

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES DE DETECÇÃO
DE VÍRUS, BACTÉRIAS E FITOPLASMAS TRANSMITIDOS POR MATERIAL
PROPAGATIVO DE OLIVEIRA

Carlos Alberto Machado de Oliveira
Engenheiro Agrônomo/ULBRA

Dissertação apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Agosto de 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Carlos Alberto
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES
DE DETECÇÃO DE VÍRUS, BACTÉRIAS E FITOPLASMAS
TRANSMITIDOS POR MATERIAL PROPAGATIVO DE OLIVEIRA /
Carlos Alberto Oliveira. -- 2020.
83 f.
Orientador: Edson Bertolini.

Coorientador: Camila Cristina Lage de Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. Olea europaea L.. 2. PCR. 3. Viroses. 4.
Bacterias. 5. Fitoplasmas. I. Bertolini, Edson,
orient. II. Lage de Andrade, Camila Cristina,
coorient. III. Título.

CARLOS ALBERTO MACHADO DE OLIVEIRA
Bacharel em Agronomia - ULBRA

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.08.2020
Pela Banca Examinadora
(via videoconferência)

Homologado em:
Por

EDSON BERTOLINI
Orientador - PPG Fitotecnia

CHRISTIAN BREDEMEIER
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Fitotecnia UFRGS

GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA
Laboratório Nacional Agropecuário
MAPA

TATIANA MITUTI
Laboratório de Diagnóstico
Fitossanitário/ Agrônômica

VAGNER RICARDO LUNGE
Laboratório de Diagnóstico
Molecular/ ULBRA

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de
Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a deus;

À minha família, por todo o apoio e dedicação;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino de qualidade;

À CAPES, pela concessão da bolsa;

Ao professor Dr. Edson Bertolini, por toda orientação, apoio, ensinamento e paciência para realização deste trabalho;

À Dra. Camila Andrade, pelo ensinamento, atenção e amizade;

Aos diretores do Laboratório Agrônoma, Patrícia Teló e Valmir Duarte, por disponibilizarem as dependências da empresa para realização deste trabalho;

À TECNOPLANTA, pelo financiamento e colaboração;

E a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para realização e conclusão da dissertação de mestrado.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES DE DETECÇÃO DE VÍRUS, BACTÉRIAS E FITOPLASMAS TRANSMITIDOS POR MATERIAL PROPAGATIVO DE OLIVEIRA¹

Autor: Carlos Alberto Machado de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Edson Bertolini

Coorientador: Dra. Camila Cristina Lage de Andrade

RESUMO

O cultivo da oliveira (*Olea europaea* L.), planta arbórea responsável pela produção de azeitonas e do azeite de oliva, vem crescendo no Rio Grande do Sul. Tendo em vista a ausência de técnicas moleculares validadas e de um programa de certificação, no Brasil, que garanta a qualidade fitossanitária do material propagado, neste trabalho foram desenvolvidos e validados protocolos de RT-PCR e PCR em tempo real para detecção dos principais patógenos da oliveira transmitidos através do material propagativo. Foram desenhados iniciadores e sondas TaqMan para a detecção dos vírus ArMV, CLRV, CMV, SLRSV e OLYaV, utilizando sequências do GenBank e o programa Primer Express. Para as bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) e *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp), e para fitoplasmas, foram utilizados iniciadores e sondas TaqMan descritos na literatura. Estes marcadores e protocolos foram validados, avaliando os parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, ciclo de corte, limite de detecção (LD), repetitividade e reprodutibilidade segundo recomendações da “*European and Mediterranean Plant Protection Organization*” (EPPO). A determinação da prevalência dos patógenos foi realizada a partir da análise de plantas de um viveiro e plantio comerciais, nos cultivares Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Picual, Frantoio e Coratina. Os resultados demonstraram, de modo geral, bom estado sanitário das plantas, com resultado negativo para todas as plantas frente a Xfp, Pss, ArMV, CMV, CLRV e SLRSV. A análise de fitoplasmas revelou a presença em 0,75% das amostras de viveiro, com resultados positivos em plantas dos cvs. Arbequina, Picual e Coratina. O vírus OLYaV, foi detectado em 100% das plantas da cv. Coratina, tanto no viveiro quanto no plantio comercial. Este é o primeiro relato da presença de vírus em plantas de oliveiras no Brasil. O desenvolvimento e validação de técnicas de detecção é uma importante ferramenta que permitirá a multiplicação de material vegetal livre dos principais patógenos do cultivo, além de fornecer subsídios para a implementação de um programa oficial de certificação de qualidade sanitária das mudas de oliveira.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (83f.) Agosto, 2020.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MOLECULAR TECHNIQUES FOR DETECTION OF VIRUSES, BACTERIA AND PHYTOPLASMS TRANSMITTED BY PROPAGATIVE MATERIAL FROM OLIVE TREES

Author: Carlos Alberto Machado de Oliveira

Adviser: Prof. Dr. Edson Bertolini

Co-adviser: Dra. Camila Cristina Lage de Andrade

ABSTRACT

The cultivation of the olive tree (*Olea europaea* L.), a tree plant responsible for the production of olives and olive oil, has been growing in Rio Grande do Sul. In view of the absence of validated molecular techniques and a certification program in Brazil, which guarantees the phytosanitary quality of the propagated material, in this work RT-PCR and PCR protocols were developed and validated in real time to detect the main pathogens of the olive tree transmitted through the propagating material. Primers and probes TaqMan were designed to detect ArMV, CLRV, CMV, SLRSV and OLYaV viruses, using GenBank sequences and using the Primer Express program. For bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) and *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp), and for phytoplasmas, primers and probes TaqMan described in the literature were used. These markers and protocols were validated, evaluating the parameters of sensitivity, specificity, accuracy, cutting cycle, detection limit (LD), repeatability and reproducibility according to recommendations of the “*European and Mediterranean Plant Protection Organization*” (EPPO). The determination of the prevalence of pathogens was carried out from the analysis of plants from a commercial nursery and planting, in the cultivars Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Picual, Frantoio and Coratina. The results showed, in general, a good sanitary condition of the plants, with a negative result for all plants in relation to Xfp, Pss, ArMV, CMV, CLRV and SLRSV. Phytoplasma analysis revealed the presence in 0.75% of the nursery samples, with positive results in cvs plants. Arbequina, Picual and Coratina. The OLYaV virus was detected in 100% of cv. Coratina, both in the nursery and in commercial planting. This is the first report of the presence of viruses in olive plants in Brazil. The development and validation of detection techniques is an important tool that will allow the multiplication of plant material free of the main pathogens of cultivation, in addition to providing subsidies for the implementation of an official program for the certification of sanitary quality of olive seedlings.

¹Master Dissertation in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (83p.) August, 2020.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 O cultivo da oliveira	3
2.2 Doenças da oliveira.....	7
2.2.1 Doenças causadas por vírus.....	7
2.2.1.1 <i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	10
2.2.1.2 <i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRv)	10
2.2.1.3 <i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	11
2.2.1.4 <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	12
2.2.1.5 <i>Olive leaf yellowing associated virus</i> (OLYaV)	13
2.2.1.6 <i>Olive latente virus 1</i> (OLV-1).....	13
2.2.2 Doenças causadas por fitoplasmas	14
2.2.3 Doenças causadas por bactérias	15
2.2.3.1 <i>Xylella fastidiosa</i>	15
2.2.3.2 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Pss).....	17
2.3 Métodos de detecção e diagnóstico	19
2.3.1 Métodos biológicos	19
2.3.2 Métodos sorológicos	20
2.3.3 Métodos Moleculares	21
2.3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase.....	21
2.3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.....	22
2.4 Validação de técnicas de detecção.....	23
2.5 Programas de certificação fitossanitária de material propagativo de oliveiras.....	24
2.6 Referências.....	25

	Página
3 CAPÍTULO 1.....	34
3.1 Introdução	35
3.2 Material e métodos.....	38
3.2.1 Desenho de iniciadores e sondas	38
3.2.2 Condições de amplificação	38
3.2.3 Obtenção de extrato vegetal.....	39
3.2.4 Obtenção dos controles positivos.....	39
3.2.5 Extração de ácidos nucleicos	40
3.2.6 Obtenção do Limite de Detecção (LD)	40
3.2.7 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da PCR em tempo real.....	41
3.2.8 Determinação da prevalência dos patógenos em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais	42
3.3 Resultados e Discussão	42
3.3.1. Desenho de iniciadores e sondas	42
3.3.2. Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da PCR em tempo real.....	44
3.3.3. Determinação da prevalência dos patógenos em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais	50
3.4 Referências.....	53
4 CAPÍTULO 2.....	57
4.1 Introdução	58
4.2 Material e métodos.....	60
4.2.1 Desenho de iniciadores e sondas	60
4.2.2 Condições de amplificação por RT-PCR em tempo real	60
4.2.3 Condições de amplificação por RT-PCR convencional e sequenciamento....	60
4.2.4 Obtenção de extrato vegetal.....	61
4.2.5 Obtenção dos controles positivos.....	61
4.2.6 Extração ácidos nucleicos	62
4.2.7 Obtenção do Limite de Detecção (LD)	62
4.2.8 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da RT-PCR em tempo real.....	63
4.2.9 Determinação da prevalência do patógeno em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais	63

	Página
4.3 Resultados e Discussão	64
4.3.1 Desenho de iniciadores e sondas	64
4.3.2 RT-PCR convencional e sequenciamento.....	65
4.3.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da RT-PCR em tempo real	66
4.3.4 Determinação da prevalência do patógeno em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais	68
4.4 Referências.....	70
5 CONCLUSÕES GERAIS	72
6 APÊNDICES.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
TABELA 1. Principais países produtores de oliveira na safra 2018/2019.....	4
TABELA 2. Vírus descritos na cultura da oliveira e distribuição geográfica.....	9

CAPÍTULO 1

TABELA 1. Materiais de referência utilizados na validação para a detecção dos patógenos alvos em plantas de oliveiras por RT-PCR.....	39
TABELA 2. Sequência dos iniciadores e sondas TaqMan desenhados ou utilizados neste trabalho.....	43
TABELA 3. Parâmetros de desempenho da PCR em tempo real estabelecidos para cada patógeno alvo.....	45
TABELA 4. Tabela de resultados para validação molecular dos métodos.....	46
TABELA 5. Número de plantas analisadas em proporção ao total de plantas de cada cultivar presentes no viveiro.....	50

CAPÍTULO 2

TABELA 1. Materiais de referência utilizados na validação para detecção do OLYaV em plantas de oliveira por RT-PCR em tempo real.....	62
TABELA 2. Tabela de resultados para validação molecular do método.....	66
TABELA 3. Detecções do <i>Olive leaf yellowing associated virus</i> (OLYaV) nos diferentes cultivares presentes no viveiro.....	68

RELAÇÃO DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Página

FIGURA 1. Faixas de latitude entre 30° e 45°, tanto no hemisfério sul como no hemisfério norte, propícias ao cultivo da oliveira. Modificado de Civantos 1998.....	5
FIGURA 2. Zoneamento edafoclimático da olivicultura no Rio Grande do Sul (Filippini-Alba <i>et al.</i> , 2014).....	6
FIGURA 3. Cultivar ‘Frantoio’ infectada pelo SLRSV, cv. ‘Frantoio’ saudável e cv. ‘Raggiola’ infectada pelo SLRSV. Aspectos morfológicos dos cultivares infectados com sintomas idênticos (Pequenas inflorescências e folhas estreitas) (Albanese <i>et al.</i> , 2012).	12
FIGURA 4. Sintoma de superbrotamento em plantas de oliveira (Ferreira, 2017).....	15
FIGURA 5. Sintomas causados por <i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i> em oliveira. A esquerda, sintomas iniciais em folhas e ramos e a direita, sintomas em toda a planta (EPPO, 2019). ..	17
FIGURA 6. Tumores em plantas de oliveira causados por <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (EPPO, 2020c).	18

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Curvas de amplificação por PCR ou RT-PCR em tempo real, demonstrando as diluições seriadas dos patógenos alvos na determinação do limite de detecção e funcionamento dos iniciadores e sondas do SLRSV.....	44
---	----

CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real, demonstrando o funcionamento dos iniciadores e da sonda do OLYaV.....	65
--	----

1 INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma espécie arbórea originária de países do Mediterrâneo. Sua importância está além dos seus produtos (azeitona e azeite de oliva), mas também relacionado a fatores históricos bíblicos e da cultura regional de diversos países. Além disso, o consumo do azeite de oliva e de azeitonas traz diversos benefícios a saúde humana e animal, tornando uma opção atrativa para a diversificação de culturas.

No Brasil, a área cultivada é considerada pequena quando comparada ao potencial de expansão de terras cultiváveis e a demanda pelo produto no mercado brasileiro. O Rio Grande do Sul é o estado com maior expressividade no plantio de oliveiras. A cada ano, aumenta a procura por material propagativo da cultura e o plantio em novas áreas, principalmente, em pequenas propriedades ou áreas não propícias aos cultivos de culturas tradicionais.

O material vegetal contaminado pode servir como fonte de inóculo para disseminar patógenos entre países e continentes. O Brasil não possui um programa de certificação de mudas de oliveira, o que não garante a produção e a introdução de material vegetal de qualidade livre de patógenos à cultura. Conseqüentemente, não há conhecimento do estado sanitário das plantas já cultivadas no país. A oliveira pode ser afetada por uma série de patógenos, tais como vírus, bactérias e fitoplasmas, que causam doenças conhecidas, infecções latentes e outras de etiologia ainda desconhecida. Muitas destas causam sintomas indefinidos, outras assemelham-se a problemas nutricionais ou a fatores climáticos, o que dificulta o diagnóstico visual, tornando indispensável o uso de técnicas avançadas para detecção de patógenos.

A ausência de análises eficientes, precisas e confiáveis para a detecção e diagnose de patógenos transmitidos por material propagativo da oliveira coloca em risco toda a cadeia produtiva, já que o material é propagado sem conhecimento do seu estado sanitário. A detecção destes patógenos, principalmente, dos vírus, requer estas análises

mais sensíveis, devido a dificuldade na visualização dos sintomas nas mudas, associado a complexidade biológica destes patógenos em interação com as plantas. O avanço das técnicas de análise tem evoluído ao longo dos anos e recentemente o uso de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em suas versões convencional, em tempo real (PCR) e transcriptase reversa (RT-PCR), tem se mostrado uma ferramenta imprescindível a ser inserida nos principais programas de certificação.

A aplicação de novas técnicas e o desenvolvimento de protocolos de detecção de patógenos em oliveiras baseados na técnica da PCR, apesar de geralmente mencionada como sensível e específica, necessita do estudo de alguns parâmetros de desempenho, de forma a garantir a confiabilidade e a precisão dos resultados obtidos. A validação e ou verificação dos desempenhos é um estudo experimental e documentado que objetiva avaliar se o procedimento analítico adotado, incluindo todo o processo e estruturação para análise, é adequado a finalidade proposta, colaborando na certeza dos resultados obtidos. Além disso, para a implementação de um programa de certificação de mudas de oliveiras no Brasil é preciso certificar-se da eficiência dos métodos e fundamentos das técnicas para que estes possam ser aplicados por institutos de pesquisa e laboratórios de análise com a mesma confiabilidade.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver, validar e ou verificar protocolos de RT-PCR e PCR em tempo real para detecção de vírus, bactérias e fitoplasmas que afetam a cultura da oliveira. Também analisar o material propagativo de oliveiras, provenientes de viveiro comercial, possibilitando a multiplicação exclusiva de material livre de patógenos, gerar conhecimentos e informações necessárias para o manejo e controle das doenças causadas por estes patógenos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O cultivo da oliveira

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma das mais antigas espécies arbóreas cultivadas no mundo. É uma planta angiosperma dicotiledônea da família Oleaceae, com porte arbóreo e adaptada ao clima mediterrâneo. Como possui uma estrutura xerofítica, desenvolve-se bem em diversos ambientes, incluindo verões quentes, longos e secos, com baixos índices pluviométricos. Atualmente, é cultivada no sul da Europa, principalmente nos países mediterrâneos como Portugal, Espanha, França, Itália e Grécia, norte da África, América do Norte e América do Sul, além de alguns países da Ásia (Villa, 2007; Filippini-Alba *et al.*, 2014). De acordo com dados do conselho oleícola internacional (IOC, 2020), a área total cultivada com oliveiras no mundo ultrapassa os 12 milhões de hectares, estimando para safra 2019/20 uma produção acima dos 2,9 milhões de toneladas, sendo a Espanha o maior produtor (Tabela 1). Deste total, 10% são destinados à comercialização de azeitonas de mesa e 90% para a produção de azeite de oliva (Menezes, 2016).

No Brasil, a produção ainda é insignificante se comparada ao consumo nacional. A área cultivada é de 10.000 ha, distribuídos nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, porém em sua maioria composta por plantas jovens que ainda não atingiram o pico de produção. Consequentemente, o nosso país é o segundo maior importador mundial de azeite de oliva e azeitonas. As importações cresceram de 13,6 mil toneladas para 71 mil toneladas em 22 anos. No mesmo período de tempo, o consumo mundial aumentou apenas 1,7 vezes (IBRAOLIVA, 2020).

TABELA 1. Principais países produtores de oliveira na safra 2018/2019.

Países	Produção (Toneladas)	Área (Hectares)
Espanha	587.800	2.573.000
Turquia	423.500	845.000
Egito	400.000	67.000
Argélia	299.500	424.000
Grécia	167.000	887.000
Marrocos	130.000	1.000.000
Síria	100.000	765.000
Argentina	80.000	61.000
Irã	60.000	66.000
Peru	50.000	17.000
Itália	40.000	1.165.000
Outros Países	627.700	7.699.427
TOTAL	2.885.500	12.000.000

A origem da oliveira não é bem definida, sendo atribuída à Síria ou Líbia. Nestes locais, registros históricos apontam para o cultivo há mais de 10.000 anos antes de Cristo (a.C). Depois a oliveira foi cultivada provavelmente na Grécia (700 a.C), Marselha (600 a.C) e Roma (500 a.C) (Wrege *et al.*, 2009). Com o passar do tempo, foi gradativamente introduzida em quase todos locais do mundo que apresentam compatibilidade climática (Figura 1). Na América, os registros indicam que as primeiras oliveiras foram introduzidas no México, Estados Unidos da América e Peru, difundindo-se depois para outros países como Chile e Argentina. No Brasil, os primeiros cultivos datam do período colonial. No entanto, a coroa portuguesa ordenou o corte dos pequenos pomares para evitar a concorrência aos produtos portugueses naquela época. Recentemente, a oliveira foi introduzida em vários estados, principalmente, nas Regiões Sul e Sudeste, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (Rosa, 2012; Filippini-Alba *et al.*, 2014).

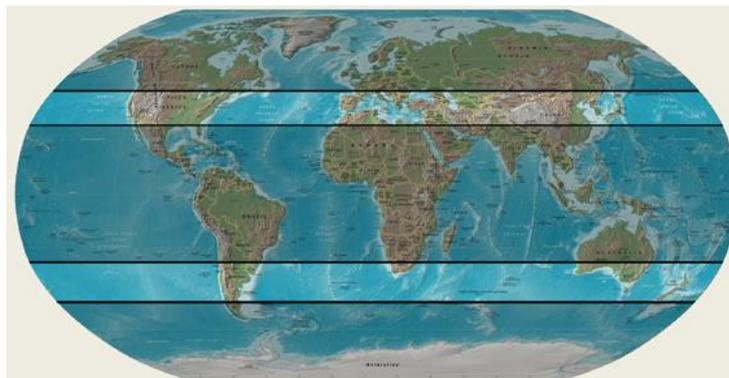


FIGURA 1. Faixas de latitude entre 30° e 45°, tanto no hemisfério sul como no hemisfério norte, propícias ao cultivo da oliveira. Modificado de Civantos 1998.

No Rio Grande do Sul, o cultivo da oliveira foi introduzido oficialmente pelo “Serviço Oleícola” (plano do governo estadual para estímulo do desenvolvimento desta cultura) em 1948. Estes primeiros olivais apresentaram baixa qualidade devido a pouca base técnica e orientação agrônômica. Já no final de década de 1960, foi implantado um pomar com mudas oriundas da Argentina no município de Uruguaiana. As análises em laboratórios brasileiros e italianos dos azeites e azeitonas produzidos demonstraram qualidade muito boa, compatível com produtos europeus. A partir daí o plantio foi intensificado, principalmente nas regiões sul e oeste do estado. No período de 2007 a 2013, foi realizado o zoneamento edafo-climático para identificar e propor as regiões aptas para implantação dos olivais (Figura 2) (Wrege *et al.*, 2009; Filippini Alba *et al.*, 2014).

Atualmente, mais de 160 propriedades em um total aproximado de 5.500 hectares (quase todas localizadas na metade sul do estado) têm plantações de oliveiras. Destes, 1.500 ha estão em fase de produção, conforme dados do programa estadual de olivicultura (PRÓ-OLIVA) e, no ano de 2019, 198.664 litros de azeite foram processados de 1.700.000 kg de azeitonas, posteriormente comercializados em 34 marcas de azeites extra virgens. Destacam-se os municípios de Caçapava do Sul, Pinheiro Machado, Cachoeira do Sul, Santana do Livramento, Canguçu, Dom Pedrito, Candiota, Jaguarão, Bagé, Encruzilhada do Sul, Formigueiro, Piratini, São Sepé e Barra do Ribeiro (PRÓ-OLIVA, 2020).

A escolha específica dos locais de produção considera o clima, que deve ser propício para o florescimento, a polinização e a fixação dos frutos, bem como a maturação e, principalmente, a qualidade final dos produtos. A escolha da variedade adequada também é fundamental. As principais diferenças entre os cultivares estão

relacionados ao destino da produção (azeitonas e/ou azeite de oliva) e sabor. Os cultivares Arbequina, Picual, Koroneiki, Frantoio, Arbosana, Coratina, Leccino, Lechin de Sevilla e Cipressino são destinadas à produção de azeite, já Ascolana e Manzanilla são utilizados na produção de azeitonas para mesa. Também existem cultivares de dupla finalidade, como Galega Ato D'ouro (Cappellaro *et al.*, 2015). Estes cultivares estão no registro de cadastro de viveiristas junto ao programa estadual de olivicultura (PRÓ-OLIVA), seguindo orientações e avaliações agronômicas realizadas pela Embrapa Clima Temperado (Cappellaro *et al.*, 2009, PRÓ-OLIVA, 2020).

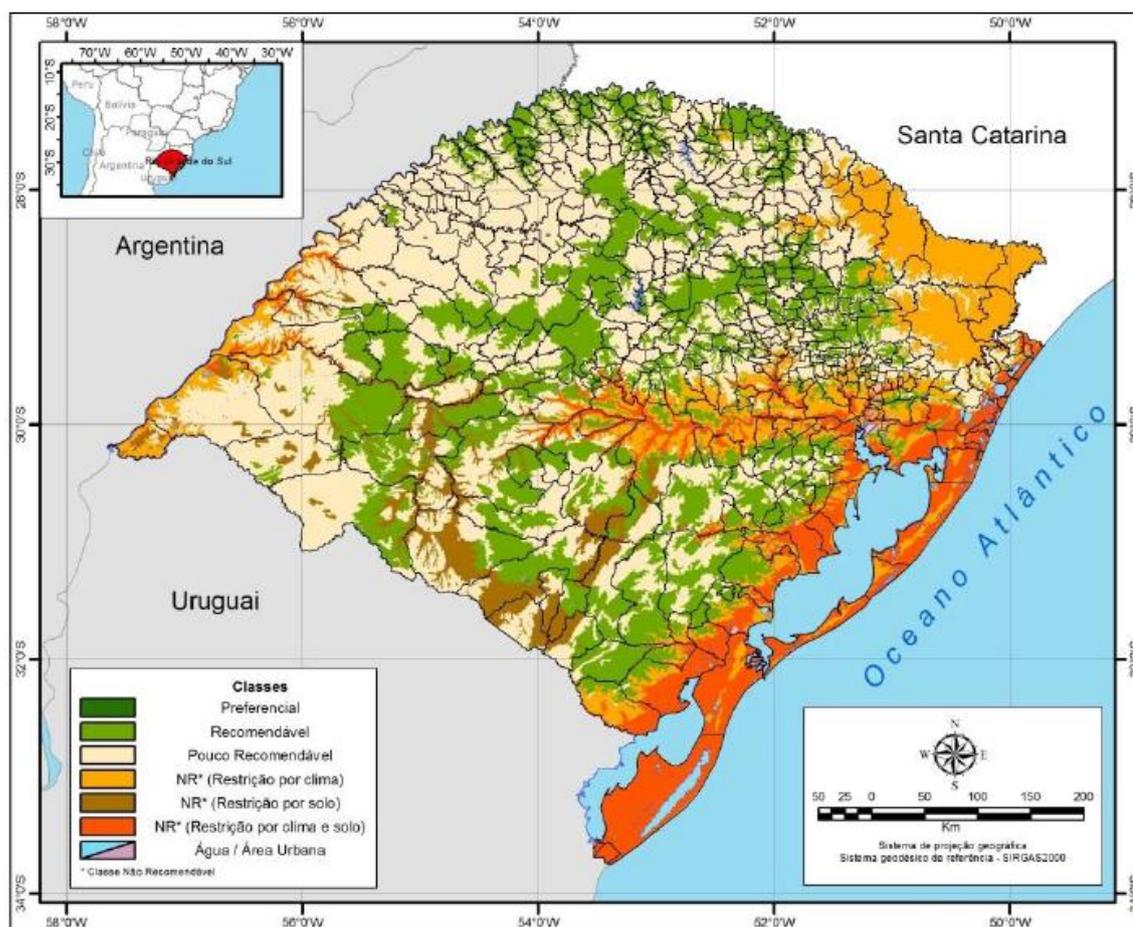


FIGURA 2. Zoneamento edafoclimático da olivicultura no Rio Grande do Sul (Filippini-Alba *et al.*, 2014).

Embora o cultivo da oliveira no Brasil tenha se mostrado uma boa opção como alternativa de plantio e diversificação de renda, alguns desafios para o seu avanço ainda devem ser superados. Alguns fatores ainda requerem atenção dos produtores, extensionistas rurais, pesquisadores e demais envolvidos na área. Primeiramente, ainda se necessitam de estudos sobre a interação entre a planta, solo e clima, para entender melhor o comportamento dos cultivares em diferentes regiões do país. Também, devem-

se considerar problemas fitossanitários da cultura. As doenças fúngicas, assim como em outros países, no Brasil causam perdas significativas, principalmente, devido as condições climáticas de umidade, temperatura e alto índice pluviométrico. Outro fator está na ausência de um programa de certificação de mudas de oliveiras que garante a qualidade genética e, principalmente, a qualidade fitossanitária do material vegetativo produzido e/ou introduzido no país. Sem este programa, doenças conhecidas e aquelas de etiologia indefinidas podem entrar no Brasil e causar danos importantes a cultura.

2.2 Doenças da oliveira

A oliveira é suscetível a várias doenças que podem reduzir o rendimento e a qualidade da produção. No Rio Grande do Sul, as principais doenças diagnosticadas até o momento são causadas por fungos (Cappellaro *et al.*, 2015). No entanto, ainda não existem pesquisas detalhadas sobre a qualidade fitossanitária do material produzido no Brasil e principalmente introduzido anos atrás no início da cultura no país. Outras doenças causadas por bactérias e fitoplasmas causam danos severos, e também as viroses, as quais requerem estudos mais detalhados da interação destes patógenos e dos sintomas causados nas plantas. Muitos destes patógenos estão presentes no solo ou transmitidos por insetos e material vegetal (Çaglayan *et al.*, 2011).

2.2.1 Doenças causadas por vírus

A oliveira é hospedeira de uma ampla gama de vírus nos diferentes locais de cultivo comercial no mundo. Porém, sua importância econômica e agrônômica parece menos importante quando comparada a infecções em outras árvores frutíferas. Historicamente, os estudos sobre doenças virais em oliveiras começaram no final da década de 1930 na Itália e foram retomados a partir da década de 1950 na Espanha, Itália e outros países (Felix & Clara, 2006; Martelli, 2003).

A primeira evidência experimental da presença de vírus em oliveiras foi em 1976, por acaso, em grãos de pólen do cv. ‘Corregiolo’ sem sintomas. Estas partículas isoladas foram identificadas como sendo do vírus *Strawberry latent ringspot virus* – SLRSV (Pacini and Cresti, 1977 *apud* Çaglayan *et al.*, 2011). Já nos anos 1980, com o avanço das técnicas de detecção, novos vírus foram sendo identificados. A exemplo disso, foi demonstrado em um estudo, pela redução da capacidade de enraizamento de estacas semi-lenhosas de diferentes cultivares de oliveiras infectadas por vírus (Leitão *et al.*, 1997).

A grande maioria dos vírus de oliveira foram detectados pela primeira vez em plantas com sintomas desconhecidos e sem associação com alguma outra doença já conhecida (Martelli, 2013). Em geral, a ocorrência de “frutos irregulares” e “amarelecimento das folhas” podem ser associados a uma doença de origem viral (Martelli, 2003). Porém, a ausência de técnicas eficientes de detecção dificultou o avanço de estudos na área, principalmente, a associação da sintomatologia com a presença destes vírus. Nas últimas décadas, o avanço das técnicas de detecção tem possibilitado uma melhor classificação e identificação destes patógenos em oliveiras. Assim, novos vírus passaram a ser identificados em oliveiras. De acordo com Çaglayan *et al.* (2011), consideram-se 3 estados diferentes no processo de infecção em oliveiras: 1) Plantas doentes sem a identificação de nenhum agente causal; 2) Plantas sem sintomas, porém, vários vírus detectados (latentes); 3) Plantas com distúrbios visíveis (amarelecimento, clorose, má formação folhas e frutos, etc.) associados a presença de um ou mais vírus.

Um importante fator no estudo dos vírus da oliveira está na forma em que estes se disseminam. O material propagativo infectado é a principal forma de disseminação e, levando em consideração que a obtenção de novos materiais se dá principalmente pelo método de estaquia, a eficiência na propagação destes patógenos aliado a ausência de programas sanitários que certifiquem a qualidade destes materiais facilitam a entrada e trânsito de materiais contaminados (Penso *et al.*, 2016). A transmissão de vírus por vetores, como nematoides do gênero *Longidorus* e *Xiphinema*, sementes e grãos de pólen também podem ocorrer, porém com baixa eficiência (Rumbou *et al.*, 2009; Albanese *et al.*, 2012).

Até o momento, 15 espécies de 8 gêneros virais diferentes foram detectadas em oliveiras, sendo algumas relatadas em outras espécies vegetais e aquelas específicas da cultura (Albanese *et al.*, 2012). Para uma melhor classificação, essas viroses foram divididas em dois grupos principais: vírus identificados pela primeira vez em oliveiras (todos com *Olive* na denominação) e aqueles já conhecidos por infectar diferentes culturas (incluindo a oliveira). No primeiro grupo estão inclusos os *Nepovirus*: *Arabis mosaic virus* (**ArMV**) (Savino *et al.*, 1979); *Cherry leaf roll virus* (**CLRV**) e *Olive latent ringspot virus* (**OLRSV**) (Savino & Gallitelli, 1981); os *Necrovirus*: *Tobacco necrosis virus* (**TNV**) e *Olive latente virus 1* (**OLV-1**) (Gallitelli & Savino, 1985; Felix & Clara, 2002); os *Tobamovirus*: *Tobacco mosaic virus* (**TMV**) (Triolo *et al.*, 1996); *Cucumovirus*, *Cucumber mosaic virus* (**CMV**) (Savino & Gallitelli, 1983); e

Secoviridae, *Strawberry latent ringspot virus* (**SLRSV**) (Savino *et al.*, 1979). Já no segundo grupo estão aqueles isolados apenas em oliveiras, sendo classificados como específicos da cultura, o *Oleavirus Olive latente virus 2* (**OLV-2**) (Savino *et al.*, 1984); o *Olive leaf yellowing associated virus* (**OLYaV**) (Savino *et al.*, 1996) ainda não classificado a um gênero específico mas pertencente à família *Closteroviridae*; o *Potexvirus, Olive vein yellowing associated virus* (**OVYaV**) (Faggioli & Barba, 1995); o *Necrovirus, Olive mild mosaic virus* (**OMMV**) (Cardoso *et al.*, 2005); o *Marafivirus, Olive latente virus 3* (**OLV-3**); e sem classificação de gênero o *Olive semi-latente virus* (**OSLV**) (Materazzi *et al.*, 1996) e o *Olive yellow mottling and decline associated virus* (**OYMDaV**) (Savino *et al.*, 1996) (Tabela 2).

TABELA 2. Vírus descritos na cultura da oliveira e distribuição geográfica.

Sigla	Vírus	Gênero/família	Distribuição Geográfica/Continte
ArMV	<i>Arabid mosaic virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Europa, Ásia, África e América do Norte.
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virus</i>	<i>Secoviridae</i>	Europa, Ásia, África e América do Norte.
CLRV	<i>Cherry leaf roll virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Europa, Ásia e África.
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Europa, Ásia e América do Norte.
TNV	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Necrovirus</i>	Europa, Ásia e América do Norte.
OLRSV	<i>Olive latente ringspot virus</i>	<i>Nepovirus</i>	Europa, Ásia e África.
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	Europa, Ásia, África, América do Norte e Oceania.
OLV-2	<i>Olive latente virus 2</i>	<i>Oleavirus</i>	Europa, Ásia e África.
OVYaV	<i>Olive vein yellows associated virus</i>	<i>Potexvirus</i>	Europa e Ásia.
OSLV	<i>Olive semi-latent virus</i>	Indeterminado	Europa e Ásia
OYMDaV	<i>Olive yellow mottling and decline associated virus</i>	Indeterminado	Europa e Ásia
OLYaV	<i>Olive leaf yellowing associated virus</i>	<i>Closteroviridae</i>	Europa, Ásia, África, América e Oceania.
OMMV	<i>Olive mild mosaic virus</i>	<i>Necrovirus</i>	Europa e Ásia.
OLV-1	<i>Olive latente virus 1</i>	<i>Necrovirus</i>	Europa, Ásia, África e América do Norte.
OLV-3	<i>Olive latente virus 3</i>	<i>Marafavirus</i>	Europa e Ásia.

Alguns vírus de oliveira, por serem os mais disseminados a nível mundial foram incluídos em programas de certificação fitossanitária de material vegetal propagativo de vários países.

2.2.1.1 *Arabis mosaic virus* (ArMV)

Pertencente a família *Secoviridae*, gênero *Nepovirus*, com genoma bipartido de fita simples de RNA sentido positivo com peso molecular de 2,4 e 1,4 x 10⁶ respectivamente. As partículas virais são isométricas e possuem 30nm de diâmetro e uma única proteína da cápside (CP) com peso de 54 x 10³ (EPPO, 2020a). Este vírus pode ser transmitido por nematoides da espécie *Xiphinema diversicaudatum*, mas a forma mais eficiente ocorre através de material propagativo contaminado. A disseminação por sementes também pode ser considerada, mas sem importância para culturas que não utilizam este método de multiplicação comercial, como é o caso da oliveira. Várias espécies de plantas podem hospedar o vírus ArMV, sendo as principais o morango, lúpulo, várias espécies de videiras, framboesas, beterraba, rabanete e a alface, além de plantas sem importância comercial (Çaglayan *et al.*, 2011). Os sintomas mais comuns causados pelo ArMV variam dependendo da planta hospedeira e normalmente são manchas nas folhas, descolorações e várias formas de deformações. Em oliveiras o ArMV não causa sintomas visíveis, ocorrendo de forma latente (Martelli, 2003). O vírus está presente em oliveiras em diversos países como Itália, Egito, EUA, Síria e Líbano (Chliyeh *et al.*, 2017).

2.2.1.2 *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Pertencente à família *Secoviridae*, gênero *Nepovirus*, possui genoma de RNA fita simples sentido positivo e partículas isométricas com 28 nm de diâmetro (AUSTRALIA, 2018). Relatado pela primeira vez em cerejeiras na Inglaterra, já é descrito em outras plantas como *Ulmus*, noz, sabugueiro, framboesas, oliveiras, kiwi, além de outras plantas arbustivas e também hortícolas (Woo *et al.*, 2012). Muitas vezes, os sintomas incluem atraso no desenvolvimento, enrolamento das folhas, riscas ou manchas cloróticas, atrofia dos ramos, bem como morte da planta, porém em oliveiras o CLRV é assintomático (Savino & Gallitelli, 1981; Rebenstorf *et al.*, 2006). A transmissão desse vírus ocorre por sementes e pólen, não ocorrendo através de nematoides conforme outros membros desse gênero. Em oliveiras a transmissão por sementes foi comprovada por Saponari *et al.* (2001). A presença em oliveiras foi reportada na Itália, Portugal, Espanha, Egito, Turquia, Síria e Líbano (Chliyeh *et al.*, 2017).

2.2.1.3 *Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)*

Vírus pertencente a família *Secoviridae*, ainda não classificado em nenhum gênero, mas possivelmente um *Nepovirus* (Faggiolli *et al.*, 2002; Albanese *et al.*, 2012). Sua morfologia é isométrica com 30 nm de diâmetro e seu genoma é composto por duas partículas de RNA de fita simples e sentido positivo. É transmitido por inoculação mecânica, por enxertia e também por nematoides da espécie *Xiphinema diversicaudatum*. Em diversas espécies vegetais a transmissão por sementes também pode ocorrer (Mazyad *et al.*, 2014). O SLRSV acomete uma ampla gama de hospedeiros, como morangos e framboesas, além de amoreiras, cerejeiras, videiras, ameixeiras, pessegueiros e plantas sem importância econômica. Na grande maioria das espécies o SLRSV é assintomático, mas quando ocasiona sintomas, estes podem ser manchas foliares cloróticas, seguida de necroses e declínio das plantas (EPPO, 2020b). Em oliveiras foi isolado a primeira vez em plantas do cultivar “Corregiolo” na Itália por Savino *et al.* (1979). De modo geral, é assintomático na cultura, porém plantas dos cvs. ‘Raggiola’ e ‘Frantoio’ que são considerados diferentes morfologicamente, mas com alta homologia genética, foi constatado que a presença repetida do vírus SLRSV no cv. ‘Raggiola’ seria a causa desta diferenciação morfológica entre os dois cultivares (Figura 3). Estas diferenças morfológicas estão relacionadas ao formato das folhas e das inflorescências (Ferretti *et al.*, 2002 *apud* Albanese *et al.*, 2012). Outro estudo propôs o baixo enraizamento de estacas dos cultivares ‘Galega’, ‘Blanqueta’, ‘Manzanilla Algarvia’, ‘Carrasquenha’ e ‘Manzanilla dos Hermanos’ com a infecção do SLRSV nas plantas (Leitão *et al.*, 1997). Em oliveiras já foi relatado em diversos países como: Itália, Croácia, Portugal, Espanha, Albânia, Síria, Turquia, Egito, Líbano e nos EUA (Chliyeh *et al.*, 2017).

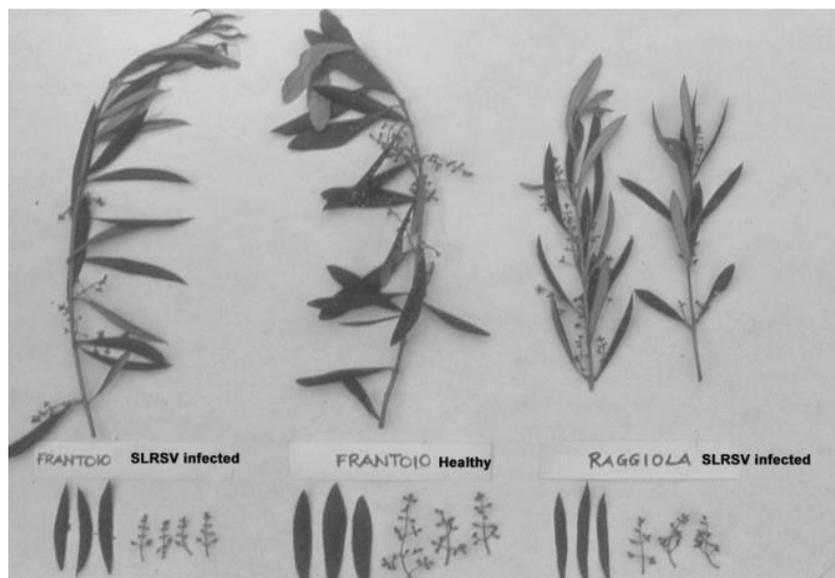


FIGURA 3. Broto do cultivar ‘Frantoio’ infectado pelo SLRSV, broto do cv. ‘Frantoio’ saudável e brotos do cv. ‘Raggiola’ infectados pelo SLRSV. Aspectos morfológicos dos cultivares infectados com sintomas idênticos (Pequenas inflorescências e folhas estreitas) (Albanese *et al.*, 2012).

2.2.1.4 *Cucumber mosaic virus (CMV)*

O CMV é membro da família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*. Possui três partículas esféricas com aproximadamente 28 nm cada uma e seu genoma é composto por RNA de fita simples sentido positivo (Canto *et al.*, 1997). O CMV é um dos vírus de maior preocupação no mundo, podendo infectar mais de 1.200 espécies de 100 famílias diferentes, tanto mono como dicotiledôneas, acometendo desde plantas ornamentais, hortícolas à plantas lenhosas. Entre as mais importantes destacam-se as cucurbitáceas (pepino, chuchu, abóbora, melão, melancia, outras), feijão, tomate, soja, alfafa, salsa, alface, batata, cenoura, plantas ornamentais como dália e lírio, além de plantas semi-lenhosas como maracujá. Os sintomas em plantas infectadas podem variar de atrofia e rugosidades foliares, mosaicos, manchas cloróticas, baixa qualidade dos frutos e enrolamento das folhas, variando de acordo com época do ano, idade e espécie da planta. Em oliveiras, o CMV foi detectado por Savino & Galitelli (1983). A transmissão deste vírus ocorre por meio de sementes e uma ampla gama de insetos vetores, onde mais de 80 espécies de pulgões, incluindo *Myzus persicae* e *Aphis gossipy*, são potenciais transmissores (Jones *et al.*, 2008). Em oliveiras a infecção do vírus é assintomática e não há relatos da formação de colônias de pulgões nas plantas, não sendo relevante a transmissão do CMV por insetos vetores. O principal meio de transmissão do vírus na cultura é através do material propagativo contaminado

(Albanese *et al.*, 2012). Há relatos do vírus em diversos locais de plantios comerciais de oliveiras no mundo, principalmente pela grande variedade de hospedeiros naturais, incluindo Itália, Espanha, Portugal, Tunísia, Egito, Albânia, Turquia, Síria, Argélia, Austrália, França, Israel, Marrocos, Grécia e Líbano (Chliyah *et al.*, 2017).

2.2.1.5 Olive leaf yellowing associated virus (OLYaV)

Membro da família *Closteroviridae* mas sem classificação a nível de gênero. Este vírus possui RNA de fita simples sentido positivo (Fontana *et al.*, 2019). Vírus específico da cultura da oliveira, foi relatado pela primeira vez na Itália em plantas do cv. ‘Biancolilla’, causando o sintoma de amarelecimento das folhas em oliveiras (Savino *et al.*, 1996). Outros prováveis sintomas como necrose, má formação dos frutos e desfolha podem ser associados a presença do OLYaV, mas também de outras viroses específicas da oliveira. Além disso, o OLYaV demonstra ser um dos vírus mais difundido da cultura, detectado em 43% das plantas analisadas para o vírus na Espanha e 93,8% na Califórnia - EUA (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Faggioli *et al.*, 2017). A alta incidência do OLYaV ainda não está clara, podendo estar associada a alguns vetores, como cochonilhas do gênero *Pseudococcus* (Sabanadzovic *et al.*, 1999). De momento, a propagação do vírus por mudas contaminadas ainda é a forma mais eficiente de transmissão. Países como Chile, EUA, Austrália, além dos principais produtores, já possuem relatos da presença do vírus (Chliyah *et al.*, 2017).

2.2.1.6 Olive latent virus 1 (OLV-1)

Pertence a família *Tombusviridae*, gênero *Necrovirus*. Possui partículas isométricas de 30nm e genoma composto de RNA de fita simples sentido positivo. O OLV-1 inicialmente era considerado específico da oliveira, porém foi isolado também em plantas cítricas e tulipas com manchas cloróticas nas folhas (Martelli *et al.*, 1996). Em Portugal, três cultivares de oliveira apresentavam baixo vigor e clorose foliar, sendo associados com a confirmação da presença do OLV-1. Em outros casos o vírus é assintomático em oliveiras (Félix *et al.*, 2006). Por ser um *Necrovirus*, a transmissão por fungos da espécie *Olpidium brassicae* é considerada, mas sem confirmação (Martelli, 2013). Além disso, o OLV-1 já foi relatado em diversos países em diferentes continentes, destacando que o comércio de mudas e novos materiais entre viveiros e produtores pode ser a principal fonte de disseminação de vírus e outros patógenos da cultura (Chliyah *et al.*, 2017).

2.2.2 Doenças causadas por fitoplasmas

Os fitoplasmas pertencem aos Procariotos, bactérias pleimórficas sem parede celular, pertencentes a classe mollicutes, com tamanho de 200 a 800 nm e pequeno genoma com cerca de 680-1600 kb. São endoparasitas obrigatórios habitantes do floema (Nerodi, 2004). Podem ser transmitidos através de insetos vetores, enxertia e plantas parasitas (Bedendo, 2011). Naturalmente, vetores que se alimentam a nível de floema são potenciais transmissores, em especial insetos da ordem Hemiptera. Em plantas de oliveira a única evidência foi relatada na Itália por Del Serrone *et al.* (1996), onde cigarrinhas do gênero *Hyalestes* spp. foram capturadas em armadilhas dispostas em plantas sintomáticas. De modo geral, não há associação de nenhum vetor como possível transmissor destes fitoplasmas, o que explica a baixa transmissão do patógeno dentro de uma mesma área (Çaglayan *et al.*, 2011). Com base nas características destes organismos, em especial a dificuldade de se cultivar *in vitro*, os fitoplasmas são classificados como ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ (Firrao, 2004). Com o sequenciamento do gene de RNA 16S, os fitoplasmas que acometem várias espécies vegetais foram identificados e classificados. Quatro diferentes espécies foram identificadas causando distúrbios em oliveiras, pertencentes aos grupos e subgrupos 16S-IB (‘*Ca. Phytoplasma asteris*’), 16S-VA (‘*Ca. Phytoplasma ulmi*’), 16S-XIIA (‘*Ca. Phytoplasma solani*’), 16S-IC (‘*Ca. Phytoplasma asteris*’) e 16Sr-III (‘*Ca. Phytoplasma pruni*’)(Pasquini *et al.*, 2000; Bertaccini *et al.*, 2002 *apud* Martelli, 2013). Após o primeiro relato na Itália em 1995, vários trabalhos confirmaram a associação entre distúrbios nas folhas da oliveira com a presença de fitoplasmas na Espanha, Itália e Irã (Pasquini *et al.*, 2000; Ahangaran *et al.*, 2006). A presença de fitoplasmas em plantas de oliveiras também foi relatada na Albânia, e na Austrália (Chliyen *et al.*, 2017).

Diferentemente dos vírus, a presença de fitoplasmas em oliveiras pode causar vários sintomas, sendo mais conhecido o “Vassoura de Bruxa”, caracterizado pelo superbrotamento dos ramos (Figura 4). Podem estar acompanhados por mais alterações na planta como descoloração do floema, alongamento ou encurtamento de entrenós, anomalias florais, enrolamento e amarelecimento foliar, necrose, redução tamanho das folhas, desfolha, declínio e morte da planta. No Brasil, Ferreira (2017), descreveu pela primeira vez a ocorrência de fitoplasmas em plantas de oliveiras em 73% das plantas analisadas. Além disso, o primeiro relato da associação de fitoplasmas do grupo 16Sr-VII com a doença “Vassoura de Bruxa”.



FIGURA 4. Sintoma de superbrotamento em plantas de oliveira (Ferreira, 2017).

2.2.3 Doenças causadas por bactérias

As doenças causadas por bactérias causam danos expressivos no cultivo da oliveira. O controle destas patologias é difícil e as formas de propagação são várias, incluindo insetos vetores, ferimentos em folhas ou galhos e, principalmente por material vegetal contaminado. Na oliveira, uma bacteriose foi recém classificada como umas das principais doenças da cultura, causando danos severos e perdas significativas nos pomares. A seguir, são descritas as duas principais bactérias que acometem a oliveira:

2.2.3.1 *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram negativa, pertencente a família Xanthomonadaceae, limitada ao xilema das plantas, com formato de pequenos bastonetes (0,1 – 0,5 um X 1,0 – 5,0 um) imóveis e atríquios (sem flagelos). Desenvolve-se bem com temperatura de 25-28°C e baixo índice pluviométrico (Queiroz-Voltan *et al.*, 2004). Possui uma ampla gama de hospedeiros, sendo descritos mais de 500 plantas pertencentes a 82 famílias (IAS, 2019). Porém, apesar do grande número de hospedeiros, boa parte não manifesta sintomas, servindo apenas como fonte de inóculo para plantas com maior importância. Insetos da ordem Hemiptera são os principais disseminadores deste patógeno, em especial as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae). O hábito alimentar destes insetos é fundamental para a aquisição da bactéria e transmissão para outras plantas, isso porque *Xylella fastidiosa* habita os vasos do xilema e também é o principal ponto de alimentação destes insetos-vetores.

A espécie *Xylella fastidiosa* foi dividida em seis subespécies de acordo com a diversidade bioquímica e fisiológica de cada isolado, classificadas como subespécies: *fastidiosa*, *multiplex*, *tashke*, *sandyi*, *mori* e *pauca* (Yuan *et al.*, 2010). Muitas destas

acometem plantas de importância comercial, como a subsp. *fastidiosa*, responsável pela causa do “mal-de-pierce” em videira (*Vitis vinifera*), além de sintomas de queimas das folhas em Amendoeiro (*Prunus dulcis*) e também nanismo em plantas de Alfafa (*Medicago sativa*). Na maioria dos hospedeiros os sintomas causados por *Xylella* estão associados a escaldadura das folhas, enfezamento, nanismo e clorose variegada. A *X. fastidiosa* subespécie *multiplex* é mais comum em Amendoeiro (*Prunus dulcis*), Pessegueiro (*Prunus persicae*), Damasqueiro (*Prunus armeniaca*), Ameixeira (*Prunus domestica*), Ulmeiro (*Ulmus americana*), Cercis (*Cercis canadenses*), Liquidâmbar (*Liquidambar styraciflua*) e Carvalho (*Quercus sp.*). Assim como a subsp. *mori* ocorre em Amoreira (*Morus spp.*), a subsp. *sandyi* em Oleandro (*Nerium oleander*) e a subsp. *tashke* em Chitalpa (*Chitalpa taskhentensis*) (Janse & Obradovic, 2010).

Já a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* é responsável por infectar plantas como Citros (*Citrus sp.*), Café (*Coffe sp.*) e, recentemente, Oliveiras (*Olea europeae*). Em plantas cítricas, causa a Clorose Variegada dos Citros (CVC), onde as folhas apresentam manchas cloróticas, redução no tamanho dos frutos, maturação precoce e com o avanço da doença, os frutos ficam queimados. A CVC é responsável por importantes perdas econômicas na citricultura de diversos países (Fundecitros, 2020). Em plantas de café, causa a escaldadura das folhas, sintoma mais comum, além de abscisão foliar, redução de crescimento, declínio do vigor, e quando muito avançado, morte da planta (Queiroz-Voltan *et al.*, 1998). Recentemente, a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* foi identificada como responsável pela “Síndrome do declínio rápido da oliveira” na região de Apúlia, Itália (Saponari *et al.*, 2013). Os sintomas nas plantas iniciavam com a seca de brotações novas que evoluíam para os ramos até atingirem a planta toda, e com rápida dispersão do patógeno em todo o pomar, associando a transmissão através de insetos-vetores, em especial as cigarrinhas (Hemiptera: Cicadellidae) (Figura 5). O grande número de plantas que hospedam esse patógeno e a alta comercialização de material vegetal entre diversos países onde há relatos da presença da bactéria acaba por ser a principal forma de entrada nos países onde não estava presente, principalmente por plantas não inclusas nos programas de certificação, sem contar com a rápida dispersão através dos vetores (Sicard *et al.*, 2018). Essa hipótese é reformada porque estudos genéticos apontam que a origem de três importantes subespécies é alopátrica, sendo *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* da América do Norte, *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* da América Central e a *X. fastidiosa* subsp. *pauca* da América do Sul (Nunney *et al.*, 2012). A diversidade genética existente a subespécie *pauca* é demonstrada nos isolados

das plantas de citros, café e oliveiras. Os Isolados de citros não causam danos a plantas de oliveiras, apenas isolados de café, mas todos pertencentes a *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Isto é demonstrado por Colleta-Filho *et al.* (2016), onde se obteve o primeiro relato de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* em plantas de oliveiras com sintomas de “Queima das Folhas” no Brasil. O país não possui um programa de certificação fitossanitário, conseqüentemente o autor sugere que a introdução da bactéria ocorreu por meio de mudas de café contaminados oriundos da Costa Rica. Este material foi detectado em novos pomares de oliveira no estado de São Paulo e Minas Gerais, importantes centros da cafeicultura brasileira (BRASIL, 2020). A *X. fastidiosa* subsp. *pauca* também foi relatada em oliveiras na Espanha, Portugal, França, Eslovênia, Equador, Costa Rica e EUA (Chliyen *et al.*, 2017; EPPO, 2019).



FIGURA 5. Sintomas causados por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* em oliveira. A esquerda, sintomas iniciais em folhas e ramos e a direita, sintomas em toda a planta (EPPO, 2019).

2.2.3.2 *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss)

Bactéria Gram negativa, da família das Pseudomonadaceae, pertencente ao complexo *syringae*. Descrita a centenas de anos (século IV - a.C.) em plantas de oliveiras com sintomas típicos causado por Pss. Conhecido como tuberculose da oliveira ou também “galha do olivo”, foi entre os anos de 1887-1889 que Luigi Savastano descreveu a etiologia desta doença (Smith, 1920).

A tuberculose da oliveira causa sintomas característicos que afetam principalmente ramos e troncos, quando muito avançada, também visível em folhas e frutos. Estes sintomas referem-se a uma hiperplasia do tecido vegetal, resultando no crescimento de tumores ou galhas que afetam direta e indiretamente o pleno desenvolvimento da planta (Figura 6). Além disso, esses tumores acabam por servir de

hospedeiros para insetos-praga e outros patógenos. A *P. savastanoi* pv. *savastanoi* apresenta ciclo de vida epifítico/patógeno. Na fase epifítica, a Pss coloniza ramos e folhas, mas também pode ser endofítica, colonizando o interior da planta, neste caso na parte interna dos tumores/galhas, sendo importante forma de sobrevivência desta bactéria (Ramos *et al.*, 2012). Esta capacidade de sobrevivência é extremamente importante para este microrganismo, tendo em vista que não é suscetível as variações ambientais e também a falta de nutrientes para sua sobrevivência, mantendo-se assim sem prejudicar o seu hospedeiro. Na fase patogênica, a Pss se multiplica nos tecidos vegetais, com crescimento bacteriano alternado conforme a suscetibilidade de cada cultivar de oliveira. A infecção requer uma rápida proliferação do câmbio e diferenciação do xilema e floema. As temperaturas ótimas de desenvolvimento estão entre 20-25°C, com crescimento bacteriano mais favorecido com elevadas temperaturas e alto índice pluviométrico, podendo permanecer nas plantas de oliveira de forma latente e assintomática até a possibilidade de condições ambientais favoráveis. A formação dos tumores se da pela produção bacteriana dos fitohormônios ácido 3-indol acético (AIA) e citocininas pela bactéria e, como resposta da planta, ocorrem os sintomas descritos (Quesada *et al.*, 2007; Vega-Celedón *et al.*, 2016).



FIGURA 6. Tumores em plantas de oliveira causados por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (EPPO, 2020c).

A transmissão da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* é considerada rápida em condições ambientais favoráveis ao patógeno e associado aos fatores chuva, ventos e práticas culturais como sendo os principais disseminadores à curtas distâncias. A infecção ocorre através de feridas nas plantas. Já a distâncias mais longas, a

disseminação ocorre principalmente pelo material vegetal contaminado (Nguyen *et al.*, 2018). Não há uma definição da ação de insetos vetores com a bactéria (Luthy *et al.*, 1983). Este patógeno foi relatado em quase todos os continentes, incluindo países como Espanha, Itália, França, Portugal, Jordânia, Tunísia, Marrocos, Egito, Argélia, Líbano, Grécia, Iraque, Turquia, Síria, Irã, Croácia, Nepal, China, Japão, EUA, Nova Zelândia e Austrália (Chliyen *et al.*, 2017). No Brasil, não há relatos da presença da Pss. A frequente comercialização de material vegetal na implantação dos novos pomares poderia introduzir o patógeno, porém os sintomas características seriam facilmente notados, também se considerar a distribuição dos plantios de oliveiras no Brasil e a diversidade climática de cada região, favorecendo ou não o pleno desenvolvimento da Pss, podemos propor que o patógeno ainda não está presente no país, sendo considerada portanto como uma praga exótica.

2.3 Métodos de detecção e diagnóstico

O uso de métodos de detecção de patógenos para diagnóstico de doenças é importante para garantir a sanidade vegetal e impedir a disseminação de diversos patógenos. As ferramentas de diagnóstico têm evoluído ao longo dos anos, a diagnose através da indexação biológica em plantas indicadoras evoluiu para testes sorológicos, como a técnica ELISA, até chegar aos métodos moleculares, como a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) “convencional” e em tempo real. Cada um destes métodos apresenta vantagens e limitações. A seguir serão descritos os métodos para a detecção e diagnóstico dos principais patógenos e doenças de oliveiras:

2.3.1 Métodos biológicos

A indexação biológica ou bioensaio é muito utilizado para o diagnóstico de viroses, e consiste em utilizar plantas indicadoras sensíveis e específicas para cada vírus. Por se tratar de uma espécie lenhosa, a enxertia é o método mais utilizado para este teste em oliveira. Porém, devido a inexistência de plantas lenhosas indicadoras e a ausência de sintomas na maioria das viroses torna o método biológico inviável para estudos de vírus em oliveiras (Martelli, 1998 *apud* Bertolini, 2003). Algumas limitações como, por exemplo, espaço requerido em campo e em casa de vegetação para a realização dos experimentos também dificulta o uso deste método em grande escala (Osman, 2008). Por outro lado, em casos de vírus já identificados por métodos mais confiáveis, o uso dos métodos biológicos serviria para avaliar a virulência do isolado

viral na planta através da inoculação mecânica ou enxertia, lembrando que a virulência pode variar conforme o cultivar escolhido (Faggioli *et al.*, 2005).

2.3.2 Métodos sorológicos

O teste sorológico de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) tem sido muito utilizado para a detecção de patógenos em plantas, devido a sua simplicidade, adaptabilidade e rapidez, podendo ser utilizado em grande escala para diagnose de um grande número de amostras ao mesmo tempo (Figueira, 2000; López *et al.*, 2003 e 2009). A técnica baseia-se no princípio clássico da sorologia, onde um antígeno é reconhecido pelo anticorpo (imunoglobulina-Ig), que lhe deu origem formando um complexo anticorpo-antígeno, associado à propriedades colorimétricas. A coloração do meio ocorre devido à ação de uma determinada enzima em contato com um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina (IgG), e a intensidade da coloração será medida em um espectrofotômetro com filtros adequados para o comprimento da onda a 405nm (Clark & Adams, 1977).

As limitações dos testes sorológicos estão na disponibilidade de antissoros produzidos contra um antígeno específico, no suporte físico utilizado, na padronização quanto à concentração adequada dos reagentes e do extrato vegetal que contém o patógeno. Embora o uso de técnicas biológicas (transmissão mecânica para hospedeiros herbáceos) associadas com testes sorológicos, utilizando antissoros específicos, permitiu a identificação precoce dos primeiros casos de infecção de oliveiras por nepovírus (SLRSV e ArMV) e, mais tarde, de outros vírus como OLRSV, CMV, CLRV, esta técnica geralmente não é de sensibilidade suficiente para ser considerada confiável para a detecção de viroses na oliveira (Savino *et al.*, 1979). De fato, as tentativas de aplicação de ELISA para o diagnóstico em grande escala de oliveiras geralmente falharam, isso porque, de acordo com Almeida & Lima (2001), o extrato vegetal pode conter substâncias como tanino e oxidantes que interferem nos resultados podendo originar falsos positivos. Também, a técnica ELISA não é suficientemente sensível na diagnose de alguns vírus, principalmente aqueles que ocorrem em baixas concentrações nos tecidos das plantas (Bertolini *et al.*, 2001). Além disso, Bertolini *et al.* (1998), verificou que amostras positivas analisadas por ELISA e através de técnicas moleculares não coincidiram nos resultados positivos, sugerindo que o uso de testes sorológicos utilizando anticorpos policlonais geravam resultados falsos positivos.

2.3.3 Métodos Moleculares

Nos últimos anos, a aplicação de técnicas de diagnóstico molecular baseados na detecção de ácidos nucleicos tem sido uma importante ferramenta para análise, detecção e diagnose de doenças em diversas áreas, em especial na fitopatologia, demonstrando maior eficiência e confiabilidade dos resultados que técnicas tradicionais de detecção. Inicialmente, as técnicas moleculares eram utilizadas como complemento do produto de ensaios biológicos e sorológicos. Atualmente, são as técnicas mais utilizadas em diversos países, principalmente, no estudo de vírus vegetais.

2.3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983 (Saiki *et al.*, 1985) e é uma técnica que permite produzir milhões de cópias de um fragmento de DNA em um curto período de tempo. O processo utiliza uma DNA polimerase termoestável e oligonucleótidos iniciadores específicos (*primers*) que se ligam às extremidades 5' e 3' de uma determinada região do genoma a ser amplificada. A RT (transcrição reversa) - PCR é uma adaptação da PCR aplicada para o diagnóstico de vírus que possuem RNA como material genômico. Este método combina a transcrição reversa do RNA, seguida da reação em cadeia da polimerase.

Finalizado o processo de amplificação por PCR ou RT-PCR, é necessária a separação eletroforética dos produtos amplificados para detecção e análise dos fragmentos amplificados de DNA, em géis de agarose ou poliacrilamida. Esse processo ocorre na presença de um corante, como o brometo de etídeo, após a incidência de luz ultravioleta, seguido de avaliação visual das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados (Faggioli *et al.*, 2002). A necessidade de um passo pós PCR aumenta o risco de contaminação das amostras durante a manipulação (Osman, 2008).

Inicialmente, esta técnica complementava os testes sorológicos em programas de certificação de mudas em diversos países. Um dos primeiros trabalhos de detecção de vírus em oliveiras utilizando a técnica de multiplex RT-PCR foi publicado por Bertolini *et al.* (2001), para a detecção simultânea de seis vírus (CMV, CLRV, SLRSV, ArMV, OLV-1 e OLV-2). Posteriormente, Bertolini *et al.* (2003b), desenvolveram um protocolo de “*multiplex nested RT-PCR*” para detecção de quatro vírus (ArMV, CMV, CLRV e SLRSV), além da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Este protocolo foi recomendado pelo Ministério de Agricultura Pesca e Alimentação

(MAPA) da Espanha, para a análise de material vegetal propagativo no programa de certificação de material vegetal de oliveiras na Espanha (Espanha, 2016).

Outros trabalhos utilizando a RT-PCR para a detecção de vírus em oliveiras foram desenvolvidos em países como Itália (Saponari *et al.*, 2001; Grieco *et al.*, 2002; Faggioli *et al.*, 2005), Portugal (Grieco *et al.*, 2002; Varanda *et al.*, 2008 e 2010; Félix *et al.*, 2006 e 2011), Albânia e Croácia (Luigi *et al.*, 2011), Egito (Youssef *et al.*, 2010; El-Morsy *et al.*, 2017), Turquia (Çifçi & Serçe, 2014), Grécia (Hatzopoulos *et al.*, 2002), Israel e EUA (Al Rwahnih *et al.*, 2011). Loconsole *et al.* (2010), desenvolveu e validou um protocolo de RT-PCR para o diagnóstico de oito vírus da oliveira, permitindo por primeira vez a detecção dos vírus TNV e OMMV através de técnica molecular.

2.3.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real

Buscando monitorar em tempo real a quantidade e qualidade do material amplificado, sem a necessidade de um passo de pós PCR (eletroforese) foi desenvolvida a PCR em tempo real. A técnica foi descrita por Higuchi *et al.* (1993), onde o funcionamento é semelhante a PCR convencional porém com a possibilidade de quantificar o DNA amplificado a cada ciclo. Para o monitoramento da reação em tempo real, são utilizadas, no mix de amplificação, substâncias químicas que emitem fluorescência em determinadas condições e um aparelho termociclador equipado com leitor para esta fluorescência.

Atualmente, os métodos de fluorescência utilizados na PCR em tempo real são diversos, sendo divididos em dois grupos principais: corantes intercalantes e sondas de sequência específica (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Basicamente, os corantes intercalantes conhecidos como “*Greens*” e a sonda de sequência “*TaqMan*” são amplamente utilizados, cada um com suas vantagens e desvantagens (Oliveira, 2010; Tajadini *et al.*, 2014).

A PCR em tempo real é uma técnica simples, específica, de alta sensibilidade, rápida, com menor risco de contaminações, e possibilita a quantificação de ácidos nucleicos em tempo real. A técnica também se mostrou altamente eficiente na análise direta de material vegetal, tornando-a ainda mais rápida para obtenção final dos resultados sem a necessidade da etapa de purificação de ácidos nucleicos (Capote *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009). Por outro lado, a principal limitação desta tecnologia é o alto custo dos equipamentos e reagentes.

Nos últimos anos, a PCR em tempo real tem sido cada vez mais utilizada na detecção de vírus em material vegetal, porém ainda são poucos os estudos publicados com vírus em oliveiras. Campos *et al.* (2019), utilizando *SYBR Green*, demonstrou maior sensibilidade da PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional, na análise de quatro vírus de oliveiras. A PCR em tempo real já foi descrita também para a detecção das bactérias *Xylella fastidiosa* subsp. *paucis* (Ouyang *et al.*, 2013) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Tegli *et al.*, 2010), além de fitoplasmas (Hren *et al.*, 2007) em oliveiras.

2.4 Validação de técnicas de detecção

As técnicas moleculares de detecção e diagnose vem evoluindo rapidamente nos últimos anos e cada vez mais são utilizadas no estudo de fitopatógenos. Porém, são poucas as técnicas e protocolos de detecção que são devidamente validados, comprometendo a precisão dos resultados. Sabendo que nenhuma técnica é perfeita, a validação dos métodos para detecção de patógenos é importante (López *et al.*, 2009).

O processo de validação é um estudo experimental e documentado com o objetivo de avaliar se o procedimento analítico adotado, incluindo todo o processo e estruturação para análise destes patógenos é adequado à finalidade proposta, colaborando na certeza dos resultados obtidos. Alguns métodos já são disponibilizados por órgãos oficiais como o MAPA (métodos oficiais) e também instituições internacionais (métodos normalizados). Logo, cabe aos laboratórios credenciados realizá-los *in house* seguindo as mesmas condições e parâmetros por eles estabelecidos, seja o método oficial ou normalizado, de forma a verificar a reprodutibilidade do método. Em paralelo, quando não se dispõe de um método oficial ou normalizado, há a necessidade de desenvolver o método, definir os parâmetros de análise e realizar a validação de forma a fornecer dados de sensibilidade analítica, especificidade analítica, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade. Com isto, as instituições e/ou laboratórios credenciados podem utilizar estes métodos desenvolvidos e validados para auxiliar nos protocolos de detecção de patógenos associados a tecidos de plantas assintomáticos e assim garantir a sanidade fitossanitária (EPPO, 2014). Também podem ser utilizados como base na implementação de análises de rotina para programas de certificação de mudas, a exemplo a oliveiras no Brasil.

2.5 Programas de certificação fitossanitária de material propagativo de oliveiras

A produção de materiais livre de patógenos e de alta qualidade para cultivo depende, em grande parte, da qualidade do material vegetal utilizado na origem da obtenção de novas mudas para o cultivo da oliveira. Em geral, a produção de plantas de qualidade para plantação ocorre através de procedimentos de certificação definidos, cujo estado sanitário é oficialmente testado e comprovado de acordo com requisitos específicos. Em um esquema de certificação típico, o material certificado é submetido a um número definido de etapas de propagação de plantas individuais, isentas de patógenos e pragas nocivas e mantidas e propagadas em condições ambientais rigorosas para evitar sua contaminação (Albanese *et al.*, 2012).

Para isto, são necessários regulamentos adequados e o uso de técnicas eficientes, sensíveis e confiáveis para assegurar a produção, comercialização e movimentação de material certificado de propagação de plantas com padrões elevados de qualidade. Ao longo dos últimos vinte anos, através do crescimento econômico e da expansão de várias culturas em diversas áreas, surgiram preocupações sobre novas doenças transmitidas por materiais de propagação infectados. Na tentativa de limitar a propagação de pragas e agentes patogênicos através do movimento de plantas infectadas, leis específicas foram emitidas a nível regional e nacional.

A Itália foi o primeiro país a implementar um plano de certificação para o cultivo de oliveiras, sendo obrigatório que a produção e comercialização de materiais de propagação preencha os requisitos estabelecidos pelo decreto italiano de 14 de abril de 1997 (Itália, 1997), em conformidade com Diretiva 92/34/CEE (União Europeia, 2008). De acordo com esta lei, a avaliação do tipo de planta e a certificação do estado sanitário dos materiais de propagação de oliveiras são obrigatórias e as plantas são certificadas como CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*). Na Itália, em um primeiro momento, as plantas certificadas deveriam estar livres de patógenos como *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Verticillium dahliae* e todas as viroses conhecidas. No entanto, vários aspectos não bem definidos, relativos aos procedimentos para inspeções e controles, levando a interpretações errôneas e à aplicação heterogênea da lei nas diferentes regiões do país, além da obrigatoriedade na análise de todas os vírus descritos no ano de 1997, fez com que o decreto fosse revisto e atualizado nos últimos anos (Albanese *et al.*, 2012).

Na Espanha, antes da elaboração do plano de certificação, seguia-se as normas previstas pelas diretivas da união europeia e, somente em 1999, buscando dispor de uma base sólida de referência e fomentar a qualidade dos materiais de multiplicação utilizados, criaram uma norma de certificação e regulamento técnico, embasado no real decreto 1678/1999 de 29 de outubro do Ministério da Agricultura espanhol (Espanha, 1999). As plantas de oliveiras certificadas inicialmente deviam estar livres do fungo *Verticillium dahliae*, da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e de quatro vírus (CMV, CLRV, SLRSV e ArMV). O regulamento técnico foi modificado em 2016, excluindo o CMV e a Pss do real decreto (Espanha, 2016).

A Argentina foi o primeiro país na América a elaborar um programa de certificação de oliveiras. Em 2000, a *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación*, através da resolução 811/2000 (ARGENTINA, 2000), regulamentou a produção e certificação de mudas de oliveira, que em aspectos produtivos não difere muito da aplicada na Espanha. As plantas de oliveira produzidas devem estar livres dos patógenos *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Verticillium dahliae*, *Phytophthora cinnamomi*, *Cercospora cladosporioides*, *Cycloconium oleaginum*. A certificação na Argentina não considera nenhum dos vírus descritos em plantas de oliveiras.

A ampla distribuição do cultivo e a crescente demanda por materiais propagativos de oliveiras tem elevado a preocupação com programas que garantem a qualidade destes materiais em diferentes países. No Brasil, não há um programa de certificação genética e fitossanitária regulamentado pelo governo federal, apenas programas regionais que visam orientar produtores e viveiristas de acordo com a demanda de cada estado. Porém, tais programas não definem normas e, principalmente, a obrigatoriedade na análise sanitária do material vegetal propagado e comercializado, ficando a critério de cada produtor. O potencial produtivo da olivicultura no Brasil e a concorrência dos produtos gerados requerem o uso de mudas certificadas como critérios de qualidade no mercado mundial (PRÓ-OLIVA, 2020).

2.6 Referências

AHANGARAN, A. *et al.* The first report of detection of a phytoplasma in olive trees in a botanic collection in Iran. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Gent, v. 7, p. 1133-1138, 2006.

- ALBANESE, G.; SAPONARI, M.; FAGGIOLI, F. Phytosanitary certification. *In*: MUZZALUPO, I. **Olive germplasm: the olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy**. London: InTech Open, 2012. cap. 6, p. 107-132.
- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A. A. Técnicas sorológicas aplicadas à fitopatologia 3.4.2: difusão dupla em anjar. *In*: ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicada em virologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 45-50.
- AL RWAHNIH, M. *et al.* Characterization of latent viral infection of olive trees in the National clonal germplasm repository in California. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 93, n. 1, p. 227-231, 2011.
- ARGENTINA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Calidad y Sanidad Vegetal - Resolución 811/2000, 17 nov. 2000. Apruébanse las Normas para la Producción, Comercialización e Introducción de Plantas de Vivero de Olivo o sus Partes. Organismos competentes en la materia. **Boletín Oficial de La República Argentina**: primera sección, Buenos Aires, n. 29.533, 24 nov. 2000. Disponível em: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-811-2000-65125/texto>. Acesso em: 5 abr. 2020.
- AUSTRALIA. Subcommittee on Plant Health Diagnostic Standards. **National diagnostic protocol for Cherry leaf roll virus (CLRV) for cherry and walnut strains**: NDP 10 V2. Australia, 2018. Disponível em: <https://www.plantbiosecuritydiagnostics.net.au/app/uploads/2018/11/NDP-10-Cherry-leaf-roll-virus-cherry-and-walnut-strains-V2.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2024.
- BEDENDO, I. P. Fitoplasmas e espiroplasmas. *In*: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 255-270.
- BERTOLINI, E. *et al.* Virosis del olivo detectadas en España. Nuevos métodos de diagnóstico. **Phytoma España**, Valencia, v. 102, p. 191–193, 1998.
- BERTOLINI, E. *et al.* Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 96, p. 33-41, 2001.
- BERTOLINI, E. **Virosis e bacteriosis del olivo: detección serológica e molecular**. 2003. Tesis (Doutorado Engenharia Agrônômica) - Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2003a.
- BERTOLINI, E. *et al.* Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viroses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive tree. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, n. 3, p. 286-292, 2003b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. **Sumários executivos de produtos agrícolas**. Brasília, DF: MAPA, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/sumarios-executivos-de-produtos-agricolas>. Acesso em: 31 mar. 2020.
- ÇAGLAYAN, K.; FAGGIOLI, F.; BARBA, M. Viruses, phytoplasmas and diseases of unknown etiology of olive trees. *In*: HADIDI, A. *et al.* **Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits**. St. Paul: APS, 2011. cap. 53, p. 289-297.

- CAMPOS, M. D. *et al.* Establishment of a sensitive qPCR methodology for detection of the olive-infecting viruses in portuguese and tunisian orchards. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.10, [art.] 694, [p.1-7], 2019.
- CANTO, T. *et al.* Characterizations of *Cucumber mosaic virus*. **Virology**, London, v. 237, p. 237-248, 1997.
- CAPPELLARO, T. H. *et al.* Cultivares. In: COUTINHO, E. F. *et al.* (ed.). **Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. cap. 13. p. 41-46. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Margarete-Nicolodi-2/publication/267626833_Solos/links/545449d40cf2cf51647c2cfb/Solos.pdf. Acesso em: 12 mar. 2023.
- CAPPELLARO, T.H. Cultiveres. In: COUTINHO, E. F. *et al.* (ed.). **Oliveira: aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2015. p. 57-86.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**, Berlin, v. 12, p. 1-6, 2009.
- CARDOSO, J. M. S. *et al.* The complete genome sequence of a new Necrovirus isolated from *Olea europaea* L. **Archives of Virology**, Wien, v. 150, p. 815-823, 2005.
- CHLIYEH, M. *et al.* Inventory and world geographical distribution of the olive tree (*Olea europaea* L.) diseases caused by viruses, bacteria and phytoplasma. **International Journal of Environment, Agriculture & Biotechnology**, New Delhi, v. 2, p. 1410-1440, 2017.
- CIVANTOS, L. La olivicultura en el mundo y España. In: BARRANCO, D. R.; FERNANDEZ-ESCOBAR, L.; RALLO, L. (ed.). **El cultivo del olivo**. Madri: Mundi Prensa, 1998. p. 17-31.
- ÇIFÇI, O.; SERÇE, Ç. U. Research on the presence of some viruses in olive orchards using serological and molecular techniques in Mardin province of Turkey. **Bitki Koruma Bülteni**, Ankara, v. 54, n. 3, p. 233-246, 2014.
- CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplante method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **The Journal of General Virology**, London, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977.
- COLETTA-FILHO, H. D. *et al.* First report of olive leaf scorch in Brazil, associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 55, n. 1, p. 130-135, 2016.
- DEL SERRONE, P. *et al.* Fitoplasmi associati a scopazzi dell'olivo. **Petria**, Roma, v. 6, p. 83-88, 1966.
- EL-MORSY SH, I. *et al.* Molecular identification of *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV) in Egypt. **Journal of Basic and Environmental Sciences**, Egypt, v. 4, p. 24-33, 2017.
- EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. EPPO Standards: Diagnostics: PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. **EPPO Bulletin**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 117-147, Aug. 2014.
- EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (XYLEFP) – **Distribution**. [Data sheets EPPO Data Base].

[Paris]: EPPO, 2019. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/XYLEFP/distribution>. Acesso em: 15 abr. 2020.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* (PSDMSA) – **Photos**. [Data sheets EPPO Data Base]. [Paris]: EPPO, 2020c. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMSA/photos>. Acesso em: 25 abr. 2020.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Nepovirus arabis* (ARMV00) – **Overview**. [Data sheets EPPO Data Base]. [Paris]: EPPO, 2020a. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00>. Acesso em: 2 mar. 2020.

EPPO - EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. *Stralariavirus fragariae* (SLRSV0) – **Overview**. [Data sheets EPPO Data Base]. [Data sheets EPPO Data Base]. [Paris]: EPPO, 2020b. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/SLRSV0>. Acesso em: 2 mar. 2020.

ESPAÑA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto 1678/1999 de 29 de octubre 1999. Por el se modifica el Real Decreto 929/1995 de 9 de junio, por el que se aprueba el reglamento técnico de control y certificación de plantas de viveiro de frutales. **Boletín Oficial del Estado**, Madrid, n. 276, p. 40077-40079, 29 oct. 1999.

ESPAÑA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Real Decreto de 9 de junio 929/1995. Por el que se aprueba el reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de frutales. **Boletín Oficial del Estado**, Madrid, n. 141, 15 jun. 1995.

FAGGIOLI, F. *et al.* Detection of *Strawberry latent ringspot virus* in leaves of olive trees in Italy using one-step RT-PCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 636-639, 2002.

FAGGIOLI, F. *et al.* Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RTPCR. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 87, p. 49-55, 2005.

FAGGIOLI, F. Sanitary selection of olive (*Olea europaea* L.) cultivars for worldwide distribution. **Asian Journal of Plant Pathology**, Faisalabad, v. 11, p. 28-34, 2017.

FIGUEIRA, A. R. **Manejo de doenças viróticas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000.

FILIPPINI ALBA, J. M. *et al.* Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 23., 2014, Cuiabá. **Anais**. Cuiabá: SBF, 2014. p. 1-4. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/995817/1/JoseFilipiniTRA3108.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2020.

FIRRAO, G. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1243-1255, 2004.

FONTANA, A. *et al.* Impact of *Olive leaf yellowing associated virus* on olive (*Olea europaea* L.) oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 121, n. 4, [art.] 18000472, [p. 1-4], 2019.

FELIX, M. R.; CLARA, M. I. Two necrovirus isolates with properties of *Olive latent virus 1* and of *Tobacco necrosis virus* from olive in Portugal. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 586, p. 725-728, 2002.

FÉLIX, M. R.; CLARA, M. I. E. Characterization of viruses occurring in *Olea europaea* L. In: RAO, G. P.; VALVERDE, A.; KATIS, C. I. **Techniques in diagnosis of plant viruses**. Lanham: Studium Press, 2006. p. 173-216.

FÉLIX, M. D. R.; VARANDA, C. M. R.; CLARA, M. I. E. Biology and molecular characterization of necroviruses affecting *Olea europaea* L.: a review. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, p. 247–259, 2011.

FERREIRA, J. **Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com sintoma de vassoura-de-bruxa**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Clorose variegada dos citros**. Araraquara: Fundecitrus, 2020. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cvc>. Acesso em: 5 abr. 2020.

GALLITELLI, D.; SAVINO, V. *Olive latent virus 1*. A single-RNA spherical virus isolated from olive in Apulia (southern Italy). **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 106, p. 295-303, 1985.

GRIECO, F.; PARRELLA, G.; VOVLAS, C. An isolate of *Olive latent virus 2* infecting castor bean in Greece. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 84, p. 129–131, 2002.

HATZOPOULOS, P. Breeding, molecular markers and molecular biology of the olive tree. **European Journal Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, p. 574–586, 2002.

HIGUCHI, R. *et al.* Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, New York, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

HREN, M. *et al.* Real-time PCR detection systems for *Flavescence dorée* and *Bois noir* phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant Pathology**, Oxford, v. 56, p. 785-796, 2007.

IAS - INSTITUTO DE AGRICULTURA SOSTENIBLE. **Situación actual y avances científicos en el patosistema *Xylella fastidiosa*/olivo**. Córdoba: IAS, 2019.

IOC – INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. **Table olivea**. Madrid: IOC, 2020. Disponível em: <http://www.internationaloliveoil.org/>. Acesso em: 2 mar. 2020.

IBRAOLIVA - INSTITUTO BRASILEIRO DE OLIVICULTURA. **Alguns números do mercado oleícola no Brasil**. Porto Alegre: Ibraoliva, 2020. Disponível em: <https://www.ibraoliva.com.br/>. Acesso em: 21 fev. 2020.

ITÁLIA. Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali. Decreto Ministeriale 14 aprile 1997. Recepimento delle direttive della Commissione n. 93/48/CEE del 23 giugno 1993, n. 93/64/CEE del 5 luglio 1993 e n. 93/79/CEE del 21 settembre 1993, relative alle norme tecniche sulla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e delle piante da frutto destinate alla produzione di frutto. **Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana**: Serie Generale, Roma, n. 126, 2 giugno 1997. Suppl. Ordinario n.112. Disponível em: <https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1997/06/02/097A3754/sg>. Acesso em: 15 abr. 2020.

JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 92. p. 35-48, 2010.

- JONES, R. A. C. *et al.* *Cucumber mosaic virus* infection of chickpea stands: temporal and spatial patterns of spread and yield-limiting potential. **Plant Pathology**, Oxford, v. 57, p. 842-853, 2008.
- LEITÃO, F. *et al.* Seleção clonal y sanitária de 10 cultivares de *Olea europaea* L. en el sur de Portugal. **Olivae**, Madrid, v. 66, p. 51-53, 1997.
- LOCONSOLE, G. *et al.* Interlaboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. **EPPO Bulletin**, Paris, v. 40, p. 423-428, 2010.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**, Berlin, v. 6, p. 233-243, 2003.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues Molecular Biology**, Wymondham, v. 11, n. 1, p. 13-46, 2009.
- LUGI, M. *et al.* Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 50, p. 150-153, 2011.
- LUTHY, P. *et al.* Morphology and in vitro cultivation of the bacterial symbiote of *Dacus oleae*. **Journal of the Swiss Entomological Society**, Zürich, v. 56, p. 67-72, 1983.
- MACKAY, I. M. *et al.* Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: MACKAY, I. M. (ed.). **Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization**. Norfolk: Caister Academic Press, 2007. p. 1-40.
- MARTELLI, G. P. *et al.* Properties of a citrus isolate of *Olive latent virus 1*, a new necrovirus. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, p. 527-536, 1996.
- MARTELLI, G. P. Malattie infettive. In: FIORINO, P. (ed.). **Olea: trattato di olivicoltura**. Bologna: Edagricole, 2003. p. 449-457.
- MARTELLI, G. P. A brief outline of infectious diseases of olive. **Palestine Technical University Research Journal**, Tulkarm, v. 1, p. 1-9, 2013.
- MATERAZZI, A. *et al.* On the presence of a new isometric virus in *Olea europaea* L. In: CONVEGNO ANNUALE DELLA SOCIETA ITALIANA DI PATOLOGIA VEGETALE, 1996, Udine. **Atti**. Pisa: Università di Pisa, 1996. p. 57-59.
- MAZYAD, A. A. *et al.* Characterizations of *Strawberry latent ringspor virus* (SLRSV) on strawberry in Egypt. **Egyptian Journal of Virology**, Cairo, v. 11, n. 2, p. 219-235, 2014.
- MENEZES, E. G. Olivicultura “Made in Brazil” - Tecnologia e inovação a serviço da qualidade. In: FRUTITEC, 2016, Lisboa. [**Trabalhos apresentados**]. [Lisboa: AJAP, 2016]. [Trabalho apresentado na Mostra Profissional de Máquinas, Equipamentos, Produtos e Tecnologia para Fruticultura e Horticultura]. Disponível em: <http://www.frutitec.com.br/>. Acesso em: 29 fev. 2020.
- NERODI, R. C. **Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira**. 2004. Dissertação (Mestrado Engenharia Agrônômica) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NGUYEN, K. A.; FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E. Genetic diversity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Califórnia and characterization of epidemiological factor for olive knot development. **Plant Disease**, St. Paul, v. 102, n. 9, p. 1-28, 2018.

NUNNEY, L. *et al.* Detecting genetic introgression: high levels of intersubspecific recombination found in *Xylella fastidiosa* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 13, p. 4702-4714, 2012.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

OSMAN, F. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 149, p. 292-299, 2008.

OUYANG, P. *et al.* Enhanced reliability and accuracy for field deployable bioforensic detection and discrimination of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, causal agent of citrus variegated chlorosis using razor ex technology and taqman quantitative PCR. **PLOS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, [art.] e81647, [p. 1-13], 2013.

PASQUINI, G. *et al.* Molecular characterization of phytoplasmas affecting olive trees (*Olea europea* L.) in Italy. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 82, p. 213-219, 2000.

PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**. Dordrecht: Springer, 2008. 332 p.

PENSO, G. A. *et al.* Propagação de oliveira ‘Koroneiki’ pelo método de estaquia em diferentes épocas, concentrações de AIB e presença de folhas. **Revistas Ceres**, Viçosa, MG, v. 63, n. 3, p. 355-360, 2016.

PRÓ-OLIVA - PROGRAMA ESTADUAL DE OLIVICULTURA. **Situação atual – Olivicultura do RS**. Porto Alegre: Pró-Oliva, 2020. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/pro-oliva>. Acesso em: 12 jan. 2020.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B. *et al.* Aspectos estruturais de cafeeiro infectado com *Xylella fastidiosa*. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 23-33, 1998.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; CABRAL, L. P.; PARADELA FILHO, O. Comparações sazonais do efeito de *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 3, p. 381-393, 2004.

QUESADA, J. M. *et al.* Recovery of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from symptomless shoots of naturally infected olive trees. **International Microbiology**, Berlin, v. 10, p. 77-84, 2007.

RAMOS, C. *et al.* *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 998-1009, 2012.

REBENSTORF, K. *et al.* Host species-dependent population structure of a pollen-borne plant virus, *Cherry leaf roll virus*. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 80, p. 2453-2462, 2006.

ROSA, F. **Reunião técnica nacional de olivicultura em Bagé**. Porto Alegre: EMATER/RS, 8 nov. 2012. Disponível em: <http://www.emater.tche.br/site/noticias/noticia.php?id=15691>. Acesso em: 28 jan. 2019.

RUMBOU, A.; VON BARGEN, S.; BÜTTNER, C. A model system for plant-virus interaction-infectivity and seed transmission of Cherry leaf roll virus (CLRV) in *Arabidopsis thaliana*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, p. 527–532, 2009.

SABANADZOVIC, S. *et al.* Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with leaf yellowing. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 81, p. 37-45, 1999.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAPONARI M. *et al.* Diagnosi di virus dell'olivo mediante limpiego degli RNA a doppia elica. In: PROGETTO POM A, 32., 2001, Locorotondo. **Atti**. [S. l.: s. n.], 2001. p. 793–797.

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**, Pisa, v. 95, n. 3, p. 659-668, 2013.

SAVINO, V. *et al.* Two nepovirus isolated from olive in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 18, p. 135-142, 1979.

SAVINO, V.; GALLITELLI, D. *Cherry leaf roll virus* in olive. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 20, p. 202-203, 1981.

SAVINO, V.; GALLITELLI, D. Isolation of *Cucumber mosaic virus* from olive in Italy. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 22, p. 76-77, 1983.

SAVINO, V. *et al.* Olive latent virus 2, a newly recognized virus with a differently shaped particle. In: CONGRESS OF THE MEDITERRANEAN PHYTOPATHOLOGICAL UNION., 6., 1984, Cairo, Egypt. **Proceeding of the** [...]. [S.l.: s.n.], 1984. p. 24-26.

SAVINO, V. *et al.* Due giallumi di possibile origine virale in Sicilia. **Informatore Fitopatologico**, Bologna, v. 46, n. 5, p. 55-59, 1996.

SICARD, A. *et al.* *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 56, p. 181-202, 2018.

SMITH, E. F. Pathogenicity of the olive knot organism on hosts related to the olive. **Phytopathology**, St. Paul, v. 12, p. 271-278, 1920.

TAJADINI, M. *et al.* Comparison of *SYBR Green* and *TaqMan* methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. **Advanced Biomedical Research**, Isfahan, v. 3, [art.] 85, 2014.

TEGLI, S. *et al.* Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. **BMC Microbiology**, London, v. 10, [art.] 156, [p. 1-14], 2010.

TRIOLO, E.; MATERAZZI, A.; TONI, S. An isolate of *Tobacco mosaic* tobamovirus from *Olea europea*. **Advances in Horticultural Science**, Firenze, v. 10, p. 39-45, 1996.

UNIÃO EUROPEIA. Directiva 2008/90/CE do Conselho de 29 de setembro de 2008. Relativa à comercialização de material de propagação de fruteiras e de fruteiras destinados à produção de frutos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L 268/8, 8 out. 2008. Disponível em:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0090>. Acesso em: 13 mar. 2024.

VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F.; CLARA, M. I. E. DsRNA analysis and RT-PCR assays to evaluate viral infections: the case of necroviruses in olive. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v. 90, n. 2, p. 385, 2008.

VARANDA, C. M. R. *et al.* Multiplex RT-PCR for detection and identification of three necroviruses that infect olive trees. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 127, p. 161–164, 2010.

VEGA-CELEDÓN, P. *et al.* Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. **Cultivos Tropicales**, La Habana, v. 37, p. 33-39, 2016.

VILLA, P. **El cultivo del olivo**. Barcelona: Editorial De Vecchio, 2007.

WOO, E. N. Y.; CLOVER, G. R. G.; PEARSON, M. N. First report of *Cherry leaf roll virus* (CLRV) in *Malus domestica*. **Australasian Plant Disease Notes**, Dordrecht, v. 7, p. 151-156, 2012.

WREGGE, M. S. *et al.* **Zoneamento agroclimático para oliveira no estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

YOUSSEF, S. A. *et al.* Detection of olive tree viruses in Egypt by one step RT-PCR. **Julius-Kühn-Archiv**, Quedlinburg, v. 427, p. 51–55, 2010.

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

3 CAPÍTULO 1

DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES E SONDAS PARA DETECÇÃO DE VÍRUS, BACTÉRIAS E FITOPLASMAS DA OLIVEIRA POR PCR EM TEMPO REAL

3.1 Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é uma importante espécie arbórea, originária da região do Mediterrâneo, que ao longo dos anos vem ganhando espaço em diferentes regiões do mundo. Seus produtos finais, a azeitona e o azeite, possuem inúmeros benefícios nutricionais a saúde humana e animal, tornando-se uma opção na diversificação de cultivos (Filippini-Alba *et al.*, 2014).

Assim como em vários cultivos de importância econômica, diversos patógenos podem infectar a oliveira, incluindo vírus, bactérias, fungos e fitoplasmas, causando doenças que interferem no desenvolvimento das plantas, desde a produção das mudas até o plantio a campo. Cada um destes patógenos, uns com maior severidade que outros, afetam direta e indiretamente a produção das plantas e causam perdas econômicas significativas em diversas regiões de cultivo no mundo. Em oliveiras são descritas 15 espécies de vírus que, de modo geral, ocorrem de forma latente e assintomáticos, o que dificulta a diagnose da doença (Çaglayan *et al.*, 2011). O *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), o *Cherry leaf roll virus* (CLRv), o *Cucumber mosaic virus* (CMV), o *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) e o *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV), são alguns dos vírus descritos em oliveira e inclusos nos principais programas de certificação de mudas no mundo. A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss), responsável pela doença conhecida como ‘tuberculose da oliveira’, causa sintomas característicos e bem definidos (Ramos *et al.*, 2012). Outra doença, denominada ‘escaldadura das folhas da oliveira’, causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp), tem causado importantes perdas econômica devido a severidade da doença em oliveiras (Saponari *et al.*, 2013). Também, os fitoplasmas da oliveira são responsáveis por causar perdas econômicas expressivas na cultura, dentre os vários sintomas descritos, o mais comum é o ‘Vassoura-de-bruxa’ (Martelli, 2013), principal característica sintomatológica para a detecção do patógeno a campo. A etiologia de algumas doenças ainda é desconhecida, outras já bem definidas, porém, estudos necessitam ser realizados para melhorar a detecção dos agentes causais e a compreensão da interação destes patógenos com as oliveiras (Martelli, 2013).

A transmissão destes patógenos, em alguns casos, ocorre através de vetores como insetos e nematoides, porém, a forma mais eficiente de transmissão é através do material propagativo infectado, (Albanese *et al.*, 2012; Chliyen *et al.*, 2017). Assim, a certificação de mudas é importante para garantir a qualidade sanitária do material

propagado, principalmente no Brasil, já que a cultura da oliveira está se tornando expressiva no país.

Para a detecção e o diagnóstico destes patógenos, a utilização de diferentes técnicas laboratoriais foram implementadas ao longo dos anos, evoluindo desde bioensaios, testes sorológicos, até as modernas técnicas moleculares de detecção. Inicialmente, os testes sorológicos, como o ELISA, eram amplamente utilizados (Cambra *et al.*, 1996). Esta técnica é rápida e permite avaliar inúmeras amostras em um curto período de tempo (López *et al.*, 2003), porém, apresenta algumas limitações como baixa sensibilidade, principalmente, na análise de plantas em período de repouso vegetativo. Também a baixa especificidade e a presença de inibidores no extrato da planta reduzem a confiabilidade dos resultados (Bertolini *et al.*, 2001). Em paralelo aos testes sorológicos, as técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, baseadas na amplificação de ácidos nucleicos, foram sendo amplamente utilizadas na detecção e diagnóstico de patógenos de plantas. Os ensaios moleculares demonstraram maior sensibilidade, especificidade e versatilidade na detecção de patógenos da oliveira, especialmente no caso dos vírus (Bertolini, 2003). Diversos trabalhos foram publicados utilizando a PCR convencional, para detecção de vírus no cultivo da oliveira. Consequentemente, novos vírus foram detectados e também mapeados quanto à prevalência e distribuição em diferentes locais do mundo (Bertolini *et al.*, 2003).

As técnicas baseadas na PCR também passaram a ser adotadas nos principais programas de certificação de mudas de oliveira em vários países, atestando a ausência dos principais patógenos da cultura. Nos últimos anos, uma variante da PCR convencional, a PCR em tempo real, está permitindo uma detecção mais sensível, específica e confiável nas análises de patógenos vegetais. Além da melhora nos critérios técnicos, esta técnica permite acompanhar os dados em tempo real, tornando o diagnóstico de patógenos ainda mais rápido e confiável (Capote *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009). Vários trabalhos publicados têm demonstrado a eficiência do uso desta técnica na análise de patógenos em oliveiras (Tegli *et al.*, 2010; Ouyang *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2019).

A confiabilidade dos resultados com a utilização de técnicas de detecção, tais como a PCR em tempo real são de importância na análise de patógenos em plantas. Assim, o processo de validação de métodos é essencial para garantir a precisão dos dados obtidos e garantir que o processo adotado é adequado para a finalidade proposta

(López *et al.*, 2009). Métodos já desenvolvidos por órgãos oficiais como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e instituições internacionais como a *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) e a *International Plant Protection Convention* (IPPC) são disponibilizados podendo ser adotados e verificados internamente por laboratórios e instituições seguindo as mesmas condições descritas.

Na ausência destes métodos oficiais ou normalizados, há a necessidade da validação, a fim de estabelecer os critérios de aceitação e desempenho da técnica a ser utilizada. Validar uma técnica significa compará-la com outras já estabelecidas ou de referência “*Gold Standard technique*” mediante uma série de parâmetros. Deste modo, parâmetros de desempenho como limite de detecção, Ct de corte ou “*Cut off*”, sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade são calculados e avaliados.

A sensibilidade de um teste de diagnóstico é definido pela capacidade do mesmo em detectar amostras ou plantas verdadeiramente infectadas, a especificidade, é a probabilidade que o resultado de um teste seja negativo em uma planta ou amostra sadia e a acurácia de um teste, é a correspondência entre resultados verdadeiramente positivos e negativos, obtidos sob mesmas condições de análise (Altman & Bland 1994a; 1994b; Cambra *et al.*, 2016). A repetitividade é a capacidade de se encontrar o mesmo resultado nas amostras analisadas, sob uma mesma rodada e mesmo método, em condições de repetitividade, e a reprodutibilidade é a concordância entre os resultados de uma mesma amostra, onde os testes são realizados sob diferentes condições, tais como rodadas e analistas. O limite de detecção (LD) é a sensibilidade analítica de um teste de diagnóstico, correspondendo a menor concentração de analito em uma amostra, que produzirá um resultado positivo que pode ser determinado com nível aceitável de exatidão e precisão (Fonseca Jr. *et al.*, 2015; EPPO, 2018). O *Cycle threshold* (Ct) de corte ou *Cut-off*, corresponde ao maior valor de Ct obtido em todas as diluições no LD do alvo e não observadas nos não-alvos, é estabelecido conforme haja necessidade, principalmente, onde se observa presença de ampliações nos patógenos não-alvos, que geralmente atribui-se ao inadequado desenho dos primers e/ou sonda e/ou contaminações, ou problemas na fluorescência (Caraguel *et al.*, 2011).

No Brasil, a ausência de um programa de certificação específico para plantas de oliveira não garante a qualidade do material introduzido, produzido e ou propagado para cultivo. A ausência de técnicas sensíveis de detecção de patógenos e de critérios de

amostragem definidos para auxiliar no conhecimento do estado fitossanitário do material proveniente de viveiros, dificulta a fiscalização do comércio de mudas e limita a realização de um programa de qualidade sanitária. Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar técnicas de detecção baseados em PCR em tempo real para os principais patógenos da oliveira transmitidos por material propagativo, e determinar a prevalência dos patógenos, de forma a conhecer o estado sanitário do material vegetal propagativo em viveiros e plantios comerciais.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Desenho de iniciadores e sondas

Foram obtidas sequências nucleotídicas disponíveis nas bases de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dos vírus ArMV, CLRV, CMV e SLRSV. Com o auxílio dos softwares BLAST 2.0 e Geneious (Drummond *et al.*, 2010), as sequências foram alinhadas e comparadas para determinar as regiões mais conservadas. O desenho de iniciadores e sondas TaqMan para PCR em tempo real foi realizada no programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). As sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores e sondas obtidas no NCBI foram AY017339 (ArMV); S84125.1 (CLRV); D28489.1 (CMV) e HM591197 (SLRSV). Para Xfp, foram utilizados iniciadores e sondas descritos por Harper *et al.* (2010); EPPO (2016), para a Pss, os iniciadores e sonda descritos por Tegli *et al.* (2010), e para fitoplasmas foram utilizados os iniciadores e sonda descritos por Hren *et al.* (2007).

3.2.2 Condições de amplificação

Para a realização da RT-PCR em tempo real utilizando os iniciadores e sondas desenhados para os vírus ArMV, CLRV, CMV e SLRSV foram utilizados os seguintes reagentes: água ultrapura, 1x master mix (GoTaq Probe qPCR Master Mix 2x, Promega), 1x RT Mix (GoScript 1-Step RT-qPCR 50x, Promega), 0,5 µM dos iniciadores *forward* (F) e *reverse* (R) (0,1 µM da sonda (P) (Macrogen, EUA) e 2 µl de RNA (amostra), em um volume final de 12 µL. As reações foram realizadas no termociclador StepOne Plus[®] (Applied Biosystems) nas condições: 1 ciclo: 45°C a 15 min e 95 °C a 2 min; 40 ciclos: 95°C a 15 s e 60°C a 45 s. Para os iniciadores e sonda do CLRV, as condições foram: 1 ciclo: 45°C a 15 min 95 °C a 2 min; 40 ciclos: 95°C a 15 s e 62°C a 45 s. A PCR em tempo real para Xfp, foi realizada com as condições descritas

por Harper *et al.* (2010), para Pss foram utilizadas as condições descritas por Tegli *et al.* (2010) e para os fitoplasmas (Fit), foram utilizadas as condições descritas por Hren *et al.* (2007). Os produtos das reações de PCR em tempo real foram analisados com a utilização do software StepOne™. Todos os ensaios foram realizados no Agronômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria. Porto Alegre, RS.

3.2.3 Obtenção de extrato vegetal

Para a obtenção dos extratos foram coletados brotos do ano de uma planta de oliveira do cultivar Arbequina na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS em Eldorado do Sul, RS, cadastro no SISGEN nº: ABC9B54. Um grama do material vegetal foi macerado em bolsas plásticas individuais contendo tampão de extração fosfato (PBS, pH = 7,4 + 0,2% dietilditiocarbamato de sódio - DIECA + 2% PVP) (na proporção 1 peso: 10 volumes). Posteriormente, foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, identificados e conservados a -20°C até sua utilização. As amostras foram processadas no Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

3.2.4 Obtenção dos controles positivos

Os controles positivos utilizados para a validação e verificação dos métodos de detecção foram obtidos em coleções como a DSMZ *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*, Alemanha, do IVIA da Espanha, da ESALQ em SP e materiais de referência internos do Laboratório Agronômica conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1. Materiais de referência utilizados na validação para a detecção dos patógenos alvos em plantas de oliveiras por RT-PCR.

Patógenos	Provedor	Materiais
<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>pauca</i>	Agronômica, RS	Extrato vegetal de folhas de citros infectadas
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (Pss)	IVIA, Espanha	Colônia bacteriana
Fitoplasmas	ESALQ, SP	brotos de oliveiras infectados

continuação TABELA 1. Materiais de referência utilizados na validação para a detecção dos patógenos alvos em plantas de oliveiras por RT-PCR.

<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Psv)**	Agronômica, RS	Colônia bacteriana
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	DSMZ	Extrato vegetal liofilizado
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	DSMZ	Extrato vegetal liofilizado
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Agronômica, RS	Extrato vegetal de tabaco
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)*	IVIA, Espanha	RNA de sementes de salsa
Extrato de oliveira	EEA/UFRGS, RS	Extrato vegetal de brotos de oliveira

*Não foi submetido a validação de métodos, devido a pequena quantidade de controle positivo adquirida.

**Foi utilizada somente como não alvo nos protocolos de verificação da Xfp, Pss e Fitoplasmas.

3.2.5 Extração de ácidos nucléicos

Para a extração e purificação de ácidos nucléicos, foram utilizados 200 µL de extrato de oliveira e extrato vegetal infectado com CMV, Xfp e fitoplasmas, e 100 mg de extrato vegetal liofilizado para o ArMV e CLRV. Foi realizada uma suspensão concentrada da colônia bacteriana de Psv e Pss utilizando tampão fosfato (PBS, pH = 7,4), posteriormente, fervura a 95 °C por 10 min e foi utilizado 200 µL para extração de DNA. Os kits comerciais SV Total RNA Isolation System (Promega) e Wizard Genomic DNA Purification (Promega), foram utilizados para purificação de RNA e DNA, respectivamente, seguindo recomendações do fabricante. No final, as amostras foram eluidas/ressuspendidas em 100 µL de água ultrapura e DNA *Rehydration Solution*, respectivamente. A integridade e a concentração do DNA da Xfp e Pss foram avaliadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, New Hampshire, EUA). A concentração de DNA da Xfp e Pss foram ajustadas para 100 a 200 ng e 50 ng µL⁻¹, respectivamente, utilizando DNA de oliveira como diluente. O DNA e RNA foram armazenados a -20°C até a análise.

3.2.6 Obtenção do Limite de Detecção (LD)

Para estabelecer o limite de detecção (LD), foram realizadas diluições seriadas de cada controle positivo dos patógenos alvos (ArMV, CLRV, CMV, Xfp e Pss), para o fitoplasma foi utilizada a diluição de 1:1, sendo utilizado RNA ou DNA de oliveira

como diluente. As diluições seriadas foram de 10^0 a 10^{-6} com 7 repetições, para cada patógeno alvo. Posteriormente, as diluições foram submetidas a PCR em tempo real.

Para os patógenos Xfp, Pss e fitoplasmas foram realizadas apenas uma purificação de DNA pelo analista 1, e esta purificação foi utilizada nas diluições seriadas (DNA alvo + DNA oliveiras). Já para os patógenos ArMV, CLRV e CMV foram realizadas duas purificações de RNA, uma realizada pelo analista 1 e outra realizada pelo analista 2, e cada analista realizou suas diluições seriadas (RNA alvo + RNA oliveiras), de forma a obter o mesmo LD e garantir a reprodutibilidade, uma vez que, trata-se de uma validação de métodos, devido a confecção de um novo protocolo de detecção destes vírus em oliveiras. Também foram incluídas nas análises, os controles negativos: branco da extração, no qual utilizou-se 200 μ L de água ultrapura no lugar da amostra, o branco do ambiente, onde um microtubo contendo 200 μ L de água ultrapura foi deixado aberto durante toda a purificação de DNA/RNA e o branco da reação, no qual foi utilizado 2 μ L de água ultrapura como amostra na etapa de PCR e RT-PCR em tempo real.

3.2.7 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da PCR em tempo real

A partir do limite de detecção (LD) estabelecido referente a cada patógeno alvo, foram realizadas PCR em tempo real em triplicata de 14 amostras (7 amostras sabidamente positivas e 7 amostras sabidamente negativas) em dois dias diferentes, utilizando dois analistas, a fim de verificar e ou validar os parâmetros de desempenho: sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade.

Para os patógenos Xfp, Pss e fitoplasmas, o analista 1 utilizou, em cada dia, 7 amostras sabidamente positivas, sendo uma amostra com o DNA mais diluído, uma amostra com o DNA mais concentrado e o restante das amostras com os DNAs intermediários. As diluições foram estabelecidas conforme o LD obtido. Também foram utilizadas até 7 amostras sabidamente negativas, de patógenos não alvos à análise, incluindo a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Psv) e a matriz oliveira. O analista 2, utilizou as mesmas diluições seriadas das 7 amostras positivas do analista 1 e submeteu as mesmas condições da PCR em tempo real, a fim de verificar a reprodutibilidade da técnica.

Para os patógenos ArMV, CLRV e CMV, ambos analistas utilizaram, em cada dia, cada uma de suas amostras, da mesma forma que para os patógenos descritos

acima, sendo que o analista 2, além das 7 amostras sabidamente positivas, também utilizou as 7 amostras negativas para realizar a RT-PCR em tempo real.

Os resultados das PCRs em tempo real obtidos a partir dos dois dias, utilizando os dois analistas foram agrupados conforme descrito por Olmos *et al.* (2008), em verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) e posteriormente analisados conforme Apêndice 1, para avaliar os parâmetros de desempenho descritos acima.

3.2.8 Determinação da prevalência dos patógenos em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais

Para determinação do estado sanitário de plantas de oliveira, amostras foram coletadas no viveiro da Tecnoplanta, situado em Barra do Ribeiro - RS, e de um plantio comercial em Sertão Santana – RS, cadastro no SISGEN nº: ABC9B54. No viveiro, foram coletadas amostras de 5% das plantas matrizes dos cultivares Arbequina, Koroneiki, Coratina, Frantoio e Picual, totalizando 545 amostras. As matrizes estavam distribuídas por canteiros, onde as plantas foram escolhidas aleatoriamente, identificadas e coletados dois brotos de cada matriz. Seguindo a ordem de identificação e coleta, os brotos foram agrupados de 5 em 5, obtendo 38 amostras do cv. Arbequina, 47 do cv. Koroneiki e 8 amostras dos cvs. Coratina, Picual e Frantoio, separadamente. Na ocorrência de resultados positivos dentro dos grupos, as amostras foram analisadas separadamente.

Para as plantas de campo, foram coletados de três a cinco brotos do ano dos mesmos cultivares descritos anteriormente para viveiro, mais o cv. Arbosana, totalizando 140 amostras. As amostras coletadas foram agrupadas, obtendo 5 grupos de 5 plantas dos cvs. Arbequina, Arbosana, Frantoio e Koroneiki, e 4 grupos dos cvs. Coratina e Picual. Na ocorrência de resultados positivos dentro dos grupos, as amostras foram analisadas separadamente.

O preparo das amostras coletadas e posterior obtenção dos extratos, purificação dos ácidos nucléicos e as condições das reações de PCR em tempo real, foi realizado seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a verificação e ou validação do protocolo de detecção de cada patógeno.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1. Desenho de iniciadores e sondas

A partir da análise das sequências nucleotídicas obtidas, foi possível desenhar iniciadores e sondas TaqMan, específicos para os vírus ArMV, CLRV, CMV e SLRSV, conforme apresentado na Tabela 2. As sondas foram marcadas com o fluoróforo FAM, na extremidade 5', e um quencher (BHQ), na extremidade 3'. As condições de amplificação para a RT-PCR em tempo real foram seguidas conforme parâmetros descritos pelo software Primer Express, com exceção do CLRV, onde a temperatura de extensão foi alterada de 60°C para 62°C. Nas rodadas teste realizadas a fim de se verificar a funcionalidade dos iniciadores e sondas utilizando os controles positivos, foi observado amplificação de todos os patógenos-alvos, demonstrando o funcionamento dos marcadores, dos controles positivos e das condições de amplificação (Figura 1).

TABELA 2. Sequência dos iniciadores e sondas TaqMan desenhados ou utilizados neste trabalho.

Iniciadores e Sondas	Sequência (5'-3')	Referência
ArMV	F- TAGCCCTTGTACTTATGGCA	Este Trabalho
	R- TATTTAAACAGTTGATTCCA	
	P- FAM- GTTAGTGAATGGAACGGGGTCA- BHQ	
CLRV	F- GGTTATGTGGGTAGATAGCGTTAGC	Este Trabalho
	R- CCGACACTCATACAATAAGCAAATTT	
	P1- FAM- CAATATTTGTTGCCCGATCGGTTTTTC - BHQ	
	P2- FAM – CGATATTTGTTGCCCGTTAGTGTTTC - BHQ	
CMV	F- TTCCTGCCTCCTCGGACTT	Este Trabalho
	R- AGGCTCCGTCGCAAAC	
	P- FAM – TCCGTTGCCGCCATCTCTGCT - BHQ	
SLRSV	F- CAGCACCTCCCCAAA	Este Trabalho
	R- TCCGCTTCACCGGTATGC	
	P- FAM- CCTTTTCATAATAGGGTGGGTGTCCTTGTAAGC - BHQ	
Fit	F- AAATATAGTGGAGTTATCAGGGATACAG	Hren <i>et al.</i> , 2007
	R- AACCTAACATCTCACGACACGAACT	
	P- FAM - ACGACAACCATGCACCA - BHQ	
Pss	F- CGGATTTGGTTTGCGGGGTA	Tegli <i>et al.</i> , 2010
	R- AATGGGGTGACACTAAAATTGTGAA	
	P- FAM – CTCGTGCGATCTAAACAGCCGTAGC - BHQ	
Xfp	F- CACGGCTGGTAACGGAAGA	Harper <i>et al.</i> (2010); EPPO, 2016
	R -GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG	
	P – FAM- TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC - BHQ	

F: Forward; R: Reverse; P: Probe; ArMV: *Arabidopsis mosaic virus*; CMV: *Cucumber mosaic virus*; CLRV: *Cherry leaf roll virus*; SLRSV: *Strawberry latent ringspot virus*; Fit: Fitoplasma; Xfp: *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*; Pss: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

3.3.2. Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da PCR em tempo real

Os valores obtidos do limite de detecção (LD) demonstraram de modo geral, uma alta sensibilidade para a detecção dos patógenos alvos, tanto para vírus, quanto para bactérias e fitoplasmas (Figura 1). O LD teve variação entre os diferentes patógenos, variando de 10^{-4} para ArMV e Xfp, até 10^{-6} para CLRV, fitoplasmas e Pss (Tabela 3). Para o CMV, foi necessário estabelecer um Ct de corte de 35, devido a ampliações cruzadas em testes preliminares com não alvos à análise e a matriz oliveira (Figura 1 e Tabela 3). Os iniciadores e sonda para o vírus SLRSV apresentaram curvas típicas de amplificação, demonstrando seu funcionamento (Figura 1). Porém, estes não foram validados devido à baixa concentração do controle positivo e a inviabilidade na aquisição de um material de referência devido ao alto custo.

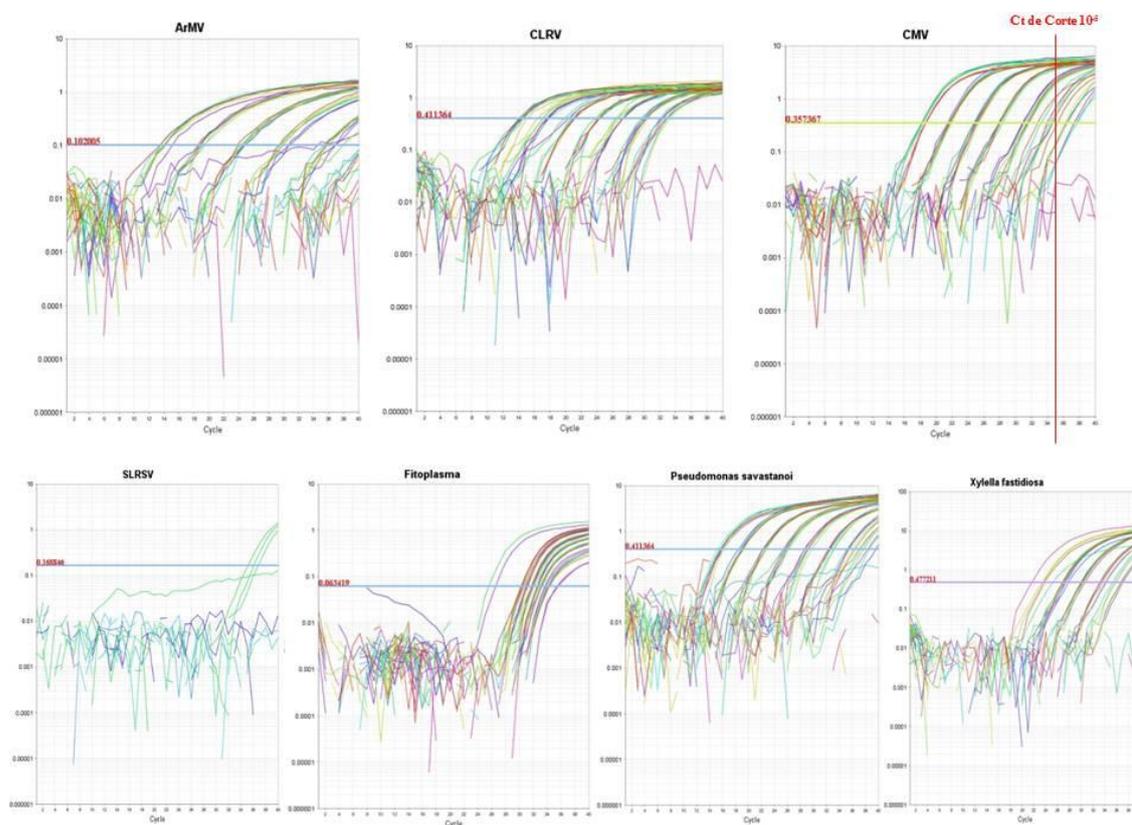


FIGURA 1. Curvas de amplificação por PCR ou RT-PCR em tempo real, demonstrando as diluições seriadas dos patógenos alvos na determinação do limite de detecção e funcionamento dos iniciadores de sondas do SLRSV.

De modo geral, os resultados do limite de detecção (LD) estão de acordo com as definições estabelecidas pela EPPO (2018b), o qual sugere que, quando não há quantificação inicial do patógeno alvo, deve-se seguir o máximo de diluição alcançado

pelo método. O estabelecimento do LD dos patógenos alvos é importante, pois corresponde ao menor valor que possivelmente será detectado em uma amostra, sendo relevante para padronizar protocolos para uso em diferentes laboratórios.

Para o parâmetro de desempenho da sensibilidade, foram obtidos diferentes porcentagens para cada patógeno, variando de 95% para a bactéria Xfp, até 100% para o vírus ArMV, a bactéria Pss e fitoplasmas (Tabela 3). Quanto à especificidade, as porcentagens foram de 81% e 93% para os vírus CMV e CLRV respectivamente, e 94% para Pss. Para os demais patógenos a especificidade foi de 100% (Tabela 3). Com relação à acurácia, com exceção do CMV que apresentou um valor de 91%, os demais valores foram superiores a 96%. Os valores de repetitividade e reprodutibilidade foram superiores a 90% em todos os casos (Tabela 3). De modo geral, as PCRs em tempo real para o vírus ArMV e para fitoplasmas obtiveram os melhores desempenhos, apresentando valores de 100% para todos os parâmetros (Tabela 3).

TABELA 3. Parâmetros de desempenho da PCR em tempo real estabelecidos para cada patógeno alvo.

Patógenos alvos	Ct de corte	LD	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia	Repetitividade	Reprodutibilidade
ArMV	-	10 ⁻⁴	100%	100%	100%	100%	100%
CMV	35	10 ⁻⁵	96%	81%	91%	91%	91%
CLRV	-	10 ⁻⁶	99%	93%	96%	92%	96%
Fit	-	10 ⁻⁶	100%	100%	100%	100%	100%
Pss	-	10 ⁻⁶	100%	94%	98%	98%	99%
Xfp	-	10 ⁻⁴	95%	100%	97%	93%	94%

Os valores em porcentagens dos parâmetros de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia, foram obtidos da análise de uma população de amostras sabidamente positivas e outras sabidamente negativas. Para a determinação dos parâmetros de desempenho do ArMV foram analisadas 124 amostras, das quais 72 eram sabidamente positivas e 52 negativas. Estes resultados foram confirmados pelas análises de RT-PCR em tempo real e não se obteve nenhum resultado falso negativo ou falso positivo (Tabela 4). No caso do CMV, foram analisadas 84 amostras sabidamente positivas e 48 negativas, totalizando 132 análises que confirmaram como verdadeiros positivos e verdadeiros negativos 81 e 39 respectivamente, sendo obtidos ainda 3 amostras como falsos negativos e 9 amostras falsos positivos. Já o CLRV, 84 amostras positivas e negativas foram analisadas, totalizando 168 análises, das quais obtiveram 83 verdadeiros positivos, 78 verdadeiros negativos, uma amostra falso negativo e 6 falsos

positivos. Para os fitoplasmas, 72 amostras foram analisadas, sendo 42 positivas e 30 negativas, não sendo obtido nenhum falso positivo ou negativo. No caso da Pss, foram analisadas 42 amostras sabidamente positivas e 18 sabidamente negativas, sendo 42 verdadeiramente positivas, 17 verdadeiramente negativas, uma amostra falso positivo e nenhuma falso negativo. Já a Xfp, foram 42 verdadeiros positivos e 36 negativos, totalizando 78 amostras analisadas, sendo duas falsos negativos e nenhum falso positivo (Tabela 4).

Quanto à estimativa da repetitividade e reprodutibilidade do método de detecção, este é um importante dado para o processo de validação e são necessárias para avaliar a robustez e principalmente fornecer dados confiáveis para a aplicação de protocolos entre diferentes laboratórios ou pesquisadores. Conforme apresentado por Botermans *et al.* (2013), comparações intra e inter-laboratórios foram obtidas 100% de concordância dos resultados, demonstrando robustez da técnica de RT-PCR em tempo real para detecção de todas as espécies do gênero *Pospiviroid*. No presente trabalho, estes parâmetros foram avaliados internamente no laboratório, apresentando bons resultados, como o ArMV e fitoplasmas, com 100% para ambos, e os demais com baixas variações entre amostras e os analistas, apresentados na Tabela 3. A utilização de materiais de referência caracterizados e disponibilizados por instituições reconhecidas internacionalmente também contribuem com a confiabilidade dos protocolos desenvolvidos e validados.

TABELA 4. Tabela de resultados para validação dos métodos de PCR ou RT-PCR em tempo real desenvolvidos ou utilizados.

Organismo Alvo	Amostras Positivas (Obtidas do LD)	Amostras Negativas (Extrato oliveira e não alvos)	Resultados Obtidos na PCR em tempo real			
			VP	FN	FP	VN
ArMV	72	52	72	0	0	52
CMV	84	48	81	3	9	39
CLRV	84	84	83	1	6	78
Fit	42	30	42	0	0	30
Pss	42	18	42	0	1	17
Xfp	42	36	40	2	0	36

VP: Verdadeiros positivos; FN: Falsos negativos; FP: Falsos positivos; VN: Verdadeiro negativos

A análise assertiva é crucial para a confiabilidade dos resultados e atestar a qualidade fitossanitária das matrizes de oliveiras. O uso de métodos confiáveis, rápidos

e simples e que permitam processar um grande número de amostras, contribuem para tornar o processo de qualidade fitossanitária exequível. Considerando que muitos patógenos podem estar presentes de modo latente ou em baixa quantidade nas plantas e que muitas plantas podem estar infectadas por mais de um patógeno, a busca por métodos de detecção com alta acurácia torna-se ainda mais necessária.

Os resultados de sensibilidade obtidos para a detecção da bactéria Xfp utilizando a oliveira como matriz foram superiores aos publicados pela EPPO (2016), utilizando a mesma matriz. Para o parâmetro especificidade, os resultados deste trabalho, corroboram com o publicado pela EPPO (2016), onde não foram observadas reações cruzadas com patógenos não alvos que também infectam as oliveiras. Li *et al.* (2013), utilizando os mesmos iniciadores e sondas TaqMan, também obtiveram alta sensibilidade e especificidade na detecção de *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* em plantas de citros. Dupas *et al.* (2019) obtiveram valores de Ct semelhantes aos encontrados neste trabalho, confirmando o LD de 10^{-4} .

A sensibilidade da PCR em tempo real para detecção da bactéria Pss foi estimada determinando o limite de detecção de $0,00005 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Este valor foi 10 vezes maior quando comparado ao método normalizado descrito por Tegli *et al.* (2010). Apesar daquele trabalho não demonstrar valores de especificidade, este estudo apresentou um único dado considerado falso positivo, possivelmente devido a uma contaminação durante o preparo da PCR. Além disto, a análise *in silico* dos iniciadores e sonda, juntamente com o sequenciamento da região 16S rDNA da bactéria, utilizada como controle positivo, confirmaram a confiabilidade da técnica. A mesma estratégia foi utilizada por Tegli *et al.* (2010), que confirmou todos os resultados positivos por sequenciamento da mesma região ribossomal.

A PCR em tempo real para detecção de fitoplasmas apresentou valores máximos em todos os parâmetros de desempenho avaliados. Estes resultados são importantes já que os fitoplasmas são organismos que se encontram em baixas concentrações nos tecidos vegetais e que podem apresentar sintomas similares a bactérias e vírus. A porcentagem de especificidade foi similar com a apresentada pelo método normalizado descrito por Hren *et al.* (2007), no qual não houve amplificação cruzada com nenhuma bactéria testada. Da mesma forma, não houve amplificação cruzada com as bactérias Xfp, Psv, Pss, que também infectam a oliveira.

Considerando a ausência de protocolos de RT-PCR em tempo real oficiais ou normalizados de detecção dos vírus ArMV, CLRV e CMV em oliveira, foi necessário o

desenho de iniciadores e sondas TaqMan e sua validação, determinando parâmetros de desempenho tais como: sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade, seguindo orientações da EPPO (2018b). Trabalhos semelhantes, com dados de validação para vírus e viroides vegetais foram publicados pela *International Plant Protection Convention* (IPPC). O protocolo de detecção do vírus *Citrus tristeza virus* (CTV) demonstrou maior especificidade utilizando a técnica sorológica ELISA (100%), quando comparado à técnica de RT-PCR em tempo real (85%). Por outro lado, a RT-PCR em tempo real apresentou maior sensibilidade (98%) comparado com a técnica ELISA (ITALIA, 2019). Este protocolo é recomendado para uso rotineiro na análise de CTV em material vegetal, onde a alta sensibilidade da técnica permite a análise de até 10 plantas em uma análise composta, e de afídeos transmissores do vírus, em qualquer época do ano (ITALIA, 2019).

Outro protocolo de diagnóstico para o vírus *Plum pox virus* (PPV), em uma análise entre 17 laboratórios, com amostras sadias e infectadas com o PPV, foi observado alta acurácia da técnica de ELISA (95%) em comparação com duas variações da RT-PCR convencional (82% e 94%). Porém, é recomendado o uso em paralelo de outros métodos de detecção quando utilizado anticorpos policlonais para confirmação de resultados frente ao PPV, isso porque diversos kits comerciais disponíveis utilizando anticorpos policlonais já demonstraram menor especificidade e não homogeneidade entre as diferentes marcas (ITALIA, 2020). Quanto ao parâmetro sensibilidade, as técnicas RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real, se mostraram 100 e 1000 vezes, respectivamente, mais sensíveis que a técnica ELISA. As porcentagens de verdadeiros positivos que foram diagnosticados corretamente foram de 97,5% para RT-PCR tempo real e 86,6%, para ELISA (ITALIA, 2020). Esses dados são extremamente importantes, visto que os testes sorológicos em alguns casos não são suficientemente eficientes na análise de plantas no período de dormência e com baixo título viral nas plantas (Capote *et al.*, 2009).

A eficiência da técnica molecular RT-PCR em tempo real também é demonstrada para detecção e diagnóstico do viroide *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), onde a alta sensibilidade da técnica permite a detecção de pequenas concentrações do viroide nas plantas, e uma maior especificidade é obtida quando comparado com a detecção biológica (ITALIA, 2017).

Em oliveiras, a detecção de alguns dos vírus descritos é realizada através de testes sorológicos como ELISA e testes moleculares, principalmente baseados na RT-

PCR convencional. A quantidade de vírus presente em uma planta pode ser influenciada diretamente pela época do ano e estágio de desenvolvimento, podendo ser um fator limitante para a utilização dos testes sorológicos que normalmente possuem uma baixa sensibilidade (López *et al.*, 2009). Além disso, a ausência de anticorpos específicos para determinados patógenos limita a utilização dos testes sorológicos. Diante disto, diversos protocolos baseados na RT-PCR convencional passaram a ser amplamente utilizados para detecção de patógenos, em especial os vírus (Faggioli *et al.*, 2005; 2017; Loconsole *et al.*, 2010; Luigi *et al.*, 2011)

Os testes moleculares baseados na RT-PCR convencional são mais sensíveis que os testes sorológicos e ainda são utilizados para a detecção e diagnóstico de vírus em plantas. Porém, sua eficiência está relacionada a fatores como tipo de polimerase, pureza e concentração do RNA viral e o risco de contaminações na eletroforese em gel de agarose para análise dos resultados, podendo reduzir a especificidade da técnica (Lopes *et al.*, 2009; Oliveira, 2010). A RT-PCR em tempo real, por outro lado, possui maior sensibilidade, especificidade e eficiência. A utilização de sondas específicas marcadas com fluoróforos permite que todo o processo seja realizado em um único passo, onde os resultados são observados em tempo real, evitando a necessidade da pós-PCR, reduzindo os riscos de contaminações e diminuindo significativamente o tempo da análise.

Bertolini *et al.* (2010), compararam a técnica sorológica ELISA e molecular RT-PCR em tempo real em plantas de videiras, em dois diferentes períodos vegetativos (inverno e primavera), na detecção dos vírus ArMV, *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll associated virus-1* (GLRaV-1) e *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3). Os resultados obtidos, demonstraram a maior precisão da RT-PCR em tempo real frente ao teste ELISA. Estes resultados, confirmam a menor sensibilidade do teste sorológico, principalmente, na fase de dormência (inverno) das plantas, onde a quantidade de vírus é baixa. Capote *et al.* 2009 compararam os testes de ELISA, RT-PCR convencional e em tempo real para detecção do PPV, onde foi observado que com a utilização de técnicas de menor sensibilidade, há um menor número de resultados falsos positivos, confirmando a confiabilidade dos resultados positivos. Por outro lado, o número de falsos negativos é maior, reduzindo a confiabilidade dos resultados negativos. Para programas de certificação de mudas, é importante o uso de técnicas de detecção com maior confiabilidade dos resultados verdadeiros negativos para assegurar a multiplicação de material vegetal sadio.

Os protocolos desenvolvidos neste trabalho para detecção dos vírus da oliveira, utilizando a RT-PCR em tempo real, e suas validações, mesmo na ausência de uma técnica de referência, foram extremamente satisfatórios. Requisitos essenciais foram cumpridos, conforme descrito pela EPPO (2018c), assim como todos os processos foram realizados em laboratório credenciado pela ISO17025:2005. De acordo com Petter & Suffert (2010), um método é considerado totalmente validado quando fornece dados para os critérios de desempenho: sensibilidade analítica, especificidade analítica, repetitividade e reprodutibilidade. No presente estudo, estes parâmetros foram obtidos para a detecção dos vírus ArMV, CMV e CLRV, das bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, e os fitoplasmas em plantas de oliveiras.

3.3.3. Determinação da prevalência dos patógenos em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais

Foram analisadas 545 plantas de viveiro onde apenas 4 amostras, compostas de 5 plantas, apresentaram resultados positivos frente a fitoplasmas, sendo um grupo do cultivar Arbequina, dois do cv. Coratina e um do cv. Picual. Na análise das 20 plantas individualmente, foi confirmado a presença de fitoplasmas em uma planta do cv. Arbequina (0,53%), duas plantas do cv. Coratina (0,25%) e uma planta do cv. Picual (0,12%) (Tabela 5).

TABELA 5. Número de plantas amostradas em proporção ao total de plantas de cada cultivar presentes no viveiro e amostras positivas para fitoplasmas analisadas em grupos de 5 plantas ou de maneira individual.

Cultivares	Total de Plantas no viveiro	Amostragem de 5%	Grupos de 5 plantas	Plantas individuais do grupo positivo
Arbequina	3.796	190	1/38*	1/5
Koroneiki	4.825	235	0/47	NA
Coratina	815	40	2/8	2/10
Frantoio	815	40	0/8	NA
Picual	815	40	1/8	1/5

* 1/38: Um grupo positivo de 38 grupos analisados; NA: Não analisado

Estes resultados demonstram de maneira geral, o bom estado sanitário das plantas matrizes de viveiro onde do total de 545 plantas analisadas, apenas 4 (0,73%)

foram positivas para fitoplasmas. Nenhum dos vírus analisados foi detectado nas plantas matrizes de viveiro. Nas amostras de campo, não foi detectado a presença de nenhum dos patógenos testados.

No Brasil, Ferreira (2017) relatou pela primeira vez a presença de fitoplasmas em plantas de oliveira com sintomas de vassoura-de-bruxa, localizadas no estado de Minas Gerais. Neste trabalho, os resultados positivos para fitoplasmas são preocupantes, pois na maioria das vezes, principalmente em mudas, elas apresentam-se assintomáticas. Neste caso, fica evidente a necessidade de um programa de certificação sanitária com a utilização de técnicas sensíveis e precisas, para a detecção precoce em viveiro, podendo evitar prejuízos futuros no campo. Apesar dos fitoplasmas serem transmitidos por cigarrinhas, as plantas matrizes estão em ambiente coberto e recebem tratamento frequente com inseticidas, minimizando desta forma possíveis transmissões horizontais.

Em relação aos vírus, a não obtenção de resultados positivos é apenas uma garantia das plantas amostradas neste viveiro, mas não é suficiente para garantir a ausência destes patógenos no Brasil em plantas de oliveira. De todos modos, a falta de insetos vetores conhecidos, pode ser um indício de que se estes estiverem presentes, a prevalência provavelmente seja baixa e limitada ao uso de material infectado durante a multiplicação.

Trabalhos já realizados em outros países, utilizando a técnica da PCR convencional para detecção dos vírus ArMV, CMV, CLRV e SLRSV, demonstram taxas de detecção abaixo dos 10% em plantas de oliveiras (Bertolini *et al.*, 2001; Faggioli *et al.*, 2005; 2017). Com o avanço das restrições quanto à comercialização de material vegetal sem certificação e o avanço nas técnicas de detecção, há um controle maior do material propagativo produzido e comercializado nos principais países produtores como Espanha, Itália e Portugal.

No Brasil, o descaso com a regulamentação sobre o comércio e introdução de plantas de oliveira, facilitou a entrada de materiais de diferentes procedências, tornando indispensável à aplicação de um programa de certificação de mudas para análises destes materiais e garantir a qualidade final. Da mesma forma, análises em outros viveiros e plantios comerciais, são de extrema importância para conhecer melhor a presença e prevalência destes vírus em nosso país.

Para determinar a prevalência de patógenos em plantas matrizes, a utilização da amostragem representativa e aleatória de 5% foi definida levando-se em consideração a ausência de informações na literatura sobre estudos de tamanho de

amostras específica para a cultura da oliveira. De acordo com Alves & Czermainski (2015), três aspectos são importantes no planejamento de um levantamento amostral em pomares: representatividade, aleatoriedade e exequibilidade, indo ao encontro do estabelecido neste trabalho. De acordo com Wulfsohn (2010), a investigação de uma parte da população selecionada aleatoriamente já é suficiente e pode se obter uma informação da população total, e todos os indivíduos da população total tem probabilidade de serem selecionados. Considerando-se que, no presente estudo, buscou-se determinar a prevalência dos patógenos em plantas matrizes de viveiros e plantios comerciais, deve-se ressaltar que a utilização da porcentagem de 5% é alta, pois as mudas devem apresentar-se isentas, de qualquer patógeno viral, bacteriano e/ou fitoplasmas, de forma a garantir a propagação exclusiva de material sadio.

A alta sensibilidade da técnica PCR em tempo real permitiu a realização de análises compostas de até 5 plantas. Neste caso, para aumentar a confiabilidade dos resultados, a identificação/localização das plantas que compuseram cada uma das 5 amostras para PCR em tempo real foram rastreáveis, de forma a identificar exatamente qual a planta estava infectada para que as medidas de manejo fossem implementadas. A eficiência da PCR em tempo real em analisar amostras compostas também foi demonstrada por Bertolini *et al.*, (2014), onde plantas cítricas saudáveis e infectadas com a doença Huanglongbing (HLB) foram analisadas, sendo demonstrado que é possível detectar a presença da bactéria em amostras compostas por uma única planta contaminada, junto com 9 plantas negativas. Vidal (2010), também demonstrou a possibilidade de uso de amostras compostas, onde foi possível a detecção do PPV em amostras com 10 plantas agrupadas, independentemente do número de plantas negativas sem perder a precisão da técnica da RT-PCR em tempo real e em qualquer época do ano.

Bertolini *et al.* (2003) também demonstraram a distribuição irregular dos vírus em uma planta de oliveira, sendo necessário a coleta de amostras representativas dentro de uma mesma planta, preferencialmente dois ou três brotos de plantas jovens (mudas) e quatro a cinco de plantas adultas.

No Brasil, não há conhecimento sanitário do material existente e propagado, muito menos rastreabilidade destes materiais. Assim, não se sabe se as plantas utilizadas em viveiros como matrizes, ou de plantios comerciais, são oriundas de países com certificação implantada ou de materiais já introduzidos anos atrás. De todos os modos, o bom estado fitossanitário observado no material analisado durante este trabalho, pode

ser consequência de uma pré-seleção realizada por instituições como a EMBRAPA ou Órgãos estaduais, produtores e viveiristas onde as plantas com melhor aspecto e bons índices de produção foram selecionadas como matrizes.

O presente estudo desenvolveu e validou protocolos de detecção dos principais patógenos de oliveiras e, a partir disto, pretende contribuir para agregar valor comercial e qualidade fitossanitária para as mudas produzidas em viveiros registrados e que possuam um esquema de análise das plantas matrizes. A crescente expansão do cultivo da oliveira em diversas regiões do Brasil, em especial no estado do Rio Grande do Sul, faz com que haja uma crescente demanda por mudas de oliveira. Consequentemente, há uma maior exigência com a qualidade do material vegetal produzido, principalmente livre de patógenos. No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, um programa de certificação para mudas de oliveira está em tramitação e, a aplicação de técnicas de detecção eficientes é indispensável. Desta forma, os protocolos desenvolvidos neste trabalho servirão como uma importante ferramenta de análise, detecção e diagnóstico de patógenos em plantas matrizes para produção de mudas de oliveiras.

3.4 Referências

- ALBANESE, G.; SAPONARI, M.; FAGGIOLI, F. Phytosanitary Certification. *In*: MUZZALUPO, I. **Olive Germplasm: The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy**. InTech Open, 2012. Cap. 6. p.107-132.
- ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. **British Medical Journal**. v. 308. p.1552. 1994a.
- ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Diagnostic tests 2: predictive values. **British Medical Journal**. v. 309 p.102. 1994b.
- ALVES, S. A. M.; CZERMANSKI, A. B. C. Controle de cancro europeu das pomáceas com base no novo ciclo *Neonectria ditissima* – macieira nas condições do Brasil. Embrapa - Comunicado Técnico 178. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1027351/controlado-cancro-europeu-das-pomaceas-com-base-no-novo-ciclo-neonectria-ditissima---macieira-nas-condicoes-do-brasil>. Acesso em 01 jun. 2020.
- BERTOLINI, E. et al. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal Virology Methods**. v.96. p. 33-41. 2001.
- BERTOLINI, E. Virosis e bacteriosis del olivo: detección serológica e molecular. 2003. Tese (Doutorado Engenharia Agrônoma). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos - Universidad Politécnica de Valencia. 2003a.

- BERTOLINI, E. *et al.* Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viroses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive tree. **Phytopathology**. v. 93 (3). p. 286-292. 2003b.
- BERTOLINI, E. *et al.* High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. **European Journal of Plant Pathology**. v. 128. p. 283-287. 2010.
- BERTOLINI, E. *et al.* Tissue-print and squash real-time PCR for direct detection of 'Candidatus Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. **Plant Pathology**. v. 63. p. 1149-1158. 2014.
- BOTERMANS, M. *et al.* Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. **Journal of Virological Methods**. v.187. p. 43-50. 2013.
- ÇAGLAYAN, K.; FAGGIOLI, F.; BARBA, M. Viruses, phytoplasmas and diseases of unknown etiology of olive trees. *In: HADIDI, A. et al. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*. v.53, p. 289-297. 2011.
- CAMBRA, M.; GORRIS, M. T.; TERRADA, E. Caracterización, diagnóstico y detección serológica de virus. *In: LLÁCER, G. et al. Patología vegetal*. Sociedade Española de Fitopatología (SEF), 1996. p. 207-254.
- CAMBRA, M.; PALLÁS, V.; BERTOLINI, E. Diagnóstico y detección. *In: AYLLÓN, M. et al. Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*. 1ª Ed. Sociedad Española de Fitopatología (SEF), 2016. cap. 3. p. 93-132.
- CAMPOS, M. D. *et al.* Establishment of a Sensitive qPCR Methodology for Detection of the Olive-Infecting Viruses in Portuguese and Tunisian Orchards. **Frontiers in Plant Science**. v.10 (694). p.1-7. 2019.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology**. v.12. p.1-6. 2009.
- CARAGUEL, C. G. B. *et al.* Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.23 (2). p.1-15. 2011.
- CHLIYEH, M. *et al.* Inventory and world geographical distribution of the olive tree (*Olea europaea* L.) diseases caused by viruses, bacteria and phytoplasma. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**. v.2. p. 1410-1440. 2017.
- DRUMMOND, A. J. *et al.* Geneious v.4.8.5. 2010. Disponível em: <http://www.geneious.com>. Acesso em: 22 Jun. 2018.
- DUPAS, E. *et al.* Comparison of real-time PCR and droplet digital PCR for the detection of *Xylella fastidiosa* in plants. **Journal of Microbiological Methods**. v. 162. p. 86-95. 2019.
- EPPO. PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Bulletin OEPP/EPPO**. p. 1-38. 2016.
- EPPO. PM 7/76 (5) Use of EPPO Diagnostic Standards. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Bulletin OEPP/EPPO**. v. 48 (3). p. 373-377. 2018.

- EPPO. PM 7/98 (3) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Bulletin OEPP/EPPO**. v. 48 (3). p.387-404. 2018b.
- EPPO. PM 7/82 (2). Basic requirements for quality management in plant pest diagnosis laboratories. European and Mediterranean Plant Protection Organization. **Bulletin OEPP/EPPO**. v. 48 (3). p.378-386. 2018c.
- FAGGIOLI, F. *et al.* Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. **Journal of Phytopathology**. v. 87. p.49-55. 2005.
- FAGGIOLI, F. *et al.* Sanitary selection of olive (*Olea europaea* L.) cultivars for worldwide distribution. **Asian Journal of Plant Pathology**. v. 11. p. 28-34. 2017.
- FERREIRA, J. Identificação molecular de um fitoplasma associado a árvores de oliveira com sintoma de vassoura-de-bruxa. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2017. accreditation for a plant pest diagn
- FILLIPINI ALBA, J.M. *et al.* Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul. Brasília, DF. Embrapa. v.80, p.77-111. 2014.
- FONSECA JR, A. A. *et al.* Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. MAPA/ACS. Brasília. 2015. 57p.
- ITALIA. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. PD 7: Viroide del tubérculo fusiforme de la papa (patata). NIMF 27, Roma. 2017. Disponível em: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/04/DP_07_2015_Es_2017-04-25_LRGreviewed.pdf. Acesso em: 5 abr. 2020.
- ITALIA. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. PD 15: Virus de la tristeza de los cítricos. NIMF 27, Roma. 2019. Disponível em: https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2018/02/DP_15_2016_Es_2018-01-15_RevLRG.pdf. Acesso em: 25 mar. 2020.
- ITALIA. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. PD 2: Plum pox virus. NIMF 27, Roma. 2020. Disponível em: <https://www.ippc.int/en/publications/dp-2-2012-plum-pox-virus/>. Acesso em 20 mar. 2020.
- LI, W. *et al.* Development and systematic validation of qPCR assays for rapid and reliable differentiation of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Journal of Microbiological Methods**. v. 92. p. 79–89. 2013.
- LOCONSOLE, G. *et al.* Interlaboratory validation of PCR-based protocol for detection of olive viruses. **EPPO Bulletin**. v. 40. p. 423-428. 2010.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria. **International Microbiology**. v. 6. p. 233-243. 2003.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Molecular Biology**. v. 11 (1). p. 13-46. 2009.
- LUIGI M. *et al.* Detection of viruses in olive trees in Croatian Istria. **Phytopathology Mediterranea**. v.50. p.150-153. 2011.

MARTELLI, G. P. A brief outline of infectious diseases of olive. **Palestine Technical University Research Journal**. v.1. p.1-9. 2013.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>. Acesso em 06. Jul de 2020.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

OLMOS, A. *et al.* An evidence-based approach to *Plum pox virus* detection by DASI-ELISA and RT-PCR in dormant period. **Virology**. v.1. p.1-8. 2008.

OUYANG, P. *et al.* Enhanced Reliability and Accuracy for Field Deployable Bioforensic Detection and Discrimination of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, Causal Agent of Citrus Variegated Chlorosis Using Razor Ex Technology and TaqMan Quantitative PCR. **PLOS One**. v.8. p.1-13. 2013.

PETTER, F.; SUFFERT, M. Survey on the use of tests mentioned in EPPO diagnostic protocols. **European and Mediterranean Plant Protection Organization**. v. 40. p.121-126. 2010.

RAMOS, C. *et al.* *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 998-1009, 2012.

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 (3). p. 659-668. 2013.

TEGLI, S. *et al.* Development of a versatile tool for the simultaneous differential detection of *Pseudomonas savastanoi* pathovars by End Point and Real-Time PCR. **BMC Microbiology**. v.10. p.1-14. 2010.

VIDAL, E. Epidemiología de *Plum pox virus* y *Citrus tristeza virus* em bloques de plantas de vivero. Métodos de control. 2010. Tese (Doutorado Engenharia Agrônômica). Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos - Universidad Politécnica de Valencia. 2010.

VIDAL, E. *et al.* Calculation of Diagnostic Parameters of Advanced Serological and Molecular Tissue-Print Methods for Detection of *Citrus tristeza virus*: A Model for Other Plant Pathogens. **Virology**. v. 102 (1). p. 114-121. 2012.

WULFSON, D. Sampling Techniques for Plants and Soil. *In*: DOWNEY, D. *et al.* Advanced Engineering Systems for Specialty Crops: A Review of Precision Agriculture for Water, Chemical, and Nutrient Application, and Yield Monitoring. Braunschweig: Landbauforschung Völkenrode, 2010, cap. 2. p. 3-30.

4 CAPÍTULO 2

**DESENHO E VALIDAÇÃO DE INICIADORES E SONDA PARA
DETECÇÃO DO VÍRUS *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) POR
PCR EM TEMPO REAL EM OLIVEIRAS**

4.1 Introdução

A oliveira (*Olea europaea* L.) é acometida por 15 espécies diferentes de vírus, causando doenças não bem definidas, mas que podem prejudicar o desenvolvimento e produção das plantas. De modo geral, ocorrem de forma latente e assintomáticos, mas alguns distúrbios como deformação das folhas e frutos, paralisia dos ramos, clorose e amarelecimento das folhas, podem ser associados quando confirmado a presença destes patógenos (Martelli, 2013). A queda na taxa de enraizamento de estacas, assim como na qualidade do azeite também já foram observados (Leitão *et al.*, 1997; Godena *et al.*, 2012). Quanto à epidemiologia, alguns destes vírus podem ser transmitidos por algum vetor específico, mas a forma mais comum é a transmissão através do material propagativo contaminado. A maioria dos vírus descritos em oliveira também infectam outras culturas, enquanto outros são específicos desta espécie, com o “*Olive*” na nomenclatura. Da mesma forma, alguns são mais raros e detectados esporadicamente, já outros estão em diversos países do mundo. O *Arabid mosaic virus* (ArMV), o *Cucumber mosaic virus* (CMV), o *Cherry leaf roll virus* (CLRv), o *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), o *Olive latent virus 1* (OLV-1), o *Olive latent virus 2* (OLV-2), o *Olive latent ringspot virus* (OLRSV) e o *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) são considerados os mais importantes vírus da oliveira. Esta classificação é baseada na prevalência e distribuição, visto que a sintomatologia ainda não é bem definida (Çaglayan *et al.*, 2011; Albanese *et al.*, 2013).

O *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) é um vírus específico da oliveira. Membro da família *Closteroviridae*, foi descrito a primeira vez por Savino *et al.*, 1996 em plantas de oliveira do cultivar ‘Biancolilla’. O OLYaV é o mais difundido e com alta prevalência em diferentes regiões do mundo (Chliyah *et al.*, 2017; Faggioli *et al.*, 2017; Zellama *et al.*, 2018). Sintomas de folhas amareladas são observados em plantas infectadas, o que pode interferir diretamente na fotossíntese e no desenvolvimento das plantas. Mas, na maioria das vezes as plantas não apresentam sintomas ou estes podem ser facilmente confundidos com deficiências minerais ou outros tipos de injúrias. Deste modo, técnicas de detecção são importantes para a correta detecção do vírus e diagnose dos sintomas causados.

As metodologias de detecção de vírus em oliveira são de importância, principalmente, quando ainda não se conhece os reais danos que causam as plantas. Assim, os métodos de detecção evoluíram ao longo dos anos, iniciando com os testes

sorológicos, como ELISA, aos testes moleculares baseados na amplificação de ácidos nucleicos, como a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Capote *et al.*, 2009). Inicialmente, a RT-PCR era utilizada como técnica complementar aos testes de ELISA, porém se mostrou mais rápida, sensível e confiável, principalmente quando o título viral na planta é baixo (Zellama *et al.*, 2018). Diversos trabalhos demonstraram a utilização da técnica ao longo dos últimos anos para detecção de vírus em oliveiras (Beiano *et al.*, 2005; Faggioli *et al.*, 2005; Youssef *et al.*, 2010; Faggioli *et al.*, 2017).

A RT-PCR em tempo real, variante da convencional, tem tornado a detecção de vírus ainda mais rápida, precisa e confiável, isso porque o risco de contaminação é reduzido, pois não é necessária uma etapa pós-PCR, além disso a utilização de compostos fluorescentes (corantes intercalantes e sondas específicas) aumentam a sua eficiência, em comparação à convencional, e possibilita o acompanhamento dos resultados em tempo real, acelerando análises de rotina (López *et al.*, 2009). O primeiro trabalho com RT-PCR em tempo real para detecção de vírus em oliveiras foi publicado para detecção dos vírus OLV-1, OMMD e OLYaV, utilizando o corante intercalante SYBR Green (Campos *et al.*, 2019). Até o momento nenhum trabalho utilizando sondas TaqMan foi publicado para detecção de vírus específicos de oliveiras. Esta tecnologia de uso de sondas de sequências específicas, como a TaqMan, é mais sensível e específica que o SYBR Green (Oliveira, 2010).

A maioria dos métodos de detecção publicados, não são validados corretamente. Diante disto, é importante garantir a confiabilidade e precisão das técnicas de detecção desenvolvidas e utilizadas na análise de vírus em oliveiras, através da validação de métodos, que verifica se o processo adotado está adequado para a finalidade proposta (López *et al.*, 2009). A inexistência de protocolos validados e até mesmo de uma técnica de referência “*Gold standard technique*”, para a detecção do OLYaV faz necessário o desenvolvimento e validação de um protocolo de detecção deste vírus.

Associado a falta de um protocolo validado de detecção e a alta prevalência e ampla distribuição do OLYaV em outros países, torna necessário o desenvolvimento de protocolos de detecção do vírus em oliveira no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma RT-PCR em tempo real para detecção do OLYaV de forma a conhecer o estado sanitário do material propagativo de viveiro e de plantio comercial, a fim de fornecer ferramentas para um possível programa de certificação.

Para isso, parâmetros de desempenho como limite de detecção, Ct “*Cut off*”, sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade já abordados no capítulo 1 desta dissertação para outros vírus de oliveira, foram avaliados.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Desenho de iniciadores e sondas

Foram obtidas sequências nucleotídicas disponíveis nas bases de dados do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) do vírus OLYaV. As sequências foram comparadas com o auxílio dos programas informáticos BLAST 2.0 e Geneious (Drummond *et al.*, 2010). O desenho de iniciadores e sonda TaqMan para RT-PCR em tempo real foi possível com o auxílio do programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystem) e a sequência do isolado Ror-1, região da proteína *shock* HSP70 (acesso GenBank KC133195).

4.2.2 Condições de amplificação por RT-PCR em tempo real

Para a realização da RT-PCR em tempo real utilizando os iniciadores e sonda desenhados para o vírus OLYaV, foram usados os seguintes reagentes: água estéril, 1x master mix (GoTaq Probe qPCR MM 2x), 1x RT Mix (GoScript 1-Step RT-qPCR 50x), 0,5 µM dos iniciadores forward (F) e reverse (R) 0,1 µM da sonda probe (P) e 2 µL de RNA purificado (amostra), em um volume final de 12 µL. As reações foram rodadas no termociclador StepOne Plus[®] (Applied Biosystems) nas condições: 1 ciclo: 45°C a 15 min e 95 °C a 2 min; 40 ciclos: 95°C a 15 s e 60°C a 45 s. Os produtos das reações de PCR em tempo real foram analisados com uso do software StepOne™. Todos os ensaios foram realizados no Agrônômica Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria – Porto Alegre, RS.

4.2.3 Condições de amplificação por RT-PCR convencional e sequenciamento

A RT-PCR convencional descrita por Campos *et al.* (2019), foi utilizada para confirmar a detecção do OLYaV por RT-PCR em tempo real. Os reagentes utilizados na reação foram: 4,90 µL de água, 7,50 µL de master mix (GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System), 0,30 µL de RT-Mix (GoScript Probe 1-Step RT-qPCR System), 0,15 µL dos iniciadores OLYaV Fw e OLYaV Rv a 25 µM, e 2µL de RNA purificado (amostra)

num volume final de 15µL por reação. As sequências dos iniciadores foram descritas por Sabanadzovic *et al.* (1999).

A reação foi realizada no termociclador SimpliAmp Thermal Cycler, Applied Biosystems nas condições: um ciclo a 45°C por 15 min, um ciclo a 95°C por 1 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, a 58°C por 1 min e a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Os amplicons foram processados em gel de agarose a 1,5% (peso / volume) em tampão 0,5X Tris / Borate / EDTA (TBE) a 90V a 80 minutos, sendo visualizados com corante azul verde (LGC) e visualizados em Luz UV usando o fotodocumentador L-PIX touch Loccus. Os tamanhos dos fragmentos, foram estimados contra um marcador de peso molecular padrão de 1kb (Qiagen, EUA). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, EUA) conforme recomendações do fabricante. Os produtos de PCR da região da proteína *shock 70* (*hsp70*) foram sequenciados em ambas as direções, usando os mesmos iniciadores utilizados para as reações de PCR, pela ATCGene *Molecular Analysis Company*, Porto Alegre, RS, utilizando um sequenciador automático AB-3500 (Applied Biosystems, EUA).

4.2.4 Obtenção do extrato vegetal

Ramos do ano de uma planta do cultivar Arbequina, localizada na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS em Eldorado do Sul, RS, cadastro no SISGEN nº: ABC9B54, foram coletados para obtenção dos extratos vegetais. Um grama do material vegetal foi macerado em bolsas plásticas individuais contendo tampão de extração fosfato (PBS, pH = 7,4 + 0,2% dietilditiocarbamato de sódio - DIECA + 2% PVP) (na proporção 1 peso: 10 volumes). Posteriormente, foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, identificados e conservados a -20°C até sua utilização. As amostras foram processadas no Laboratório de Virologia Vegetal da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

4.2.5 Obtenção dos controles positivos

Os controles positivos utilizados para a validação do método de detecção foram obtidos em coleções como a DSMZ *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*, Alemanha e materiais de referência internos do Laboratório Agronômica, com exceção do OLYaV onde se utilizou como controle, uma amostra confirmada por mais de uma técnica durante este trabalho, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1. Materiais de referência utilizados na validação para a detecção do OLYaV em plantas de oliveiras por RT-PCR em tempo real.

Patógenos	Provedor	Materiais
<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)	DSMZ	Extrato vegetal liofilizado
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	DSMZ	Extrato vegetal liofilizado
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Agronômica, RS	Extrato vegetal de tabaco
<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)	IVIA, Espanha	RNA de sementes de salsa
<i>Olive leaf yellowing associated virus</i> (OLYaV)	Agronômica, RS	Extrato vegetal de oliveira
Extrato de oliveira	EEA/UFRGS, RS	Extrato vegetal de oliveira

4.2.6 Extração ácidos nucleicos

Para a extração e purificação de RNA, foram utilizados 200 µL de extrato de oliveira, do controle positivo e dos não alvos SLRSV e CMV. Para o ArMV e CLRV, 100 mg de extrato vegetal liofilizado foram utilizados. O kit comercial da Promega SV Total RNA Isolation System foi utilizado para extração de RNA, seguindo recomendações do fabricante. Ao final, as amostras foram eluídas em 100 µL.

4.2.7 Obtenção do Limite de Detecção (LD)

Para estabelecer o limite de detecção (LD), foram realizadas diluições de 1:10 do controle positivo do OLYaV, utilizando RNA de oliveira como diluente. As diluições seriadas foram de 10^0 a 10^{-6} com 4 repetições. Posteriormente, as diluições foram submetidas a RT-PCR em tempo real.

Foram realizadas duas purificações de RNA, uma realizada pelo analista 1 e outra realizada pelo analista 2, e cada analista realizou suas diluições seriadas (RNA alvo + RNA oliveiras), de forma a obter o mesmo LD e garantir a reprodutibilidade, uma vez que, trata-se de uma validação de método, devido a confecção de um novo protocolo de detecção deste vírus em oliveiras. Foram incluídas nas análises, os controles negativos: branco da extração, utilizando 200 µL de água ultrapura no lugar da amostra, o branco do ambiente, onde um microtubo contendo 200 µL de água ultrapura foi deixado aberto durante toda a purificação do RNA e o branco da reação, no qual foi utilizado 2 µL de água ultrapura no lugar da amostra na etapa de RT-PCR em tempo real.

4.2.8 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da RT-PCR em tempo real

O limite de detecção (LD) estabelecido para o vírus OLYaV foi utilizado para realização de novas rodadas de RT-PCR em tempo real, analisados em triplicata de 12 amostras (7 amostras sabidamente positivas e 5 amostras sabidamente negativas), em dois dias diferentes, utilizando dois analistas, a fim de validar os parâmetros de desempenho: sensibilidade, especificidade, acurácia, repetitividade e reprodutibilidade.

O analista 1 utilizou, em cada dia, 7 amostras sabidamente positivas, sendo uma amostra com o RNA mais diluído, uma amostra com o RNA mais concentrado, e o restante das amostras com os RNAs intermediários, as diluições foram estabelecidas conforme o LD analisado. Também foram utilizadas 5 amostras sabidamente negativas, composta de patógenos não alvos à análise, incluindo os vírus ArMV, CLRV, CMV e SLRSV e a matriz oliveira. O analista 2, utilizou as mesmas diluições seriadas das 7 amostras positivas do analista 1 e submeteu as mesmas condições da RT-PCR em tempo real, a fim de se verificar a reprodutibilidade da técnica.

Os resultados das RT-PCRs em tempo real obtidos a partir dos dois analistas e nos diferentes dias, foram utilizados para avaliar os parâmetros de desempenho descritos acima, agrupados conforme descrito por Olmos *et al.* (2008), em verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) e posteriormente analisados conforme Apêndice 1.

4.2.9 Determinação da prevalência do patógeno em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais

Para determinação do estado sanitário de plantas de oliveira, amostras foram coletadas no viveiro da Tecnoplanta, situado em Barra do Ribeiro - RS, e de um plantio comercial em Sertão Santana – RS, cadastro no SISGEN n°: ABC9B54. No viveiro, foram coletadas amostras de 5% das plantas matrizes dos cultivares Arbequina, Koroneiki, Coratina, Frantoio e Picual, totalizando 545 amostras. As matrizes estavam distribuídas por canteiros, onde as plantas foram escolhidas aleatoriamente, identificadas e coletados dois brotos de cada matriz. Seguindo a ordem de identificação e coleta, os brotos foram agrupados de 5 em 5, obtendo 38 amostras do cv. Arbequina, 47 do cv. Koroneiki e 8 amostras dos cvs. Coratina, Picual e Frantoio, separadamente. Na ocorrência de resultados positivos dentro dos grupos, as amostras foram analisadas separadamente.

Para as plantas de campo, foram coletados de três a cinco brotos do ano dos mesmos cultivares descritos anteriormente para viveiro, com exceção do cv. Arbosana, totalizando 140 amostras. As amostras coletadas foram agrupadas, obtendo 5 grupos de 5 plantas dos cvs. Arbequina, Arbosana e Frantoio, e 4 grupos dos cvs. Coratina e Picual. Na ocorrência de resultados positivos dentro dos grupos, as amostras foram analisadas separadamente.

O preparo das amostras coletadas e posterior obtenção dos extratos, extração e purificação dos ácidos nucleicos e as condições das reações de RT-PCR em tempo real, seguiram-se os mesmos procedimentos descritos anteriormente para a validação do protocolo de detecção do OLYaV.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Desenho de iniciadores e sondas

A partir da análise das sequências nucleotídicas obtidas, foi possível desenhar iniciadores e sonda TaqMan para o vírus OLYaV, sendo o iniciador F (5'-CGTCACTTGTCTTGGTGATCATTT-3'), o iniciador R (5'-TGGAAACGATCTCATGCAGATT-3') e a sonda P (5'-FAM TCCTACATTCGGACAGGACCGTCTTCG -BHQ 3'). As condições de amplificação para a RT-PCR em tempo real foram seguidas conforme parâmetros descritos pelo software Primer express. A funcionalidade dos iniciadores e sonda desenhados foi observada em rodadas teste utilizando o controle positivo, demonstrando o funcionamento dos marcadores, do controle positivo e das condições de amplificação (Figura 1).

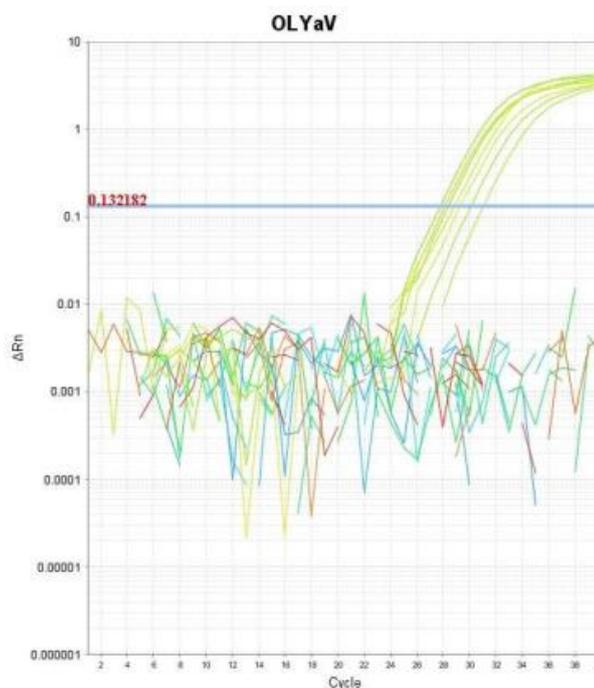


FIGURA 1. Curvas de amplificação por RT-PCR em tempo real, demonstrando o funcionamento dos iniciadores e da sonda do OLYaV.

4.3.2 RT-PCR convencional e sequenciamento

A partir da RT-PCR convencional, foram obtidos dois fragmentos, um de aprox. 600 pb e outro de aprox. 350 pb e posteriormente submetidos ao sequenciamento. Apenas o fragmento de aprox. 600 pb gerou sequências válidas. As sequências obtidas por ambos iniciadores (F e R) a partir da região da proteína *shock 70* (*hsp70*) foram editadas no programa BioEdit 7.0.5.3 e a sequência consenso, foi analisada pelo software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 7.0) (Kumar *et al.*, 2016), construído com o algoritmo ClustalW e comparado no banco de dados NCBI GenBank. A similaridade da sequência de nucleotídeos proveniente da amostra positiva foi calculada utilizando o programa BLAST (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) e apresentou 98,11% de identidade com a sequência do *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) (número de acesso Genbank KC133172.1).

No trabalho publicado por Campos *et al.* (2019), estes iniciadores amplificam apenas um fragmento de 346 pb. A amplificação de um fragmento de aprox. 600 pb em este trabalho pode ser devido a variabilidade que pode existir nesta espécie. Mais trabalhos precisam ser realizados e outros isolados devem ser comparados para confirmar esta hipótese. Amostras de RNA purificado das plantas onde foi detectada a presença do OLYaV em este trabalho, foram enviadas para sequenciamento por “Next-

Generation Sequencing” (NGS), para confirmar a identidade do vírus. A utilização de duas técnicas é importante para a confirmação da identidade do vírus OLYaV, detectado através da RT-PCR em tempo real.

4.3.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho da técnica da RT-PCR em tempo real

O limite de detecção estabelecido para o vírus OLYaV foi de 10^{-6} . Os valores em porcentagens dos parâmetros de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia, foram obtidos da análise de uma população de 72 amostras sabidamente positivas e outras 56 sabidamente negativas, totalizando 128 análises. Destas, foram obtidos 68 verdadeiros positivos, 55 verdadeiros negativos, quatro amostras falso negativos e uma falso positivo (Tabela 2). A partir da Tabela descrita no Apêndice 1, os parâmetros de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia foram de 94%, 98% e 96%, respectivamente. Já a repetitividade e a reprodutibilidade do método foi de 98% e 95%, nesta ordem, com baixas variações entre amostras e os analistas.

TABELA 2. Tabela de resultados para validação da RT-PCR em tempo real para o OLYaV.

Organismo alvo	Amostras positivas (Obtidas do LD)	Amostras negativas (Extrato oliveira e não alvos)	Resultados obtidos na RT-PCR em tempo real			
			VP	FN	FP	VN
OLYaV	72	56	68	4	1	55

Os parâmetros de desempenho e a importância da validação de um novo método, principalmente quando não há uma técnica de referência ou métodos oficiais e internacionais, foram discutidos anteriormente no capítulo 1 para os demais protocolos de detecção de vírus em oliveiras validados. É importante destacar que a análise *in silico* dos iniciadores e sonda, juntamente com o sequenciamento da região da proteína shock (hps70) do vírus OLYaV, utilizado como controle positivo, proporcionam uma maior confiabilidade na correta detecção do vírus e da precisão da técnica de RT-PCR em tempo real.

As técnicas moleculares, de modo geral, são a base das ferramentas de diagnósticos dos últimos anos, preferencialmente utilizadas devido à maior sensibilidade, especificidade e rapidez. Em oliveiras, a detecção de alguns dos vírus descritos é realizada através de testes sorológicos como ELISA e testes moleculares, principalmente baseados na RT-PCR convencional. A quantidade de vírus presente nas

plantas pode influenciar a utilização dos testes sorológicos, os quais normalmente possuem uma baixa sensibilidade (López *et al.*, 2009). Além disso, a ausência de anticorpos específicos para determinados patógenos e a presença de inibidores nas plantas de oliveira, acabam que limitando a utilização destes testes individualmente (Bertolini *et al.*, 2001). Erilmez & Erkan (2016) avaliaram a sensibilidade da técnica ELISA e a RT-PCR convencional na análise de plantas de oliveira, provenientes de diferentes regiões da Turquia, frente aos vírus ArMV, CLRV, CMV, SLRSV, OLV-1, OLV-2, OLV-3, OLRV e OLYaV, onde verificaram maior sensibilidade da RT-PCR na análise de diferentes partes vegetais das plantas.

O desempenho dos testes moleculares fez com que estes protocolos passassem a serem adotados amplamente na detecção e diagnóstico de diversos vírus em plantas de oliveiras (Youssef *et al.*, 2010; Faggioli *et al.*, 2005, 2017; Zellama *et al.*, 2018). Porém, a baixa sensibilidade, necessidade de uma etapa de purificação dos ácidos nucleicos devido à ação de inibidores e risco de contaminação na etapa pós-PCR, tornam-se algumas desvantagens da técnica. Deste modo, a RT-PCR tempo real demonstrou ser mais sensível e específica, além de não ser necessária uma etapa de eletroforese em gel para visualização dos resultados, visto que os produtos da PCR podem ser acompanhados em tempo real devido à ação de fluoróforos que emitem fluorescência ao longo da reação.

Campos *et al.* (2019), desenvolveram um protocolo para detecção dos vírus OLV-1, OLYaV, OMMV e o *Tobacco necrosis virus* (TNV-D) em plantas de oliveira utilizando a RT-PCR em tempo real com tecnologia SYBR Green. Dois experimentos foram realizados para uma análise comparativa entre a técnica desenvolvida com uma RT-PCR convencional. Um total de 63 amostras foram analisadas com ambas as técnicas. Através da RT-PCR tempo real, 56 foram positivas para o OLV-1, 20 para o OLYaV e 38 para o OMMV e TNV-D. Já com a RT-PCR convencional, os valores foram inferiores, com 13, 10 e 16 amostras positivas, respectivamente. Deste modo foi observado a maior sensibilidade da técnica de RT-PCR em tempo real na comparação com a RT-PCR convencional.

É importante destacar que o composto fluorescente SYBR Green intercala-se em qualquer DNA de fita dupla, incluindo produtos de sequências não específicas, dificultando a análise dos resultados, podendo gerar falsos positivos. A análise dos resultados a partir do SYBR Green geralmente é realizada através da temperatura de dissociação dos amplicons (produtos de amplificação) (temperatura de *melting* - T_m)

que pode sofrer pequenas alterações de valores em diferentes análises dependendo dos reagentes e equipamentos utilizados. Assim, este trabalho validou iniciadores e uma sonda TaqMan que normalmente é mais sensível, específica e confiável que a PCR utilizando SYBR-Green (Oliveira, 2010). Além disso, a utilização de sondas TaqMan, podem ser utilizadas sem a necessidade de purificação dos ácidos nucleicos (“direct PCR”) com excelentes resultados.

Neste trabalho, a metodologia desenvolvida para a detecção do OLYaV obteve parâmetros de desempenho com índices extremamente satisfatório, considerando a ausência de técnicas de referência baseadas na RT-PCR tempo real utilizando sonda TaqMan. Assim, a validação de um novo protocolo com alta sensibilidade e especificidade possibilitará uma maior confiabilidade na detecção e diagnóstico do vírus em plantas de oliveiras.

4.3.4 Determinação da prevalência do patógeno em materiais vegetais de viveiro e plantios comerciais

Foram analisadas 545 plantas de viveiro de diferentes cultivares. Destes, 490 plantas, dos cvs. Arbequina, Koroneiki, Picual e Frantoio testaram negativos para o OLYaV. Entretanto, todos os oito grupos do cv. Coratina apresentaram resultado positivo. A análise individual dentro de cada grupo demonstrou que as 40 plantas (100%) estavam infectadas com o vírus OLYaV (Tabela 3).

TABELA 3. Detecções do *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) nas diferentes cultivares presentes no viveiro.

Cultivares	Total de Plantas no viveiro	Amostragem de 5%	Grupos de 5 plantas	Plantas individuais dos grupos positivos
Arbequina	3.796	190	0/38	NA**
Koroneiki	4.825	235	0/47	NA
Coratina	815	40	8/8*	40/40
Frantoio	815	40	0/8	NA
Picual	815	40	0/8	NA

* 8/8: Oito grupos positivos de 8 grupos analisados **NA: Não analisado

As amostras do plantio comercial reproduziram os resultados obtidos no viveiro, todos os 4 grupos do cv. Coratina foram positivos. Na análise das 20 plantas individualmente, todas foram positivas para o OLYaV. Nas 120 amostras dos demais cultivares não foi detectada a presença do vírus. Todas as mudas de oliveira utilizadas para compor o plantio comercial em Sertão Santana – RS, do cv. Coratina, tiveram como origem as plantas matrizes do viveiro comercial, reforçando a afirmação de Albanese *et al.* (2012), de que o principal método de propagação dos vírus da oliveira, em especial o OLYaV é através do material propagativo contaminado.

Estes resultados demonstram a importância de metodologias validadas de detecção de patógenos em plantas utilizadas como fornecedoras de material vegetal para obtenção de mudas e que a rastreabilidade das mudas é um requisito importante e fundamental para definir critérios de manejo dos patógenos.

No Brasil, não há informações da presença de nenhum dos vírus descritos na oliveira. Este é o primeiro relato do OLYaV em oliveiras no Brasil, onde é considerado uma praga exótica. Como neste trabalho foram coletadas e analisadas amostras apenas de um viveiro e plantas de campo procedentes do mesmo viveiro, não é possível estimar a real disseminação deste vírus em outros viveiros e plantações, uma vez que é necessária uma maior abrangência de amostragens, para melhor classificar a distribuição do OLYaV. O não cumprimento da regulamentação sobre o comércio e introdução de plantas de oliveira, permitiu a entrada de materiais não fiscalizados de diferentes procedências, tornando indispensável à aplicação de um programa de certificação de mudas para análises destes materiais e garantir a qualidade sanitária. Trabalhos anteriores, demonstraram a alta incidência do OLYaV também em outros países. Faggioli *et al.* (2017), analisaram por RT-PCR convencional 189 plantas de diferentes cultivares de oliveira na Itália, das quais 40% testaram positivas para o OLYaV, 3,17% para CLRV e 0,53% para o ArMV. Al Rwahnih *et al.* (2011), analisaram, também por RT-PCR convencional, diferentes cultivares de oliveira que compõem o repositório clonal de germoplasma dos EUA, com materiais de 19 países e relataram que 93,8% das plantas testaram positivas para o OLYaV, e 34,7% para o CMV, demonstrando a ampla distribuição do vírus em diversas regiões de cultivo no mundo. Zellama *et al.* (2018), observaram uma prevalência de 63% do OLYaV em plantas de oliveira dos cvs. Arbequina, Koroneiki e Picual na Tunísia.

A preocupação com a qualidade das mudas e o avanço nas técnicas de detecção, está fazendo com que haja um maior controle do material propagativo

produzido e comercializado nos principais países produtores como Espanha, Itália e Portugal onde existem programas de certificação de material vegetal estabelecidos.

Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um protocolo de detecção do OLYaV, o qual permitiu detectar pela primeira vez a presença do vírus em plantas de oliveira no Brasil. A expansão da olivicultura está atrelada a alta demanda por novas mudas. Deste modo, a qualidade fitossanitária de todo material vegetal produzido é esperada, visando garantir a sanidade das plantas desde o viveiro até o campo. Um programa de certificação para mudas de oliveira está em elaboração no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o qual necessitará de metodologias de detecção e diagnóstico confiáveis e eficientes para a análises de rotina. Desta forma, as ferramentas desenvolvidas neste trabalho poderão ser aplicadas em plantas matrizes a fim de garantir a produção de material livre de vírus.

4.4 Referências

- ALBANESE, G.; SAPONARI, M.; FAGGIOLI, F. Phytosanitary Certification. *In: MUZZALUPO. I. Olive Germplasm: The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy.* InTech Open, 2012. Cap. 6. p. 107-132.
- AL RWAHNINH, M. *et al.* Characterization of latent viral infection of olive trees in the national clonal germplasm repository in California. **Journal of Plant Pathology.** v. 93 (1). p. 227-231. 2011.
- BERTOLINI, E. *et al.* Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. **Journal Virology Methods.** v. 96. p. 33-41. 2001.
- CAMPOS, M. D. *et al.* Establishment of a sensitive qPCR methodology for detection of the olive-infecting viruses in portuguese and tunisian orchards. **Frontiers in Plant Science,** Lausanne, v.10, [art.] 694, [p.1-7], 2019.
- CAPOTE, N. *et al.* Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. **International Microbiology.** v. 12. p. 1-6. 2009.
- CHLIYEH, M. *et al.* Inventory and world geographical distribution of the olive tree (*Olea europaea* L.) diseases caused by viruses, bacteria and phytoplasma. **International Journal of Environment, Agriculture & Biotechnology,** New Delhi, v. 2, p. 1410-1440, 2017.
- DRUMMOND, A. J. *et al.* Geneious v.4.8.5. 2010. Disponível em: <http://www.geneious.com>. Acesso em: 22 Jun. 2018.
- ERILMEZ, S.; ERKAN, S. The comparison of sensitivity of various methods in the detection of olive tree viruses. **Journal of Turkish Phytopathology.** v. 45 (1). p. 1-12. 2016.
- FAGGIOLI, F. *et al.* Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by one-step RT-PCR. **Journal of Phytopathology.** v. 87. p. 49-55. 2005.

- FAGGIOLI, F. *et al.* Sanitary selection of olive (*Olea europaea* L.) cultivars for worldwide distribution. **Asian Journal of Plant Pathology**. v. 11. p. 28-34. 2017.
- GODENA, S. *et al.* Cherry leaf roll virus: impact on olive fruit and virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science Technology**. v. 114. p. 535-541. 2012.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v. 33. p. 1870-1874. 2016.
- LEITÃO, F. *et al.* Selección clonal y sanitaria de 10 cultivares de *Olea europaea* L. en el sur de Portugal, **Olivae**, v. 66. p. 51-53. 1997.
- LÓPEZ, M. M. *et al.* Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Molecular Biology**. v. 11 (1). p. 13-46. 2009.
- MARTELLI, G. P. A brief outline of infectious diseases of olive. **Palestine Technical University Research Journal**. v. 1. p. 1-9. 2013.
- NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>. Acesso em 06. Jul de 2020.
- OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. Tese (Doutorado) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.
- OLMOS, A. *et al.* An evidence-based approach to *Plum pox virus* detection by DAS-ELISA and RT-PCR in dormant period. **Virology**. v. 1. p. 1-8. 2008.
- SABANADZOVIC S. *et al.* Partial molecular characterization and RT-PCR detection of a putative closterovirus associated with leaf yellowing. **Journal of Plant Pathology**. v. 81. p. 37-45. 1999.
- SAVINO, V. *et al.* Due giallumi di possibile origine virale in Sicilia. **Informatore Fitopatologico**. v. 46 (5). p. 55-59. 1996.
- YOUSSEF, S. A. *et al.* Detection of olive tree viruses in Egypt by one-step RT-PCR. **Julius-Kühn-Archiv**. v. 427. p. 51-55. 2010.
- ZELLAMA, M. S. *et al.* An integrated approach for understanding the high infection rates of olive viruses in Tunisia. **European Journal of Plant Pathology**. v. 153. p. 1043-1054. 2018.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Foram desenhados iniciadores e sondas TaqMan e validado protocolos de detecção por RT-PCR em tempo real para os vírus *Arabid mosaic virus* (ArMV), *Cherry leaf roll virus* (CLRV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) em material vegetal de oliveira.

Foram desenhados iniciadores e sonda TaqMan para detecção por RT-PCR em tempo real do vírus *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) em material vegetal de oliveira.

Foram validados protocolos de detecção por PCR em tempo real para as bactérias *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) e *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp) em material vegetal de oliveira.

Foi validado protocolo de detecção por PCR em tempo real para fitoplasmas em material vegetal de oliveira.

Os protocolos desenvolvidos e validados permitiram conhecer o estado sanitário de plantas matrizes de viveiro e plantios comerciais, demonstrando, de modo geral, baixa prevalência dos patógenos analisados.

O desenvolvimento e validação do protocolo de detecção por RT-PCR em tempo real para *Olive leaf yellowing associated virus* (OLYaV) permitiu a primeira detecção deste vírus em plantas de oliveira no Brasil.

Em todas as plantas de oliveira do cv. Coratina analisadas, foi detectada a presença do OLYaV, sugerindo a introdução de material contaminado de outros países.

6 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Tabela de contingência para avaliação do método molecular

Resultado confirmado	Resultado presuntivo obtido			Cálculos (%)		
	Positivo	Negativo	Resultado	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
Positivo	a	b	a+b	$a/(a+c) \times 100$	$d/(b+d) \times 100$	$(a+d)/n \times 100$
Negativo	c	d	c+d			
Resultado	a+c	b+d	N			

a: número de presumíveis positivos encontrados como positivo (verdadeiros positivos); b: número de presumíveis negativos encontrados como positivo (falsos positivos); c: número de presumíveis positivos encontrados como negativos (falsos negativos) e d: número de presumíveis negativos encontrados como negativos (verdadeiros negativos).