ACC	AAA	TTC	ACC	1995
631	F	Y	H	M	L	Q	T	G	V	K	R	T	K	F	T	645
1996	AAG	ACC	GGC	GAG	TTT	CAG	ACG	AAC	GGG	TTG	GGG	TAT	CAC	TCT	AGA	2040
646	K	T	G	E	F	Q	T	N	G	L	G	Y	H	S	R	660
2041	TAT	ATG	CAT	AGA	GTG	GCC	CGA	GCC	ATT	TCG	CCC	GAA	ACC	CGT	TTA	2085
661	Y	M	H	R	V	A	R	A	I	S	P	E	T	R	L	675
2086	TCC	TTC	TAT	TTA	GCG	TTC	GGT	ATC	ACA	CCA	GAC	CTT	CAG	GAA	GCA	2130
676	S	F	Y	L	A	F	G	I	T	P	D	L	Q	E	A	690
2131	CTG	GAG	GCC	TTT	TAT	GAT	ACC	CAT	ACG	CTT	GAG	TTG	GAT	GAT	GTT	2175
691	L	E	A	F	Y	D	T	H	T	L	E	L	D	D	V	705
2176	GTC	CCA	GTT	GAT	ACC	TAC	CAA	GTA	TCA	GGA	GAG	CAT	TTG	ATC	AAT	2220
706	V	P	V	D	T	Y	Q	V	S	G	E	H	L	I	N	720
M	1															
2221	GGA	TTA	CCA	AAC	TGA	GGT	TAG	TGA	GGA	TAA	CGT	GAG	CGT	ACG	CGG	2265
721	G	L	P	N	*											724
2	D	Y	Q	T	E	V	S	E	D	N	V	S	V	R	G	16
2266	TCG	AGC	TAG	GAG	GGG	CAC	TGA	GGA	TAA	GAA	GCA	CAA	TGG	ATC	GGG	2310
17	R	A	R	R	G	T	E	D	K	K	H	N	G	S	G	31
2311	ATT	AAC	TGG	CGT	TAA	GCG	TCA	TGC	GGT	GAG	TGA	AAC	ATC	TCA	GAA	2355
32	L	T	G	V	K	R	H	A	V	S	E	T	S	Q	K	46
2356	ATC	ACA	GCA	AGG	TAC	TGG	CAA	CGG	CAC	GAT	GAC	CAA	CAT	AGC	TGA	2400
47	S	Q	Q	G	T	G	N	G	T	M	T	N	I	A	E	61
2401	AGA	GCA	GAC	CAT	TGC	CGT	GAC	ATA	CAA	CTT	TAA	CTT	TTA	GTT	ATG	2445
62	E	Q	T	I	A	V	T	Y	N	F	N	F	*			73
M	1															
2246	GCT	GTG	TGT	CGC	TGT	TGT	GAT	ACT	TCA	CCA	GGT	ATT	ACA	TTA	TTC	2490
2	A	V	C	R	C	C	D	T	S	P	G	I	T	L	F	16
2491	CCT	TAC	TTT	GCT	ATT	CTC	ATT	CTC	ATC	CTT	GCA	ATA	TTA	GTT	GTT	2535
17	P	Y	F	A	I	L	I	L	I	L	A	I	L	V	V	31
2536	GGA	ACT	CCA	AAC	CAG	CAA	TAT	CAT	CAT	TCT	CCT	AGT	ACT	TAC	GAG	2580
32	G	T	P	N	Q	Q	Y	H	H	S	P	S	T	Y	E	46
2581	TAT	AAG	ACT	CAA	CAC	ATT	TCG	ATC	GCA	AAA	TAG	ACA	TTT	CGC	AAC	2625
47	Y	K	T	Q	H	I	S	I	A	K	*					56
2626	TCT	CTC	AAC	ATG	GTT	AAT	TAT	TAC	TGG	GAT	AGT	CGA	ATT	CAG	AGG	2670
1				M	V	N	Y	Y	W	D	S	R	I	Q	R	12
2671	TGG	TTC	TAC	GAA	AGT	GGA	CCA	CAG	CGT	GTC	CGA	ACA	TAT	ATG	AAA	2715

13	W	F	Y	E	S	G	P	Q	R	V	R	T	Y	M	K	27
2716	GCG	GAT	TTC	ACC	CCA	CCA	AAT	GGC	AAA	CTG	CCT	GCC	CGC	AAG	ACT	2760
28	A	D	F	T	P	P	N	G	K	L	P	A	R	K	T	42
2761	AAA	AGG	TCG	CCC	CCG	AAT	AAG	GGC	AAC	CTA	CAG	GTT	CTT	CCG	GTT	2805
43	K	R	S	P	P	N	K	G	N	L	Q	V	L	P	V	57
2806	ACA	GCA	CCC	GCT	GCT	GGT	GGA	GTG	ATC	TCC	ACA	AGA	AGA	CGC	GTT	2850
58	T	A	P	A	A	G	G	V	I	S	T	R	R	R	V	72
2851	CCT	CGA	ATT	ACT	ACT	ACT	AAT	GAG	CAG	ACT	GTC	GTG	AGA	AAC	ACA	2895
73	P	R	I	T	T	T	N	E	Q	T	V	V	R	N	T	87
2896	GAA	GTC	ATG	AGT	GCC	ATC	AAC	TCT	GCC	GCT	CTA	GGT	GCG	TTT	TCG	2940
88	E	V	M	S	A	I	N	S	A	A	L	G	A	F	S	102
2941	GCA	ACC	ACC	GTC	ACG	GTG	ATC	CCG	TCC	AAC	CTC	TCA	TGG	TTG	GCA	2985
103	A	T	T	V	T	V	I	P	S	N	L	S	W	L	A	117
2986	GGG	CTG	TCC	GAT	TTG	TAC	AGC	AAG	TAC	CGT	TGG	CGC	AAG	CTC	CGG	3030
118	G	L	S	D	L	Y	S	K	Y	R	W	R	K	L	R	132
3031	TTT	ATT	TAT	ATT	CCG	GTC	TGC	CCA	ACC	AGC	ACA	CAA	GGC	AAT	GTC	3075
133	F	I	Y	I	P	V	C	P	T	S	T	Q	G	N	V	147
3076	TCT	ATG	TCA	CTA	TCA	TTC	GAC	AGA	ATC	GAT	GCG	CAG	CCA	ACA	AGC	3120
148	S	M	S	L	S	F	D	R	I	D	A	Q	P	T	S	162
3121	ATC	ACT	CAA	ATG	CAA	CAG	GGC	TAC	CGT	GCC	ATC	ACG	TTC	CCG	CCT	3165
163	I	T	Q	M	Q	Q	G	Y	R	A	I	T	F	P	P	177
3166	TAC	GCG	GGG	TAT	GAT	GGT	GCC	ATG	GCC	TTG	TCA	TCT	TTC	GGC	AAC	3210
178	Y	A	G	Y	D	G	A	M	A	L	S	S	F	G	N	192
3211	ATC	CCT	GGA	ATG	GTT	GTC	GTC	GAT	GTG	GAC	TGT	GCA	CGA	ATG	GAC	3255
193	I	P	G	M	V	V	V	D	V	D	C	A	R	M	D	207
3256	AAG	TTG	TGG	TAT	CCT	AAT	GTT	ACC	CTG	GCC	ACC	TTC	CTT	GCC	ATG	3300
208	K	L	W	Y	P	N	V	T	L	A	T	F	L	A	M	222
3301	GCA	ACT	AAC	ATC	CAA	AAC	GGA	TAT	TGC	GGA	GTA	ACC	CTG	TTC	ACT	3345
223	A	T	N	I	Q	N	G	Y	C	G	V	T	L	F	T	237
3346	GCA	AGT	GAT	CAA	GGG	CCA	GCC	GCC	GCC	ACT	AAC	TTT	GGC	CAA	GTG	3390
238	A	S	D	Q	G	P	A	A	A	T	N	F	G	Q	V	252
3391	TTC	TGC	CAT	TAC	GAA	ATC	GAA	TTT	ATA	GAA	CCA	GTG	AAC	CCA	ACT	3435
253	F	C	H	Y	E	I	E	F	I	E	P	V	N	P	T	267
3436	GTC	AAT	GTG	TAA	CCGCACAACGATGGGTGAGTTACGTA	ACTGTGCTAATCCCTAA	3489									
268	V	N	V	*	270											
3490	AGGTTTTAGTAGAGCGGTAAGCAAGACGGATCCTGGGAAACAGGTTTAAACGGGCTGGGG	3548														
3549	GTGGTGCCCCGGCCGTCGCATCACTTGCTGATACAATCTACAAGGCCCATGGGAGGGTC	3607														
3608	TGCACAGGTATCCACGCCAAGGACGGGACGAAAGTCTCGGACGGGGGGTAGTGACCCA	3666														
3667	ACACCAGATTGAGGGGCCCTTTGCC -----	3699														

Figura 24 – Sequência parcial de bases do genoma do isolado viral G1A. A sequência de aminoácidos deduzida para as proteínas codificadas pelo RNA viral é apresentada na parte inferior da sequência, com diferentes cores para cada provável proteína. Os asteriscos (\*) correspondem ao códon stop.

### 3.5.3. Organização do genoma

Por análise informática com o programa Bio Edit (Hall, 1999), e por analogia às sequências completas de outros isolados de OLV-1 disponíveis na base de dados, foram identificadas 5 ORFs na sequência nucleotídica do genoma do isolado viral de G1A (Figura 25).

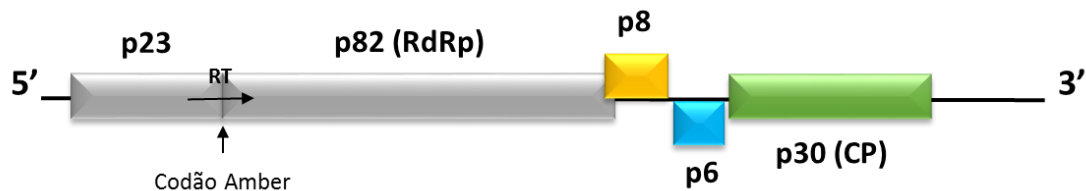


Figura 25 - Organização do genoma do isolado viral G1A. As caixas representam as proteínas codificadas por cada uma das ORFs: p23, p82, p8, p6 e p30 kDa. RT – leitura contínua ('read through'), RdRp – RNA polimerase dependente de RNA, CP – cápside proteica.

A ORF 1 começa com o codão AUG no nucleótido 61 e termina com um codão stop 'amber' UAG no nucleótido 666. Esta ORF codifica um provável polipéptido com 202 aminoácidos (p23). A leitura contínua ('read through') do codão stop *amber* da ORF 1 origina um polipéptido constituído por 724 aminoácidos (p82), parcialmente idêntica à p23, que termina no codão UGA (nt 2232) (ORF 2). A seguir aparecem duas ORFs centrais, ORF 3 e ORF 4. A ORF 3 sobrepõe-se aos 14 nts finais da ORF 2, situa-se entre os nucleótidos 2219 e 2437 e codifica um polipéptido com 73 aminoácidos (p8). A ORF 4 compreende os nucleótidos de 2443 a 2610 e codifica um polipéptido com 58 aminoácidos (p6). Por fim, a ORF 5 começa no nucleótido 2635 e termina no codão stop UAA na posição 3444, codificando um polipéptido com 270 aminoácidos (p30).

A organização do genoma do isolado viral G1A é muito compacta, tendo apenas duas ICR muito pequenas. As ORF 3 e ORF 4 estão separadas por uma ICR composta por 5 nts e a ORF 4 está separada da ORF 5 por uma ICR de 24 nts.

### 3.5.4. Proteínas hipotéticas codificadas no genoma e identidade com as de outros vírus de oliveira

#### 3.5.4.1. Proteína p82

Após uma pesquisa com o programa BLAST (Altschul et al., 1997), a proteína p82 foi identificada como sendo uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp).

A sequência de aminoácidos da RdRp do isolado G1A foi alinhada com a de outros isolados da espécie *Olive latent virus 1* com sequência genômica completa disponível, tais como o OLV-1 GM6 de oliveira (Número de acesso ao 'GenBank': DQ\_083996), o OLV-1 de citrino (Número de acesso ao 'GenBank': NC\_001721.1) e o OLV-1 CM1 de tomate (GU\_326337.2). Verificou-se que a sequência de aminoácidos da RdRp do isolado G1A apresenta uma elevada percentagem de identidade com os três isolados comparados, sendo no entanto o isolado OLV-1 GM6 de oliveira o que tem a percentagem de identidade mais próxima observada relativamente à RdRp de G1A (99,99%) (Quadro 9).

**Quadro 9 - Percentagem de identidade das duas maiores proteínas (RdRp e CP) codificadas pelo genoma do isolado G1A com outros isolados de OLV-1.**

Vírus / isolado	Identidade da sequência de aminoácidos (%)	
	RdRp	CP
OLV-1 citrino	99,97	99,87
OLV-1 GM6	99,99	99,97
OLV-1 CM1	99,98	99,92

#### 3.5.4.2. Proteína p30

A proteína p30 foi encontrada, tal como anteriormente, pelo grau de semelhança da sequência do genoma com outras sequências homólogas de vírus de OLV-1, obtidas após uma pesquisa BLAST, como o OLV-1 GM6 de oliveira (Número de acesso ao 'GenBank': DQ\_083996), o OLV-1 de citrino (Número de acesso ao 'GenBank': NC\_001721.1) e o OLV-1 CM1 de tomate (GU\_326337.2). O alinhamento mostrou que existe uma maior percentagem de identidade com a sequência equivalente do isolado de OLV-1 GM6 de oliveira (99,97%) do que com a do isolado de OLV-1 CM1 de tomate (99,92%). Por outro lado, foi observada uma ligeira baixa percentagem

de identidade com a sequência de aminoácidos da CP do isolado de OLV-1 de citrino (99,87%) (Quadro 9).

Após uma pesquisa de regiões conservadas foi encontrado o domínio S (*Shell*) da sequência da CP, situado entre os aminoácidos 53 e 270 e também a respectiva região de consenso do domínio S, designada por assinatura das CPs dos vírus de plantas icosaédricos (Figura 26). Esta assinatura, é constituída por 26 aminoácidos entre os resíduos 135 e 160 com a seguinte sequência ([FYW]-x-[PSTA]-x(7)-G-x-[LIVM]-x-[LIVM]-x-[FYWI]-x(2)-D-x(5)-P) em que x representa um qualquer aminoácido (Félix et al., 2007). Um alinhamento feito apenas com as sequências das CPs de OLV-1, veio mostrar que existem zonas altamente conservadas entre eles (Figura 26). Como zonas mais conservadas estão os quatro resíduos de ligação ao Ca<sup>2+</sup>, dois resíduos de ácido aspártico, um de lisina, e um de leucina, e que são responsáveis pela estabilidade da estrutura quaternária da cápside proteica (Oda et al., 2000).

<b>G1A</b>	1	<b>MVNYYWDSRI QRWFYESGPQ RVRTYMKADF TPPNGKLPAR</b>	40
GM6	1	<b>MVNYYWDSRI QRWFYESGPQ RVRTYMKADF TPPNGKLPAR</b>	40
OLV-1citrino	1	<b>MVNYYWDSRI QRWFYESGPQ RVRTYIKRIS PHQMASLPAR</b>	40
CM1	1	<b>MVNYYWDSRI QRWFYESGPQ RVRTYMKADF TPPNGKLPAR</b>	40
<b>G1A</b>	41	<b><u>KTKRSPPNKG NLQVLPVTAP AAGGVISTR RVPRIITTTNE</u></b>	80
GM6	41	<b>KTKRSPPNRG NLQVLPVTAP AAGGVISTR RVPRIITTTNE</b>	80
OLV-1citrino	41	<b>KTKRSPPNRG NLQVLPVIAP VAGGVISTEG HVPRIITTTNE</b>	80
CM1	41	<b>KTKRSPPNRG QRWFYESGPQ TAGGVVSTR RVPRIITTTNE</b>	80
<b>G1A</b>	81	<b><u>QTVVRNTEVM SAINSAALGA FSATTVTVIP SNLSWLAGLS</u></b>	120
GM6	81	<b>QTVVRNTEII SAINSAALGA FSATTVTVIP SNLSWLAGLS</b>	120
OLV-1citrino	81	<b>QTVVRNTEII SAINSAALGA IFGNYVTVIP SNLSWLAGLS</b>	120
CM1	81	<b>QTVVRNTEVI SAINSAALGA FSANTVTVIP TNLSWLAGLS</b>	120
<b>G1A</b>	121	<b><u>DLYSKYRWRK LRFIYIPVCP TSTQGNVSMS LSFDRIDAQP</u></b>	160
GM6	121	<b>DLYSKYRWRK LRFIYIPVCP TSTQGNVSMS LSFDRIDAQP</b>	160
OLV-1citrino	121	<b>DLYSKYRWRK LRFIYLPCP TSTQGNVSMS LSFDRIDTQP</b>	160
CM1	121	<b>HLYSKYRWRK LRFIYIPICP TSTQGHVSMS LSFDRIDVQP</b>	160
		Ca <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>	
<b>G1A</b>	161	<b><u>TSITQMQQGY RAITFPPYAG YDGAMALSSF GNIPGMVVVD</u></b>	200
GM6	161	<b>TSITQMQQGY RAITFPPYAG YDGAMALSSF GNIPGMVVVD</b>	200
OLV-1citrino	161	<b>TSITQMQQGY RAITFPPYAG YDGAMALASF GNIPGMVVVD</b>	200
CM1	161	<b>TSIIQMQQGY RAITFPPYAG YDGAMALSSF GNIPGMVVVD</b>	200

<b>G1A</b>	201	<b>VDCARMDKLW</b>	<b>YPNVTLATFL</b>	<b>AMATNIQNGY</b>	<b>CGVTLEFTASD</b>	240
GM6	201	<b>VDCARMDKLW</b>	<b>YPNVTLATFL</b>	<b>AMATNIQNGY</b>	<b>CGVTLSTASD</b>	240
OLV-1citrino	201	<b>VDCARMDKLW</b>	<b>YPNVTLATFL</b>	<b>AMAPTSRTDT</b>	<b>CGVTLEFTASD</b>	240
CM1	201	<b>VDCARMDKLW</b>	<b>YPNVTLSTFL</b>	<b>AMAPTSRTDT</b>	<b>CGVTLEFTASD</b>	240
			 Ca <sup>2+</sup>			
<b>G1A</b>	241	<b>QGPAAATNFG</b>	<b>QVFCHYEIEF</b>	<b>IEPVNPTVNV</b>		270
GM6	241	<b>QGPAAATNFG</b>	<b>QVFCQYEIEF</b>	<b>IEPVNPTVNV</b>		270
OLV-1citrino	241	<b>QGPAAATNFG</b>	<b>QVFCQYEIEF</b>	<b>IEPVNPTVNL</b>		270
CM1	241	<b>QGPAAATNFG</b>	<b>QVFCQYEIEF</b>	<b>IEPVNPTVNV</b>		270
				 Ca <sup>2+</sup>		

Figura 26 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da CP do isolado de G1A, com as de OLV-1 GM6 de oliveira (Número de acesso ao ‘GenBank’: DQ\_083996), OLV-1 de citrino (Número de acesso ao ‘GenBank’: NC\_001721.1) e OLV-1 CM1 de tomate (Número de acesso ao ‘GenBank’: GU\_326337.2). Os resíduos idênticos estão a negrito. A região sublinhada corresponde ao domínio S da cápside proteica, os resíduos a cinzento correspondem ao padrão de consenso do domínio S e a seta indica o aminoácido leucina na 17ª posição deste consenso. Os locais de ligação ao cálcio (Ca<sup>2+</sup>) estão indicados abaixo das sequências, junto dos aminoácidos que favorecem a ligação).

### 3.5.4.3. Proteínas p8 e p6

As proteínas p8 e p6, codificadas pela região central do genoma do isolado G1A poderão estar relacionadas com o movimento das partículas virais de célula para célula. De facto, estas proteínas apresentam elevadas percentagens de identidade, (99,98% em ambas) quando comparadas com as proteínas p8 e p6 do isolado de OLV-1 de citrino, que têm um papel importante no movimento das partículas entre células (Pantaleo et al., 1999). Elas apresentam também elevada percentagem de identidade com as respetivas p8 e p6 dos isolados de oliveira com sequência completamente definida, GM6 e CM1 (Quadro 10).

Quadro 10 – Percentagem de identidade das sequências de aminoácidos das proteínas p8 e p6 codificadas pelo genoma do isolado G1A, com as proteínas de outros isolados OLV-1.

Vírus / isolado	Proteína	(%)	Vírus / isolado	Proteína	(%)
GM6	p8	99,97	GM6	p6	100
OLV-1 citrino	p8	99,98	OLV-1 citrino	p6	99,98
CM1	p8	99,86	CM1	p6	100

## B. ESTUDO DA RESPOSTA À PRESENÇA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE FITOSSANIDADE

### 3.1. Identificação do isolado bacteriano e análise filogenética

A identificação do isolado bacteriano fez-se através da análise da sequência obtida (ver ponto 2.2.) por pesquisa utilizando o programa BLAST ('Basic Local Alignment Search Tool'). A sequência demonstrou uma identidade de 100% do gene codificante do 16S rRNA com o género *Ureibacillus*. É também idêntica à sequência de um isolado bacteriano anteriormente obtido e caracterizado (Santana et al., 2013), sendo que as características morfológicas e de *Gram* são também idênticas. Trata-se de uma bactéria em forma de bastonete e que apresenta uma coloração *Gram* variável, facto já reportado para outros membros do género *Ureibacillus* (Kim et al., 2006).

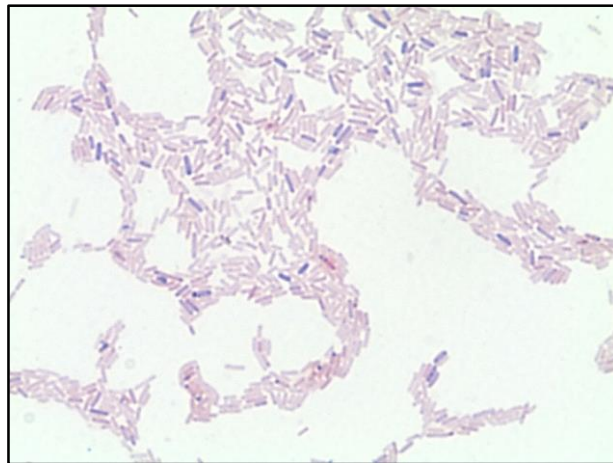


Figura 27 - Visualização do isolado bacteriano 18 UE/10 ao microscópio ótico Olympus BX41 (ampliação 1000X) após coloração diferencial de *Gram*.

Nos trabalhos subsequentes, usou-se então o isolado 18 UE/10 caracterizado por Santana et al. (2013). Entre as características definidas para este isolado nomeiam-se uma temperatura mínima de crescimento entre 25 e 30°C, uma temperatura ótima de crescimento entre 50 e 60°C e ausência de esporulação.



### 3.2. Produção de sulfato e viabilidade celular a 24°C

Foram efetuadas medições de sulfato produzido pelo isolado bacteriano (ver ponto 2.5.), mantido a 24°C durante cinco dias em solução nutricional sem sulfato, sendo esta a mesma solução utilizada para a rega das plantas aquando os ensaios (ver ponto 2.4.1.). Paralelamente, foram determinadas as unidades formadoras de colónias por mililitro (*ufc/mL*) e a densidade ótica a 600 nm.

Os resultados obtidos estão traduzidos na Figura 28 e demonstraram que, embora o isolado 18 UE/10 esteja a uma temperatura inferior à sua temperatura mínima de crescimento, manteve a viabilidade, já que o número de *ufc/mL* foi aproximadamente o mesmo durante o todo processo da experiência. A manutenção da viabilidade está com certeza relacionada com a presença de agregados celulares que foram observados ao microscópio ótico. A presença de agregados como resposta a situações de *stress* é um fenómeno anteriormente verificado (Beattie & Lindow, 1999, Munna et al., 2014).

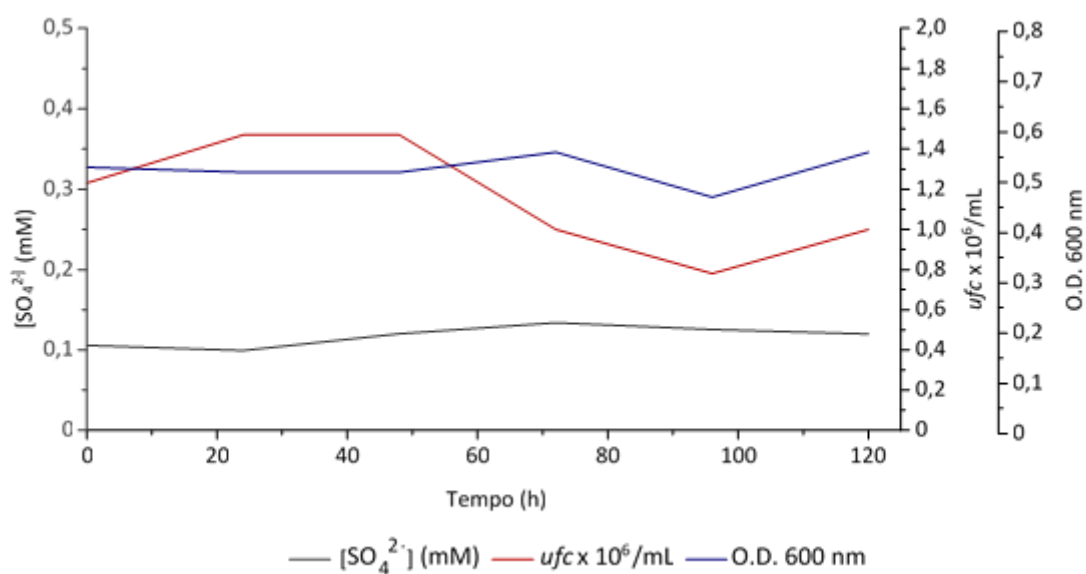


Figura 28 - Valores de produção de sulfato, unidades formadoras de colónias por mL e densidade ótica (600 nm), registados para o isolado 18 UE/10, a partir de uma suspensão deste em meio nutricional sem sulfato.

Além de manter a viabilidade, o isolado bacteriano foi também capaz de produzir sulfato numa quantidade significativa de cerca de 0,1 mM.

### **3.3. Ensaios de resposta à presença do isolado bacteriano**

#### **3.3.1. Análise do efeito de resposta à presença do isolado nos ensaios**

A análise dos parâmetros, como o número médio e máximo de lesões necróticas e a percentagem de plantas infetadas, foi efetuada nos ensaios, a fim de comparar o efeito causado pela presença de sulfato e do isolado bacteriano sobre o aparecimento e desenvolvimento dos sintomas de infeção viral com G1A.

Aquando da otimização do protocolo definido no ponto 2.4. foram realizados vários ensaios com registos das características acima descritas ao terceiro dia depois da inoculação viral e ao sexto dia, como exemplificado para cada um dos ensaios (Figura 29).

Deste modo, foi possível constatar uma diminuição em todos os parâmetros registados tanto na presença de sulfato (com ou sem isolado bacteriano 18UE/10) como na ausência de sulfato (desde que o isolado bacteriano 18 UE/10 esteja presente). A diminuição é mais acentuada no que respeita ao número máximo de lesões, o que sugere heterogeneidade dentro da população testada, sendo as plantas mais suscetíveis rapidamente afetadas na ausência de sulfato ou do isolado bacteriano. Ao fim de seis dias, esse decréscimo torna-se menos acentuado, o que pode ser explicado pela aglomeração das lesões múltiplas numa única lesão para as plantas mais infetadas, ou seja, aquelas sujeitas a rega com solução nutricional sem sulfato, enquanto o número de lesões mesmo de dimensões inferiores, continua a aumentar nas restantes condições. Mesmo assim, o número médio de lesões é sempre superior para as plantas regadas com a solução nutricional sem sulfato. Após o sexto dia, não se verifica aumento no número de lesões contadas em qualquer das condições.

Em suma, a presença do isolado bacteriano na solução sem sulfato, ou a presença de sulfato na solução nutricional de rega, leva a um retardamento dos sintomas de infeção viral, particularmente evidente no último caso.

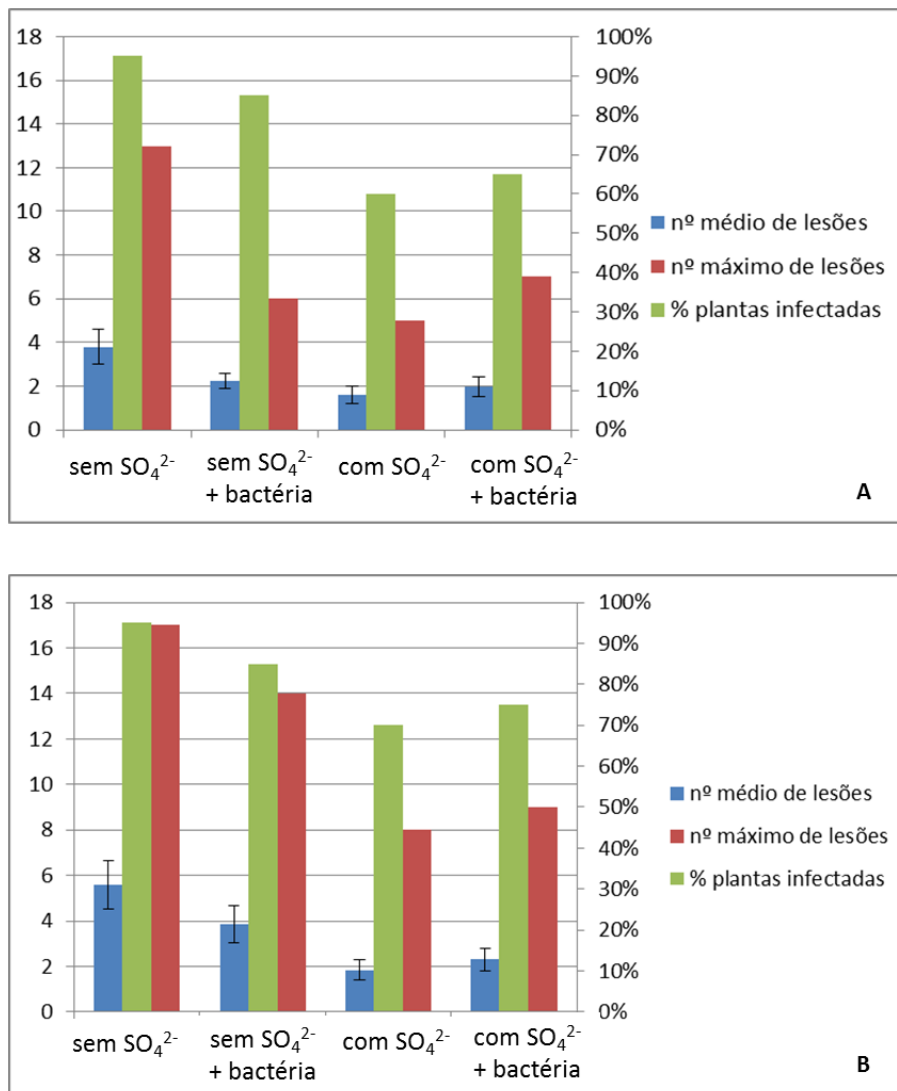


Figura 29 - Valores relativos ao número médio e máximo de lesões necróticas, bem como a percentagem de plantas infectadas para as diferentes condições de rega utilizadas no dia da inoculação bacteriana (ver Figura 15). A - 3 dias após inoculação com G1A. B - 6 dias após inoculação com G1A.

A Figura 30 mostra o resultado obtido para dois ensaios ao fim de seis dias, abrangendo a um total de trinta e duas plantas para cada condição de rega. Foi realizada uma análise estatística para este conjunto de resultados, traduzida na legenda da Figura, que revela haver diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre os seguintes tratamentos: sem sulfato vs sem sulfato + bactéria, este último similar a com sulfato + bactéria, e sem sulfato vs com sulfato.

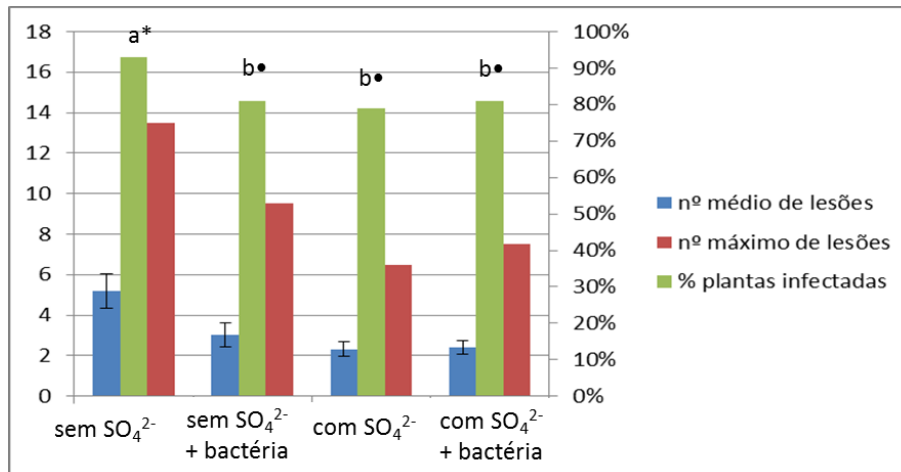


Figura 30 - Valores relativos ao número médio e máximo de lesões necróticas, bem como a média da percentagem de plantas infetadas para as diferentes condições de rega utilizadas em duas experiências. Os valores foram registados 6 dias após inoculação com G1A.

Letras diferentes (a, b) e símbolos diferentes (\*, •) representam diferenças significativas para a presença do isolado bacteriano e para a presença de sulfato, respetivamente.

Nas representações fotográficas apresentadas na Figura 31, é visível o efeito tanto do sulfato, como da presença do isolado bacteriano na ausência do sulfato. Neste caso, o efeito, tal como já referido e indicado no gráfico da Figura 30, é intermédio ao da rega com sulfato, para a qual o número de lesões é notoriamente inferior.

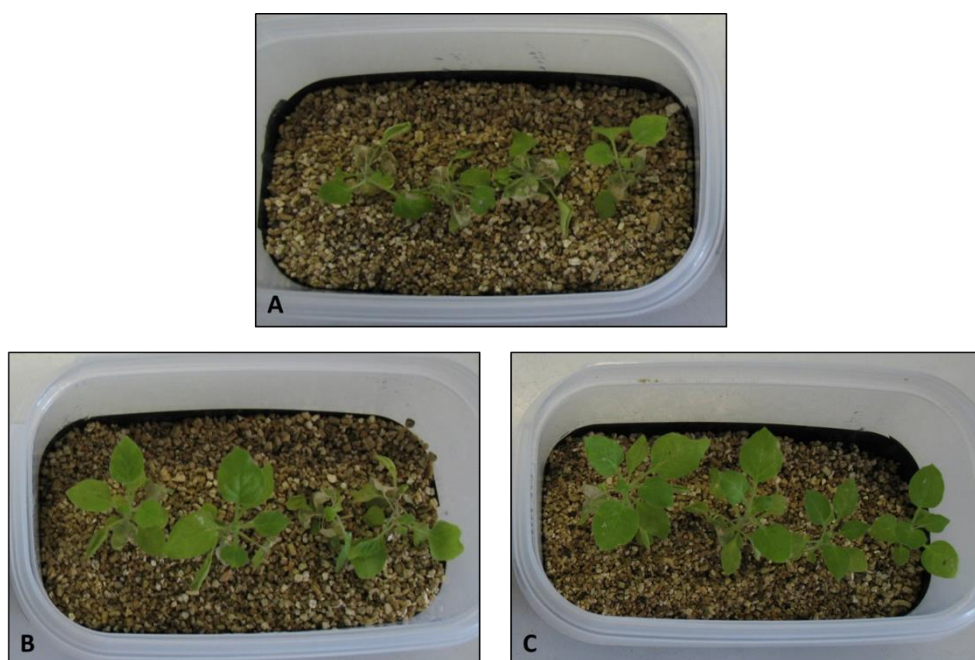


Figura 31 - Revelações fotográficas dos ensaios de plantas aquando inoculação bacteriana e posterior inoculação viral. A – rega sem sulfato, B - rega sem sulfato mais inóculo bacteriano, C - rega com sulfato.



Figura 32 - Revelações fotográficas dos ensaios de plantas aquando rega com soluções nutricionais sem e com sulfato e posterior inoculação viral. A – vista lateral e de topo de rega sem sulfato; B - vista lateral e de topo de rega com sulfato.

As plantas regadas com solução nutricional com sulfato mantiveram um aspeto saudável ao fim de quinze dias de inoculação viral, enquanto as plantas que carecem de sulfato acabaram por murchar completamente (Figura 32).

### 3.3.2. Análise da anatomia radicular

No final dos ensaios foi realizada a remoção das plantas de forma a analisar a sua parte radicular. As plantas foram recolhidas cuidadosamente com o auxílio de pinças estéreis e a raiz foi observada macroscopicamente quanto ao comprimento e ao grau de ramificação. Paralelamente, fragmentos radiculares foram também observados microscopicamente após coloração de *Gram*.

#### 3.3.2.1. Observações macroscópicas

Para as várias raízes observadas, foi frequente a verificação de uma maior ramificação radicular nos tratamentos incluindo a rega com o isolado 18 UE/10 (Figura 33), seja em presença ou na ausência de sulfato na solução nutricional, sugerindo um efeito do isolado bacteriano termofílico na anatomia da raiz, onde a ramificação ocorria logo a partir do colo das plantas.



Figura 33 – Visualização das raízes de cada ensaio. A – planta regada com solução nutricional com sulfato e infetada com G1A. B – planta regada com solução nutricional com sulfato mais bactéria e infetada com G1A.



### 3.3.2.2. Observações microscópicas

Após o tratamento descrito em 2.4.3., foi efetuada a observação microscópica de raízes coradas pelo método de *Gram*. Tal como indica a Figura 34 foram observadas as células do isolado bacteriano 18 UE/10 à superfície dos pêlos radiculares não lavados, ou seja em ambiente rizosférico. Assim, a lavagem permitiu a esterilização da superfície radicular, eliminando essas células.

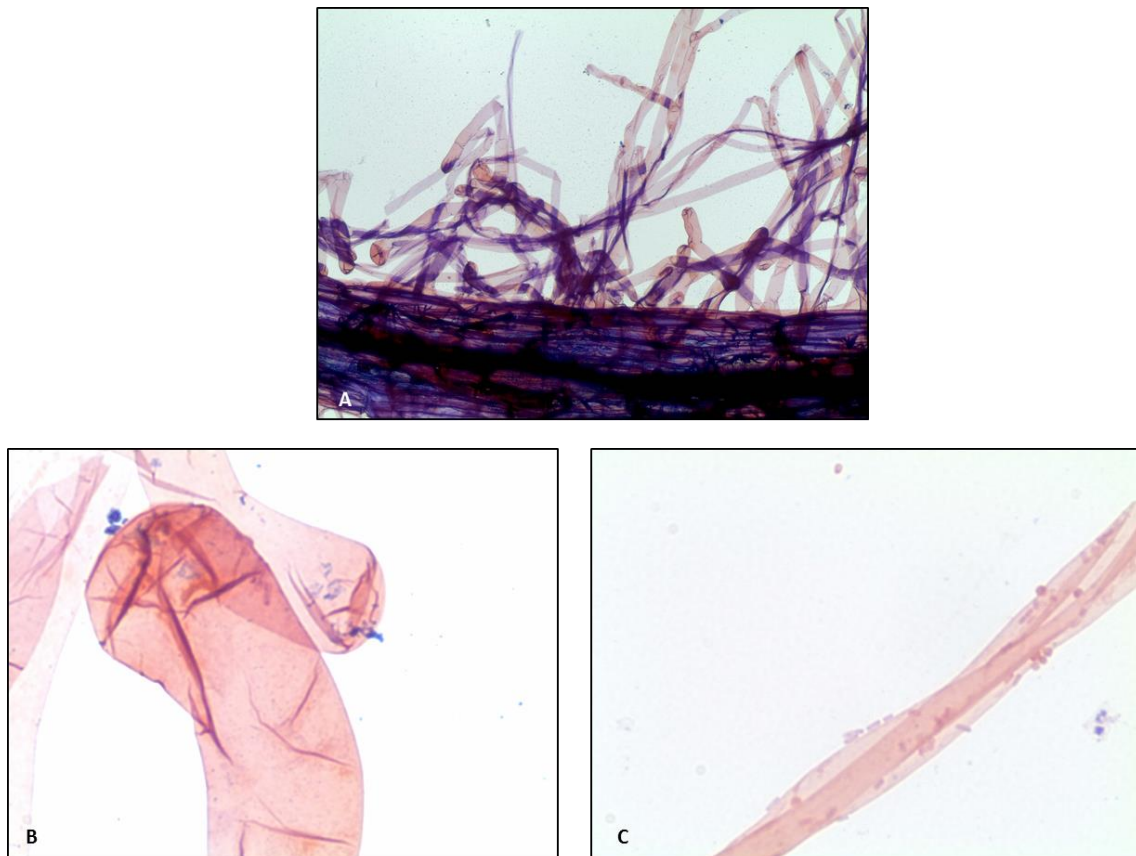


Figura 34 - Fotografias de fragmentos radiculares de uma planta sujeita a rega com sulfato e com adição do isolado bacteriano 18 UE/10, após coloração *Gram*. A – pêlos radiculares que emergem da superfície da raiz (ampliação 100X). B – superfície de um pêlo radicular após lavagem para remoção bacteriana (ampliação 1000X). C – superfície de um pêlo radicular sem lavagem para remoção bacteriana, sendo visíveis as bactérias coradas à superfície deste.





# CAPÍTULO 4

---

## Discussão Geral



## 4.1. Caracterização molecular do isolado viral G1A de OLV-1 obtido de oliveira

Neste trabalho sequenciou-se parcialmente o RNA genómico do genoma do isolado G1A de OLV-1 de oliveira. O G1A foi inicialmente escolhido para estes estudos por ter sido recuperado de frutos de oliveira, produzir abundantes sintomas nas plantas indicadoras herbáceas, das quais foi possível obter quantidades de vírus suficientes para as análises efetuadas que permitiram a sua caracterização detalhada. Em analogia, o isolado em estudo revelou ser idêntico aos isolados de OLV-1 conhecidos e publicados por outros autores (Felix et al., 2005, Grieco et al., 1996b, Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

A sequência parcial do genoma do isolado G1A de oliveira obtida tem 3668 nucleótidos. Através de uma pesquisa utilizando o programa BLAST ('Basic Local Alignment Search Tool'), a sequência de nucleótidos obtida mostrou uma elevada identidade de 99% com o isolado GM6 de OLV-1 de oliveira (Felix et al., 2005), 95% com o isolado de OLV-1 de citrino (Grieco et al., 1996b) e 96% com o isolado CM1 de OLV-1 de tomate (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

Em termos de comparação das sequências nucleotídicas do isolado G1A com os restantes isolados de OLV-1 foi revelado, com o isolado GM6 de oliveira um total de 41 alterações de nucleótidos, resultando em 18 substituições não sinónimas de aminoácidos, com o isolado de citrino um total de 178 alterações de nucleótidos, resultando em 81 substituições não sinónimas de aminoácidos e, por fim, com o isolado CM1 de tomate um total de 148 alterações de nucleótidos, resultando em 53 substituições não sinónimas de aminoácidos.

A elevada identidade verificada entre o isolado deste estudo e o isolado GM6 poderá ser devido ao facto de ambos os isolados terem sido obtidos de oliveira. Estudos anteriores sugeriram que algumas substituições de aminoácidos parecem ser específicas dos hospedeiros a partir dos quais foram obtidos (Varanda et al., 2014)

A proteína p23, codificada pela ORF1 do G1A tem uma percentagem de identidade elevada de 99,99% com a p23 do isolado GM6 de oliveira (Felix et al., 2005), 99,97% com a p23 do isolado de citrino (Grieco et al., 1996b) e 99,98% com a p23 do isolado CM1 de tomate (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011). A proteína p82, codificada pela ORF 2, resulta da leitura contínua do codão *stop amber* UAG da ORF 1, que é traduzido numa glutamina (Harrell et al., 2002) Esta proteína foi identificada como uma RdRp com base na elevada percentagem de identidade com a RdRp do isolado GM6 (Felix et al., 2005) (99,99%). Ambas as proteínas, p23 e p82, são funcionais, na replicação de RNA, como foi demonstrado para o isolado de citrino

(Pantaleo et al., 1999) e também para outros membros da família *Tombusviridae*, como TCV (Hacker et al., 1992) e CymRSV (Dalmay et al., 1993).

A proteína p30, identificada como sendo a constituinte da cápside proteica, apresentou uma identidade da sequência de 99,97% com a da cápside do isolado de GM6, diferindo apenas em 5 aminoácidos, enquanto comparada, por alinhamento, com a da cápside do isolado de OLV-1 de citrino apresenta uma identidade de sequência de 99,87% diferindo em 36 aminoácidos e com a da cápside do isolado de CM1 de tomate apresenta uma identidade da sequência de 99,92% diferindo em 22 aminoácidos.

Na pesquisa de domínios efetuada à sequência da cápside proteica de G1A, detetou-se o domínio S, com o padrão de consenso típico dos vírus de pequena dimensão, constituído por 26 aminoácidos entre os resíduos 135 e 160 contendo a seguinte forma: ([FYW]-x-[PSTA]-x(7)-G-x-[LIVM]-x-[LIVM]-x-[FYWI]-x(2)-D-x(5)-P) (Falquet et al., 2002, Félix et al., 2007). Os resíduos de ligação ao Ca<sup>2+</sup> detetados no domínio S da cápside do isolado G1A, são conservados, observando-se também no isolado GM6 de oliveira (Felix et al., 2005), no isolado de citrino (Grieco et al., 1996b) e no isolado CM1 de tomate (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

As proteínas menores, p8 e p6, codificadas pelo RNA genómico de G1A foram consideradas funcionais no movimento da partícula viral de célula para célula, por analogia, tendo em conta as elevadas percentagens de identidade com as homólogas do isolado de GM6 de oliveira, 99,97% e 100%, respetivamente.

## **4.2. Estudo da resposta à presença de bactérias promotoras de fitossanidade**

O isolado bacteriano do género *Ureibacillus* aqui utilizado já tinha sido caracterizado e revelado um efeito positivo do mesmo na germinação de sementes de *Nicotiana benthamiana*. Em estudos anteriores, plantas germinadas a partir de sementes tratadas com o sobrenadante de cultura do isolado apresentaram um aumento de tamanho dos cotilédones e uma cor mais verde em relação a plantas resultantes de sementes não tratadas (Santana et al., 2013). Por outro lado, também já era conhecida em *Nicotiana tabacum* a existência da resistência induzida pelo enxofre, SIR, à infeção pelo *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Höller et al., 2010). Tendo por base estas informações, e sabendo também que o 18UE/10 é um isolado produtor de sulfato, e deste modo um adjuvante no crescimento das plantas e de fitossanidade, foi aqui colocada a

hipótese do mesmo promover a resistência de *N. benthamiana* a infecções virais de *Olive latent virus 1* (OLV-1), por meio de SIR. As análises efetuadas para testar esta hipótese forneceram dados importantes que revelaram a capacidade SIR em *N. benthamiana* para diminuir os sintomas causados por OLV-1, sendo que a existência de SIR no combate a OLV-1 não tinha sido testada até à data. Os dados sugerem também uma futura aplicação de bactérias termofílicas produtoras de sulfato para despoletar a SIR.

Dado que a produção de sulfato pelo isolado é superior em termofilia, o ideal seria mimetar as condições transitórias de temperatura elevada do solo durante os ensaios a realizar. Aliás, inicialmente foi testado o efeito do sobrenadante da cultura do isolado bacteriano 18UE/10, recolhido na altura de máxima produção de sulfato (entre 0,6 a 1 mM), isto é, em fase estacionária de crescimento a 50°C, num ensaio similar ao representado na Figura 15. O uso do sobrenadante de cultura para tratar as plantas uma semana antes da inoculação viral com G1A traduziu-se não só num decréscimo do número de lesões, como num aumento do tamanho das folhas, as quais apresentaram também uma coloração mais verde do que as plantas controlo. Contudo, é desejado utilizar as células bacterianas, visando uma futura aplicação comercial. Por outro lado, não foi possível montar um sistema que permitisse causar temperaturas transientes no solo necessárias à proliferação do isolado termofílico. Procederam-se então a ensaios à temperatura ambiente, também importantes para compreender o estado metabólico do isolado quanto à produção de sulfato a temperaturas inferiores à sua temperatura mínima de crescimento. Os ensaios realizados à temperatura de 24°C revelaram que o isolado bacteriano mantém-se viável, o que não é surpreendente, uma vez que foi obtido a partir do solo recolhido a uma temperatura de 13°C. Notavelmente, os ensaios revelaram a presença de agregados e sabe-se que as células bacterianas sobrevivem preferencialmente quando em agregados na superfície de folhas, sendo que a formação destes constitui uma defesa em condições de *stress* e facilita a colonização da superfície da planta (Monier & Lindow, 2003). Para além de manter o mesmo número de células viáveis a 24°C, o isolado foi capaz de produzir sulfato, a partir de substrato endógeno. Essa produção, de *ca.* de 0,1 mM, aumentará aquando a adição da suspensão bacteriana às plantas, pois a produção de exsudados pela planta, os quais se acumulam na rizosfera e que incluem aminoácidos (Mehdipour Moghadam et al., 2012), fornecerá substrato orgânico adicional para a oxidação de enxofre orgânico pelo isolado.

A capacidade de sobrevivência e produção de sulfato a temperatura mais baixa permitiu observar uma diminuição do número de lesões em plantas tratadas com o isolado bacteriano comparativamente às não tratadas e na ausência de sulfato. Contudo, não podemos afirmar de

modo categórico que este é um resultado estatisticamente significativo. No caso do fenómeno SIR em *N. tabacum* inoculado com TMV, foram testadas noventa e seis plantas (Höller et al., 2010), um número superior ao testado neste trabalho.

Foi também observado durante este estudo uma maior ramificação radicular nas plantas sujeitas a tratamento com a bactéria. Esta ramificação ocorre quer na ausência quer na presença de sulfato. Sabe-se que a ramificação radicular pode estar relacionada com o estado nutricional, o aumento do teor em sulfato pode induzir a ramificação de raízes de *Arabidopsis* ao nível do colo da planta (López-Bucio et al., 2003), uma estrutura similar à observada nas raízes de *N. benthamiana* durante os ensaios aqui descritos. Mas também é conhecido o efeito de muitas bactérias capazes de alterar vias hormonais na planta, induzindo alterações morfológicas nas raízes com formação de raízes laterais e resultando numa arquitetura radicular mais ramificada (Bhattacharyya & Jha, 2012). Neste estudo, é possível que ambos os fatores, que estão relacionados, contribuam para a arquitetura radicular observada.

A estreita associação entre o isolado bacteriano e a raiz de *N. benthamiana* foi revelada pela observação microscópica descrita em 3.3.2.2., após remoção das plantas no final dos ensaios e lavagem de fragmentos radiculares. Após a lavagem destinada para remover qualquer biofilme bacteriano, não foram visíveis células do isolado 18UE/10, as quais estavam no entanto presentes à superfície dos fragmentos não lavados. Dado que muitas outras estruturas da célula vegetal são coradas pelo método *Gram*, algumas com morfologia similar à bacteriana, a observação microscópica é bidimensional e o isolado pode adquirir uma estrutura morfológica distinta dentro da célula vegetal, não podemos eliminar a hipótese de capacidade de colonização endofítica do isolado sob estudo. Em qualquer caso, é evidente que se trata de um isolado rizosférico, que permanece associado à raiz durante um longo período após contacto e que será capaz de fortalecer a absorção de nutrientes pela planta, em particular de sulfato, quer pela sua produção na rizosfera, quer pelo efeito causado na anatomia radicular.

### 4.3. Perspetivas futuras

De entre as linhas de investigação futura abertas no decorrer do presente trabalho, relativamente à caracterização molecular do isolado G1A de OLV-1, surgem como prioritárias a sequenciação das extremidades do genoma de forma a obter a sua sequenciação completa. Paralelamente, também neste estudo foi identificado o RNA satélite associado a este isolado, e

neste momento, estão em curso trabalhos que visam a otimização dos protocolos referentes à sua caracterização molecular.

Pretende-se assim prosseguir com o estudo molecular do RNA satélite encontrado associado ao isolado G1A de OLV-1, pois este pode trazer novos conhecimentos sobre a sua função na epidemiologia do vírus e fornecer a base para o desenvolvimento de estratégias para o controlo do vírus de forma a explorar mecanismos de silenciamento.

Os ensaios relativos à resistência induzida pelo enxofre revelaram-se promissores. Serão necessários mais ensaios com vista a uma análise estatística robusta, bem como o estabelecimento de um protocolo para a realização de experiências em termofilia, por exemplo com uso de um sistema de recirculação de água aquecida. Essas análises visam uma utilização futura de bactérias termofílicas produtoras de sulfato, a aplicar diretamente em solos agrícolas, possivelmente através da sua liofilização.

Como mencionado anteriormente, o isolado viral de OLV-1 em estudo, o G1A, tem um RNA satélite associado e ainda não são conhecidas as suas propriedades nem as suas principais funções. A sua presença pode atenuar os sintomas causados pelo seu vírus auxiliar ou agravar os sintomas virais. Assim, pretende-se alargar o estudo de resistência induzida pelo enxofre a isolados virais que não possuam RNA satélite.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ALABDULLAH, A., ELBEAINO, T., MINAFRA, A., DIGIARO, M. & MARTELLI, G. 2009. Detection and variability of olive latent virus 3 in the mediterranean region. *Journal of Plant Pathology*, 521-525.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. & LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- ANANDHAM, R., INDIRAGANDHI, P., MADHAIYAN, M., RYU, K. Y., JEE, H. J. & SA, T. M. 2008. Chemolithoautotrophic oxidation of thiosulfate and phylogenetic distribution of sulfur oxidation gene (soxB) in rhizobacteria isolated from crop plants. *Research in Microbiology*, 159, 579-589.
- BEATTIE, G. A. & LINDOW, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *phytopathology*, 89, 353-359.
- BECKMAN, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101-110.
- BERENDSEN, R. L., PIETERSE, C. M. & BAKKER, P. A. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*, 17, 478-86.
- BERTOLINI, E. 1998. Virosis del olivo detectadas e España. Nuevos métodos del diagnóstico. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, 191-193.
- BERTOLINI, E., OLMOS, A., LÓPEZ, M. M. & CAMBRA, M. 2003. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology*, 93, 286-292.
- BERTOLINI, E., OLMOS, A., MARTÍNEZ, M. C., GORRIS, M. A. T. & CAMBRA, M. 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *Journal of Virological Methods*, 96, 33-41.

- BHATTACHARYYA, P. N. & JHA, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1327-1350.
- BOURBOS, V., SKOUDRIDAKIS, M., BARBOPOULOU, E. & VENETIS, K. 2000. Ecological control of grape powdery mildew (*Uncinula necator*).
- CARDOSO, J. M., FELIX, M. R., CLARA, M. I. & OLIVEIRA, S. 2005. The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Arch Virol*, 150, 815-23.
- CARDOSO, J. M., FELIX, M. R., CLARA, M. I. & OLIVEIRA, S. 2009. Complete genome sequence of a Tobacco necrosis virus D isolate from olive trees. *Arch Virol*, 154, 1169-72.
- CARDOSO, J. M., FELIX, M. R., OLIVEIRA, S. & CLARA, M. I. 2004. A Tobacco necrosis virus D isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Arch Virol*, 149, 1129-38.
- CASTELLANO, M., DI FRANCO, A. & MARTELLI, G. 1987. Electron microscopy of two olive viruses in host tissues. *Journal of submicroscopic cytology*, 19, 495-508.
- CASTELLANO, M., LOCONSOLE, G., GRIECO, F., DI SANSEBASTIANO, G. & MARTELLI, G. 2005. Subcellular localization and immunodetection of movement proteins of olive latent virus 1. *Archives of virology*, 150, 1369-1381.
- COHN, J., SESSA, G. & MARTIN, G. B. 2001. Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology*, 13, 55-62.
- CORTE, A., CIFERRI, R. & RUI, D. 1961. Infezioni sul ligustro da malformazioni fogliari dell'olivo. *Rivista di Patologia Vegetale*, 251-260.
- DALMAY, T., RUBINO, L., BURGYÁN, J., KOLLÁR, Á. & RUSSO, M. 1993. Functional Analysis of Cymbidium Ringspot Virus Genome. *Virology*, 194, 697-704.
- DE GARA, L., DE PINTO, M. C. & TOMMASI, F. 2003. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 863-870.
- DE NINO, A., LOMBARDO, N., PERRI, E., PROCOPIO, A., RAFFAELLI, A. & SINDONA, G. 1997. Direct identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 32, 533-541.

- DI FRANCO, A., MARTELLI, G. & RUSSO, M. 1983. An ultrastructural study of olive latent ringspot virus in *Gomphrena globosa*. *J. MICROSC. CYTOL.*, 15, 539-548.
- DODDS, J. A., MORRIS, T. J. & JORDAN, R. L. 1984. Plant Viral Double-Stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology*, 22, 151-168.
- FAGGIOLI, F. & BARBA, M. An elongated virus isolated from Olive (*Olea europea* L.). XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases 386, 1994. 593-600.
- FAGGIOLI, F., FERRETTI, L., ALBANESE, G., SCIARRONI, R., PASQUINI, G., LUMIA, V. & BARBA, M. 2005. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 49-55.
- 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.
- FALQUET, L., PAGNI, M., BUCHER, P., HULO, N., SIGRIST, C. J. A., HOFMANN, K. & BAIROCH, A. 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Research*, 30, 235-238.
- FELIX, M. & CLARA, M. Two Necrovirus isolates with properties of Olive latent virus 1 and of Tobacco necrosis virus from olive in Portugal. IV International Symposium on Olive Growing 586, 2000. 725-728.
- FÉLIX, M., DA CLARA, M., RAO, G., VALVERDE, R. & DOVAS, C. 2008. Characterization and diagnosis of viruses occurring on *Olea europaea* L. *Techniques in diagnosis of plant viruses*, 189-226.
- FÉLIX, M., LEITÃO, F. & FERNANDES SERRANO, J. Virus incidence in four *Olea europaea* cultivars evaluated by mechanical inoculation and immunological assays. IV International Symposium on Olive Growing 586, 2000. 721-724.
- FÉLIX, M., VARANDA, C. R. & CLARA, M. 2012. Biology and molecular characterization of necroviruses affecting *Olea europaea* L.: a review. *European Journal of Plant Pathology*, 133, 247-259.
- FÉLIX, M. R., CARDOSO, J., OLIVEIRA, S. & CLARA, M. I. E. 2007. Biological and molecular characterization of Olive latent virus 1.

- FELIX, M. R., CARDOSO, J. M., VARANDA, C. M., OLIVEIRA, S. & CLARA, M. I. 2005. Complete nucleotide sequence of an Olive latent virus 1 isolate from olive trees. Annotated Sequence Record. *Arch Virol*, 150, 2403-6.
- FROHMAN, M. A., DUSH, M. K. & MARTIN, G. R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 8998-9002.
- GALLITELLI, D. & SAVINO, V. 1985. Olive latent virus-1, an isometric virus with a single RNA species isolated from olive in Apulia, Southern Italy. *Annals of Applied Biology*, 106, 295-303.
- GALLITELLI, D., VOVIAS, C., MARTELLI, G. P., MONTASSER, M. S. & TOUSIGNANT, M. E. 1991. Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: II. Field test under natural epidemic conditions in southern Italy. *Plant disease*, 75, 93-95.
- GHANI, A., MCLARREN, R. G. & SWIFT, R. S. 1993. Mobilization of recently-formed soil organic sulphur. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 1739-1744.
- GLICK, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169, 30-39.
- GRIECO, F. 2000. Progressi nella diagnosi dei virus dell'olivo. *Informatore Fitopatologico*.(11): 49-52, 2000.
- GRIECO, F., ALKOWNI, R., SAPONARI, M., SAVINO, V. & MARTELLI, G. 2000. Molecular detection of olive viruses\*. *EPP0 Bulletin*, 30, 469-473.
- GRIECO, F., DELL'ORCO, M. & MARTELLI, G. P. 1996a. The nucleotide sequence of RNA1 and RNA2 of olive latent virus 2 and its relationships in the family Bromoviridae. *J Gen Virol*, 77 ( Pt 10), 2637-44.
- GRIECO, F., SAVINO, V. & MARTELLI, G. P. 1996b. Nucleotide sequence of the genome of a citrus isolate of olive latent virus 1. *Archives of Virology*, 141, 825-838.
- GUNASINGHE, U. & GERMAN, T. 1988. Detection of viral RNA in mealybugs associated with mealybug-wilt of pineapple. *Phytopathology*, 78, 1584.

- GUO, L. H., CAO, Y. H., LI, D. W., NIU, S. N., CAI, Z. N., HAN, C. G., ZHAI, Y. F. & YU, J. L. 2005. Analysis of nucleotide sequences and multimeric forms of a novel satellite RNA associated with beet black scorch virus. *J Virol*, 79, 3664-74.
- HACKER, D. L., PETTY, I. T. D., WEI, N. & MORRIS, T. J. 1992. Turnip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement. *Virology*, 186, 1-8.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 1999. 95-98.
- HANEKLAUS, S., BLOEM, E. & SCHNUG, E. The significance of sulphur induced resistance (SIR) for sustainable agricultural production systems. 13th International Reinhardsbrunn Symposium "Modern Fungicides and Antifungal Compounds, 2001. 18.
- HANEKLAUS, S., BLOEM, E. & SCHNUG, E. 2004. Interaction of sulfur and plant disease. *Mineral nutrition and plant diseases*. APS Press, St. Paul, MN.
- HANEKLAUS, S., BLOEM, E. & SCHNUG, E. 2006. Disease control by sulphur induced resistance. *Aspects of Applied Biology 79, What will organic farming deliver? COR 2006*, 221-224.
- HARRELL, L., MELCHER, U. & ATKINS, J. F. 2002. Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons. *Nucleic acids research*, 30, 2011-2017.
- HASIÓW-JAROSZEWSKA, B., BORODYNKO, N. & POSPIESZNY, H. 2011. Molecular characterisation of the full-length genome of olive latent virus 1 isolated from tomato. *Journal of Applied Genetics*, 52, 245-247.
- HENRIQUES, M., REI, F., LEITÃO, F., SERRANO, J. & POTES, M. 1992. Virus diseases in *Olea europaea* L. cultivars. 1. Immunodiagnosis of strawberry latent ringspot nepovirus. *Phytopathologia Mediterranea*, 31, 127-132.
- HÖLLER, K., KIRÁLY, L., KÜNSTLER, A., MÜLLER, M., GULLNER, G., FATTINGER, M. & ZECHMANN, B. 2010. Enhanced glutathione metabolism is correlated with sulfur-induced resistance in tobacco mosaic virus-infected genetically susceptible *Nicotiana tabacum* plants. *Molecular plant-microbe interactions*, 23, 1448-1459.
- HU, C.-C., HSU, Y.-H. & LIN, N.-S. 2009. Satellite RNAs and satellite viruses of plants. *Viruses*, 1, 1325-1350.

- HUBERT, C., ARNOSTI, C., BRÜCHERT, V., LOY, A., VANDIEKEN, V. & JØRGENSEN, B. B. 2010. Thermophilic anaerobes in Arctic marine sediments induced to mineralize complex organic matter at high temperature. *Environmental Microbiology*, 12, 1089-1104.
- HUBERT, C., LOY, A., NICKEL, M., ARNOSTI, C., BARANYI, C., BRÜCHERT, V., FERDELMAN, T., FINSTER, K., CHRISTENSEN, F. M., ROSA DE REZENDE, J., VANDIEKEN, V. & JØRGENSEN, B. B. 2009. A Constant Flux of Diverse Thermophilic Bacteria into the Cold Arctic Seabed. *Science*, 325, 1541-1544.
- HULL, R. 2001. *Nomenclature and classification of plant viruses*, Gulf Professional Publishing.
- INE 2011. Recenseamento Agrícola 2009 - Análise dos principais resultados.
- JANSSEN, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 72, 1719-1728.
- 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.
- KASSANIS, B. 1962. Properties and behaviour of a virus depending for its multiplication on another. *Journal of general microbiology*, 27, 477-488.
- KERSTIENS, G. 1996. Signalling across the divide: a wider perspective of cuticular structure—function relationships. *Trends in Plant Science*, 1, 125-129.
- KIM, B.-Y., LEE, S.-Y., WEON, H.-Y., KWON, S.-W., GO, S.-J., PARK, Y.-K., SCHUMANN, P. & FRITZE, D. 2006. *Ureibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from cotton waste composts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56, 663-666.
- KING, A. M., ADAMS, M. J., LEFKOWITZ, E. J. & CARSTENS, E. B. 2012. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier.
- KIRÁLY, L., KÜNSTLER, A., HÖLLER, K., FATTINGER, M., JUHÁSZ, C., MÜLLER, M., GULLNER, G. & ZECHMANN, B. 2012. Sulfate supply influences compartment specific glutathione metabolism and confers enhanced resistance to Tobacco mosaic virus during a hypersensitive response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 59, 44-54.
- KLECZKOWSKI, A. 1955. The statistical analysis of plant virus assays: a transformation to include lesion numbers with small means. *Journal of general microbiology*, 13, 91-98.

- LAPPARTIENT, A. G., VIDMAR, J. J., LEUSTEK, T., GLASS, A. D. M. & TOURAINÉ, B. 1999. Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *The Plant Journal*, 18, 89-95.
- LAVEE, S. & TANNE, E. 1984. Spheriosis-a virus disease of the olive (*Olea europaea*). Symptoms, growth, tree development and production. *Olea*, 12, 71-75.
- LÓPEZ-BUCIO, J., CRUZ-RAMÍREZ, A. & HERRERA-ESTRELLA, L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.
- MADIGAN, M. T. 2003. Brock Biology of Microorganisms, 11th edn. SciELO Espana.
- MADRP 2008. State of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in Portugal. *Second Portuguese National Report on Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*, 42.
- MARCHANT, R., BANAT, I. M., RAHMAN, T. J. & BERZANO, M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology*, 4, 595-602.
- MARCHANT, R., FRANZETTI, A., PAVLOSTATHIS, S., TAS, D., ERDBRÜGGER, I., ÚNYAYAR, A., MAZMANCI, M. & BANAT, I. 2008. Thermophilic bacteria in cool temperate soils: are they metabolically active or continually added by global atmospheric transport? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 841-852.
- MARGIS-PINHEIRO, M., SANDRONI, M., LUMMERZHEIM, M. & DULCE, E. 1999. A defesa das plantas contra as doenças. *Ciência Hoje*, 26-31.
- 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, 171-172.
- MARTELLI, G. 1999a. Infectious diseases and certification of olive: an overview. *EPPO Bulletin*, 29, 127-133.
- MARTELLI, G., SABANADZOVIC, S., SAVINO, V., ABU-ZURAYK, A. & MASANNAT, M. 1995. Virus-like diseases and viruses of olive in Jordan. *Phytopathologia Mediterranea*, 34, 133-136.
- MARTELLI, G. P. 1999b. Infectious diseases and certification of olive: an overview. *EPPO Bulletin*, 29, 127-133.

- MARTELLI, G. P. 2013. A Brief Outline of Infectious Diseases of Olive.
- MARTELLI, G. P., YILMAZ, M. A., SAVINO, V., BALOGLU, S., GRIECO, F., GÜLDÜR, M. E., GRECO, N. & LAFORTEZZA, R. 1996. Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 527-536.
- MATERAZZI, A., TONI, S., PANATTONI, A. & OSTI, M. T., E. 1996 Alcune evidenze sulla presenza di un nuovo virus isodiametrico in *Olea europea* L *SIPaV* Unico 3
- MAUCH-MANI, B. & MÉTRAUX, J.-P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, 82, 535-540.
- MEHDIPOUR MOGHADAM, M., EMTIAZI, G. & SALEHI, Z. 2012. Enhanced auxin production by *Azospirillum* pure cultures from plant root exudates. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 985-994.
- MERCIEGA, V., BOSCIA, D. & SAVINO, V. 1996. Comparison of five isolates of olive latent virus 1. *Phytopathologia Mediterranea*, 35, 1-8.
- MONIER, J.-M. & LINDOW, S. 2003. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 15977-15982.
- MONTESINOS, E., BONATERRA, A., BADOSA, E., FRANCÉS, J., ALEMANY, J., LLORENTE, I. & MORAGREGA, C. 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology*, 5, 169-175.
- MORRIS, T. & DODDS, J. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*, 69, 855.
- MUNNA, M. S., TAMANNA, S., AFRIN, M. R., SHARIF, G. A., MAZUMDER, C., KANA, K. S., URMI, N. J., UDDIN, M. A., RAHMAN, T. & NOOR, R. 2014. Influence of Aeration Speed on Bacterial Colony Forming Unit (CFU) Formation Capacity. *American Journal of Microbiological Research*, 2, 47-51.
- MURANT, A. & MAYO, M. 1982. Satellites of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 20, 49-68.



- MUTZEL, A., REINSCHIED, U. M., ANTRANIKIAN, G. & MÜLLER, R. 1996. Isolation and characterization of a thermophilic bacillus strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70 °C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 593-596.
- MUYZER, G., BRINKHOFF, T., NÜBEL, U., SANTEGOEDS, C., SCHÄFER, H., WAWER, C., KOWALCHUK, G., DE BRUIJN, F., HEAD, I. & AKKERMANS, A. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Molecular microbial ecology manual. Volumes 1 and 2*, 743-769.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59, 695-700.
- NICOLINI, J. & TRAVERSI, A. 1950. Observaciones sobre una nueva enfermedad del olivo en Argentina. *IDIA*, 32, 8-11.
- NOLASCO, G., MANSINHO, A., SANTOS, M. T., SOARES, C., SEQUEIRA, Z., SEQUEIRA, C., CORREIA, P. K. & SEQUEIRA, O. A. 2000. Large Scale Evaluation of Primers for Diagnosis of Rupestris Stem Pitting Associated Virus-1. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 311-318.
- ODA, Y., SAEKI, K., TAKAHASHI, Y., MAEDA, T., NAITOW, H., TSUKIHARA, T. & FUKUYAMA, K. 2000. Crystal structure of tobacco necrosis virus at 2.25 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 300, 153-169.
- OSBOURN, A. 1996. Saponins and plant defence — a soap story. *Trends in Plant Science*, 1, 4-9.
- PACINI, E. & CRESTI, M. 1977. Viral particles in developing pollen grains of *Olea europaea*. *Planta*, 137, 1-4.
- PANTALEO, V., GRIECO, F., CASTELLANO, M. A. & MARTELLI, G. P. 1999. Synthesis of infectious transcripts of olive latent virus 1: genes required for RNA replication and virus movement. *Archives of Virology*, 144, 1071-1079.
- PANTALEO, V., SAPONARI, M. & GALLITELLI, D. 2001. Development of a nested PCR protocol for detection of olive-infecting viruses in crude extracts. *Journal of Plant Pathology*, 143-146.
- PORTILLO, M. C. & GONZALEZ, J. 2008. Microbial communities and immigration in volcanic environments of Canary Islands (Spain). *Naturwissenschaften*, 95, 307-315.

- PORTILLO, M. C., SANTANA, M. & GONZALEZ, J. M. 2012. Presence and potential role of thermophilic bacteria in temperate terrestrial environments. *Naturwissenschaften*, 99, 43-53.
- RAHMAN, T., MARCHANT, R. & BANAT, I. 2004. Distribution and molecular investigation of highly thermophilic bacteria associated with cool soil environments. *Biochemical Society Transactions*, 32, 209-213.
- RAUSCH, T. & WACHTER, A. 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci*, 10, 503-9.
- REI, F. M. D. C. T. 1995. *A aplicação do método de isolamento de cadeias duplas de RNA (double-stranded RNA-dsRNA) no diagnóstico de infecções virais em Olea europaea L.*
- RIBALDI, M. 1959. Osservazioni preliminari sopra un «giallume infettivo» dell'Olivo (*Olea europea L. var. sativa Hoffm. et Lk.*). *Notiz. Mal. Piante*, 47-48.
- RUBINO, L. & RUSSO, M. 2010. Properties of a novel satellite RNA associated with tomato bushy stunt virus infections. *Journal of General Virology*, 91, 2393-2401.
- RUSSO, M., BURGYAN, J. & MARTELLI, G. P. 1994. The molecular biology of Tombusviridae. *Advances in virus research*, 44, 382-428.
- SABANADZOVIC, S., ABOU-GHANEM, N., LA NOTTE, P., SAVINO, V., SCARITO, G. & MARTELLI, G. 1999. Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with olive leaf yellowing. *Journal of Plant Pathology*, 37-45.
- SAFFARY, R., NANDAKUMAR, R., SPENCER, D., ROBB, F. T., DAVILA, J. M., SWARTZ, M., OFMAN, L., THOMAS, R. J. & DIRUGGIERO, J. 2002. Microbial survival of space vacuum and extreme ultraviolet irradiation: strain isolation and analysis during a rocket flight. *FEMS microbiology letters*, 215, 163-168.
- SALDARELLI, P., MINAFRA, A., MARTELLI, G. & WALTER, B. 1994. Detection of grapevine leafroll-associated closterovirus III by molecular hybridization. *Plant pathology*, 43, 91-96.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. & FRITSCH, E. F. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y, Cold Spring Harbor Laboratory.

- SANTANA, M. M., PORTILLO, M. C., GONZALEZ, J. M. & CLARA, M. I. E. 2013. Characterization of new soil thermophilic bacteria potentially involved in soil fertilization. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176, 47-56.
- SAPONARI, M., EL BEAINO, T., GRECO, F., SAVINO, V. & MARTELLI, G. 2001. Diagnosi di virus dell'olivo mediante l'impiego degli RNA a doppia elica. *Atti Progetto POM A*, 32, 793-798.
- SAVINO, V., BARBA, M., GALITELLI, G. & MARTELLI, G. 1979. Two nepoviruses isolated from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 18, 135-142.
- SAVINO, V. & GALLITELLI, D. 1981. Cherry leafroll virus in olive. *Phytopathologie Mediterranea*, 20, 202-203.
- SAVINO, V. & GALLITELLI, D. 1983. Isolation of cucumber mosaic virus from olive in Italy. *Phytopathologia Mediterranea (Italy)*.
- SAVINO, V., GALLITELLI, D. & BARBA, M. 1983. Olive latent ringspot virus, a newly recognised virus infecting olive in Italy. *Annals of applied biology*, 103, 243-249.
- SAVINO, V., SABANADZOVIC, S., SCARITO, G., LAVIOLA, C. & MARTELLI, G. 1996. Due giallumi dell'olivo di possibile origine virale in Sicilia. *Informatore Fitopatologico*, 46, 55-59.
- SCALBERT, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- SCHLESINGER, W. H. 1997. Biogeochemistry: An Analysis of Global Change. 1997. *San Diego, CA: Academic Pr.*
- SCHNEIDER, I. 1969. Satellite-like particle of tobacco ringspot virus that resembles tobacco ringspot virus. *Science*, 166, 1627-1629.
- SCHNUG, E., BOOTH, E., HANEKLAUS, S. & WALKER, K. Sulphur supply and stress resistance in oilseed rape. Proceedings of the 9th international rapeseed congress, Cambridge, 1995. 229-231.
- SHEWRY, P. R. & LUCAS, J. A. 1997. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. *In: CALLOW, J. A. (ed.) Advances in Botanical Research*. Academic Press.
- SIMON, A. E., ROOSSINCK, M. J. & HAVELDA, Z. 2004. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol*, 42, 415-37.

- SINGLETON, R., JR. & AMELUNXEN, R. E. 1973. Proteins from thermophilic microorganisms. *Bacteriol Rev*, 37, 320-42.
- SOKAL, R. & ROHLF, F. 1981. Biometry, 2nd edn WH Freeman and Co. *New York*.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B. & METRAUX, J. P. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 35, 235-70.
- THOMAS, C. L., LEH, V., LEDERER, C. & MAULE, A. J. 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in nicotiana benthamiana. *Virology*, 306, 33-41.
- THOMAS, H. 1958. Sick leaf of olive. *Plant Dis. Rep*, 42, 1154-1154.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-80.
- TOOLEY, P., HEWINGS, A. & FALKENSTEIN, K. 1989. Detection of double-stranded RNA in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 79, 470-474.
- TRIOLO, E., MATERAZZI, A. & TONI, S. 1996. An isolate of Tobacco Mosaic Tobamovirus from *Olea europaea* L. *Advances in Horticultural Science*, 10, 39-45.
- TUZUN, S. 2001. The Relationship Between Pathogen-induced Systemic Resistance (ISR) and Multigenic (horizontal) Resistance in Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 85-93.
- VALVERDE, R., NAMETH, S. & JORDAN, R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*, 74, 255-258.
- VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. & PIETERSE, C. M. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 453-83.
- VARANDA, C., CARDOSO, J. S., DO ROSÁRIO FÉLIX, M., OLIVEIRA, S. & CLARA, M. 2010. Multiplex RT-PCR for detection and identification of three necroviruses that infect olive trees. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 161-164.
- VARANDA, C., FÉLIX, M. & CLARA, M. 2008. DsRNA analysis and RT-PCR assays to evaluate viral infections: the case of necroviruses in olive. *Journal of Plant Pathology*, 90, 385.

- VARANDA, C., FÉLIX, M., LEITÃO, F., SISMEIRO, R. & CLARA, M. 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, 2006.
- VARANDA, C. M. R., CARDOSO, J. M. S., OLIVEIRA, M. D. M., OLIVEIRA, S., CLARA, M. I. E. & FÉLIX, M. R. F. 2014. A degenerate pair of primers for simultaneous detection of four alpha- and betanecroviruses. *Journal of Virological Methods*, 208, 63-65.
- WIEGEL, J., LJUNGDAHL, L. & RAWSON, J. 1979. Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Journal of bacteriology*, 139, 800-810.
- WILLEY, J. M., SHERWOOD, L. & WOOLVERTON, C. J. 2009. *Prescott's principles of microbiology*, McGraw-Hill Higher Education.
- WILSON, I. G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3741-51.



# ANEXOS

---





## ANEXO I

Sequências nucleotídicas de cada um dos fragmentos A, B, C e D que originaram a sequência parcial do genoma do isolado viral G1A.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TATCGGTGCGAGCCCGTACACAGCTAAAGTGTCTAAAAATGGAGTTACCCAACCAACATAAGCAAACATGCTGCTGAAGGTTTCGTTTCCTTAACTGG

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CTTTGTAATCCCTGGAGACGTC AACGTACAGTCAACGCTGCTGTCGCTTTTTCAGAAATAGCATTCCTTGCTATTGAGGACGTGGAACATCTCGAAGATATCA

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACGAGTGTTCGAGGAATCATCTGGAGGTC AATCGCAGCGCACTAAGGTTGTGCTGAAGGGGC TTATTCTCCCGTAAATCCGAAACGCACCCGCCGAGT

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CCGCAAGCAAAGAAGGCCAAATTCGTCAAATAATTTGGTTAATGAGGCTCGTGCCGAGTTTGGTCTCCCCAAAGCTACAGAGGCCAATCGACTCATGGTG

          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAACACTTCC TGC TCCGAAGGTGTAAGGATTTGGGGGGTTGTCAATCCAGTGCCACAACAATGTTGCAC TCGCCTTGACTCTCGTGTTCCTCCCAACAG

          510     520     530     540     550     560     570
FRAGMENTO A  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGATGATTTTGTGGCGGAGCTATGATGAACACGCACAAGACGAGGTC TGCGGTTCGTGGTATGGACAACCTCCAAG

```

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ATCCCAGTGCCACAACAATGTTGCACTCGCCTTGACTCTCGTGTGTTGTCCCAACAGAGGATGATTTGTGCTGGCGCGAGCTATGATGAACACGCACAAGACG

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGTC TGCGGTTCTGGTATGGACAACCTCCAAGGTGAAGGGTGGTGGAAACAACAGGCCTTGGCGTAGGTGGCCAGGCCGGCTTGGCCTTTCGGGCCAAGT

          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGGGTGCC TAGAGAGGAGGCCGGGGTTTTTCCACGTCGTGTTTCGCGTGGAAACCACCCCGATCTGGTGGTCAAACCATCAGGACACCCCGAGAAACAGCG

          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCAGTTGTTACGCTATAGTGGAAATGGCGGCCATTTATTAATCGGCATCCACAACAACCTCTCTCCAACTTGCGTAGGGGCTTAATAGAGAGATATTC

          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TACGTTGAGGGACCCAAATGGGCCTCCAAGACGCCCTAAACCCGTTCTGGGGGGCAATCAACTCCCTGAATAAGTTTCGAGACCTATATACCAAAAAATAGTT

          510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGCGTCATTCCTCCCTGTAAACCAATGAACAATTCCTTGATGAATTACTCGGGCAGGAAACTAACTATTTACAAAGAAGCGGTTGATAGTTTGTCCGATCAACC

          610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTTAGCTTACGGGACTCGAGGCTGAAGACTTTCTGTTAAGGCCGAAAAACTTAATCTGAGCAAGAAGCCAGATCCAGCACCCCGGGTCATTC AACCCAGG

          710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCACCTCGGTACAACGTTTGTTTGGGTCGTTATCTACGTCACATGAACACCACGCGTTCAAACCATTTGCTAAATGCTTTGGGGAGATCACGGTCTTTA

          810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
FRAGMENTO B  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AAGGGTTTACTCTAGAGCAACAAGGCCAAATCATGTTTTCGAAGTGAAGAAAATATGTTAATCCCGTCGCCGTTGGACTCGATGCAAGTCGGTTCGACCA

          910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000

```



```

        610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CAACCCGTAGATATATTTGAGCGCATTTGAGTTTTGTCAAACCCAACCCTGTGTTCGATGGCTACCAATACATCATGGTTTCGAAAAACCCTCGGTAGTCACTT

        710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
CGAAGGATGTCAC TAGCTTAAATCCCATGCCAGAAATCAGGC TCAATAATGCAGAAATGGCTGCAAGCTGTGGGTGAGTGCAGAAATGAGTATCAATGGTGGAAAT

        810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACCTGTTATGCAGAACTTTTACCATAATGCTCCAACCTGGAGTTAAACGCACCAAAATTCACCAAGACCGGGCGAGTTTCAGACGAACGGGTGGGGTATCAC

        910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TCTAGATATATGCATAGAGTGGCCCGAGCCATTTTCGCCCGAAACCCGTTTATCCCTTCATTTTAGCGTTCCGTATCACACCAGACCTTCAGGAAGCACTGG

        1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGCCTTTTATGATACCCATACGC TTGAGTTGGATGATGTTGTCCAGTTGATACCTACCAAGTATCAGGAGAGCATTTGATCAATGGATTACCAAACTG

        1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AGGTAGTGAGGATAACGTGAGCGTACGCCGTCGAGCTAGGAGGGGCAC TGAGGATAAGAAGCACAAATGGATCGGGATTAACTGGCGTTAAGCGTCATGC

        1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290     1300
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GGTGAGTGAAACATCTCAGAAATCACAGCAAGGTACTGGCAACGGCACGATGACCAACATAGCTGAAGAGCAGACCATTGCCGTGACATACAACTTTAAC

        1310     1320     1330     1340     1350     1360     1370     1380     1390     1400
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TTTTAGTTATGGCTGTGTGTCGCTGTTGTGATACCTTACCAGGTATTACATTTATCCCTTACTTTGCTATTCTCATTCATCCTTGCAATATTAGTTGT

        1410     1420     1430     1440     1450     1460     1470     1480     1490     1500
FRAGMENTO C  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
TGGAAC TCCAACCAGCAATATCATCATTCCTCC TAGTACTTACGAGTATAAGACTCAACACATTTTCGATCGAAAAATAGACATTTTCGCAACTCTCTCAAC
    
```

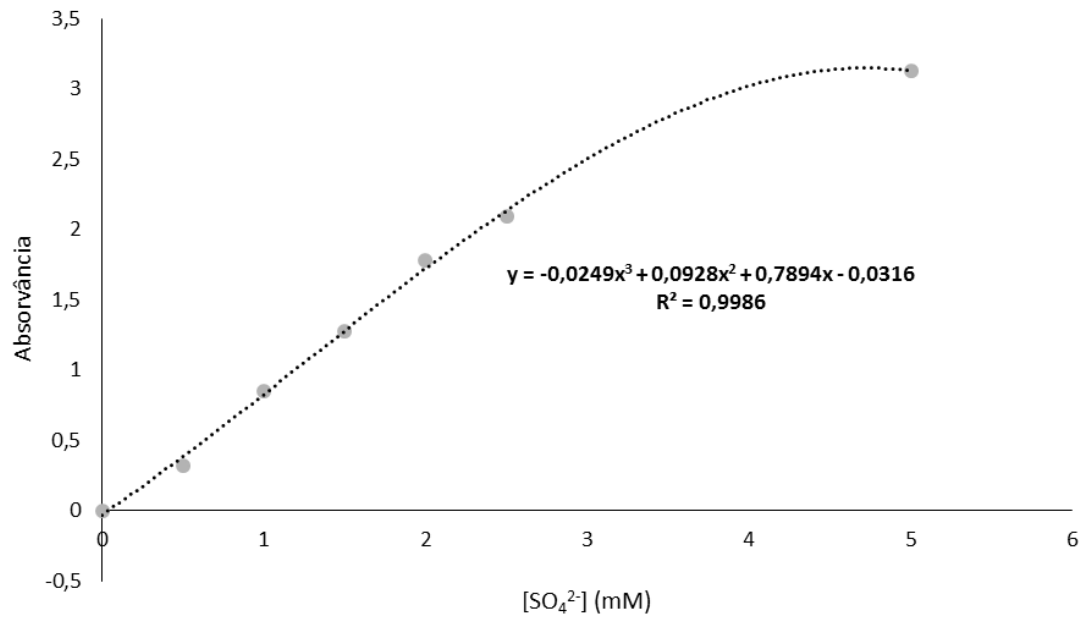


```

FRAGMENTO D  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
                310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
FRAGMENTO D  TAAATGTTACCCGTCGGCCACCCTTCCCTTGCCATGGCAACTAACATCCAAAACGGATAATTGCGGAGTAACCCGTTCACATGCAAGTGATCAAGGGCCAGCCGCC
                410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
FRAGMENTO D  GCCACTAACTTTGGCCAAGTGTTCCTGCCATTACGAAATCGAAATTTATAGAACCAGTGAACCCAACTGTCAATGTGTAACCGCACACCGATGGGTGAGTTA
                510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
FRAGMENTO D  CGTAACGTGTGCTAATCCCTAAAGGTTTTAGTAGAGCGGTAAGCAAGACGGATCCCTGGGAAACAGGTTTAACGGGCTGGGGGTGGTGCCCCGGCCGTCGCA
                610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
FRAGMENTO D  TCACTTGCTGATACAATCTACAAGGCCCATGGGAGGGTCTGCACAGGTATCCACGCCAAGGACGGGACGAAAGTCTCGGACGGGGGTAGTGGACCCAAC
                710      720      730
FRAGMENTO D  ....|....|....|....|....|....|....|....
                ACCAGATTGAGGGGCCTTTGCCGCGGCCGAAA
    
```

## ANEXO II

## Curva padrão para quantificação de sulfato







## ANEXO III

## Preparação das soluções nutricionais sem e com sulfato

1. Para 100 mL de cada solução nutricional:

SOLUÇÃO COM SULFATO	SOLUÇÃO SEM SULFATO
500 $\mu\text{L}$ $\text{KNO}_3$ 1M	500 $\mu\text{L}$ $\text{KNO}_3$ 1M
100 $\mu\text{L}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M	100 $\mu\text{L}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1M
200 $\mu\text{L}$ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1M	200 $\mu\text{L}$ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1M
Pesar 0,043 g $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	86 $\mu\text{L}$ $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 1M
100 $\mu\text{L}$ $\text{MgSO}_4$ 1M	-
140 $\mu\text{L}$ EDTA-Fe-Na 50mM	140 $\mu\text{L}$ EDTA-Fe-Na 50mM
400 $\mu\text{L}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	400 $\mu\text{L}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M
16 $\mu\text{L}$ $\text{ZnCl}_2$ 5.5mM	16 $\mu\text{L}$ $\text{ZnCl}_2$ 5.5mM
27 $\mu\text{L}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$ 111mM	27 $\mu\text{L}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$ 111mM
18 $\mu\text{L}$ $\text{CuCl}_2$ 5mM	18 $\mu\text{L}$ $\text{CuCl}_2$ 5mM
10 $\mu\text{L}$ $\text{MoO}_3$ 5mM	10 $\mu\text{L}$ $\text{MoO}_3$ 5mM
20 $\mu\text{L}$ $\text{MnCl}_2$ 100mM	20 $\mu\text{L}$ $\text{MnCl}_2$ 100mM

2. Acertar pH a 6,5 com KOH 1M.
3. Perfazer a 100 mL com  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril.
4. Autoclavar 20 minutos, 120°C.