



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

*Xylella fastidiosa* EM OLIVEIRAS (*Olea europaea*): DISTRIBUIÇÃO NA PLANTA,  
TRANSMISSÃO VERTICAL E DIAGNOSE

BEATRIZ DE NADAI GASPARINI SANTOS

Araras  
2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

***Xylella fastidiosa* EM OLIVEIRAS (*Olea europaea*): DISTRIBUIÇÃO NA PLANTA,  
TRANSMISSÃO VERTICAL E DIAGNOSE**

**BEATRIZ DE NADAI GASPARINI SANTOS**

**ORIENTADOR: PROF. DR. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2022

Beatriz, dos Santos

Xylella fastidiosa EM OLIVEIRAS (Olea europaea):  
DISTRIBUIÇÃO NA PLANTA, TRANSMISSÃO VERTICAL  
E DIAGNOSE / dos Santos Beatriz -- 2022.  
52f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São  
Carlos, campus Araras, Araras  
Orientador (a): Helvécio Della Coletta Filho  
Banca Examinadora: Evandro Henrique Schinor, Edna  
Ivani Bertoncini  
Bibliografia

1. Diagnose molecular. 2. Xylella em oliveiras . I. Beatriz,  
dos Santos. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Beatriz de Nadai Gasparini Santos, realizada em 23/05/2022.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho (IAC)

Prof. Dr. Evandro Henrique Schinor (UFSCar)

Profa. Dra. Edna Ivani Bertocini (APTA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa viagem, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas, alegrias e muitos percalços pelo caminho, mas apesar do processo solitário a que qualquer investigador está destinado, reúne contributos de várias pessoas, indispensáveis para encontrar o melhor rumo em cada momento da caminhada.

Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de várias pessoas, a quem dedico especialmente este projeto de vida. Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me fazer presente neste momento.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Helvécio Della Coletta Filho, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira de o ter-me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem. Agradeço-lhe ainda o tema do trabalho, que sempre me aliciou, o que fez, a maioria das vezes, conseguir ultrapassar dificuldades surgidas.

Agradeço, de igual forma, a Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, da Faculdade Federal de São Carlos, as conversas que, de uma forma ou de outra, sempre deram resultados práticos importantes, além da colega e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo estímulo sentido após cada conversa, que me faziam “carregar baterias”.

Aos meus colegas de laboratório, do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, quero agradecer-lhes os momentos, por vezes, magníficos, que passámos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a alegria que por vezes se instalava:

- Agradeço à minha amiga Nathalia Mancine a amizade demonstrada, a sua sempre inteira disponibilidade e paciência e pela ajuda e comprometimento de Laura Borgati.

- Um agradecimento especial à Kárita Almeida, pela amizade, simpatia e a grande ajuda que sempre me deu.

E, finalmente agradeço, à minha família:

-Ao meu Marido Raphael Sartori pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, agradeço a enorme compreensão, generosidade e alegria com que me brindou constantemente, contribuindo para chegar ao fim deste percurso.

- Aos meus pais Lucimara e Gilberto, que estão felizes por este momento e sempre me apoiaram nessa caminhada.

- À minha irmã Izabela que esteve sempre presente.

-Aos meus sogros Luciana e Sérgio por estarem presente nesse momento me apoiando.

-Aos meus cunhados Duda, Ana e Gabi que estiveram comigo nessa caminhada.

-A família Sartori Soares (Luziane, Clayton, Nina e Ciro).

- A minha avó "postiça" Cecília Sartori.

-Aos meus tios, Taina, Vando, Daiane e Edson.

-Aos meus primos, Pedro, Rafaely e Gabrielle.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS .....	2
RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	5
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS .....	10
2.1 Objetivo geral.....	10
2.2 Objetivos específicos .....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	11
3.1 A olivicultura no Brasil .....	11
3.2 <i>Xylella fastidiosa</i> : a bactéria, transmissão e hospedeiros.....	12
3.3 Métodos de controle de <i>X. fastidiosa</i> .....	16
3.4 Métodos de diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> .....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Transmissão vertical de <i>X. fastidiosa</i> .....	19
4.2 Amostragem para a distribuição de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de oliveira, com sintomas de dessecamento foliar (DFO) .....	19
4.3 Validação do diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> por meio de <i>imuno-Tissue-Print</i> 20	
4.4 Extração de DNA total, PCR e qPCR.....	22
4.5 Análise dos dados .....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1 Transmissão vertical de <i>X. fastidiosa</i> .....	25
5.2 Determinação da distribuição da bactéria em plantas de oliveira com sintomas de dessecamento foliar - DFO.....	27
5.3 Metodologia de diagnóstico de <i>Xylella fastidiosa</i> e por meio da metodologia “ <i>Tissue-Print</i> ” .....	35
6 CONCLUSÕES.....	40
7 LITERATURA CITADA.....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de CT (Cycle threshold) obtidos de mudas de oliveira enraizadas por meio de estaquia de ramos coletados em plantas assintomáticas para DFO, porém infectadas por <i>X. fastidiosa</i> .	27
Tabela 2. Distribuição de <i>X. fastidiosa</i> em diferentes partes de plantas de oliveira da cultivar "Grapollo" com baixa severidade de sintomas de dessecamento foliar. Números referem-se a valores de CT (Cycle threshold) obtidos pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).	29
Tabela 3. Distribuição de <i>X. fastidiosa</i> em diferentes partes da planta de oliveira da cultivar "Arbosana" com alta severidade de sintomas de dessecamento foliar. Números referem-se aos valores de CT (Cycle threshold) obtidos pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).	31
Tabela 4. Teste de Cohen's-Kappa para comparação da repetibilidade de resultados entre dois analistas das leituras das membranas de <i>Tissue-Print</i> (TP) obtidas de amostras de oliveira com potencial infecção por <i>X. fastidiosa</i> .	35
Tabela 5. Análise estatísticas para comparações entre os diferentes métodos de diagnóstico de <i>X. fastidiosa</i> em oliveiras.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas de <i>X. fastidiosa</i> causando síndrome do declínio rápido em folhas de oliveira.	14
Figura 2. Ilustração dos pontos de amostragem em plantas de oliveira para determinação da distribuição sistêmica de <i>X. fastidiosa</i> nos diferentes estratos da planta. Números indicam a distância a partir do ponto Zero (0) onde folhas com sintomas de DFO foram identificadas. [+] indica distância acima (+30, +50, +100 e + 300 cm) e [-] abaixo (-30 e -50 cm) do ponto zero, incluindo o sistema radicular - raiz). Ramos 1, 2, e 3 são os ramos maiores (pernadas). Para as três plantas da cultivar "Grapollo" somente um ramo apresentava folhas com sintomas de DFO (destaque em vermelho). Para a planta da cultivar "Arbosana" os três ramos apresentavam folhas com sintomas de DFO.	19
Figura 3. Ilustração para o procedimento de <i>Tissue-Print</i> . 'Carimbo' do tecido vegetal em membrana de nitrocelulose.	21
Figura 4. Sintomas, em destaque, de dessecamento foliar de oliveira (DFO) em muda após 32 meses de enraizamento de estacas retirada de planta assintomática, porém infectada com <i>X. fastidiosa</i> .	26
Figura 5. Ilustração da frequência de qPCR positivo para <i>X. fastidiosa</i> em diferentes frações da copa e sistema radicular de oliveiras. A. Somatória das reações positivas para <i>X. fastidiosa</i> (em vermelho) das amostras da cultivar "Grappolo" considerando as matrizes pecíolo e ramo (plantas 1, 2 e 3). B. Reações positivas para <i>X. fastidiosa</i> (em vermelho) das amostras da cultivar "Arbosana" considerando as matrizes pecíolo e ramo.	32
Figura 6. <i>Tissue-print</i> (TP) em membrana de nitrocelulose de ramos de oliveira com sintomas relacionados a presença de <i>X. fastidiosa</i> . A. Membrana com os 'prints' dos ramos. Os números fazem referência as amostras, N – 'print' de oliveira negativa para <i>X. fastidiosa</i> , P – controle positivo ( <i>X. fastidiosa</i> + tecido negativo). B. Foto do ramo com sintomas a partir do qual as amostras foram coletadas. Reação de coloração purpura nas amostras (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e no controle positivo (P) destaca-se da coloração mais clara (ausência de reação) no controle N.	34

## ***Xylella fastidiosa* EM OLIVEIRAS (*Olea europaea*): DISTRIBUIÇÃO NA PLANTA, TRANSMISSÃO VERTICAL E DIAGNOSE**

**Autor: BEATRIZ DE NADAI GASPARINI SANTOS**

**Orientador: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO**

### **RESUMO**

Face a recente ocorrência da doença conhecida como Dessecamento Foliar das Oliveiras (DFO), causada por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauc*a (*Xf-p*), em oliveiras (*Olea europaea*) existe uma carência de informações científicas quanto a biologia deste patógeno em oliveira e que possam auxiliar no entendimento desse patossistema em suporte as discussões sobre estratégias de manejo. A partir dessas inúmeras lacunas sobre o conhecimento de ordem prática desse patossistema, este trabalho tem como objetivos; 1. avaliar a ocorrência de transmissão vertical da bactéria; 2. determinar a distribuição da *Xf-p* em plantas com diferentes graus de severidade; e 3. estabelecer um método de diagnóstico de baixo custo e com a possibilidade de execução "in farm". Ramos de oliveira retirados de uma planta assintomática, porém infectada com *Xf-p*, foram propagados em casa-de-vegetação e as mudas oriundas analisadas para presença do patógeno através de PCR quantitativo em tempo real (q-PCR). A taxa de transmissão vertical estimada aos 32 meses foi de 57,74% (41 de 71 mudas) e somente em uma planta das 28 positivas (0,014%) foi observado sintomas da DFO. Para se atingir o segundo objetivo, amostras de 3 plantas da cultivar "Grapollo" apresentando baixa severidade da DFO (apenas um ramo com sintomas) e uma com sintomas generalizados por toda a copa (alta severidade) foram coletadas em diferentes posições da copa e do sistema radicular e analisadas para a presença de *Xf-p* através de qPCR. Mesmo em condições de baixa severidade da DFO diagnósticos positivos para *Xf-p* foram obtidos entre 30 a 57% das amostras coletadas em ramos assintomáticos, enquanto que nos ramos sintomáticos 77% das amostras foram positivas. Por outro lado, em plantas com alta incidência da DFO 82 a 100% das amostras foram positivas. Finalmente, o método de diagnóstico baseado em impressões de estratificação de ramos em membranas de nitrocelulose e identificação de *Xf-p* por meio de serologia (*Tissue-Print*. TP - objetivo 3) mostrou-se promissor, porém com necessidades de

aprimoramento uma vez que a concordância dos resultados entre as técnicas de TP e qPCR foi apenas levemente parcial ( $K = 0,01$  a  $0,20$ ) segundo o índice de Cohen-Kappa.

**Palavras-chave:** Doença bacteriana, diagnóstico, síndrome do declínio rápido, *Olea europaea*.

## ***Xylella fastidiosa* IN OLIVE TREES (*Olea europaea*): PLANT DISTRIBUTION, VERTICAL TRANSMISSION AND DIAGNOSIS**

**Author: BEATRIZ DE NADAI GASPARINI SANTOS**

**Adviser: Prof. Dr. HELVÉCIO DELLA COLETTA FILHO**

### **ABSTRACT**

As consequence of the recent occurrence of the disease known as Olive Quick Decline Syndrome (OQDS), caused by *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (*Xf-p*), in olive trees (*Olea europaea*) there is a lack of scientific information about the biology of this pathogen in olive trees that can help to understand this pathogen and support discussions about management strategies. From these numerous gaps in the practical knowledge of this pathogen, this work has as objectives: 1. to evaluate the occurrence of vertical transmission of the bacterium; 2. to determine the distribution of *Xf-p* in plants with different degrees of severity; and 3. to establish a low-cost diagnostic method with the possibility of execution "in farm". Olive branches taken from an asymptomatic plant, but infected with *Xf-p*, were propagated in a greenhouse and the resulting seedlings were analyzed for the presence of the pathogen by real-time quantitative PCR (q-PCR). The estimated vertical transmission rate at 32 months was 57.74% (41 of 71 nursery plants) and only one plant of the 28 *Xf-p*-infected (0.014%) showed symptoms of OQDS. To achieve the second objective, samples from 3 plants of the cultivar 'Grapollo' showing low OQDS severity (only one branch with symptoms) and one with symptoms generalized throughout the canopy (high severity) were collected at different positions in the canopy and root system and analyzed for the presence of *Xf-p* by qPCR. Even under conditions of low OQDS severity positive diagnoses for *Xf-p* were obtained between 30% and 57% of the samples collected on asymptomatic branches, while on symptomatic branches 77% of the samples were positive. On the other hand, in plants with high incidence of OQDS 82 to 100% of samples were positive. Finally, the diagnostic method based on printing of branch extracts on nitrocellulose membranes and identification of *Xf-p* by serology (*Tissue-Print*: TP - objective 3) showed promise, but with needs for improvement since the agreement of the results between TP and qPCR techniques was only slightly partial ( $K = 0.01$  to  $0.20$ ) according to the Cohen-Kappa index.

**Key-words:** Bacterial disease, diagnosis, quick decline syndrome, *Olea europaea*.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.) é recente no Brasil com destaque para as regiões do sul do Rio Grande do Sul e a região serrana do Sudeste, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina (VILLA & OLIVEIRA, 2012). Muitas foram as tentativas de introdução ao cultivo de oliveiras no Brasil, porém nem sempre com muito sucesso. Os fatores respectivos a estes insucessos podem ser atribuídos aos materiais genéticos ainda não adaptados às condições climáticas locais; ao local de implantação da cultura inapropriado às suas necessidades; ao pacote tecnológico não adequado às condições de clima subtropical; às dificuldades de manejo de cultura exótica em nossas condições, como adubação, poda, e controle de pragas e doenças (BERTONCINI *et al.*, 2010). No entanto, independente das dificuldades citadas, bons resultados vêm sendo obtidos quando os plantios são conduzidos em microclimas favoráveis à cultura, como é o caso do estado do Rio Grande do Sul, e em algumas regiões da serra da Mantiqueira, região vulcânica dos estados de Minas Gerais e São Paulo, com altitudes superiores a 1000 metros, além de áreas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Santa Catarina e Paraná (BELARMINO *et al.*, 2020).

Em sendo a olivicultura na região sudeste uma cultura de ambiente específico (altas altitudes), problemas de ordem fisiológica têm sido relatados pelos olivicultores, principalmente relacionados à alternância de produção e, muitas vezes, à ausência de frutificação. Somado a estes, existem ainda fatores de ordem biótica, como as doenças e pragas. Dentre estas, pode-se citar as doenças fúngicas, do Gênero *Colletotrichum*, a antracnose da oliva afeta em especial folhas, ramos, brotos, frutos e o vigor das plantas. A sua severidade e incidência variam principalmente em função da suscetibilidade do cultivar, das condições climáticas e da agressividade do patógeno, podendo causar perdas de até 50 % (DOMINGUES *et al.*, 2016). As quais estão entre as mais importantes, que podem causar desfolhas, queda de vigor, morte de plantas, lesões em frutos, apodrecimento e a queda de frutos (CASAS *et al.*, 2012; DOMINGUES *et al.*, 2016; TÖFOLI *et al.*, 2013; TRAPERO *et al.*, 2008; COUTINHO *et al.*, 2009, MOHEDANO & BERROCAL, 2011). Tais sintomas afetam diretamente o rendimento, a qualidade e o resultado econômico da atividade, além de haver uma confusão de sintomas com outras doenças.

As doenças bacterianas também se somam a estes problemas fitossanitários, pois geram perdas significativas pela destruição parcial ou total da planta ou do órgão comercializável, que tem seu valor econômico reduzido. Dentre estas, a doença denominada como dessecamento foliar das oliveiras (DFO), causada pela bactéria *X. fastidiosa*, tem impactado negativamente a produção de oliveiras no sul da Itália, sendo reportada também na Espanha e Portugal. No Brasil e Argentina foram reportados problemas com *X. fastidiosa* em oliveiras causando dessecamento foliar decorrente da síndrome do declínio rápido (HAELTERMAN *et al.*, 2015; COLETTA-FILHO *et al.*, 2016).

A bactéria *X. fastidiosa* é classificada em três principais subespécies: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* e *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (SCHAAD *et al.*, 2004). Em oliveiras nos países da América do Sul, foi reportada a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (HAELTERMAN *et al.*, 2015; COLETTA-FILHO *et al.*, 2016), portanto pertencente à mesma subespécie encontrada na Itália que causa a síndrome do declínio rápido (ELBEAINO *et al.*, 2014), enquanto na América do Norte foi reportada *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* (KRUGNER *et al.*, 2014).

De um modo geral as infecções por *X. fastidiosa* têm por característica um longo período de incubação (meses a anos) e, muitas vezes, sintomas que podem ser confundidos como fatores abióticos ou derivados de infecção de outros patógenos, o que demanda uma identificação do patógeno na amostra. Nesse contexto, ao longo dos anos, foram desenvolvidos testes sorológicos, os quais incluem ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (SHERALD & LEI, 1991), ensaio imunobinding (DIBA), Western blotting (LEE *et al.*, 1992; CHANG *et al.*, 1993), de imunofluorescência e *imunoprint*, isto é, “carimbo” da seiva do tecido vegetal em membrana (DJELOUAH *et al.*, 2014). Do mesmo modo, foram inúmeros os trabalhos publicados que utilizavam a reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas derivadas para o diagnóstico desta bactéria (EPPO Bulletin, 2016). Uma variedade de iniciadores gerais ou subespécie específicos para *X. fastidiosa* estão presentes na literatura tanto para PCR tradicional, PCR quantitativa em tempo real ou para Lamp-PCR (JANSE & OBRADOVIC, 2010; EPPO BULLETIN, 2016).

Também, um sistema inovativo baseado em microchips, contendo um método de transdução eletroquímico, foi apresentado para fins de diagnose, em que o reconhecimento da bactéria por anticorpos específicos ligados a eletrodos em

microcanais e à leitura de valores de impedância são obtidos (CHIRIACÒ *et al.*, 2018). Dentre estes diferentes métodos, aquele que mais teria potencial para atender a uma demanda de uso "*in farm*", de forma a demandar poucos recursos financeiros, é o baseado em *imunoprint*, face à facilidade na realização e ausência de equipamentos sofisticados na execução (DJELOUAH *et al.*, 2014).

Por fim, o manejo de *X. fastidiosa* em culturas perenes é ainda um grande desafio e baseia-se nos princípios de exclusão do patógeno do material de propagação, eliminação de fontes de inóculo e diminuição da população de vetores, objetivando, nessas duas últimas ações, a redução da transmissão da bactéria planta-a-planta (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 2006). A exclusão do patógeno do material de propagação e o controle do vetor foram fundamentais para a redução da CVC (Clorose Variegada dos Citros) no parque citrícola de São Paulo (COLETTA-FILHO *et al.*, 2020; BASSANEZI *et al.*, 2021). Também, a eliminação de ramos de plantas de laranja doce com CVC teve sua contribuição para o manejo da doença na década de 1990, período de maior pressão da CVC (GARCIA *et al.*, 1995; COLETTA-FILHO *et al.*, 2000).

Porém, conhecimentos acerca do manejo de *X. fastidiosa* em oliveiras ainda é muito incipiente. A poda de ramos sintomáticos tal como adotado para a CVC poderia se fazer parte das estratégias de manejo desta doença, ainda mais que a realização de podas são atividades hortícolas, tanto na formação, como poda de produção e reforma de olivais. No entanto, para isso primeiramente é necessário conhecer a distribuição espacial da bactéria ao longo da planta. Ainda, como constatado para a CVC a exclusão de *X. fastidiosa* do material de propagação foi uma das ações de maior impacto no manejo deste patógeno. No caso de oliveiras mesmo que evidências indiretas tenham sido constatadas na disseminação deste patógeno por mudas (SAFADY *et al.*, 2019), nenhuma informação foi publicada demonstrando a transmissão vertical desta bactéria. Finalizando, a constatação da ocorrência de *X. fastidiosa* nas unidades de produção de oliveira apenas com observações de sintomas de dessecamento de folhas podem levar a equívocos uma vez que outros estresses bióticos e mesmo abióticos podem levar a sintomas semelhantes. Um método de diagnóstico de *X. fastidiosa* de fácil uso e acesso pelos produtores poderia facilitar a assertividade na identificação de sintomas de dessecamento foliar associado a infecção pela bactéria.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Embora a bactéria *X. fastidiosa* tenha sido bastante estudada, especialmente, em citros e em videira, face ao recente relato em oliveiras, as informações ainda são escassas neste patossistema. Nesse sentido, este projeto tem como principal objetivo produzir informações de caráter científico, que possam ser usadas no manejo de *X. fastidiosa* na olivicultura.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a distribuição de *X. fastidiosa* em plantas de oliveira em função da severidade de sintomas como parâmetro de recomendação de podas de ramos visando à eliminação da bactéria da planta;

2. Estimar o potencial de transmissão vertical de *X. fastidiosa* pela utilização de material de propagação assintomáticos, porém retirados de plantas infectadas. Tais resultados trarão subsídios para fortalecer a demanda por produção de mudas certificadas para oliveiras;

3. Validar um sistema de diagnóstico de *X. fastidiosa*, através de *imunoprint* de tecido em membranas de celulose (*Tissue-Print*), de forma a disponibilizar um método simples de diagnose da bactéria, que possa ser levado às unidades de produção.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A olivicultura no mundo e no Brasil

A oliveira (*Olea europaea* L.) não tem sua origem propriamente definida, sendo atribuída à Síria ou à Líbia, onde já era cultivada havia mais de 10.000 anos a.C. A princípio, a oliveira pode ter chegado primeiro à Grécia, em 700 a.C; a Marselha, em 600 a.C., e, finalmente, a Roma, em 500 a.C. (WREGGE *et al.*, 2009; SANTOS, 2002). Houve uma enorme expansão da cultura ao longo dos anos, além das áreas tradicionalmente destinadas ao cultivo da oliveira, caracterizadas pelo clima mediterrâneo – verões seco e quente, invernos úmidos e com temperaturas amenas, em busca de novas oportunidades de negócio ou mesmo visando à crescente demanda mundial de azeites. A Espanha, por exemplo, é a maior produtora de oliveiras, contudo não apresenta capacidade de ampliar os plantios já existentes (WREGGE *et al.*, 2015). Por essa razão, nas últimas décadas, o cultivo da oliveira tem sido ampliado a várias regiões do mundo, principalmente em locais onde o cultivo não é tradicional (MARTINS *et al.*, 2012; TANASIJEVIC *et al.*, 2014; WREGGE *et al.*, 2015), as regiões, em que, muitas vezes, encontram-se condições climáticas e de solo muito dispares dos presentes no centro de origem da cultura, caracterizado por ter um clima com baixo volume de precipitação e solos alcalinos.

À vista disso, a constante busca por uma alimentação saudável e balanceada, através de dietas que tenham a utilização de azeite de oliva, fez com que o consumo e a produção tivessem um aumento significativo nos últimos anos, e em caráter mundial. De acordo com COI (2022), o Brasil é o segundo maior importador de azeites, consumindo mais de 62 mil toneladas de azeite estrangeiro, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. O maior exportador foi a Tunísia, com 160 mil toneladas, já o maior importador também é o EUA, com 346,5 mil toneladas, e o maior produtor, o Marrocos, com 200 mil toneladas de produção. Ainda que o consumo de azeite no Brasil seja incipiente, face à quantidade importada a produção local de azeite este ano foi de 448 mil litros de azeite, um acréscimo expressivo, de 122%, em relação ao ano passado e a produção local é de 350 mil litros em São Paulo e no Brasil a produtividade chegou a 300.000 mil litros de azeite nessa safra de 2022. (GZH, 2022).

A olivicultura se estabeleceu no Brasil no início do século XIX, e se estabeleceu nos Estados do Rio Grande do Sul e na região da Serra da Mantiqueira, devido às características climáticas mais favoráveis para a diferenciação da gema floral e,

consequentemente, para a produção dos frutos (VIEIRA NETO *et al.*, 2008). Alguns resultados obtidos de estudos indicaram que as regiões da Serra da Mantiqueira, regiões do Rio Grande do Sul e as regiões de serras vulcânicas, obtinham as melhores características, aptidões climáticas e edáficas satisfatórias para o desenvolvimento de lavouras em larga escala (MELLO; PINHEIRO, 2012). Atualmente, existem áreas de olivais plantadas em alguns Estados, como o Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Paraná e Santa Catarina (PLURAL CURITIBA 2022).

A Serra da Mantiqueira, entre Minas Gerais e São Paulo, estabeleceu-se como uma região de destaque na produção de azeite extravirgem no Brasil. Atualmente, cultiva quatro mil hectares de oliveiras, com 23 agroindústrias incubadas e mais de 60 marcas de azeite gourmet inseridas no mercado. Portanto, caracteriza-se com uma agroindústria alicerçada em produtores com pequenas áreas de cultivo, porém com importância na geração local de empregos face a forte demanda por mão de obra na condução da cultura e colheita. As principais cultivares de azeitonas colhidas na região são a Arbosana (origem espanhola); a Grappolo 541 (seleção da EPAMIG -MG e de origem italiana) e a Koroneiki (de origem grega) (EPAMIG, 2021).

No Rio Grande do Sul, concentra-se cerca de 10 mil hectares (IBRAOLIVA, 2022), São Paulo com 700 hectares e a produção chega a 50 mil litros de azeite (AGRICULTURA E ABASTECIMENTO SÃO PAULO, 2022), Minas Gerais 3000 hectares (EPAMIG, 2022) e o Brasil por sua totalidade, concentra com 15 mil hectares de cultivo de oliveira. Outros estados produtores vêm movimentando o cultivo da olivicultura, mesmo os que ainda têm com pouca tradição, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Paraná. No Espírito Santo, a primeira extração de azeite de oliva, realizada no dia 9 de fevereiro, tem significado especial para os cerca de 150 produtores de oliveiras do estado (PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2022).

### **3.2 *Xylella fastidiosa*: bactéria, transmissão e hospedeiros**

A bactéria Gram-negativa *X. fastidiosa* tem sido tentativamente classificada em diferentes subespécies. Estudos utilizando-se hibridização DNA: DNA e sequenciamento de DNA de fragmentos de genes conservados sugeriram a divisão de *X. fastidiosa* em quatro subespécies (SCHAAD *et al.*, 2004 e SCALLY *et al.*, 2005,

YUAN *et al.*, 2010): (i) *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, causa a doença de Pierce na uva; (ii) p *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*, que provoca queimaduras nas folhas de oleandro; (iii) *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, associado à doença de queimadura foliar em uma variedade de espécies arbóreas e frutíferas, incluindo amendoeiras, pêsegos, ameixeiras, carvalhos e outras; e (iv) *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, que causa a clorose variegada dos citros (CVC), a requeima de folhas em cafeeiro, além do dessecamento de folhas da oliveira, doença também conhecida como dessecamento foliar das oliveiras - DFO ("olive quick decline syndrome" - OQDS), do inglês.

A *X. fastidiosa* subsp. *pauca* também é causadora da clorose variegada dos citros (CVC), uma doença de rápida disseminação e que apresenta sintomas, principalmente, em folhas e frutos. As folhas, inicialmente, apresentam manchas amareladas, que evoluem para áreas cloróticas na face adaxial e lesões de coloração castanho-claro, na face abaxial (CARVALHO *et al.*, 2022). Os frutos, por sua vez, apresentam-se endurecidos, com tamanho drasticamente reduzido, amarelecimento precoce, além de uma forte alteração na acidez, o que torna inviável seu consumo *in natura* ou para processamento pela indústria (MACHADO *et al.*, 1994; LARANJEIRA & POMPEU JUNIOR 2002). Porém essa mesma bactéria vem causando a Síndrome do Declínio Rápido das Oliveiras podendo causar sintomas como: manchas foliares e nos frutos, morte e dessecação de ramos e de plantas podem ser visualizados causando a síndrome do dessecamento foliar das oliveiras (CANALE, 2017).



1. Inicia-se com folhas com aspecto de murcha, ficando um verde mais claro, sempre são restritas a um ramo.
2. Neste ramo são encontradas folhas murchas cujos sintomas evoluem para o dessecamento foliar em toda a folha.
3. Porém, este dessecamento, na grande maioria das vezes, evolui do ápice para a base das folhas.
4. As folhas ficam então secas e aderidas aos ramos por um longo período. Quando de sacode os ramos as folhas não se desprendem.

**Figura 1.** Sintomas de *X. fastidiosa* causando síndrome do declínio rápido em folhas de oliveira.

Fonte: Helvecio D. Coletta Filho

A transmissão de *X. fastidiosa* pode ocorrer por vários meios, tais como a enxertia de material vegetal (borbulhas, pecíolos e raízes) infectadas com a bactéria (DE LIMA *et al.*, 1996; SEMPIONATO; STUCHI; DONADIO, 1997), garfagem lateral de ramos (SALIBE, 2001), inoculação de extrato contendo a bactéria cultivada (MÜLLER, 2013), bem como através de insetos vetores (ALMEIDA *et al.*, 2001). Em pomares já implantados a transmissão ocorre pela ação de insetos vetores, as cigarrinhas das famílias *Cercopidae* e *Cicadelidae* (MÜLLER, 2013). O principal aspecto relacionado à transmissão é a eficiência apresentada pelo vetor em adquirir e transmitir a bactéria que varia entre as espécies de vetor, e de uma mesma espécie em diferentes culturas (REDAK *et al.*, 2004). De forma geral, espécies com alta eficiência são consideradas chaves para a epidemiologia da doença. De acordo com Almeida *et al.*, (2001), uma alta concentração da bactéria nos vasos dos hospedeiros pode contribuir para que ocorra a transmissão, pois é provável que um maior número de células infectadas seja adquirido, o que pode aumentar as chances de sobrevivência e colonização no inseto.

Os insetos vetores de *X. fastidiosa* são cigarrinhas (Hemiptera: *Auchenorrhyncha*) da família *Cicadellidae* (subfamília *Cicadellinae*, tribos Proconiini e *Cicadellini*) (SEVERIN 1949,1950) e da superfamília *Cercopoidea*, representada por cinco espécies da família *Aphrophoridae* e duas da família *Clastopteridae* (EFSA PHL PANEL 2015). Na Itália, a espécie *Philaenus spumarius* (*Aphrophoridae*) já foi identificada como vetor (SAPONARI *et al.*, 2014, CORNARA *et al.*, 2016, CORNARA *et al.*, 2017).

Essa bactéria coloniza exclusivamente o xilema das plantas hospedeiras e o canal alimentar do vetor, ambientes de grande turbulência, exigindo capacidade de agregação da bactéria a estas superfícies (RAJU *et al.*, 1982). Ao longo do tempo de infecção leva à formação de biofilme bacteriano (DE SOUZA *et al.*, 2004), o que nas plantas pode gerar obstrução do fluxo dos vasos colonizados e, por consequência, diminuir a disponibilidade de água e nutrientes para a parte aérea (TYSON *et al.*, 1985; NEWMANN *et al.*, 2003). Também, como resultado desta interação, tem-se alteração do padrão hormonal da planta contribuindo para sua debilidade desta (HICKEL; ANDRADE; DUCROQUET, 2001). Esse processo, desde a colonização inicial do xilema até o aparecimento dos primeiros sintomas (período de incubação), é longo

para o patossistema *X. fastidiosa* podendo variar de meses a anos (ALMEIDA *et al.*, 2001; MENG *et al.*, 2005), sendo também alterado em função das condições climáticas (NAVARRO ORTÍN, 2017).

Recentemente, na província de Lecce, no sul da Itália, produtores observaram que plantas centenárias de oliveiras estavam com sintomas de dessecação de folhas e ramos, que se iniciavam como uma clorose na extremidade da folha (EFSA, 2015). Com o avançar dos sintomas, culminava na morte da planta. Pesquisas não demoram a associar estes sintomas à presença de *X. fastidiosa* nas plantas sintomáticas (SAPONARI *et al.*, 2013), o que possibilitou, posteriormente, concluir o postulado de Kock (SAPONARI *et al.*, 2017), o qual denomina essa doença como dessecação foliar da oliveira (DFO). Face à característica quarentenária da *X. fastidiosa* na Europa, aquele relato foi tratado com grande preocupação por parte da pesquisa e agentes de defesa. Como ação, a Organização Europeia e Mediterrânea de Proteção de Planta proibiu, de imediato, o transporte de material de propagação de qualquer espécie de planta suscetível à *X. fastidiosa* (MARTINELLI *et al.*, 2016). Atualmente, *X. fastidiosa* tem causado problemas em oliveiras e foi reportada na Itália, Brasil e Argentina (SAPONARI, *et al.*, 2017). No entanto, recentemente, em um levantamento do banco de dados da EFSA, foi reportada *X. fastidiosa* na Espanha, França e Portugal (EFSA, 2021).

No Brasil, no final de 2014, sintomas idênticos aos relatados para oliveiras infectadas com *X. fastidiosa* no sul da Itália foram observados em plantas na Serra da Mantiqueira, região localizada nos estados de Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP) (COLETTA-FILHO *et al.*, 2016). De acordo com Safady *et al.*, (2019), 83% dos pomares de oliveiras amostrados no sudeste do Brasil estavam infectados pela bactéria, porém com grau variado de intensidade entre os pomares. Os autores discutiram que um pressuposto para esta ampla dispersão de *X. fastidiosa*, em longas distâncias, poderia ser a ação antropogênica, usando material vegetativo infectado. Portanto, frente à ampla disseminação de plantas de oliveiras nas regiões produtoras do Sudeste do Brasil, durante a implantação ou ampliação de unidades de produção deve-se atentar à utilização de mudas de oliveiras produzidas num sistema de produção em que o risco de *X. fastidiosa* deva ser considerado.

### 3.3 Métodos de controle de *X. fastidiosa*

Quando *X. fastidiosa* é introduzida no sistema de produção agrícola o manejo da cultura torna-se bastante complexo, sendo a erradicação do patógeno improvável devido à sua sobrevivência em hospedeiros alternativos e a presença de insetos vetores polífagos na transmissão da bactéria planta-a-planta (EFSA, 2015; JANSE & OBRA-DOVIC, 2010). Os métodos de controle preconizados para doenças causadas por patógenos transmitidos por vetores e por material de propagação são baseados nos princípios de exclusão, proteção e erradicação (MARTINELLI *et al.*, 2016). O manejo da CVC no Brasil é um exemplo clássico o qual foi e tem sido baseado principalmente no controle químico dos vetores e na redução do inoculo, através do plantio de mudas saudáveis e eliminação de plantas ou ramos infectados (LOPES, 1999, GRAVENA *et al.*, 1998). Recomenda-se que o material de propagação seja produzido em viveiros telados para a exclusão dos insetos vetores, seguindo-se as diretrizes do sistema de produção certificada de mudas cítricas, adotado no estado de São Paulo (CARVALHO, 2003).

Além do uso de material de propagação livre da presença de *X. fastidiosa*, a poda de ramos de plantas cítricas infectados com *X. fastidiosa* foi uma das ferramentas usadas no manejo da CVC (COLETTA-FILHO & DE SOUZA, 2014). Isso pois, o hábito de crescimento sistêmico de *X. fastidiosa* e limitação ao xilema nos vasos dificultam o desenvolvimento de controle químico ou biológico da bactéria. Por outro lado, o aparente crescimento lento da bactéria na planta cítrica levou-se a uma estratégia de controle com base na eliminação dos ramos infectados, de modo a reduzir a infecção sistêmica (COLETTA-FILHO *et al.*, 2000). Tais informações são desconhecidas para o caso de oliveiras, o que pode se tornar uma ferramenta no manejo.

A ocorrência de oliveiras infectadas com *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, no Brasil, e a ausência de um programa de produção certificada de mudas de oliveiras, sugerem atenção do sistema produtivo, para se evitar a disseminação não intencional do patógeno a outras partes do País, assim como no uso não intencional de material de propagação contaminado pela bactéria. A forma mais viável de se evitar a introdução do patógeno em áreas onde ele ainda não está presente, consiste no estabelecimento de olivais com mudas saudáveis, livres do patógeno, produzidas por viveiristas confiáveis

em viveiros com telados, a partir de material propagativo sadio (CANALE, 2017). Segundo a autora, seria apropriado, no futuro, a instalação de um programa de produção de mudas de oliveiras certificadas e protegidas, a partir de matrizes indexadas, com a garantia de que as plantas jovens estarão livres do patógeno, à semelhança do que já é feito no sistema de produção de mudas de citros.

### 3.4 Métodos de diagnóstico de *X. fastidiosa*

Uma gama de ferramentas de diagnósticos está disponível para detecção de *X. fastidiosa*, que varia de métodos sorológicos – por exemplo, ensaio de imunoabsorção enzimática, imuno ensaio de blot direto de tecido e microscopia de imunofluorescência –, até métodos moleculares – como ensaios baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), PCR em tempo real (qPCR) e amplificação isotérmica mediada por loop (LEE *et al.*, 1992; CHANG *et al.*, 1993).

O isolamento da bactéria de material vegetal infectado é muito trabalhoso e demanda alguns dias para obtenção de resultados devido à natureza de crescimento lento da bactéria (EPPO 2016). Por outro lado, os métodos sorológicos normalmente carecem de especificidade e sensibilidade (VETTRAINO *et al.*, 2010). Portanto, a extração de DNA, combinada com a detecção molecular, permite um diagnóstico mais rápido e preciso (HUGHES *et al.*, 2006). No entanto, estes necessitam de equipamentos e reagentes importados, tornando o teste mais oneroso.

Em que valha a maior sensibilidade dos testes baseados na PCR, técnicas sorológicas são igualmente importantes, uma vez que inibidores de plantas, como polifenóis, não interferem na eficiência da técnica, os quais podem ocorrer na PCR, além de terem um custo de análise muito menor (BOSCIA, D *et al.*, 1998; DE BOER *et al.*, 2012). Segundo De Boer *et al.*, (2012), vários métodos sorológicos, todos baseados em anticorpos policlonais convencionais (PAbs), foram desenvolvidos para a detecção de *X. fastidiosa*, incluindo ELISA, imunofluorescência por aprisionamento de membrana, *dot immunobinding assay*, *western blotting* e imunofluorescência indireta. Além destes, o método baseado em impressão de extrato de plantas em membrana de nitrocelulose (*Tissue-Print*) é outra ferramenta no diagnóstico polifásico de *X. fastidiosa*, a qual pode ser útil, principalmente, no *screening* inicial de plantas no

campo quanto aos sintomas associados à *X. fastidiosa* e, em particular, em locais de cultivo distante de laboratório de análises.

Para vírus, protocolos de fixação deste patógeno em membranas de celulose, por meio de 'carimbos' de tecido vegetal, e posterior reconhecimento destes, por intermédio de anticorpos primários, que a estes se ligam anticorpos recombinantes secundários que reconhecem a enzima fosfatase alcalina, são conhecidos (CAMBRA *et al.*, 2000). Segundo os autores, estas membranas podem ser armazenadas por meses, até serem iniciadas ao protocolo de imuno reconhecimento do vírus, sendo, portanto, ideal para o diagnóstico em amostras coletadas em regiões distantes, que após fixadas em membranas, estas poderiam ser enviadas posteriormente para análises.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

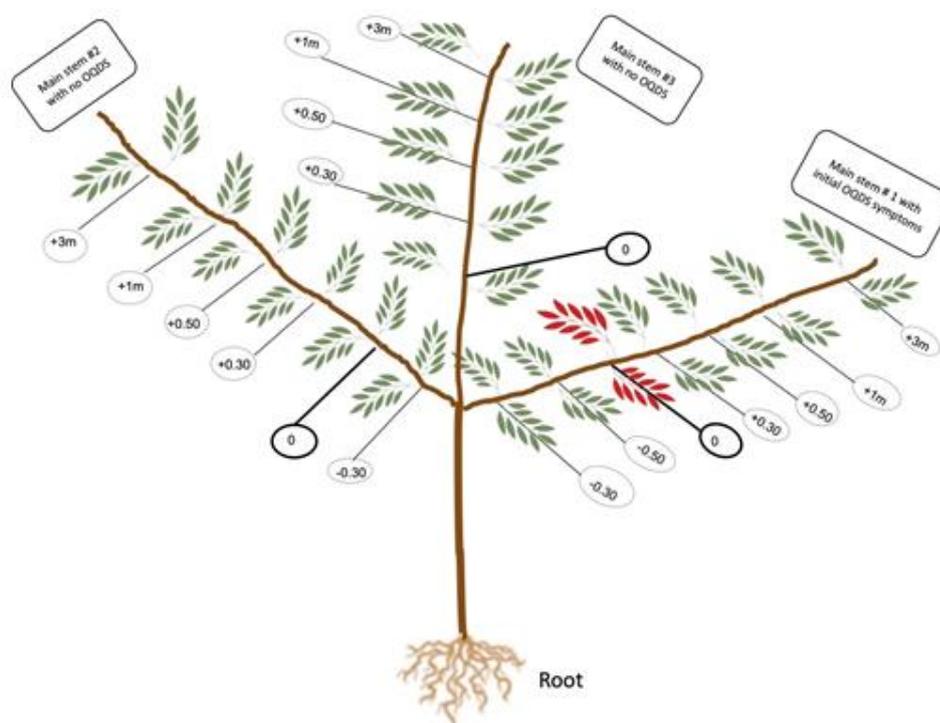
### 4.1 Transmissão vertical de *Xylella fastidiosa*

Com a finalidade de quantificar a frequência da transmissão vertical de *X. fastidiosa* para mudas de oliveira foram produzidas por meio de enraizamento de ramos retirados de uma planta de oliveira, da cultivar "Grapollo", diagnosticada para a presença de *X. fastidiosa*, porém assintomática. Estacas de 10 cm foram retiradas da planta mãe em maio de 2018, selecionadas e tratadas em solução de ácido indol butírico (0,6 gr/200 mL de água) por 10 min, seguindo-se do estabelecimento em canteiro úmido sob telado protegido de insetos vetores. As estacas enraizadas, num total de 71, foram transferidas para sacos plásticos contendo terra e matéria orgânica (3:1) e mantidas em casa-de-vegetação, mantidas em telado até a finalização do experimento. Aos 32 meses após o enraizamento ao redor de 10 folhas de cada planta foram amostradas e armazenadas em freezer a -80°C para posterior extração de DNA total e diagnóstico de *X. fastidiosa* por qPCR. O processo de produção das mudas envolvendo coleta dos ramos, enraizamento em câmara úmida e transplântio das plântulas foi realizado com o apoio de técnicos da estação experimental da EPAMIG, em Maria da Fé, MG.

### 4.2 Amostragem para a distribuição de *X. fastidiosa* em plantas de oliveira, com sintomas de dessecamento foliar (DFO)

Três plantas de oliveira da cultivar "Grapollo", com incidência de dessecamento foliar presente em apenas um ramo, foram selecionadas em um pomar localizado em São Bento do Sapucaí, SP, (22° 38' 43.714" S e 45° 41' 06.641" W), a 1560m de altitude. A título de comparação, outra planta de oliveira, retirada do mesmo local, porém da cultivar "Arbosana" e com alta severidade da doença (dessecamento foliar generalizado na planta) foi selecionada para análise. Ambas as cultivares tinham seis anos de idade e foram cultivadas no mesmo talhão e receberam os mesmos tratamentos culturais. Destas plantas, foram amostrados tanto os segmentos de ramos laterais presente na região amostral do ramo principal (pernadas) e pecíolos das folhas presentes nestes ramos laterais. Foram tomadas amostras de ambas as matrizes (ramos e pecíolos) nas posições acima (+30, +50, +100 e + 300 cm) do ramo secundário sintomático e abaixo (-30 e -50 cm), incluindo amostras do sistema

radicular (Figura 2). Pecíolo das folhas e ramos foram picotados, armazenados a -20°C para posterior extração de DNA seguindo-se do diagnóstico de *X. fastidiosa* por meio da PCR quantitativa em tempo real.



**Figura 2** - Ilustração dos pontos de amostragem em plantas de oliveira para determinação da distribuição sistêmica de *X. fastidiosa* nos diferentes estratos da planta. Números indicam a distância a partir do ponto Zero (0) onde folhas com sintomas de DFO foram identificadas. [+] indica distância acima (+30, +50, +100 e + 300 cm) e [-] abaixo (-30 e -50 cm) do ponto zero, incluindo o sistema radicular - raiz). Ramos 1, 2, e 3 são os ramos maiores (pernadas). Para as 3 plantas da cultivar "Grapollo" somente um ramo apresentava folhas com sintomas de DFO (destaque em vermelho). Para a planta da cultivar "Arbosana" os três ramos apresentavam folhas com sintomas de DFO.

#### 4.3 Validação do diagnóstico de *X. fastidiosa* por meio de *imuno-Tissue-Print*

Trabalhos prévios, realizados no Centro de Citricultura Sylvio Moreira, possibilitaram a purificação de um anticorpo policlonal através do uso de células totais de *X. fastidiosa* injetadas em coelhos. Tal anticorpo foi desenvolvido na forma de

prestação de serviços pelo laboratório Reach biotec<sup>1</sup>. A utilização deste anticorpo para reconhecimento de *X. fastidiosa* fixada em membranas de nitrocelulose e revelação desta através de substrato cromogênico BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) / NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride) que detecta a atividade da fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo secundário que por sua vez se liga ao primário (anti-*X. fastidiosa*), metodologia conhecida como imunoenensaio direto de carimbos de tecido vegetal em membrana (DTBIA - "direct tissue blot immuno assay") foram muito promissores no diagnóstico de *X. fastidiosa*. Para as reações positivas, presença da bactéria *X. fastidiosa* na amostra, é esperado uma reação de coloração púrpura nos spots (carimbos) das seivas de ramos estampados nas membranas de nitrocelulose. A coloração é o resultado da reação da fosfatase ligada ao anticorpo secundário como os substratos alcalina com os BCIP / NBT.

Três grupos de amostras foram avaliados de acordo com a origem: G1 - amostras da atividade de distribuição de *X. fastidiosa* em plantas de oliveira com graus de severidade sintomas de dessecamento foliar (n=74); G2 - amostras oriundas das atividades de transmissão vertical de *X. fastidiosa* (n=71); e G3 - amostras coletadas a campo de plantas com sintomas de dessecamento foliar (n=35). Estas amostras (G1, G2 e G3) num total de 180 foram estampados ('carimbados') com o auxílio de um alicate em membrana de nitrocelulose, as quais foram postas para reagir contra o anticorpo policlonal que reconhece *X. fastidiosa* sendo a leitura dos resultados obtidos feita por dois analistas (Figura 3).

<sup>1</sup> <https://www.rheabiotech.com.br/>



**Figura 3** - Ilustração para o procedimento de *Tissue-Print*. 'Carimbo' do tecido vegetal em membrana de nitrocelulose.

Para fins de comparação, DNA de algumas das amostras analisadas por *Tissue-Print* foram obtidos e submetidas a PCR tradicional e qPCR cujas

metodologias estão descritas no item 4.4. Foi adotado a qPCR como método de referência ('padrão ouro') para comparação dos métodos.

De uma maneira geral, seguiu-se o seguinte protocolo descrito abaixo para a execução do teste DTBIA (*Tissue-Print*);

1. As amostras foram impressas em membrana de nitrocelulose segundo esquema da Figura 3;
2. Em seguida foram lavadas com água destilada e na sequência com TTBS buffer quente, deixando-se dois minutos. Após a membrana foi bloqueada com leite desnatado dissolvido em TTBS buffer a 5% durante 4 horas;
3. Após, descartar a solução de bloqueio lavou 2 vezes com água e TTBS buffer alternando-os. Adicionou a solução contendo o antissoro primário (anti-*Xylella*) diluído na razão 20 µL: 150 mL de tampão (150 mL de TTBS + 75 µL Tween 20 + 0,75g de BSA) e deixado em "overnight" a temperatura ambiente);
4. Na manhã seguinte descartou a solução e lavou, por 4 vezes a membrana com água e TTBS buffer alternando-os. Incubou durante 2 horas com antissoro secundário (anti-rabbit, conjugado com fosfatase alcalina) em 37° C diluído 1 µL: 20 mL;
5. Após, as 4 lavagens com água e TTBS buffer alternando-os. Foi revelado com substrato BCIP/NBT 96 mL de tampão TRD + 0,008g de BCIP (Bromo-Cloro-Indolil- Fosfato) + 0,016 mg de NBT (Nitro blue tetrazolium), preparado na hora.

#### **4.4 Extração de DNA total, PCR e qPCR**

Pecíolo de folhas, segmentos de raízes e de ramos foram utilizados para extração de DNA total utilizando-se 200 mg de cada uma das matrizes mencionadas. O tecido vegetal foi adicionado em tubos de 2 mL contendo duas esferas de aço inoxidável (5 mm) mais 625 µL de tampão de extração 1 (100 mM Tris pH8,0; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM e H2O destilada autoclavada) seguindo-se da homogeneização através de sistema TissueLyser II (Qiagen, Valencia, CA), na velocidade de 30 Hz por 120 s. Após, 725µL de tampão 2 (CTAB 5%; Sarcosil 10%; 10 mM B-mercaptoetanol) foi adicionado ao tubo, seguindo-se o protocolo de purificação de DNA modificado de Irey *et al.*, (2006). Resumidamente, os tubos foram incubados de 55 a 65°C por 30 minutos, centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos, e a fase superior transferida para

um novo tubo, no qual se adicionou 500 µL de acetato de potássio 5M. Novamente, o tubo foi centrifugado a 10000 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, em que se adicionou 1 volume de isopropanol, mantendo-o então 1 hora a -20°C. Depois, o tubo foi centrifugado por 10 min a 12000 rpm, descartado a fase superior e o precipitado lavado com etanol 70%, mantido em estufa na temperatura de 60°C por 15 minutos e dissolvido em 400 µL de 1/10 TE, contendo 10 µg/ µL de RNAase a 37°C durante 30 minutos e armazenado a -20°C.

As amplificações *X. fastidiosa* por PCR tradicional foram realizadas usando os iniciadores RST31 e RST33 (MINSAVAGE *et al.*,1993) em um volume de 20 µL contendo 1 X Tampão Master Mix, 20 pmol de cada um dos iniciadores, 4 µL de DNA total (100 ng / µL). O termociclador foi programado para as etapas de desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 45 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 1 min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. As amplificações foram visualizadas em matrix de agarose 1% corada com brometo de etídeo submetida a eletroforese horizontal.

Para o diagnóstico envolvendo qPCR segue-se a metodologia descrita por Oliveira *et al.*, (2002) utilizando o termociclador ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems®). As amplificações continham um volume total de 13,5 µL, composto por 6,75 µL de TaqMan PCR Master Mix (Biosystem), 0,80 µM dos primers CVC1/CCSM1 e 0,40 µM da sonda CVC. Uma concentração final de 300 ng de DNA total foi usada para todas as amostras. As amplificações seguiram o padrão do equipamento: pré-incubação a 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguindo 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento/extensão a 60°C por 1 min após cada ciclo. Somente amostras com valores de CT menores que 32 foram aceitas como positivas, portanto, infectadas por *X. fastidiosa*. Em sendo uma correlação inversa, os menores valores de CT estão associados a maiores concentrações de *X. fastidiosa* na amostra, enquanto os maiores valores ao menor título bacteriano.

#### 4.5 Análise dos dados

Os dados da frequência de presença / ausência de *X. fastidiosa* nas amostras seja por diagnóstico através de diferentes técnicas (PCR convencional, qPCR e *imuno*

*tissue-print*) ou diferentes matrizes (pecíolo da folha ou ramo) utilizada para a mesma técnica de diagnóstico foram avaliados estatisticamente pelo teste *qui-quadrado* ( $\chi^2$ ) de Pearson para proporções de ocorrência de características (frequências) entre grupos de amostras. É testado a hipótese nula ( $H_0$ ) de não associação entre os grupos e a  $H_1$  onde os grupos são associados. A rejeição da hipótese verdadeira é testada para  $P < 0.05$ . Diferenças entre os valores de CT obtidos para cada matriz (pecíolo da folha ou ramo) foram comparados pelo teste não paramétrico (Mann-Whitney U test) que testa a hipótese nula de que os valores de X ser maior que o Y é igual à do Y ser maior que a do X, quando tomados aleatoriamente de duas matrizes. Ambas as análises foram realizadas em <https://www.socscistatistics.com/tests/ztest/default.aspx>.

A reprodutibilidade de leitura dos resultados presentes nas membranas entre os analistas foi avaliada pelo teste *chi-quadrado* e pelo índice de Cohen-Kappa que estima a concordância de resultados entre duas leituras (MCHUGH *et al.*, 2012). As interpretações podem assim ser feitas comparando-se as leituras obtidas:  $\leq 0$  - sem concordância; 0,01 a 0,20 - levemente parcial; 0,21 a 0,40 - concordância razoável; 0,41 a 0,60 - moderada; 0,61 a 0,80 - substancial; 0,81 a 1,00 - quase perfeita.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Transmissão vertical de *X. fastidiosa*

Aos 32 meses após o início de formação, de um total 71 mudas, 41 (57,74%) foram positivas para *X. fastidiosa* quando diagnosticada por qPCR (Figura 4). De um modo geral os valores de CT obtidos (entre 26.13 a 31.82) denotaram uma baixa concentração de *X. fastidiosa* nestas plantas, com exceção das plantas 27, 29, 30, 36, 53, 57 e 60 cujos valores de CT foram menores que 25, com destaque para a planta 29 (CT = 24.66), sendo a única no período a apresentar sintomas de dessecamento foliar (Tabela 1). Alta taxa de transmissão vertical (28.5%) de *X. fastidiosa* por meio de enxertia de tecido vegetal infectado foi observado em laranjeiras após 24 meses da enxertia, onde os autores também usaram material vegetal (borbulhas) retiradas de plantas infectadas e assintomáticas para a infecção (COLETTA-FILHO *et al.*, 2000). Nesse caso, não foi observado sintomas de CVC em nenhuma planta mesmo após 24 meses da enxertia. Esse longo período de incubação é uma característica de infecções por *X. fastidiosa*, especificamente em laranjeiras, e agora em oliveiras, curiosamente ambas infectadas pela subespécie *pauca* de *X. fastidiosa*. Para Hill & Purcell (1995), plantas fonte de *X. fastidiosa* onde sintomas não são observados são mais frequentes que plantas onde ocorre o fenótipo da doença. Esses autores ainda mencionam que a diferença no período de incubação entre os hospedeiros pode estar relacionada à diferença na taxa de multiplicação, colonização e atratividade ao vetor. Outro fator com influência no período de incubação é a virulência da estirpe bacteriana. Fry & Milholand (1990a) observaram que em videira, a estirpe de *X. fastidiosa* mais virulenta colonizou mais rapidamente a planta do que a estirpe de baixa virulência, enquanto a não-virulenta não houve migração da bactéria. No entanto, a translocação depende não só da virulência da estirpe, mas do grau de resistência do hospedeiro e da idade da planta (HILL & PURCELL, 1995). Sendo assim, se a contaminação de *X. fastidiosa* na planta for pelo uso de estacas contaminadas durante a produção das mudas, não se pode descartar a hipótese de infecções com estirpes de *X. fastidiosa* com diferenças na virulência, sendo estas refletidas nas mudas.



**Figura 4** - Sintomas, em destaque, de dessecamento foliar de oliveira (DFO) em muda após 32 meses de enraizamento de estacas retirada de planta assintomática, porém infectada com *X. fastidiosa*.

Com base nos dados de transmissão vertical por ramos infectados e assintomáticos mostrados acima em 57,74% das mudas pode ser diagnosticado a presença de *X. fastidiosa* por qPCR, porém em somente uma (0,014%) foi observado sintomas. Esta transmissão por material de propagação aliada ao longo período de incubação, pode explicar a ampla disseminação desta bactéria nos olivais paulistas e mineiros, como mencionado por Safady *et al.*, (2019). Este longo período de incubação também é indiretamente reforçado por observações de campo onde, até então, dificilmente observou-se sintomas da DFO em plantas com idade inferior a 36 meses. Tais fatos reforçam a necessidade do estabelecimento de um sistema de produção de mudas de oliveira certificadas e em ambiente protegido com vistas à sanidade para *X. fastidiosa*.

**Tabela 1** - Valores de CT obtidos de mudas de oliveira enraizadas por meio de estaquia de ramos coletados em plantas assintomáticas para DFO, porém infectadas por *X. fastidiosa*.

Amostras	Valores de CT <sup>1</sup>	N°. cel/g de tecido <sup>2</sup>	Amostras	Valores de CT	N°. cel/g de tecido
27	24.25	3.6.E+04	21	28.30	1.50E+03
29	24.66	2.6.E+04	25	28.44	1.34E+03
36	24.79	2.3.E+04	41	29.23	7.24E+02
53	25.05	1.9.E+04	8	29.58	5.51E+02
60	25.45	1.4.E+04	54	29.69	5.06E+02
57	25.67	1.2.E+04	58	29.85	4.46E+02
30	25.79	1.1.E+04	26	29.89	4.32E+02
9	26.13	8.2.E+03	2	29.95	4.13E+02
43	26.46	6.3.E+03	13	30.08	3.75E+02
46	26.76	5.0.E+03	23	30.44	2.81E+02
17	26.77	5.0.E+03	24	30.44	2.81E+02
62	26.89	4.5.E+03	1	30.44	2.81E+02
16	27.05	4.0.E+03	66	30.52	2.64E+02
15	27.08	3.9.E+03	22	30.70	2.30E+02
28	27.53	2.7.E+03	64	30.73	2.24E+02
11	27.55	2.7.E+03	67	30.83	2.07E+02
38	27.59	2.6.E+03	6	30.92	1.93E+02
20	27.62	2.6.E+03	5	31.55	1.18E+02
56	27.70	2.4.E+03	63	31.64	1.10E+02
4	27.80	2.2.E+03	42	31.78	9.86E+01
			49	31.82	9.56E+01

<sup>1</sup>Cycle threshold obtidos pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Este valor é inversamente proporcional a concentração de *X. fastidiosa* na amostra.

<sup>2</sup>Ausência de valores de CT após 40 ciclos de amplificação.

## 5.2 Determinação da distribuição da bactéria em plantas de oliveira com sintomas de dessecamento foliar - DFO

Com o objetivo de verificar a distribuição sistêmica de *X. fastidiosa* nas plantas de oliveira amostras de folhas e ramos foram retiradas em diferentes extratos (alturas) de quatro plantas, procurando-se amostrar sistematicamente toda a copa, assim como o sistema radicular (Figura 2). Três plantas foram amostradas em talhão da cultivar "Grapollo", nas quais os sintomas estavam presentes em um único ramo na parte inferior da planta, portanto classificadas como 'planta com sintoma inicial' (Tabela 2). A quarta planta foi da cultivar "Arbosana", cujos sintomas de dessecamento foliar estavam distribuídos por toda a copa, denominado como 'planta de sintoma severo' (Tabela 3). Para ambas as condições biológicas, o diagnóstico para presença de *X.*

*fastidiosa* foi realizado nas matrizes ramo lateral presente na região amostral do ramo principal (pernadas) e pecíolo das folhas presentes nos ramos laterais.

Num total das três plantas de "Grapollo" analisadas, a frequência de diagnóstico positivo para *X. fastidiosa* foi maior nas amostras coletadas no ramo principal (pernada) sintomático com 77% das amostras positivas, tendo-se nesta condição uma distribuição mais homogênea da bactéria desde o ponto zero (local de ocorrência das folhas sintomáticas) até 3 metros acima (Tabela 2). Mesmo com ausência de sintomas de dessecamento nos dois outros ramos principais amostrados (pernadas), diagnósticos positivos para *X. fastidiosa* foram confirmados em 30% e 57% das amostras no total das 3 plantas. Os ramos principais assintomáticos da planta #3 apresentaram as menores taxas de infecção, ainda que duas amostras tenham apresentadas os valores de CT positivos, ambas amostradas nos ramos secundários. Embora as plantas tenham sido selecionadas com uniformidade em termos de sintomas, não se pode fazer inferências se as discrepâncias entre as colonizações das "Grapollo" 1, 2 e 3 refletem diferentes etapas de infecção uma vez que o período de infecção não foi controlado. Resultados similares foram reportados em plantas de laranja doce com baixa severidade de sintomas de CVC (folhas sintomáticas em um único ramo). De acordo com Coletta-Filho & De Souza (2014) na somatória das análises de cinco plantas de laranja doce o cenário foi também de uma infecção sistêmica de *X. fastidiosa* distribuída por toda planta, embora quando analisadas individualmente em três das cinco plantas a infecção não se expandiu além da região sintomática, similar ao observado para a planta #3 de "Grapollo" (Tabela 2). Na condição de ocorrência de alta severidade de sintomas da DFO, como a constatada para a planta de "Arbosana" onde os sintomas encontram-se presentes em folhas de ramos derivados dos três ramos principais, a distribuição da bactéria foi ainda mais sistêmica. Resultados de qPCR positivos foram constatados entre 82 a 100% das amostras retiradas dos pecíolos das folhas e fragmentos de ramos secundários das três pernadas (Tabela 3). Estes dados assemelham-se aos obtidos por Coletta-Filho *et al.*, (2000) em laranjeiras com CVC com alta severidade de sintomas (nível III onde os sintomas da doença encontravam-se espalhados por toda a copa) em plantas com 2 e 4 anos de idade. Face a idade das plantas tanto neste trabalho (oliveira com 6 anos) quanto no de Coletta-Filho *et al.*, (2000) presume-se que as infecções já tenham ocorrido ainda na fase de formação das mudas, seja por

material de propagação infectado ou insetos vetores, no viveiro ou logo após o plantio a campo. Para as laranjeiras do trabalho citado acima (COLETTA-FILHO *et al.*, 2000), na época em que foi realizado as amostragens as mudas eram produzidas em ambiente não protegido de insetos vetores assim como não havia um programa de certificação de qualidade fitossanitária de mudas cítricas, o qual ocorreu após 2003 (CARVALHO *et al.*, 2003). Para as oliveiras o programa de produção de mudas em ambiente protegido e sob um sistema de certificação de qualidade nos tempos atuais ainda está em discussão.

**Tabela 2** - Distribuição de *X. fastidiosa* em diferentes partes de plantas de oliveira da cultivar "Grapollo" com baixa severidade de sintomas de dessecamento foliar. Números referem-se a valores de CT (Cycle threshold) obtidos pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Pontos de amostragem <sup>1</sup>	Planta #1		Planta #2		Planta #3		No. total amostras testadas	No. total amostras positivas
	Pecíolo	Ramo	Pecíolo	Ramo	Pecíolo	Ramo		
Ramo principal 1 - presença de um ramo com sintoma								
0. Ramo com sintoma	20,38	29,82	22,50	Und	23,19	27,38	6	5
1. (-0.30 m)	--- <sup>2</sup>	---	22,56	28,69	21,60	28,59	4	4
2. (-0.50 m)	Und <sup>3</sup>	Und	---	---	---	---	2	0
3. (+0.30 m)	23,30	Und	22,33	31,06	20,70	30,46	6	5
4. (+0.50 m)	26,24	30,94	22,91	Und	19,56	26,81	6	5
5. (+1 m)	Und	Und	19,79	31,59	19,86	26,82	6	4
6. (+3 m)	20,13	31,63	22,50	28,25	22,08	Und	6	5
Porcentagem total de amostras positivas							77%	
Ramo principal 2 - sem a presença de ramo com sintoma								
0. (Ponto inicial) <sup>1</sup>	24,42	29,89	22,99	Und	Und	Und	6	3
1. (+0.30 m)	23,34	Und	Und	Und	Und	Und	6	1
2. (+0.50 m)	23,86	Und	Und	Und	Und	31,12	6	2
3. (+1 m)	25,31	27,88	Und	Und	Und	Und	6	2
4. (+3 m)	Und	27,24	Und	28,55	Und	Und	6	2
Porcentagem total de amostras positivas							30%	
Ramo principal 3 - sem a presença de ramo com sintoma								
0. (Ponto inicial)	26,43	Und	23,42	29,51	Und	30,37	6	4
1. (+0.30 m)	---	---	26,65	27,61	Und	Und	4	2
2. (+0.50 m)	24,24	Und	26,45	28,37	Und	Und	6	3
3. (+1 m)	21,81	26,78	20,33	Und	Und	Und	6	3
4. (+3 m)	25,45	25,85	24,87	28,77	Und	Und	6	4
Porcentagem total de amostras positivas							57%	
Raiz	Und		30,44		30,24		3	2

Amostras positivas/analizadas <sup>4</sup>	12/15	7/15	12/16	9/16	6/16	7/16
---	-------	------	-------	------	------	------

Estatística U de Mann-Whitney para valores de CT entre as matrizes (pecíolo x ramos) - <sup>5</sup>P = 0.020\*

Teste *chi-quadrado* de Pearson (pecíolo x ramos) - <sup>5</sup>P = 0.390<sup>ns</sup>

<sup>1</sup>Vide Figura 2 para maiores esclarecimentos. Ponto inicial tem-se como referência a mesma altura do ramo com sintoma identificado na pernada 1.

<sup>2</sup>Ausência de amostra para coleta

<sup>3</sup>Ausência de valores de CT após 40 ciclos de amplificação.

<sup>4</sup>Exceto amostras de raízes

<sup>5</sup>Análises estatísticas para limite de significância de P<0,05.

Comparando-se a frequência de resultados positivos para *X. fastidiosa* obtidos por qPCR entre as matrizes pecíolo das folhas e ramos secundários observa-se que não houve diferença estatística tanto para a condição de baixa severidade de sintomas (plantas de "Grapollo" - Tabela 2, P = 0,211<sup>ns</sup>) quanto para a condição de alta severidade (planta de "Arbosana" - Tabela 3, P = 0,133<sup>ns</sup>). No entanto, comparando-se os valores de CT os quais diretamente e de forma inversa refletem a concentração de *X. fastidiosa* observa-se que a matriz pecíolo resultou, de uma forma geral, em menores valores de CT, isto é, maiores concentrações de *X. fastidiosa* quando comparado a matriz ramo secundário. Tal fato ocorreu tanto nas condições de baixa (P = 0.02<sup>ns</sup>) quanto alta severidade (P = 0.018<sup>ns</sup>) de sintomas (Tabelas 2 e 3, respectivamente). Mesmo que as concentrações de DNA total de ambas as matrizes tenham sido normalizadas previamente a qPCR, a maior resistência dos ramos ao processo de trituração e conseqüentemente exposição da bactéria ao processo de extração de DNA pode ser uma explicação ao menor título observado. Porém, não se pode descartar a possibilidade da maior colonização natural dos vasos de xilema dos pecíolos quando comparado aos dos ramos. Niza *et al.*, (2015) obteve resultados muito similares comparando-se por qPCR a colonização de *X. fastidiosa* em pecíolo e ramos de citros tendo-se que a maior concentração da bactéria foi observada na matriz pecíolo quando comparado à matriz ramo. Também, segundo aqueles autores, a frequência de resultados positivos em amostras distantes do ponto de inoculação foi maior na matriz pecíolos quando comparadas a ramos.

Em resumo, os dados obtidos neste trabalho mostraram que independentemente da severidade dos sintomas de dessecamento foliar e de sua ocorrência na copa de oliveira, a bactéria *X. fastidiosa* foi diagnosticada

sistemicamente distribuída. Na somatória da ocorrência de ampliações positivas nas três plantas de "Grapollo" (caracterizada por baixa severidade) ou na condição de alta severidade (planta de "Arbosana") a bactéria *X. fastidiosa* foi diagnosticada em todas as frações amostradas, inclusive com amostras positivas no sistema radicular (Figura 5). Esta situação permite inferir que a poda de ramos com sintomas de dessecamento foliar associado a *X. fastidiosa* com objetivo de eliminar a bactéria da planta pode ser uma ação de baixa eficiência no manejo da doença em oliveiras. Após a poda a possibilidade de emissão de brotos já contaminados com a bactéria pode ser significativa. Ainda, as cigarrinhas, vetores de *X. fastidiosa*, podem ser ainda mais atraídas por estas brotações novas. Porém, são hipóteses que precisam ser testadas a campo.

**Tabela 3** - Distribuição de *X. fastidiosa* em diferentes partes da planta de oliveira da cultivar "Arbosana" com alta severidade de sintomas de dessecamento foliar. Números referem-se aos valores de CT (threshold cycle) obtidos pela técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Pontos de amostragem <sup>1</sup>	Valores de CT (Cycle threshold)	
	Pecíolo	Ramo
Pernada 1 - presença de ramos com sintomas		
0. Ramo com folhas sintomáticas	18,69	20,32
1. (-0.30 m)	21,62	25,85
2. (-0.50 m)	19,84	25,51
3. (+0.30 m)	15,89	24,38
4. (+0.50 m)	14,90	22,92
5. (+1 m)	17,93	22,28
6. (+3 m)	16,40	23,24
Porcentagem total de amostras positivas	100%	
Pernada 2 - presença de ramos com sintomas		
0. Ramo com folhas sintomáticas	19,05	28,97
1. (-0.30 m)	19,00	26,73
2. (-0.50 m)	--- <sup>2</sup>	---
3. (+0.30 m)	18,77	29,96
4. (+0.50 m)	21,00	und <sup>3</sup>
5. (+1 m)	24,68	AP <sup>4</sup>
6. (+3 m)	32,00	und
Porcentagem total de amostras positivas	82%	
Pernada 3 - presença de ramos com sintomas		
0. Ramo com folhas sintomáticas	21,05	25,01
1. (-0.30 m)	---	---
2. (-0.50 m)	---	---
3. (+0.30 m)	20,86	23,24
4. (+0.50 m)	19,95	29,38
5. (+1 m)	20,08	29,56
6. (+3 m)	22,56	27,57
Porcentagem total de amostras positivas	100%	
Amostras positivas/analizadas	18/18	13/15

Estatística U de Mann-Whitney para valores de CT nas matrizes pecíolo e ramos

secundários -  $^5P = 0.018^*$

Teste chi-quadrado de Pearson (pecíolo x ramos) -  $^5P = 0.133^{ns}$

---

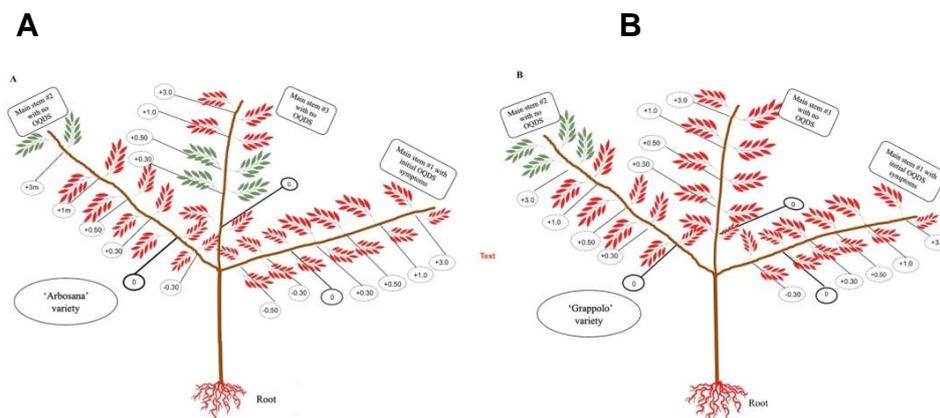
<sup>1</sup>Vide Figura 2 para maiores esclarecimentos. Ponto inicial tem-se como referência a mesma altura do ramo com sintoma identificado na pernada 1.

<sup>2</sup>Ausência de amostra para coleta

<sup>3</sup>Ausência de valores de CT após 40 ciclos de amplificação.

<sup>4</sup> Amostra perdida

<sup>5</sup>Análises estatísticas para limite de significância de  $P < 0,05$ .



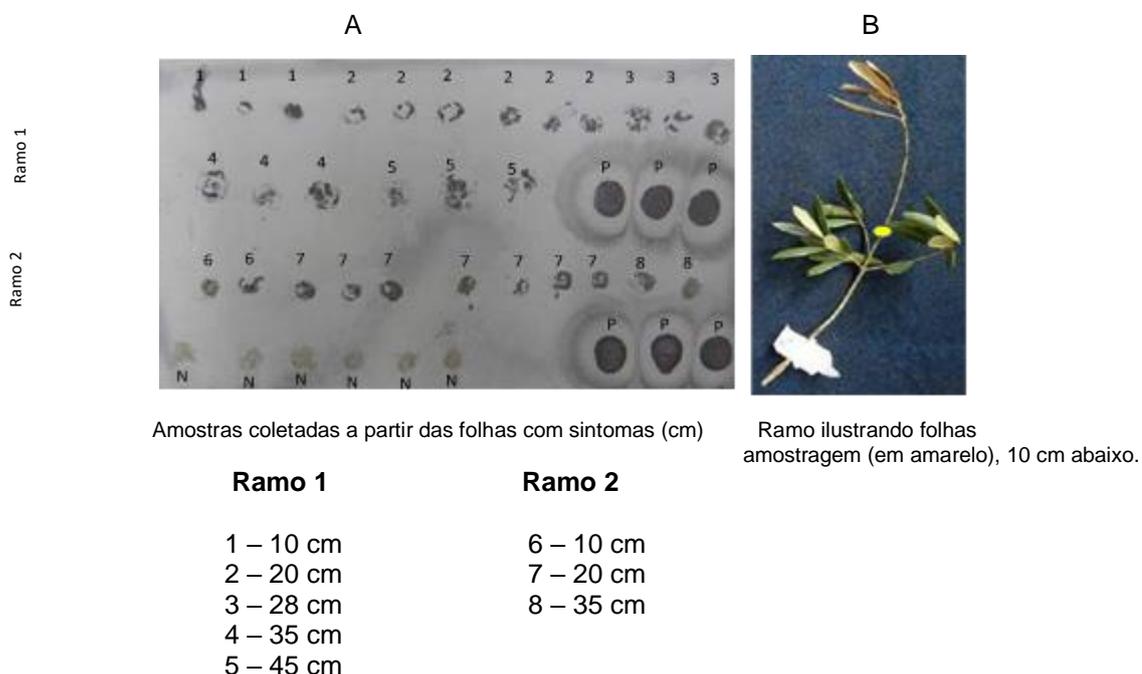
**Figura 5** - Ilustração da frequência de qPCR positivo para *X. fastidiosa* em diferentes frações da copa e sistema radicular de oliveiras. A. Somatória das reações positivas para *X. fastidiosa* (em vermelho) das amostras da cultivar "Grappolo" considerando as matrizes pecíolo e ramo (plantas 1, 2 e 3). B. Reações positivas para *X. fastidiosa* (em vermelho) das amostras da cultivar "Arbosana" considerando as matrizes pecíolo e ramo.

### 5.3 Metodologia de diagnóstico de *X. fastidiosa* e por meio da metodologia "Tissue-Print"

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) tem sido muito utilizada nos laboratórios como uma metodologia referência para diagnóstico de fitopatógenos, em decorrência de se ter mais vantagens sobre as metodologias baseadas em serologia, tendo muita sensibilidade e especificidade em sua análise. Derivada da PCR, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem ganhado popularidade na detecção de patógenos de plantas por apresentar maior sensibilidade, rapidez na execução e geração de menor volume de resíduo tóxico quando comparado a PCR, além da possibilidade de quantificação absoluta do alvo (ILES *et al.*, 2021). Nos últimos 10 anos estes métodos que têm como objetivo a detecção de sequências específicas do DNA do patógeno alvo ganharam espaço como ferramentas de diagnóstico em clínicas fitopatológicas (ALVAREZ *et al.*, 2004; MARTINELLI *et al.*, 2015). Porém seu uso requer uma estrutura física mínima e vários equipamentos necessários ao preparo das amostras, além do termociclador propriamente dito somado a necessidade de

uma mão de obra especializada (JOSHI & DESHPANDE, 2011.) que torna difícil ou até mesmo impossível de ser adotado o uso “*in farm*”.

Protocolos de diagnóstico baseados em serologia usando anticorpos que reconhecem especificamente *X. fastidiosa* seria uma estratégia interessante e com potencial de uso na propriedade rural, uma vez que são de baixo custo e de fácil execução. Resultados preliminares obtidos no laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do IAC, em Cordeirópolis, usando fixação de seiva de plantas em membranas de nitrocelulose e revelação da presença de *X. fastidiosa* por meio de anticorpos contra este patógeno, técnica conhecida como DTBIA ou *Tissue-Print* (TP) (CAMBRA *et al.*, 2000; DJELOUAH *et al.*, 2014) apresentaram resultados muito promissores (Figura 6).



**Figura 6** – *Tissue-print* (TP) em membrana de nitrocelulose de ramos de oliveira com sintomas relacionados a presença de *X. fastidiosa*. A. Membrana com os ‘prints’ dos ramos. Os números fazem referência as amostras, N – ‘print’ de oliveira negativa para *X. fastidiosa*, P – controle positivo (*X. fastidiosa* + tecido negativo). B. Foto do ramo com sintomas a partir do qual as amostras foram coletadas. Reação de coloração púrpura nas amostras (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e no controle positivo (P) destaca-se da coloração mais clara (ausência de reação) no controle N.

A partir destes resultados preliminares, deu-se início as validações comparando os resultados obtidos com as técnicas de *Tissue-Print* (TP), PCR convencional (PCR conv) e qPCR num total de 180 amostras oriundas de três grupos (G1, G2 e G3).

Primeiramente, em todas as análises de TP as leituras das intensidades de coloração dos spots e comparação com os controles negativos foram realizados por dois avaliadores independentes uma vez que se trata de uma interpretação visual, com grau de subjetividade. A comparação das concordâncias dos resultados entre os analistas foi realizada pelo index de Cohen-Kappa que estima a repetibilidade de resultados entre os avaliadores. Para os três grupos de amostras os índices variaram de K=0,50 a K=0,77, portanto concordância moderada a substancial (Tabela 4). A melhor concordância (K=0,77) foi das amostras do grupo G3 (de plantas coletadas a campo) cujo teste foi realizado logo após a impressão das amostras às membranas o que tornou a coloração dos spots mais contrastante facilitando a leitura entre os avaliadores. No caso das amostras dos grupos 1 e 2 as membranas foram mantidas em temperatura ambiente por até 60 dias após receberem as impressões ('carimbos') das amostras antes de dar início as análises o que pode ter afetado negativamente a qualidade do teste.

**Tabela 4** - Teste de Cohen's-Kappa para comparação da repetibilidade de resultados entre dois analistas das leituras das membranas de *Tissue-Print* (TP) obtidas de amostras de oliveira com potencial infecção por *X. fastidiosa*.

Grupos de amostras analisadas	No. amostras	Cohen's-Kappa index	Condição da concordância
G1. Distribuição de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de oliveira	74	K=0,67	substancial
G2. Transmissão vertical de <i>X. fastidiosa</i>	71	K=0,50	moderada
G3. Coletas a campo de plantas com sintomas de dessecamento foliar	35	K=0,77	substancial

<sup>1</sup>Valores de K ≤ 0 - sem concordância; K entre 0,01 a 0,20 - levemente parcial; K entre 0,21 a 0,40 - concordância razoável; K entre 0,41 a 0,60 - moderada; K entre 0,61 a 0,80 - substancial; K entre 0,81 a 1,00 - quase perfeita.

Comparando-se os diferentes testes de diagnóstico dentro de cada um dos grupos de amostras analisadas foi observada uma total independência para os resultados obtidos entre os testes (P<0,001), tendo a técnica de PCR apresentado a menor frequência de resultados positivos (amostras com *X. fastidiosa*) para os três grupos de amostras analisadas (Tabela 5).

**Tabela 5** - Análise estatísticas para comparações entre os diferentes métodos de diagnóstico de *X. fastidiosa* em oliveiras.

Grupos de amostras	<sup>2</sup> Número de amostras	<sup>1</sup> Técnicas de diagnóstico			<sup>3</sup> Teste Chi Quadrado 2x3
		TP	PCR	qPCR	
G1. Distribuição de <i>X. fastidiosa</i> em plantas de oliveira	74	<sup>2</sup> 65/9	40/34	43/31	$P < 0.001$
<sup>4</sup> Cohen-Kappa index	TP x qPCR (K=0,10 ; concordância levemente parcial)				
	TP x PCR (K=0,01 ; concordância levemente parcial)				
	PCR x qPCR (K= 0,92 ; concordância quase perfeita)				
G2. Transmissão vertical de <i>X. fastidiosa</i>	71	50/21	25/46	41/30	$P < 0.001$
Cohen-Kappa index	TP x qPCR (K=0,02 ; concordância levemente parcial)				
	TP x PCR (K=-0,03 ; concordância levemente parcial)				
	PCR x qPCR (K= 0,53 ; concordância moderada)				
G3. Coletas a campo de plantas com sintomas de dessecamento foliar	35	28/7	11/24	32/3	$P < 0.001$
Cohen-Kappa index	TP x qPCR (K=0,16 ; concordância levemente parcial)				
	TP x PCR (K=0,03 ; concordância levemente parcial)				
	PCR x qPCR (K= 0,02 ; concordância levemente parcial)				

<sup>1</sup>TP - *Tissue-Print* adotando-se sempre os dados do analista onde a frequência de amostras positivas foi menor. PCR - PCR convencional. qPCR - PCR quantitativo em tempo real.

<sup>2</sup>Número de amostras com *X. fastidiosa* (positivas) / número de amostras sem *X. fastidiosa* (negativas)

<sup>3</sup>Tabela de contingência do teste chi-quadrado de Pearson com dois eventos (positivo e negativo) x 3 variáveis (TP, PCR e qPCR).

<sup>4</sup>Vide Material e Métodos para definição da condição da concordância segundo a metodologia de Cohen's-Kappa (MCHUGH *et al.*, 2012).

Surpreendentemente as amostras analisadas pela metodologia de TP foram as que apresentaram maiores frequências de resultados positivos, com exceção aquelas do grupo G3, onde tem-se o método de qPCR com maior porcentagem de amostras positivas. De um modo geral a concordância entre as diferentes técnicas usadas para diagnóstico foi apenas levemente parcial segundo o índice de Cohen-Kappa (Tabela 5). A presença de inibidores da taq DNA polimerase no DNA total extraído pode ser um dos fatores que possam explicar esta baixa eficiência da PCR, principalmente no caso das oliveiras que é rica em compostos fenólicos. Este fator é

minimizado pelo uso a técnica da qPCR onde a robustez da enzima, o menor tamanho do amplicon e a sensibilidade de leitura da quantidade de DNA alvo multiplicado pela polimerase é mais eficiente no qPCR quando comparado a uma matriz de agarose (PCR). Por outro lado, a surpreendente frequência e resultados positivos pela técnica de TP pode ser atribuído ao método experimental utilizado.

Todas as amostras foram 'carimbadas' 4 vezes sequencialmente na membrana. Adotou-se que se uma destas repetições tenha apresentado leitura positiva a amostra foi considerada positiva. Portanto, o universo amostral foi maior no caso do TP. A considerar uma bactéria sistêmica e de distribuição irregular no xilema das plantas (ALVES 2003) uma maior amplitude de amostragem potencializaria a identificação de amostras com a presença do patógeno. Por outro lado, não se pode omitir a possibilidade de reações cruzadas entre o anticorpo policlonal aqui utilizado e microrganismos endofíticos presentes nas plantas. Mesmo que o anticorpo tenha sido avaliado para as reações cruzadas com outras fitobactérias (*Xanthomonas citri*, *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium*, *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas syringae*, *Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.) o número de outras espécies não conhecidas é muito maior no interior das plantas (BEATTIE 2007).

No entanto, trabalhos publicados em literatura reforçam o potencial de técnica de TP como, ao menos um método em etapas de *screening* do diagnóstico de patógenos em plantas. Djelouah *et al.*, (2014) obtiveram eficiências semelhantes para as técnicas de TP, Elisa e PCR no diagnóstico de *X. fastidiosa* em amostras de oliveiras coletadas de ramos sintomáticos quanto assintomáticos. Por outro lado, Ding *et al.*, (2017) mostraram uma maior eficiência do TP (83%) quando comparado a qPCR (64%) para diagnóstico de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' em plantas de citrus assintomáticas para *huanglongbing*. Em amostras com sintomas ambos os métodos apresentaram resultados coincidentes em 80% dos casos. No caso de infecções virais, Ahangaran *et al.* (2009) mostraram que a eficiência do TP foi similar à de imunocaptura seguida de RT-PCR para diagnóstico do vírus do mosaico da soja (SMV).

Portanto, com os resultados até então obtidos para o uso de TP como ferramenta de diagnóstico de *X. fastidiosa* em oliveiras faz-se necessário trabalhos futuros visando desenvolver ensaios mais acurados na padronização da metodologia de TP e validação das mesmas em comparação a outras técnicas de diagnóstico

consideradas como mais reprodutíveis, específicas e não sujeitas a subjetividade como a qPCR.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, após 32 meses do início de formação, de um total 71 mudas, 41 (57,74%) foram positivas para *X. fastidiosa* quando diagnosticada por qPCR e mesmo as mudas que não apresentavam sintomas, mostrou que foi possível diagnosticar a bactéria, demonstrando a transmissão vertical deste patógeno em oliveiras, por meio de material infectado, trará subsídios para a discussão e o estabelecimento de um programa de produção certificada de material de propagação, que assegurem a produção de mudas livres de *Xf-p*. Para a produção de mudas por meio da enxertia pode-se dizer que não é uma solução viável, uma vez que quando a raiz já está infectada, esse meio de propagação não seria uma estratégia de mitigação da doença.

Por outro lado, os dados obtidos neste trabalho mostraram que independentemente da severidade dos sintomas de dessecamento foliar e de sua ocorrência na copa de oliveira, a bactéria *X. fastidiosa* foi diagnosticada sistemicamente distribuída, ou seja, a frequência de diagnóstico positivo para *X. fastidiosa* foi maior nas amostras coletadas no ramo principal (pernada) sintomático com 77% das amostras positivas, tendo-se nesta condição uma distribuição mais uniforme da bactéria desde o ponto zero (local de ocorrência das folhas sintomáticas) até 3 metros acima para as plantas da cultivar "Grappolo".

Na condição de ocorrência de alta severidade de sintomas da DFO como a constatada para a planta de "Arbosana" a distribuição da bactéria foi ainda mais sistêmica. qPCR positivos foram constatados entre 82 a 100% das amostras retiradas dos pecíolos das folhas e fragmentos de ramos secundários das três pernas. Contudo, nessas duas condições de severidade de sintomas a poda de ramos com sintomas de dessecamento foliar associado a *X. fastidiosa* com objetivo de eliminar a bactéria da planta pode ser uma ação de baixa eficiência no manejo da doença em oliveiras.

Além disso, os dados das amostras analisadas pela metodologia de TP foram as que apresentaram maiores frequências de resultados positivos, com exceção aquelas do grupo G3, onde tem-se o método de qPCR com maior porcentagem de

amostras positivas. A metodologia de “*Tissue-Print*” mostrou-se eficiente quando comparada aos testes de PCR convencional e qPCR. Porém, trabalhos futuros visando validar a metodologia de TP para diagnóstico de *X. fastidiosa* ainda se faz necessário.

## 7 LITERATURA CITADA

AHANGARAN, A. *et al.* Use of rapid serological and nucleic acid-based methods for detecting the soybean mosaic virus. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 91-97, 2009.

ALMEIDA, R. P. P. *et al.* Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v. 85, n. 4, p. 382-386, 2001.

ALVAREZ, M. *et al.* Um método de co-isolamento de mRNA e DNA para amostras de casos forenses. **Bioquímica analítica**, v. 335, n. 2, pág. 289-298, 2004.

ALVES, E. *Xylella fastidiosa*—adesão e colonização em vasos do xilema de laranjeira doce, cafeeiro, ameixeira, fumo e espécies de cigarrinhas vetoras e formação de biofilme sobre película de poliestireno. 2003.

AZEITE DE OLIVA BRASILEIRO TEM PRODUÇÃO PEQUENA, MAS COMPETE EM QUALIDADE COM OS MELHORES DO MUNDO. **Plural Curitiba**, 2022. Disponível em: < <https://www.plural.jor.br/gastronomia/producao-azeite-pequena-no-brasil-mas-surpreende-pela-qualidade/>> Acesso em: 20, jun 2022

BEATTIE, G. A. Plant-associated bactéria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: **Plant-associated bactéria**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 1-56.

BELARMINO, L. C. *et al.* Análise econômica exploratória da olivicultura no Brasil e Espanha. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DA CIÊNCIA E DO AGRONEGÓCIO, 8., 2020, Porto Alegre. Inovação e empreendedorismo no agronegócio: anais. p. 356-365., 2020.

BASSANEZI, R. B. *et al.* Inoculum reduction and vector control on the temporal progress of citrus variegated chlorosis incidence. **Pest Management Science**, 2021.

BERTONCINI, E.I.; TERAMOTO, J.R.S; PRELA-PANTANO. Desafios para produção de azeite no Brasil. 2010. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_4/DesafioOliva/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_4/DesafioOliva/index.htm). Acesso em: 02 jun 2021.

BOSCIA, D.; M. A. Serological detection of viruses included in certification protocols for stone fruits. **Options Mediterraneennes. Serie B: Etudes et Recherches (CIHEAM)**. no. 19., 1998.

CAMBRA, M. *et al.* Routine detection of Citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. In: **Proc. 14th Conf. IOCV**. 2000. p. 34-41.

CANALE. Bactéria *Xylella fastidiosa* detectada em oliveiras no sudeste brasileiro. **Agropecuária Catarinense**, v. 30, n. 2, p. 35-37, 2017.

CASAS, A. T. *et al.* Doenças da oliveira e seu controle. **OLIVEIRA, AF Oliveira no Brasil: tecnologias de produção. Belo Horizonte: EPAMIG**, p. 517-566, 2012.

CARVALHO, S. A. *et al.* Production of *Xylella fastidiosa*-Free Budwood in an Insect-Proof Greenhouse in São Paulo, Brazil. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 2003.

CARVALHO, et al. DOENÇAS ASSOCIADAS À *Xylella fastidiosa* NO BRASIL 2022.

CHANG, C. J. *et al.* Culture and serological detection of the bacterium limited to xylem, causing citrus variegated chlorosis and its identification as a *Xylella fastidiosa* strain. **Current Microbiology**, v.27, p.137-142, 1993.

CHIRIACÒ, M. S. *et al.* Desenvolvimento de um método lab-on-a-chip para ensaio rápido de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* cepa CoDiRO. **Relatórios científicos**, v. 8, n. 1, pág. 1-8, 2018.

COLETTA-FILHO, H. D. *et al.* Distribution of *Xylella fastidiosa* within sweet orange trees: influence of age and level of symptom expression of citrus variegated chlorosis. In: **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**. 2000.

COLETTA FILHO, H. D. *et al.* Advances on knowledge about citrus variegated chlorosis: an overview on different components of this pathosystem. **Citrus Research and Technology**, v. 35, n. 1, p. 19-33, 2014.

COLETTA-FILHO, H. D. *et al.* First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Phytopathologia mediterranea**, p. 130-135, 2016.

COLETTA-FILHO, H. D. *et al.* Citrus variegated chlorosis: an overview of 30 years of research and disease management. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, p. 175-191, 2020.

COM CRESCIMENTO DE 122%, PRODUÇÃO GAÚCHA DE AZEITES BATE RECORDE EM 2022. **GZH CAMPO E LAVOURA**, 2022. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2022/06/com-crecimento-de-122-producao-gaucha-de-azeites-bate-recorde-em-2022-cl45uq448001801678pw42auz.html#:~:text=08%2F06%2F2022%20%2D%2014h29min&text=A%20safra%20de%202022%20bateu,produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20azeite%20do%20pa%C3%ADs>>. Acesso em: 05, jun 2022.

COI. Conselho Oléico Internacional. 2022. Disponível em: <https://www.internationaloliveoil.org/>. Acesso em: 05, jun 2022.

CORNARA, D. *et al.* Transmission of *Xylella fastidiosa* by naturally infected *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae) to different host plants. **Journal of Applied Entomology**, v. 141, n. 1-2, p. 80-87, 2016.

CORNARA, D. *et al.* Spittlebugs as vectors of *Xylella fastidiosa* in olive orchards in Italy. **Journal of pest science**, v. 90, n. 2, p. 521-530, 2017.

COUTINHO, E. F.; *et al.* Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). **Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, 2009.

DE BOER, S. H.; LÓPEZ, M. M. New grower-friendly methods for plant pathogen monitoring. **Annual review of phytopathology**, v. 50, p. 197-218, 2012.

DE LIMA, J. E. O. *et al.* Distribution of *Xylella fastidiosa* in coffee plants, coffee growing areas, and its in vitro culture. **Fitopatologia Brasileira (Brazil)**, 1996.

DE SOUZA, *et al.* Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 341- 353, 2004.

DING, D. *et al.* Rational design of core-shell Co@ C microspheres for high-performance microwave absorption. **Carbon**, v. 111, p. 722-732, 2017.

DJELOUAH, K.; *et al.* Direct tissue blot immunoassay for detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 559-564, 2014.

DOMINGUES, R. J.; *et al.* **Doenças fúngicas com potencial limitante para o desenvolvimento da olivicultura no Estado de São Paulo**. 2016. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/dt/fungos\\_oliveira.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/dt/fungos_oliveira.pdf). Acesso em: 10 de julho de 2021.

ELBEAINO, T.; *et al.* Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by "olive quick decline syndrome" in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, p. 533-542, 2014.

EFSA PANEL ON PLANT HEALTH (PLH). Scientific opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. **Efsa Journal**, v. 13, n. 1, p. 3989, 2015.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) *et al.* Update of the *Xylella* spp. host plant database—systematic literature search up to 31 December 2020. **EFSA Journal**, v. 19, n. 6, p. e06674, 2021.

EVENTO DE OLIVEIRA EM CAMPINAS RESSALTA PRODUÇÃO PAULISTA DE AZEITE. **Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**, 2022. Disponível em: <<https://www.agricultura.sp.gov.br/pt/b/evento-de-oliveira-em-campinas-ressalta-producao-paulista-de-azeite>>. Acesso em: 23, jun 2022.

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organisation) (2016) PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*. **Boletim OEPP** 48, 175 - 218.

FRY, S. M.; MILHOLLAND, R. D. Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. **Phytopathology**, St. Paul, v.80,n.1, p.61-65, 1990a.

GARCIA J. R. A. *et al.* Como conviver com a CVC em São Paulo. **Laranja**, v. 16, p. 145-154, 1995.

GRAVENA, S. Manejo ecológico de pragas dos citros—aspectos práticos. **Laranja**, v. 19, p. 61-77, 1998.

HAELTERMAN, R. M. *et al.* First presumptive diagnosis of *Xylella fastidiosa* causing olive scorch in Argentina. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, 2015.

HICKEL, *et al.* Fauna de Homoptera: *Auchenorrhyncha* em pomares de ameixeira em Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 725-729, 2001.

HILL, B. L. *et al.* Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. **Phytopathology**, v. 85, n. 2, p. 209-212, 1995.

HUGHES, J. D. *et al.* Development of a one-step real-time polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum*. **Phytopathology**, v. 96, n. 9, p. 975-981, 2006.

ILES, Ashley. Autism spectrum disorders. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 48, n. 3, p. 461-473, 2021.

IREY, M. *et al.* Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model to estimate disease spread due to catastrophic weather events. **Plant Health Progress**, v. 7, n. 1, p. 16, 2006.

JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, p. S35-S48, 2010.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 81-97, 2011.

KRUGNER, R. *et al.* Evaluation of olive as a host of *Xylella fastidiosa* and associated sharpshooter vectors. **Plant Disease**, v. 98, n. 9, p. 1186-1193, 2014.

LARANJEIRA, F. F.; POMPEU JUNIOR, J. Comportamento de quinze cultivares de laranja-doce afetadas pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 23, n. 2, p. 401-411, 2002.

LEE, R. F. *et al.* Development of a serological assay for citrus variegated chlorosis--a new disease of citrus in **Brazil**. In: **Proceedings of the annual meeting of the Florida State Horticultural Society**. 1992.

LOPES, J. R. S. *et al.* Confirmação da transmissão por cigarrinhas do agente causal da clorose variegada dos citros, *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia brasileira**, v. 21, n. Suplemento, 1999.

MACHADO, E. C. *et al.* Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 6, n. 1, p. 53-57, 1994.

MARTELLI, G. P. *et al.* The olive quick decline syndrome in south-east Italy: a threatening phytosanitary emergency. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 235-243, 2016.

MARTELLI, G. P. The current status of the quick decline syndrome of olive in southern Italy. **Phytoparasitica**, v. 44, n. 1, p. 1-10, 2016.

MARTINELLI, F. *et al.* Métodos avançados de detecção de doenças de plantas. Uma revisão. **Agronomia para o Desenvolvimento Sustentável**, v. 35, n. 1, pág. 1-25, 2015.

MARTINS, F. B. *et al.* Temperatura base e filocrono em duas cultivares de oliveira. **Ciência Rural**, v. 42, p. 1975-1981, 2012.

MCHUGH, M. L. Interrater reliability: the kappa statistic. **Biochemia medica**, v. 22, n. 3, p. 276-282, 2012.

MELLO, L. D.; PINHEIRO, M. F. Aspectos físico-químicos de azeites de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 537-548, 2012.

MENG, Y. *et al.* Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5560-5567, 2005.

MINSAVAGE, G. V. *et al.* Comparison of PCR amplification of DNA and ELISA for the detection of *Xylella fastidiosa* in plant extracts. **Phytopathology**, v. 83, p. 1399, 1993.

MÜLLER. ***Xylella fastidiosa* de ameixeira: transmissão por cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) e colonização de plantas hospedeiras.** 2013.

MOHEDANO, D. P.; BERROCAL, F. O. **Producción Integrada de Olivar.** 2011.

NAVARRO ORTÍN, A. ***Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987), the dangerous pathogen in Europe.** 2017. Tese de Doutorado. Universitat Politècnica de València.

NEWMAN, K. L. *et al.* Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 6, p. 1737-1742, 2003.

NIZA, B. *et al.* Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. **Plant Pathology**, v. 64, n. 6, p. 1259-1269, 2015.

PROJEÇÃO DO MERCADO OLEÍCOLA PARA OS PRÓXIMOS ANOS. **Instituto Brasileiro De Olivicultura (IBRAOLIVA)**, 2022. Disponível em: < <https://www.ibraoliva.com.br/sobre>>. Acesso em: 23, jun 2022.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B. *et al.* Eficiência da poda em cafeeiros no controle da *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, v. 65, p. 433-440, 2006.

RAJU, B. C. *et al.* Plum leaf scald: Isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, v. 72, n. 11, p. 1460-1466, 1982.

REDAK, R. A. *et al.* The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. **Annual Reviews in Entomology**, v. 49, n. 1, p. 243-270, 2004.

SAFADY, N. G. *et al.* Distribution and genetic diversity of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* associated with olive quick syndrome symptoms in southeastern Brazil. **Phytopathology**, v. 109, n. 2, p. 257-264, 2019.

SAFRA DE OLIVAS 2022 JÁ ESTÁ EM COLHEITA. **Portal do Agronegócio**, 2022. Disponível em: <  
<https://www.portaldoagronegocio.com.br/agricultura/fruticultura/noticias/safra-de-olivas-2022-ja-esta-em-colheita>>. Acesso em: 13, junh 2022.

SHERALD, J. L. *et al.* Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape trees. **Plant Disease**, v. 75, n. 2, p. 200-203, 1991.

SALIBE, A. B. **Reação de plantas cítricas à bactéria *Xylella fastidiosa* em função de diferentes métodos de inoculação**. 2001. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANTOS, J. F. **El contexto de la olivicultura, la producción y el consumo de aceite da oliva en el mundo**. Tesis Doctoral, 2002. p. 295-319.

SAPONARI, M. *et al.* Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 3, 2013.

SAPONARI, M. *et al.* Infectivity and transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: *Aphrophoridae*) in Apulia, Italy. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 4, p. 1316-1319, 2014.

SAPONARI, M. *et al.* Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1- 13, 2017.

SEVERIN, H. H. P. Transmission of the virus of Pierce's disease by leathoppers. **Hilgardia**, 19:190-202, 1949.

SEVERIN, H. H. P. *et al.* Spittle-insect vectors of Pierce's disease virus. II. Life history and virus transmission. **Hilgardia**, v. 19, n. 11, 1950.

SCHAAD, N. W. *et al.* *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp.[correction] *fastidiosa* [correction] subsp. *nov.*, *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. *nov.*, and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. *nov.* **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 290-300, 2004.

SCALLY, M. *et al.* Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8491-8499, 2005.

SEMPIONATO, O. R.; GIROTTO, L. F.; STUCHI, E. D. Produção de mudas sadias. In: DONADIO, L. C.; MOREIRA, C. S. (Ed) **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Fundecitrus, 1997. p. 75-92

SERRA DA MANTIQUEIRA REGISTRA COLHEITA ANTECIPADA DE AZEITONAS E SAFRA DE AZEITES DE QUALIDADE. **Epamig**, 2021. Disponível em: <https://epamig.wordpress.com/2021/01/18/serra-da-mantiqueira-registra-colheita-antecipada-de-azeitonas-e-safra-de-azeites-de-qualidade/>. Acesso em: 09. Fev. 2021.

TANASIJEVIC, L. *et al.* Impacts of climate change on olive crop evapotranspiration and irrigation requirements in the Mediterranean region. **Agricultural Water Management**, v. 144, p. 54-68, 2014.

TRAPERO, A.; BLANCO, M. A. *et al.* Enfermedades El cultivo del olivo. 6. ed. **Junta de Andalucía: Mundi-Prensa**. p. 595-656, 2008.

TOFOLI, J. G. *et al.* Doenças fúngicas da oliva: sintomas, etiologia e manejo. **Biológico, São Paulo**, v. 75, n. 1, p. 53-61, 2013.

TYSON, G. E. *et al.* Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. **Phytopathology**, v. 75, n. 3, p. 264-269, 1985.

VETTRAINO, A. M. *et al.* Diagnostic sensitivity and specificity of different methods used by two laboratories for the detection of *Phytophthora ramorum* on multiple natural hosts. **Plant Pathology**, v. 59, n. 2, p. 289-300, 2010.

VIEIRA NETO, J. Aspectos técnicos da cultura da oliveira. Belo Horizonte: EPAMIG, 56p. **Boletim Técnico**, v. 88, 2008.

VILLA, F. *et al.* Déficit hídrico e paclobutrazol no crescimento inicial de plantas jovens de oliveira. **Revista Cultivando o Saber**, v. 5, n. 4, p. 38-51, 2012.

WREGGE, M. S. *et al.* **Zoneamento agroclimático para oliveira no Estado do Rio grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. (Documentos).

WREGGE, *et al.* Distribuição potencial de oliveiras no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 3, p. 656-666, 2015.

YUAN, X. *et al.* Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. **Phytopathology**, v. 100, n. 6, p. 601-611, 2010.