



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiana Raquel Marques dos Santos

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS
REGULADAS DE PLANTAS – OTIMIZAÇÃO E
IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETEÇÃO

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Recursos
Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade,
orientado pela Doutora Joana Cardoso da Costa e Mestre Daniela
Filipa Pereira Nunes Figueira e apresentado à Faculdade de
Ciências e Tecnologia / Departamento de Ciências da Vida.

Julho de 2023

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra
Departamento de Ciências da Vida

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS REGULADAS DE PLANTAS – OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETEÇÃO

Cristiana Raquel Marques dos Santos

Relatório de Estágio orientado pela Doutora Joana Cardoso da Costa e
Mestre Daniela Filipa Pereira Nunes Figueira e apresentado à Faculdade de
Ciências e Tecnologia / Departamento de Ciências da Vida.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Este relatório foi redigido no âmbito da unidade curricular Estágio do Mestrado em Recursos Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade, realizado no Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes e incluiu um trabalho realizado no âmbito do projeto XYLOUT - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus* (PTDC/ASP-PLA/3145/2021), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P.



Agradecimentos

Este relatório de estágio é o culminar de um ano letivo a estagiar no FITOLAB e o cessar de uma etapa maior na minha vida.

Tive a sorte de durante os últimos anos ter várias “casas” que me formaram a nível pessoal e profissional. Há pessoas e locais às quais devo um sincero agradecimento por todo o suporte e carinho recebido durante esta jornada.

Começo pela família e amigos, aos quais devo um especial agradecimento pela oportunidade que me dão de seguir os meus sonhos e por acreditarem em mim.

Ao Núcleo de Estudantes de Biologia, em especial ao pelouro de Intervenção Cívica que tive o prazer de fundar e coordenar durante 2 anos, e ao Grupo Ecológico da Associação Académica de Coimbra, por me ensinarem o que é a dedicação a uma causa e me ajudarem a desenvolver *skills* essenciais.

A toda a malta do FITOLAB, um obrigada é pouco para agradecer a maneira calorosa com que me receberam e ajudaram durante este ano. Tornaram cada tarefa, mesmo as mais difíceis, em algo agradável de fazer. Obrigada por toda a experiência que partilharam comigo! Tenho de fazer um agradecimento especial às minhas orientadoras. À Joana, tenho a agradecer toda a ajuda, toda a disponibilidade e todo o rigor científico que partilhou comigo que foram essenciais no meu desenvolvimento. À Daniela, obrigada por toda a paciência e dedicação e por me aturares na secretária. Foste essencial para mim e um obrigado será sempre pouco. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui!

Por fim, um agradecimento especial à minha família escutista, o meu agrupamento de escuteiros, 1067 - Pampilhosa, que foi e será casa para todas as situações. Estou perfeitamente ciente e grata pela oportunidade de ter crescido com vocês e de ter aprendido o que é realmente importante nesta vida.

Obrigada a todos!

Resumo

As plantas são a base para a vida na Terra contribuindo, direta e indiretamente, para o bem-estar humano através de diferentes serviços dos ecossistemas. A saúde vegetal é assim essencial para manter o equilíbrio dos ecossistemas. No entanto, potenciado pelas alterações climáticas e pela atividade humana, a emergência de novas pragas e doenças é uma ameaça permanente para a segurança alimentar e produção agrícola sustentável. Para a maioria dos casos não há tratamentos eficazes disponíveis, pelo que a prevenção e o diagnóstico precoce desempenham um papel crucial. A implementação de métodos de controlo adequados é igualmente essencial para mitigar o impacto destes organismos patogénicos no ambiente e na economia.

Métodos de deteção eficazes para a deteção de pragas e doenças são ferramentas essenciais em qualquer laboratório de fitossanidade. Os métodos moleculares, devido à sua sensibilidade e especificidade, revelaram-se ferramentas fundamentais neste tipo de análises, mas exigem padrões mínimos de qualidade e quantidade de DNA para serem confiáveis. A obtenção de DNA total em quantidade e qualidade é um passo fundamental para o diagnóstico de doenças, porém, os elevados metabolitos secundários na matriz vegetal interferem com algumas reações, como a PCR. Neste contexto, foi desenvolvido um projeto de investigação com o objetivo de determinar o impacto que a matriz vegetal analisada tem na qualidade do DNA total extraído através do método de CTAB, recorrendo a uma análise sistematizada dos registos de ensaio de deteção molecular de *Xylella fastidiosa*, cujos resultados evidenciaram a existência de alguns géneros que dificultam o processo de extração do DNA total, resultando numa proposta de melhoria do protocolo de ensaio no Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes.

Neste projeto, foram ainda realizados ensaios de deteção dos organismos regulados *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora* e *Xylella fastidiosa* no âmbito de controlos oficiais e no âmbito do projeto de investigação XylOut. A deteção de *Xylella fastidiosa*, numa amostra de *Prunus avium*, um novo hospedeiro da bactéria em Portugal, reforçou a importância de projetos de investigação e da prospeção para a deteção precoce de focos de infeção, neste caso em pomares de *Prunus*, para um controlo eficaz e/ou erradicação do mesmo e para a compreensão da incidência desta bactéria em *Prunus* no território nacional.

Palavras-chave

Xylella fastidiosa, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora*, Real time polymerase chain reaction, Diagnóstico.

Abstract

Plants are the foundation of life on Earth and contribute directly and indirectly to human well-being through various ecosystem services. Plant health is therefore essential to maintaining the balance of ecosystems. However, the emergence of new pests and diseases, exacerbated by climate change and human activities, is a constant threat to food security and sustainable agricultural production. In most cases, there are no effective treatments available, so prevention and early diagnosis play a crucial role. The implementation of appropriate control methods is also essential to mitigate the environmental and economic impact of these pathogens.

Effective detection methods for pests and diseases are essential tools in any phytosanitary laboratory. Molecular methods have proven to be fundamental tools in this type of analysis due to their sensitivity and specificity, but they require minimum standards of DNA quality and quantity to be reliable. Obtaining the quantity and quality of total DNA is a fundamental step in disease diagnosis, but the high levels of secondary metabolites in the plant matrix interfere with some reactions, such as PCR. In this context, a research project was developed with the aim of determining the influence of the analyzed plant matrix on the quality of the total DNA extracted by the CTAB method, using a systematic analysis of *Xylella fastidiosa* molecular detection assay protocols. The results showed the existence of some genera that hindered the total DNA extraction process, leading to a proposal to improve the assay protocol at the Instituto Pedro Nunes Phytosanitary Laboratory.

This project also included testing for the regulated organisms *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora* and *Xylella fastidiosa* as part of official controls and the XylOut research project. The detection of *Xylella fastidiosa* in a sample of *Prunus avium*, a new host for the bacterium in Portugal, confirmed the importance of research projects and surveys for the early detection of infection foci, in this case in *Prunus* orchards, for effective control and/or eradication of the same, and for understanding the incidence of this bacterium in *Prunus* on the national territory.

Keywords

Xylella fastidiosa, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora*, Real time polymerase chain reaction, Diagnosis.

Abreviaturas

BI Beira Interior

CCT *Cycloheximide-Crystal violet-Thallium Nitrate*

CFU Unidade formadora de colónias

COX Gene constitutivo citocromo oxidase

CTAB Brometo de hexadeciltrimetilamónio

DGAV Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DNA *Deoxyribonucleic acid*

Ea *Erwinia amylovora*

EFSA *European Food Safety Authority*

EPPO *European and Mediterranean Plant Protection Organization*

FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

FITOLAB Laboratório de Fitossanidade

IPAC Instituto Português de Acreditação

IPN Instituto Pedro Nunes

IPPC *Internacional Plant Protection Convention*

ITS *Internal Transcribed Spacer*

KB *King B*

KBC *King B* modificado

NAC Controlo negativo de amplificação

NEC Controlo negativo da extração

NIC Controlo negativo do isolamento

ODS Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

ONT *Oxford Nanopore Technologies*

ONU *United Nations Organization*

PAC Controlo positivo de amplificação

PBS Solução tampão fosfato-salino

PBS-Tween-20 Solução tampão fosfato-salino-Tween-20

PCR *Polymerase chain reaction*

PE Procedimento de ensaio

PIC Controlo positivo do isolamento

Psa *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

RNQP Praga regulamentada não sujeita a quarentena

RT Responsável técnico

RT-PCR *Real time polymerase chain reaction*

TBE Tris-Borato-EDTA

TEA Tampão de extração Llop

UE União Europeia

Xf *Xylella fastidiosa*

Índice

1	Introdução	1
1.1.	Enquadramento empresarial	1
1.2.	Sanidade vegetal e sustentabilidade	1
1.3.	Importância do diagnóstico através de métodos moleculares	4
1.4.	Objetivos	6
2	Métodos de deteção de organismos nocivos regulados de plantas	7
2.1.	Deteção e identificação de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	9
2.1.1.	Introdução	9
2.1.2.	Materiais e métodos	15
2.1.3.	Resultados e discussão	19
2.1.4.	Conclusão	21
2.2.	Deteção e identificação de <i>Erwinia amylovora</i>	22
2.2.1.	Introdução	22
2.2.2.	Materiais e métodos	28
2.2.3.	Resultados e discussão	34
2.2.4.	Conclusão	36
2.3.	Deteção de <i>Xylella fastidiosa</i>	38
2.3.1.	Introdução	38
2.3.2.	Materiais e métodos	44
2.3.3.	Resultados e discussão	47
2.3.4.	Conclusão	50
3	Avaliação da incidência das doenças associadas aos pomares de <i>Prunus</i> na região da Beira Interior	51
3.1.	Contextualização	51
3.2.	Metodologia	53
3.2.1.	Amostras analisadas	53
3.2.2.	Deteção molecular de <i>Erwinia amylovora</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	53
3.2.3.	Verificação dos controlos dos métodos de deteção molecular e interpretação dos resultados	54
3.3.	Resultados e discussão	54
4	Avaliação do efeito da matriz na qualidade e quantidade de DNA total extraído – COX	59
4.1.	Contextualização	59
4.2.	Metodologia	60
4.3.	Resultados e discussão	62
5	Considerações finais	73

Capítulo 1

Introdução

1.1. Enquadramento empresarial

Este relatório foi redigido no âmbito da unidade curricular Estágio do Mestrado em Recursos Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade da Universidade de Coimbra. O Estágio teve a duração de 10 meses e foi realizado no Laboratório de Fitossanidade (FITOLAB) do Instituto Pedro Nunes (IPN), em Coimbra.

O IPN, criado por iniciativa da Universidade de Coimbra em 1991, é uma instituição privada sem fins lucrativos que promove uma cultura de inovação, qualidade, rigor e empreendedorismo, baseando-se na ligação entre o meio científico e tecnológico e o tecido produtivo, atuando em três frentes que se reforçam e complementam: investigação e desenvolvimento tecnológico, consultadoria e serviços especializados; incubação e aceleração de ideias e empresas; formação especializada e divulgação de ciência e tecnologia (IPN, 2023). Um dos seis laboratórios próprios de investigação e desenvolvimento tecnológico do IPN é o FITOLAB.

O FITOLAB é um laboratório de diagnóstico reconhecido pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) como “Laboratório Oficial” para a deteção de organismos regulados no âmbito da sanidade vegetal. Atua em duas frentes: a fitossanidade, através da prestação de serviços no âmbito de controlos oficiais, e o estudo da diversidade total de microrganismos (IPN, 2023). A ligação entre o conhecimento de excelência produzido na Universidade de Coimbra e a procura de soluções inovadoras para os desafios do mercado, garante o reconhecimento da qualidade de todo o trabalho e investigação ali desenvolvido, contribuindo desta forma para a saúde das plantas no contexto agroflorestal e ambiental.

Os ensaios realizados no FITOLAB assentam em normas internacionais da *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) e *Internacional Plant Protection Convention* (IPPC) bem definidas, validadas e verificadas. O laboratório tem ainda implementado um Sistema de Gestão da Qualidade que está de acordo com o regulamento normativo NP EN ISO/IEC 17025:2018, tendo, desde 2022, um ensaio acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC) – Deteção de *Xylella fastidiosa* (Xf) por PCR e PCR em tempo real.

No FITOLAB encontram-se a decorrer dois projetos de investigação. O projeto XylOut - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus* (PTDC/ASP-PLA/3145/2021), financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P (FCT), que pretende colmatar a falta de conhecimento sobre o agroecossistema da Beira Interior através da identificação e caracterização dos agentes causais associados aos pomares de *Prunus* da região e determinação do impacto das doenças sobre a microbiota. Em paralelo, e de extrema importância, avaliar qual o potencial de expansão dos organismos patogénicos. O Programa Integrado de IC&DT CULTIVAR – Rede de competências para o desenvolvimento sustentável e inovação no setor Agroalimentar, cofinanciado pelo Centro2020, Portugal 2020 e FEADER e em fase de conclusão, pretende responder aos desafios que as fileiras do setor Agroalimentar da Região Centro enfrentam, nomeadamente caracterizar, conservar e valorizar os recursos genéticos endógenos regionais em zonas de baixa densidade, através de uma estratégia de desenvolvimento territorial, promovendo e consolidando a colaboração entre instituições de ciência, tecnologia e ensino superior e o cluster Agroalimentar (Cultivar, 2023).

1.2. Sanidade vegetal e sustentabilidade

Os serviços dos ecossistemas referem-se às características, funções ou processos fornecidos pelos ecossistemas que direta ou indiretamente contribuem para o bem-estar humano (Costanza *et al.*, 1997). Esses serviços podem ser categorizados em quatro grupos: serviços de suporte, e.g. ciclo de nutrientes, formação do solo, e produção primária; serviços de provisionamento, e.g. alimentos, água, madeira, fibras e recursos genéticos; serviços de regulação, e.g. regulação do clima, controlo de cheias, polinização e controlo de doenças; e serviços culturais, e.g. valores éticos, atividades recreativas e ecoturismo (Leemans & Groot, 2003).

As plantas são um pilar para a vida na Terra, constituem até 80% dos alimentos que comemos e são a fonte de 98% do oxigénio que respiramos (FAO, 2019). A saúde das plantas está diretamente relacionada com saúde e bem-estar humano. Saúde das plantas reflete-se em manutenção dos serviços dos ecossistemas e melhor qualidade de vida, e.g. maior produção de alimentos (plantas saudáveis e nutritivas) contribui para o aumento da biodiversidade (conservação dos ecossistemas naturais) e da qualidade do solo, que por sua vez significa mais quantidade e melhor qualidade de comida, melhor saúde, mais postos de trabalho e pagamentos justos que contribuem para a erradicação da fome e redução da pobreza (FAO, 2019).

Assembleia Geral da *United Nations Organization* (ONU), por iniciativa conjunta da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e do Secretariado da IPPC,

declarou 2020 como o Ano Internacional da Saúde das Plantas, contribuindo para a implementação da Agenda 2030 da ONU para o Desenvolvimento Sustentável. Segundo a FAO, a disseminação de pragas e doenças é responsável pela destruição anual de até 40% das colheitas refletindo-se em perdas anuais superiores a 200 mil milhões de euros (FAO, 2019). No entanto, a saúde das plantas não é algo que se possa tomar por garantido, muitas áreas livres de pragas e doenças, aptas para o crescimento de plantas, têm ameaça permanente de serem infetadas por diversos organismos patogénicos (Godefroid *et al.*, 2019). Essa ameaça é potenciada pelas alterações climáticas e pelas atividades humanas que: impactam negativamente os ecossistemas, contribuem para a redução da biodiversidade, e para a criação de novos nichos onde as pragas e doenças podem prosperar (FAO, 2019). Ao mesmo tempo, a globalização e o aumento do comércio global – nomeadamente a transação comercial de plantas, contribuem significativamente para a rápida dispersão de pragas e doenças pelo mundo, causando danos críticos a plantas nativas e ao ambiente (FAO, 2019).

No caso de conseguirem invadir uma determinada área, as pragas e doenças são um dos principais fatores limitantes à produtividade. Os danos podem ser severos e necessitar da implementação de medidas extensas de controlo, condicionando a viabilidade de algumas culturas e forçando a sua substituição e procura de alternativas (Ribal *et al.*, 2022).

O controlo adequado de pragas e doenças em plantas é essencial para garantir a segurança alimentar e a produção agrícola sustentável, no entanto, em muitos casos não há tratamento disponível, reforçando a importância da prevenção e diagnóstico precoce (Ribal *et al.*, 2022). Prevenção e proteção das plantas de pragas e doenças, é muito mais rentável do que lidar com as repercussões de surtos que requerem medidas dispendiosas e morosas (FAO, 2019). As desigualdades e o aumento da pobreza são reforçados com a disseminação de pragas e doenças, pois os pequenos produtores (com capacidade financeira limitada) não podem investir em estratégias mais intensivas e dispendiosas para a sua gestão e, conseqüentemente, veem o seu meio de subsistência ser gravemente afetado (Ribal *et al.*, 2022).

A fitossanidade é o estudo das pragas e doenças que afetam plantas e desempenha um papel fundamental na proteção das mesmas, correlacionando-se com os serviços dos ecossistemas e com sustentabilidade. Para atingir as metas propostas pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), a fitossanidade tem de continuar na vanguarda das estratégias dos países e dos *stakeholders* (i.e., autoridades fitossanitárias, meio científico, entidades políticas, produtores, consumidores, etc.) de forma a contribuir diretamente para a produção e consumo sustentáveis, proteção da biodiversidade e erradicação da fome, mas também para a concretização dos outros ODS.

1.3. Importância do diagnóstico através de métodos moleculares

International Plant Protection Convention é um tratado intergovernamental assinado por mais de 180 países com o objetivo de proteger os recursos vegetais do mundo contra a propagação e introdução de pragas e doenças, promovendo o comércio seguro. Esta convenção encontra-se sub-dividida em organizações, entre as quais se encontra a EPPO que é constituída por 52 países membros e desempenha um papel fundamental na promoção da cooperação e harmonização da proteção fitossanitária na região europeia e mediterrânica e tem como objetivos: disponibilizar documentos informativos e orientações técnicas (padrões internacionais de diagnóstico e controlo de pragas e doenças), promover o uso de métodos de controlo modernos, seguros e efetivos, facilitar a troca de conhecimento científico entre países membros e desenvolver estratégias internacionais contra a introdução e disseminação de pragas e doenças (incluindo espécies exóticas invasoras) que danifiquem cultivares e plantas selvagens em ecossistemas agrícolas (EPPO, 2023d).

A EPPO, categoriza os organismos patogénicos com preocupações fitossanitárias urgentes em duas listas – A1 e A2, atualizadas anualmente. Na lista A1, estão incluídas pragas e doenças reguladas de quarentena que se encontram ausentes da região EPPO, e que por isso, requerem medidas especiais de prevenção e erradicação precoce em caso de surto. Na lista A2, estão incluídas pragas e doenças reguladas presentes na região da EPPO e que conseqüentemente, requerem medidas fitossanitárias específicas para o seu controlo e minimização de danos. Foi recentemente criada uma categoria - praga regulamentada não sujeita a quarentena (RNQP), que inclui organismos que devido à sua ampla distribuição numa área geográfica não estão sujeitos a medidas de erradicação, mas cuja presença em plantas para plantar afeta a utilização prevista destas plantas, com um impacto economicamente inaceitável e que é, por conseguinte, regulamentada no território.

Os organismos regulados *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) e *Erwinia amylovora* (Ea) estão incluídos na lista A2 da EPPO, mas a União Europeia (UE) ao implementar o Regulamento de Execução (UE) 2021/2285 da Comissão, de 14 de dezembro de 2021, classificou-as como RNQP. Por outro lado, Xf é um organismo regulado de quarentena inserido na lista A2 da EPPO, e encontra-se incluído no Anexo IIB da Diretiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de maio de 2000. Neste contexto existe um Plano de Contingência de acordo com as normas estabelecidas no Regulamento de Execução (EU) 2020/1201 da Comissão, de 14 de agosto de 2020, que estabelece as medidas para impedir a introdução e propagação de Xf na UE.

A erradicação e controlo de pragas e doenças não são possíveis sem métodos de diagnóstico adequados, fulcral para a deteção de organismos patogénicos. Os métodos moleculares baseados na amplificação de regiões específicas do genoma com base na metodologia de *polymerase chain reaction* (PCR) revolucionaram a deteção e são técnicas fundamentais nos laboratórios atuais, pois são geralmente considerados mais sensíveis e específicos (devido à utilização de primers específicos) (Oliveira, 2010). Comparativamente à PCR convencional, a técnica de *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) permite que a amplificação do fragmento alvo seja avaliada em tempo real, através da monitorização da fluorescência emitida durante a reação, prescindindo da análise do produto da reação por eletroforese, o que torna a análise mais rápida e simples (Oliveira, 2010).

Ainda que os métodos moleculares sejam considerados mais sensíveis e específicos, a presença de inibidores em algumas matrizes vegetais, constitui um problema recorrente para a deteção de organismos patogénicos a partir de *deoxyribonucleic acid* (DNA) total, no entanto, esses constrangimentos podem ser ultrapassados com protocolos de extração de DNA adequados a cada situação (EPPO, 2023c).

A EPPO tem para cada organismo patogénico normas próprias, onde são apresentados vários métodos validados para a deteção do organismo em causa. Nos últimos anos tem havido uma evolução no sentido de reduzir o uso dos métodos de identificação dependentes de cultivo que são mais morosos, menos sensíveis (dependem do grau de especialização do operador) e com maior risco de contaminações. As normas da EPPO mais recentes para o diagnóstico e.g., de Ea e Psa, já permitem que o diagnóstico seja realizado apenas com base em métodos moleculares, exigindo a realização de métodos dependentes do cultivo apenas para confirmar a presença do organismo em caso de obtenção de resultado positivo pelos métodos moleculares.

Neste contexto, o FITOLAB é um *player* inquestionável pois colabora de perto com as autoridades de gestão nacionais enquanto “Laboratório Oficial” para a deteção de organismos nocivos de quarentena e de organismos regulados não sujeitos a quarentena contribuindo para a proteção das plantas.

1.4. Objetivos

Um dos objetivos transversais aos Estágios no âmbito do Mestrado em Recursos Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade é a formação científica e técnica em contexto de trabalho, promovendo sinergias entre a comunidade científica, sociedade civil e empresarial. De forma a integrar com aptidão as atividades do FITOLAB abrangidas pelo âmbito dos controlos oficiais e acreditados, foram realizadas diversas formações teóricas e práticas que antecederam os trabalhos de investigação e de rotina englobados neste projeto.

No contexto deste projeto, foram realizados ensaios de deteção dos organismos regulados Psa, Ea e Xf no âmbito de controlos oficiais (capítulo 2) e no âmbito do projeto de investigação XylOut - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus* (PTDC/ASP-PLA/3145/2021) (capítulo 3).

Em paralelo, foi desenvolvido um projeto de investigação que teve como objetivo determinar o impacto que a matriz vegetal analisada tem na qualidade do DNA total extraído através do método de Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) recorrendo a uma análise sistematizada dos registos de ensaios da deteção molecular de Xf (capítulo 4).

Capítulo 2

Métodos de deteção de organismos nocivos regulados de plantas

Contextualização

O Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes (FITOLAB) é reconhecido como “Laboratório Oficial” pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) para a realização de ensaios de deteção dos seguintes organismos nocivos de quarentena e/ou regulados não sujeitos a quarentena (RNQP): *Xylella fastidiosa* (Xf), *Erwinia amylovora* (Ea), *Candidatus Liberibacter* spp., *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) (bacteriologia), *Citrus tristeza virus* (virologia), *Fusarium circinatum* (micologia), *Bursaphelenchus xylophilus*, *Globodera rostochiensis* e *Globodera pallida* (nematologia).

No contexto deste estágio curricular, foi incluída formação teórica e prática para a realização dos seguintes ensaios: deteção de *Xylella fastidiosa* por *polymerase chain reaction* (PCR) e *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR); deteção e identificação de *Erwinia amylovora* por PCR e PCR em tempo real; deteção e identificação de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* por PCR. Este capítulo encontra-se organizado por organismo, com uma breve contextualização do organismo patogénico, seguida da descrição dos métodos e técnicas utilizados em cada um dos ensaios.

O FITOLAB é acreditado pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC), segundo o referencial normativo NP EN ISO/IEC 17025:2018 pelo que dispõe de pessoal, instalações, equipamentos, sistemas e serviços de suporte necessários à gestão e à execução das atividades do laboratório neste âmbito. Em particular, todo o pessoal é qualificado para cada etapa dos ensaios segundo procedimentos internos, as condições ambientais são monitorizadas, controladas e registadas, e os equipamentos de medição são calibrados e verificados para estabelecer a rastreabilidade metrológica dos resultados. Os métodos são validados e descritos em normas internacionais da *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO) e da *International Plant Protection Convention* (IPPC), a partir das quais são selecionados os ensaios a implementar, posteriormente verificados internamente.

A colheita, acondicionamento, transporte e toda a informação relativa à identificação e caracterização das amostras não é da responsabilidade do FITOLAB, sendo este apenas responsável pelos itens ensaiados e remanescentes de amostras.

O laboratório tem procedimentos para a receção, manuseamento, armazenamento e eliminação de itens de ensaio, assim como para a sua codificação. Existem registos técnicos para cada atividade do laboratório por forma a facilitar a identificação de fatores que possam afetar os resultados das medições que incluem data e a identificação do pessoal responsável por cada atividade do laboratório e pela verificação dos resultados e dos dados. As observações originais, dados e cálculos devem ser registados de imediato e devem ser identificáveis com a tarefa específica a que respeitam. As atividades do FITOLAB realizam-se com imparcialidade e confidencialidade reguladas através de procedimentos internos.

Toda a informação relativa aos ensaios realizados no âmbito da prestação de serviços do FITOLAB é tratada como confidencial, salvo no que envolve o acesso à informação por parte das autoridades relevantes (DGAV, IPAC, tribunais, autoridades de investigação criminal, entre outras). Excetuam-se os casos em que a informação é tornada pública pelo cliente ou em que há acordo entre o laboratório e o cliente para divulgação da mesma.

Para a realização dos ensaios apresentados no contexto deste relatório, foi realizada uma subamostragem em paralelo das amostras processadas no âmbito dos controlos oficiais às quais foi atribuído um novo código de identificação.

2.1. Deteção e identificação de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

2.1.1. Introdução

Classificação e morfologia

Descrita por Takikawa *et al.* (1989), Psa é o agente causal do cancro bacteriano da actinídea e um fator limitante no cultivo e produção de kiwi no mundo (Kim *et al.*, 2017). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* está incluída na lista A2 da EPPO, mas a União Europeia (UE) ao implementar o Regulamento de Execução (UE) 2021/2285 da Comissão, de 14 de dezembro de 2021, classificou a Psa como uma RNQP. O conceito RNQP define uma praga cuja presença em plantas para plantação afeta a utilização prevista destas plantas com um impacto economicamente inaceitável e que é, por conseguinte, regulamentada no território. O que na prática se traduz na necessidade das plantas de actinídea para plantar sejam acompanhadas de um passaporte fitossanitário que ateste a não presença de Psa.

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* é uma bactéria Gram negativa caracterizada pela forma de bastonete, pela presença de flagelos polares (de um a três), e pelo seu tamanho aproximado que varia entre 2-2,5 x 0,5-0,8 µm. Apresenta um crescimento ótimo entre os 15-22°C e é aeróbia (Takikawa *et al.*, 1989). As colónias de Psa em meio de cultura *King B* modificado (KBC) são lisas, com margens inteiras ou ligeiramente lobadas, de cor amarela-esbranquiçada, com 4-5 mm de largura após 4-5 dias de crescimento e apresentam uma pequena mancha branca no centro da colónia (EPPO, 2021).

A espécie *Pseudomonas syringae* pertence à família *Pseudomonadaceae* e está dividida em dezenas de patovares (EPPO, 2023a). Estudos recentes baseados em análises genéticas e bioquímicas confirmaram a existência de pelo menos seis tipos diferentes de Psa (também conhecidos como biovares), capazes de infetar *Actinidia* spp., mas com diferentes níveis de virulência e isoladas em diferentes áreas geográficas (Chapman *et al.*, 2012; Sawada *et al.*, 2016). A biovar 1 e biovar 2 foram descritas como moderadamente agressivas e ambas detetadas em *Actinidia* spp. nos anos 80 e 90, no Japão, na Coreia do Sul e Itália (Serizawa *et al.*, 1989; Scortichini, 1994; Sawada & Fujikawa, 2019). A biovar 3 apresenta elevada patogenicidade sendo responsável pela pandemia que afeta globalmente a cultura do kiwi, enquanto a biovar 5 e a biovar 6 são descritas como sendo pouco patogénicas (Sawada *et al.*, 2014; Sawada *et al.*, 2016) (EPPO, 2023a). A antiga biovar 4 apresenta muitas diferenças em relação aos restantes biovares, e.g. menos agressiva, não causa cancro nem morte dos rebentos, e

consequentemente, foi reclassificada num novo patovar: *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (Cunty *et al.*, 2015).

História e distribuição geográfica

A bactéria Psa foi detetada pela primeira vez em 1984 no Japão em *Actinidia* spp. (Serizawa *et al.*, 1989; Takikawa *et al.*, 1989) e posteriormente, em 1989, na Coreia do Sul (Miyoshi *et al.*, 1994), onde causou a destruição de muitos pomares, resultando em grandes perdas económicas (Kim *et al.*, 2017). Sequentemente, foi reportada na China e na zona da EPPO, nomeadamente no centro de Itália (Scortichini, 1994). Em Itália, a infeção por Psa não foi tão severa como no Japão e na Coreia do Sul, consequentemente, não recebeu a devida importância até ao aparecimento de novos surtos, repetidamente observados a partir de 2007, levando a perdas massivas de colheitas (Kim *et al.*, 2017). As populações bacterianas que causaram esses surtos em Itália foram reportadas como sendo geneticamente diferentes das bactérias causais dos surtos anteriores em Itália, na China, na Coreia do Sul e no Japão, e foram classificadas como biovar 3 (Chapman *et al.*, 2012). Posteriormente, na zona da EPPO, foram detetados vários surtos deste biovar: Turquia (2009); França e Portugal (2010); Espanha e Suíça (2011); Eslovénia e Geórgia (2013); e Grécia (2014) (EPPO, 2023a). Na Nova Zelândia, a Psa foi detetada pela primeira vez em 2010, tendo-se disseminado por todo o país. Na Austrália, foi detetada pela primeira vez em 2011, mas manteve-se restrita à região de Victoria (EPPO, 2023a). Na América do Sul, a Psa foi detetada no Chile, em 2010, e na Argentina, o organismo patogénico foi encontrado no pólen de kiwis, não sendo detetado em pomares de kiwis (EPPO, 2023a).

Atualmente a Psa está presente: na Oceânia, na Austrália e Nova Zelândia; no sul do continente americano, na Argentina e no Chile; no continente asiático, na China, no Japão e na Coreia do Sul; e no continente europeu, em Portugal, Espanha, França, Itália, Suíça, Eslovénia, Grécia e Turquia (EPPO, 2023a). O mapa da sua distribuição atual encontra-se detalhado na Figura 1.

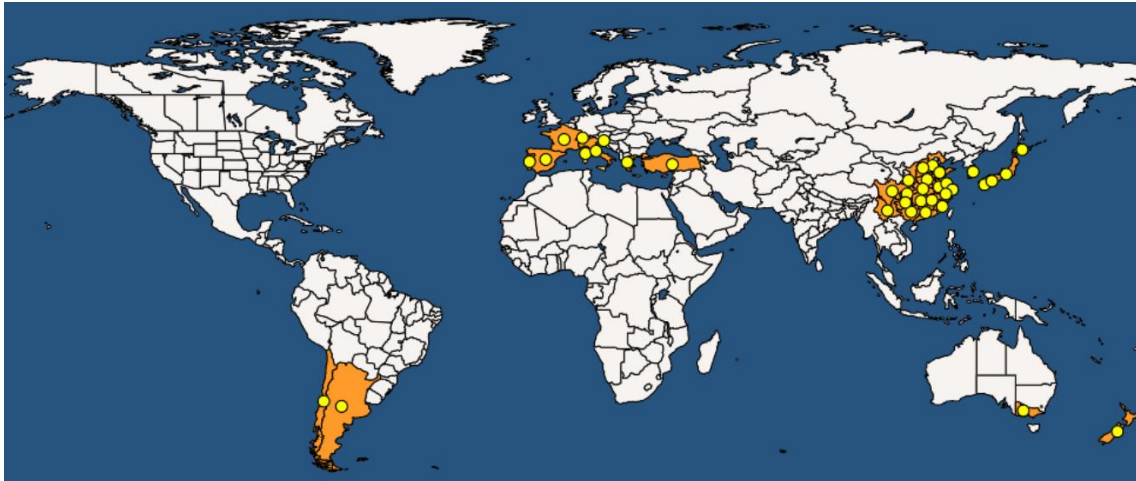


Figura 1 - Distribuição geográfica de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* assinalada amarelo. Mapa obtido em *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSDMAK)[World distribution]| EPPO Global Database.

Hospedeiros

O género *Actinidia*, oriundo do continente asiático, possui mais de 70 espécies (Kim *et al.*, 2017), e atualmente três variedades são consideradas importantes comercialmente: *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, conhecida popularmente como kiwi verde, *A. chinensis* var. *chinensis*, a qual representa o kiwi amarelo e vermelho, e *A. arguta*, conhecida como *baby kiwi*. Estas variedades apresentam diferentes suscetibilidade à Psa, em detalhe, *A. arguta* menos suscetível que *A. deliciosa*, que por sua vez é menos suscetível que *A. chinensis* (Donati *et al.*, 2014, EPPO, 2023a). Recentemente foram descobertas três espécies hospedeiras da Psa pertencentes a outros géneros: *Alternanthera philoxeroides*, *Paulownia tomentosa*, e *Setaria viridis*. Essas espécies foram cultivadas na proximidade de pomares de kiwis severamente afetados pelo cancro bacteriano (EPPO, 2023a).

Sintomatologia, ciclo de vida e epidemiologia

Os sintomas do cancro bacteriano da actinídea podem surgir na parte aérea ou no tronco das plantas infetadas (EPPO, 2023a) e são caracterizados principalmente por: manchas necróticas angulares e escuras (principalmente em folhas jovens), muitas vezes rodeadas por halos cloróticos; descoloração castanho-avermelhada sob a casca com formação de cancros em ramos e troncos com produção de exsudado vermelho-ferruginoso; murchidão e morte dos ramos; colapso dos frutos; avermelhado das lenticelas (Donati *et al.*, 2014). Na Figura 2 apresentam-se alguns exemplos. Os sintomas variam consoante a estação do ano, e.g. no final do inverno, com a humidade, o

exsudado bacteriano é inicialmente cremoso e esbranquiçado, mudando a coloração para amarelado/alaranjado e depois vermelho ferruginoso. Os organismos que se desenvolvem nos exsudados também têm influência na variação da cor do mesmo (EPPO, 2023a). Para além disto, grande parte dos sintomas causados pela Psa não são específicos desse organismo patogénico, e.g. apenas através de manchas necróticas nas folhas, é difícil de determinar se o agente causal é a Psa ou outros organismos próximos (Vanneste *et al.*, 2011).

Sabe-se que a bactéria sobrevive na superfície de vários órgãos, incluindo botões, folhas, galhos e flores. Em flores femininas a bactéria foi observada nos estigmas, no ovário e no cálice, enquanto em flores masculinas, a Psa pode sobreviver nos grãos de pólen de *Actinidia* spp., conseqüentemente, o pólen infetado contribui como uma via adicional eficaz para a dispersão deste organismo patogénico (Donati *et al.*, 2014).

Para um ciclo de infeção bem-sucedido, a Psa necessita de ultrapassar as defesas da planta hospedeira, fazendo uma transição da fase epífita para a fase endófito. De facto, a bactéria pode penetrar na planta hospedeira através de estruturas naturais da superfície ou feridas, como estomas, tricomas, lenticelas e cicatrizes de abscisão de frutos ou cortes frescos, e migrar endofiticamente das folhas para os rebentos e varas via apoplastos (EPPO, 2023a). Uma vez dentro dos tecidos da planta, a bactéria pode migrar sistemicamente para diferentes órgãos. A colonização endófito só ocorre depois da população epífita exceder o limiar de infeção que varia de acordo com a suscetibilidade do hospedeiro. Foi relatado que as populações epífitas de Psa podem sobreviver durante 21 semanas na superfície da folha sem causar qualquer sintoma. Além disso, diferentes biovars de Psa desenvolvem diferentes fatores de virulência para superar as defesas do hospedeiro, resultando em distintos graus de virulência (Donati *et al.*, 2020). O microbioma também pode influenciar a resposta imunitária das plantas e/ou a virulência de organismos patogénicos (Ares *et al.*, 2021).

O ciclo de vida da Psa é altamente afetado pelo microclima do pomar. As diferenças entre as condições meteorológicas, como a temperatura e a humidade relativa, podem determinar a gravidade e a dispersão da doença através do pomar. A infeção é favorecida por clima húmido e temperaturas amenas, e a dispersão é favorecida por vento forte e chuva (Donati *et al.*, 2014). Os danos causados pela geada e pelo degelo também promovem a disseminação da bactéria (Scortichini *et al.*, 2012). A colonização da planta hospedeira pode ocorrer em qualquer altura do ano, embora o crescimento da bactéria seja favorecido em certas estações, como o início da primavera e o outono (Kim *et al.*, 2017). Durante a primavera, o organismo patogénico pode entrar nas folhas através de feridas naturais e colonizar sistemicamente a planta hospedeira através das nervuras e pecíolos das folhas (Donati *et al.*, 2014). Nos pomares infetados é possível

observar sintomas característicos, como um exsudado bacteriano branco ou vermelho-ferruginoso nos troncos, nas varas dormentes ou após o rebentamento dos gomos nos ramos em desenvolvimento. Os exsudados são o resultado da multiplicação da bactéria nos tecidos da planta hospedeira. O clima primaveril, com temperaturas entre 12°C e 18°C, representa a temperatura ótima para o crescimento da bactéria, especialmente em varas novas (EPPO, 2023a). No verão, com o aumento das temperaturas acima de 25°C, o grau de infeção é drasticamente reduzido (Donati *et al.*, 2014), consequentemente as populações bacterianas são indetetáveis algumas semanas antes da colheita (no outono), não sendo o fruto uma via de disseminação deste organismo patogénico (EPPO, 2023a). Similarmente, os polinizadores parecem ter um papel insignificante na sua disseminação (EPPO, 2023a).



Figura 2 – Sintomas da doença provocada por *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* em *Actinidea*: 1 – Manchas castanhas rodeadas por halos cloróticos em folhas; 2 - Escurecimento dos tecidos sob o córtex dos ramos; 3 - Exsudação bacteriana cremoso/esbranquiçado em cancras; 4 – Exsudado bacteriano a escorrer de um cancro formado num ramo infetado. Fotografias obtidas em *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSDMAK)[Photos]] EPPO Global Database.

***Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* em Portugal**

Nos últimos anos, o cultivo e a produção de kiwis tiveram um crescimento exponencial a nível mundial devido à forte procura no mercado por parte dos consumidores (Kim *et al.*, 2017). Em Portugal esta cultura ocupa uma área aproximada de 1500 ha nas regiões

de Entre-Douro e Minho e na região Centro (Beira Litoral), sendo uma fonte crucial no rendimento e desenvolvimento regional (DGAV, 2014). O cancro bacteriano foi descrito pela primeira vez em Portugal em 2010, em plantas com dois anos de idade de pomares de kiwis *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*, na região norte, mais especificamente em Santa Maria da Feira e Valença (Balestra *et al.*, 2010). Em 2011, a Psa foi detetada em plantas importadas de Itália e, durante esse ano, foram relatados novos surtos da doença noutros pomares da mesma região portuguesa (Renzi *et al.*, 2012).

Atualmente, a doença continua a propagar-se pelas regiões Norte e Centro. A caracterização das populações de Psa em Portugal revelaram pertencer à biovar 3, mas com um elevado grau de variabilidade genética entre os isolados (Figueira *et al.*, 2020). Estudos recentes identificaram várias populações de Psa coexistentes e altamente heterogéneas no nosso território. Além disso, a estrutura das populações epífitas e endofíticas de folhas de actínídea é totalmente distinta e varia entre estações, com uma diminuição notável da diversidade de Psa no outono. Sabe-se hoje que a expansão clonal inicial da Psa na Europa foi seguida de uma ampla diversificação genómica (Figueira *et al.*, 2020).

Medidas de controlo e prevenção

Na Nova Zelândia, entre 2013 e 2018, foram estimadas perdas associadas à Psa entre 310 e 410 milhões de euros, enquanto em Itália, apenas em 2010, as perdas excederam os 60 milhões de euros, sendo por isso considerado o maior desafio na produção de kiwis (EPPO, 2023a). Como não existem métodos curativos disponíveis, as estratégias de controlo baseiam-se principalmente em métodos preventivos e medidas mitigadoras (Donati *et al.*, 2014), ou seja, quando a doença é detetada, a gestão fitossanitária baseia-se na diminuição do inóculo numa tentativa de reduzir as perdas e prevenir a disseminação. A poda de plantas sintomáticas, compostos à base de cobre, e *elicitors* são normalmente utilizados. Outra fonte de tratamento que também pode ser considerada é utilização de bactérias antagonistas, como controlo biológico (Reglinski *et al.*, 2013). Como métodos de prevenção para esta doença, é essencial a inspeção das plantas a serem utilizadas no pomar.

As rápidas introduções de medidas fitossanitárias específicas, a par de investimentos no conhecimento da doença, dos hospedeiros e do ambiente, são essenciais ao combate deste organismo. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos e fiáveis para deteção e identificação de Psa foi um passo fundamental para evitar a propagação do organismo patogénico para regiões livres do mesmo (Donati *et al.*, 2014).

2.1.2. Materiais e métodos

A detecção e identificação molecular de *Psa* foi realizada segundo o procedimento de ensaio IPN/FITOLAB/PE301.01, baseado na norma PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* da EPPO (2014). Na Figura 3, está representado o fluxograma do ensaio para a detecção molecular e identificação de *Psa*, através de um protocolo de *duplex* PCR convencional (Gallelli *et al.*, 2011) e isolamento em meio semi-seletivo com posterior confirmação molecular por PCR (Rees-George *et al.*, 2010).

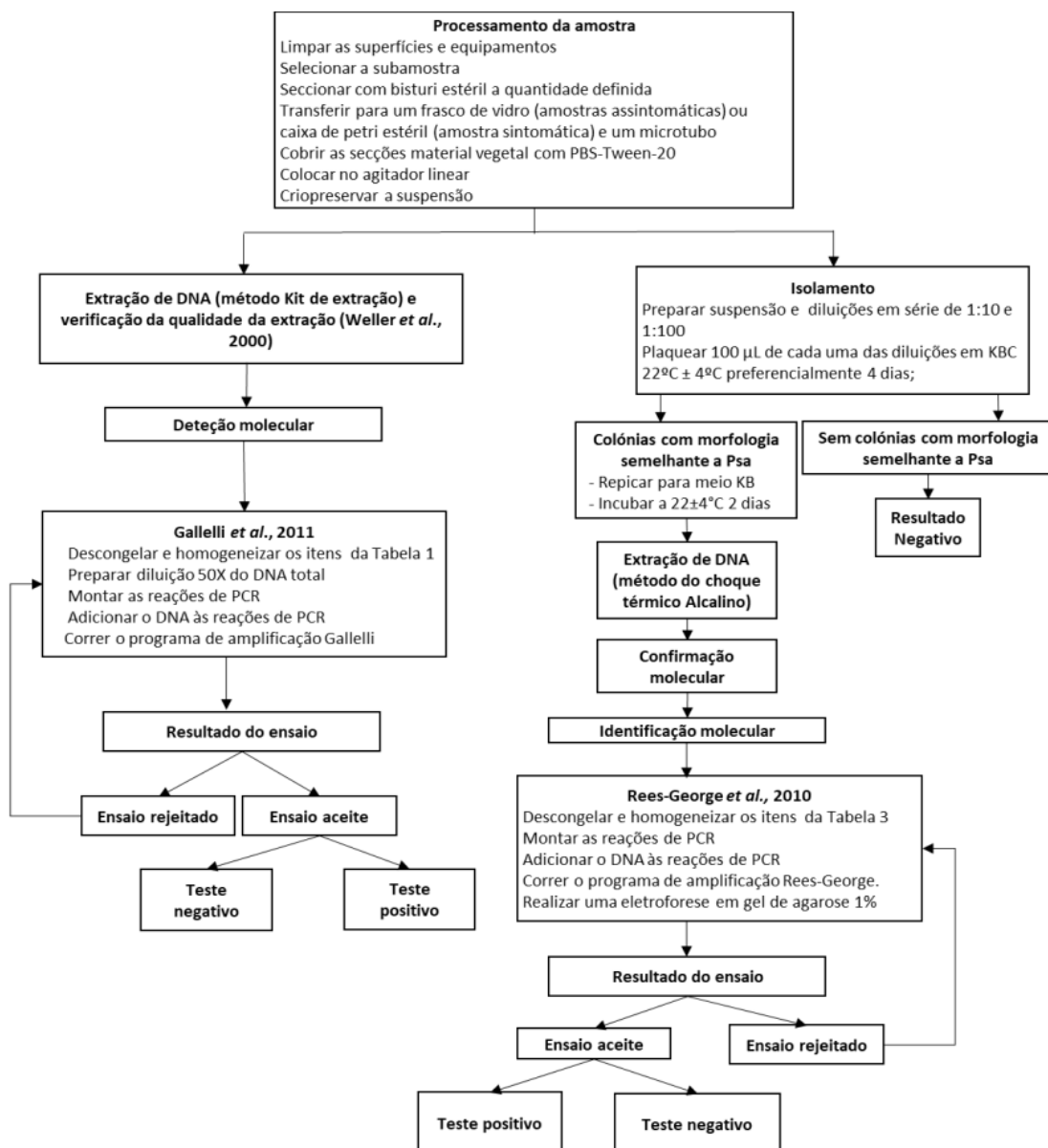


Figura 3 - Fluxograma do ensaio para a detecção e identificação molecular de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, de acordo com o protocolo experimental adotado no FITOLAB (IPN/FITOLAB/PE301.01).

Segundo a norma PM 7/120 (1), a identificação de Psa deve ser suportada por dois ou mais testes baseados em diferentes princípios biológicos, incluindo pelo menos um teste PCR. O ensaio para a deteção de Psa pode ser realizado em plantas sintomáticas ou assintomáticas (diferentes concentrações de bactéria presente), fazendo com que os procedimentos de ensaio variem de forma a otimizar a sua deteção. A maioria das amostras analisadas no FITOLAB provêm de viveiros ou centros de jardinagem (amostras críticas) e são tipificadas como amostras assintomáticas.

Em resumo, na primeira etapa do ensaio são selecionadas as seções do material vegetal a analisar, que são colocadas em solução tampão fosfato-salino-Tween-20 (PBS-Tween-20) e incubadas com agitação. Da suspensão são recolhidas alíquotas para extração de *deoxyribonucleic acid* (DNA) total e para isolamento da bactéria. O DNA total é extraído por kit comercial, seguido da realização de um protocolo de *duplex* PCR convencional de acordo com Gallelli *et al.* (2011), que utiliza dois pares de primers que amplificam regiões distintas do genoma, uma obtida através análises RAPD e RFLP do genoma de Psa, e outra que codifica o gene *avrD1*, um fator de virulência tipo III (Gallelli *et al.*, 2011). Em paralelo, é realizado o isolamento de colónias putativas de Psa. Este procedimento baseia-se no espalhamento em meio de cultura KBC de diluições em série da suspensão de extratos de folhas e raminhos de actíndea. As colónias com morfologia idêntica a Psa são selecionadas para extração de DNA por kit comercial e posterior confirmação molecular, através de um segundo protocolo de PCR convencional de acordo com Rees-George *et al.* (2010), que utiliza dois pares de primers cujas sequências alvo estão localizadas nas regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do rDNA 16S-23S.

No contexto deste ensaio foram analisadas três amostras assintomáticas de actíndea, identificadas com os códigos 1, 2 e 3.

Tipificação e processamento das amostras vegetais

A tipificação da amostra foi realizada através da observação e avaliação do estado de conservação e sintomatologia presente na amostra. Todas as informações foram registadas no impresso IPN/FITOLAB/I346.04 “Registo de ensaio: Deteção e Identificação de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*”.

O processamento das amostras incluiu a seleção de segmentos de material vegetal de ramos, com cerca de 2 cm de comprimento, representativos do estado fitossanitário de cada amostra. Os segmentos foram transferidos para um Erlenmeyer, submersos com um PBS-Tween-20 a 1% (Anexo 1, secção 1.1.1.) e colocados num agitador linear por 1h30m a 150 rpm. Pretendeu-se com este passo promover a migração de bactérias presentes nos tecidos vegetais para a solução, obtendo-se assim uma suspensão que foi

posteriormente utilizada para a deteção da Psa por isolamento. Paralelamente, foram selecionadas $\leq 0,1$ g de lascas de material vegetal para um microtubo, posteriormente utilizado para extração de DNA total.

Após agitação, o extrato foi filtrado através de uma gaze estéril para um tubo estéril de 15 ml. Por cada amostra, foram preparados dois microtubos estéreis com 15-25% de glicerol esterilizado (>99,5%) aos quais foram adicionados 1,5 ml do extrato para conservação a -80°C , permitindo repetir os ensaios em caso de necessidade.

Isolamento em meio de cultura semi-seletivo

Numa câmara de fluxo laminar em condições estéreis, foram preparadas diluições em série de 10^{-1} e 10^{-2} da suspensão em tampão fosfato-salino (PBS) (10mM) (Anexo 1, secção 1.1.1) e espalhados 100 μL da suspensão original e das diluições em placas com meio de cultura KBC (Anexo 1, secção 1.2.1.).

Em paralelo, foram preparados os seguintes controlos: controlo positivo do isolamento (PIC), através do espalhamento de uma suspensão da estirpe de referência CFBP7286 de Psa (*CIRM-CFBP Collection for Plant associated Bacteria*) a uma concentração de 10^4 CFU/mL de modo a confirmar a viabilidade do meio para o crescimento do organismo alvo; dois controlos negativos de isolamento (NIC), através do espalhamento das soluções de PBS utilizadas na preparação da suspensão e das diluições (PBS-Tween-20 e PBS, respetivamente), que monitorizam a esterilidade das soluções utilizadas. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e o seu crescimento observado diariamente, por 4 dias. Após o período de incubação foram avaliados os controlos.

A observação das placas realizou-se com o apoio de uma lupa estereoscópica (WILD M3C, Heerbrugg, Switzerland). As colónias de Psa em meio de cultura KBC apresentam-se lisas, com margens inteiras ou ligeiramente lobadas, de cor amarela-esbranquiçada, com 4-5 mm de largura após 4-5 dias de crescimento, e com uma pequena mancha branca no centro da colónia (EPPO, 2021). No caso de serem observadas colónias com morfologia semelhante a Psa, procede-se à sua repicagem para meio de cultura *King B* (KB) até se obterem culturas puras, que serão posteriormente identificadas por métodos moleculares.

Extração de DNA total e verificação da qualidade da extração

A extração de DNA total a partir do material vegetal selecionado aquando do processamento da amostra e conservado no microtubo, foi realizada com recurso ao kit de extração comercial NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total obtido foi armazenado a -20°C até à sua utilização.

O controlo da qualidade da extração de DNA total e a determinação da ausência de inibidores foi aferida através da realização de uma RT-PCR desenhada por Weller *et al.* (2000), com o objetivo de limitar a possibilidade de falsos negativos na PCR. Este protocolo combina o *set* de primers COX-F/R e a sonda COX-P (Anexo 2, Secção 2.3.), desenhados a partir de uma sequência do gene constitutivo citocromo oxidase (COX) de *Solanum tuberosum* (Weller *et al.*, 2000). Este gene é ubíquo em plantas e codifica uma citocromo presente nos cloroplastos (Quiñones *et al.*, 1995). A obtenção de um amplificado nesta reação de RT-PCR comprova a presença de DNA dos tecidos da planta na amostra de DNA total, permitindo assim, confirmar se a extração realizada foi bem-sucedida e se apresenta quantidade e qualidade de DNA total suficiente para a sua utilização. Este procedimento funciona como um controlo interno positivo da extração.

Deteção por PCR convencional

A deteção molecular de Psa foi realizada através de uma *duplex* PCR, segundo Gallelli *et al.* (2011). (Anexo 2, secção 2.1.).

Para cada amostra foram preparadas duas reações de PCR: uma utilizando o DNA total e outra uma diluição de 1:50 do DNA total. A mistura de reação foi preparada numa câmara de UV-PCR, em condições estéreis. Em paralelo, foi preparado um controlo positivo de amplificação (PAC) através da adição de 2 µL de DNA proveniente da estirpe de referência de Psa CFBP7286 (material de referência monitorizado e disponibilizado pelo FITOLAB), e um controlo negativo de amplificação (NAC) no qual o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água miliQ estéril. O PAC permite garantir a eficiência da reação, enquanto o NAC garante que não ocorreu qualquer contaminação durante o processo, não sendo expectável a sua amplificação. O ensaio da PCR convencional foi realizado no termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições descritas na tabela VI (Anexo 2).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1x (Anexo 1, secção 1.1.2.) ao qual foi adicionado o corante *GreenSafe Premium* (NZYTech). Foram carregados 8 µL do produto de PCR de cada amostra no gel, e foi aplicada uma corrente de 75V durante 40 minutos. A corrida

de eletroforese foi monitorizada com o marcador molecular *NZYDNA Ladder III* (NZYTech), que produz um padrão de bandas que variam de 200 a 10000 bp. Terminada a corrida, os produtos de PCR foram visualizados e registados com um transiluminador *Molecular Imager Doc™ XR+* (Bio-Rad).

2.1.3. Resultados e discussão

Avaliação da conformidade e tipificação das amostras

As amostras 1, 2 e 3, no que diz respeito à presença ou ausência de sintomas e à conformidade do material vegetal (i.e., se o material vegetal se encontra em condições de prosseguir o ensaio), foram classificadas como assintomáticas e conforme. As amostras eram compostas, i.e., constituídas por material vegetal pertencente a diferentes plantas da mesma espécie (constituídas por ramos de actínea sem folhas).

Isolamento em meio de cultura

O ensaio foi aceite após análise dos resultados dos controlos: verificou-se crescimento no PIC e não se observou a ocorrência de nenhuma unidade formadora de colónias (CFU) no(s) NIC(s). Não foram isoladas colónias com morfologia semelhante a Psa nas amostras analisadas aplicando os critérios descritos em 2.2.1. Neste contexto, o isolamento foi considerado negativo para a presença de Psa. Não havendo colónias isoladas, não foi possível prosseguir com o ensaio para confirmação molecular, ou seja, não se realizou o protocolo de PCR convencional de acordo com Rees-George *et al.* (2010).

As condições climáticas que favorecem a multiplicação de Psa ocorrem preferencialmente durante a primavera e o outono, quando as temperaturas médias variam entre os 10 e 20°C (Donati *et al.*, 2014). Esta é a época mais apropriada à realização destes controlos fitossanitários. No resto do ano as populações bacterianas de Psa encontram-se em concentrações muito baixas dificultando o seu isolamento.

Extração de DNA total e verificação da qualidade da extração

A extração de DNA total foi realizada para cada uma das amostras em análise. Os resultados relativos à verificação do controlo da qualidade da extração de DNA total e ausência de inibidores, podem ser observados na Figura 4. O ensaio foi aceite tendo em conta a amplificação do PAC e ausência de amplificação do NAC. Foi obtida amplificação nas amostras 1, 2 e 3, confirmando que a extração de DNA total foi realizada com

sucesso, tendo quantidade e qualidade passível de ser analisado nos procedimentos subsequentes.

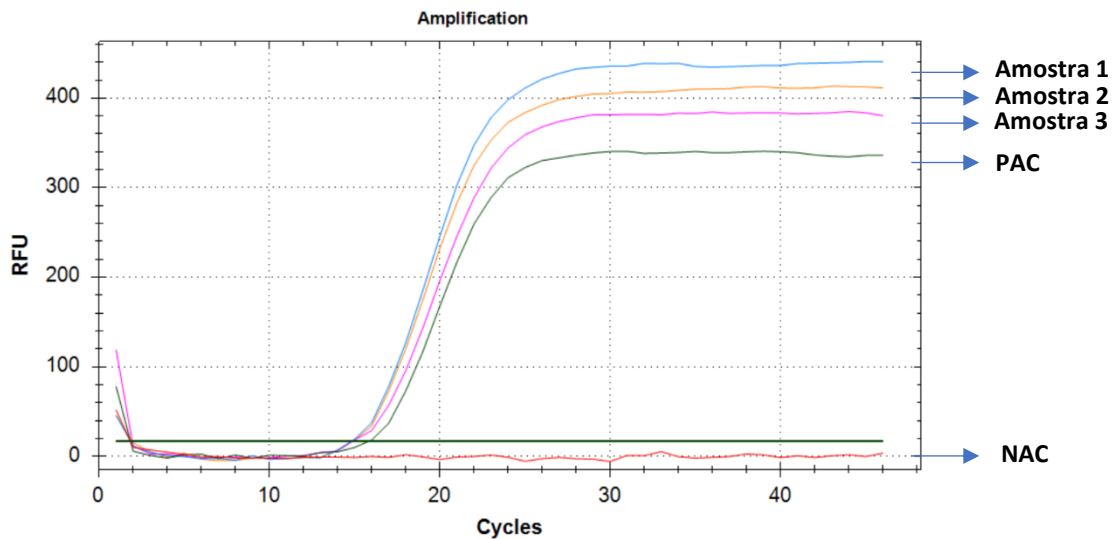


Figura 4 - Resultados obtido para as amostras 1, 2 e 3 no protocolo de *real time polymerase chain reaction* descrita por Weller *et al.* (2000). PAC - controlo positivo de amplificação; NAC - controlo negativo de amplificação.

Deteção molecular por PCR convencional

O resultado do ensaio foi aceite uma vez que o PAC apresentou amplificação de duas bandas de 492 pb e 230 pb e não houve amplificação no NAC (Figura 5).

Nas amostras 1 e 2, e respetivas diluições, não houve amplificação, ou seja, o resultado do ensaio foi considerado negativo. Na amostra 3, e respetiva diluição, foram observadas duas bandas com os pesos moleculares correspondentes a 492 pb e 230 pb, pelo que o ensaio foi considerado positivo (Figura 5).

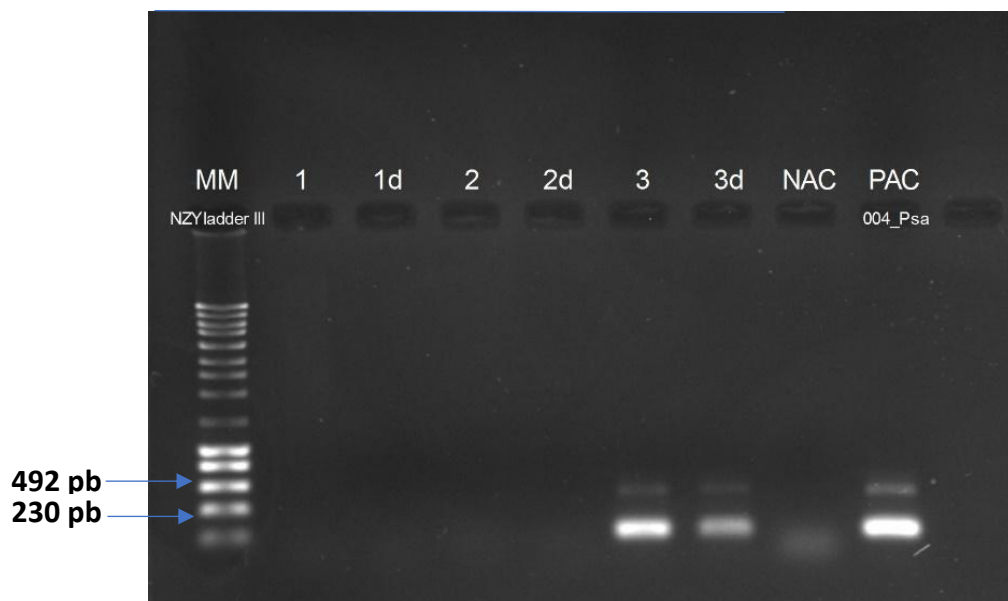


Figura 5 - Análise da eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação da duplex *polymerase chain reaction* descrita por Gallelli *et al.* (2011). MM – marcador molecular NZYDNA Ladder III; 1 a 3 – amostras 1, 2 e 3 e respectivas diluições (d); NAC – controlo negativo de amplificação; PAC - controlo positivo de amplificação.

2.1.4. Conclusão

Nas amostras 1 e 2 não foi detetada Psa, uma vez que não foram isoladas colónias com morfologia semelhante a Psa e o teste molecular de PCR convencional de Gallelli *et al.* (2011) teve resultado negativo.

Na amostra 3 foi detetada Psa, mas não identificada, porque apesar de o teste molecular de PCR convencional de Gallelli *et al.* (2011) ter um resultado positivo, não foram isoladas colónias com morfologia semelhante a Psa.

2.2. Detecção e identificação de *Erwinia amylovora*

2.2.1. Introdução

Classificação e morfologia

Erwinia amylovora, descrita pela primeira vez por Winslow *et al.* (n.d.), é o agente causal de uma das mais antigas doenças bacterianas conhecidas, o fogo bacteriano (Khan *et al.*, 2012). Ela está incluída na lista A2 da EPPO, e é considerado um organismo RNQP, descrito no Anexo IV da Diretiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de maio de 2000.

Erwinia amylovora pertence à família *Enterobacteriaceae* (Khan *et al.*, 2012), é uma bactéria Gram negativa, em forma de bastonete, com flagelos peritríquios (dois a sete) com tamanho aproximado de 0,3 x 1-3 µm (EPPO, 2023b).

Em placas de meio KB, as colónias de Ela surgem aproximadamente após 24h a 25°C, com aspeto cremoso, brancas, circulares, com tendência para se espalharem. No entanto, em placas de meio *Cycloheximide-Crystal violet-Thallium Nitrate* (CCT) as colónias surgem após 48h a 25°C e são violetas pálidas, circulares, altamente convexas e arredondadas, lisas e mucóides (após 72h), mostrando um crescimento mais lento do que em KB (EPPO, 2013).

História e distribuição geográfica

O fogo bacteriano foi descrito, pela primeira vez, nos Estados Unidos em 1780 tendo-se disseminado pelo continente Norte Americano, Nova Zelândia (desde 1920) e Europa, onde foi detetado inicialmente em Inglaterra, em 1957 (EPPO, 2023b). Rapidamente foi detetada na Europa Ocidental e no Médio Oriente. No continente Africano, o fogo bacteriano foi pela primeira vez declarado presente no Egito em 1964 (EPPO, 2023b). Atualmente, esta doença encontra-se amplamente distribuída (Figura 6), no entanto, algumas das principais zonas de produção de pomóideas continuam livres, como a Ásia, em particular a China, e a América do Sul (EPPO, 2023b).

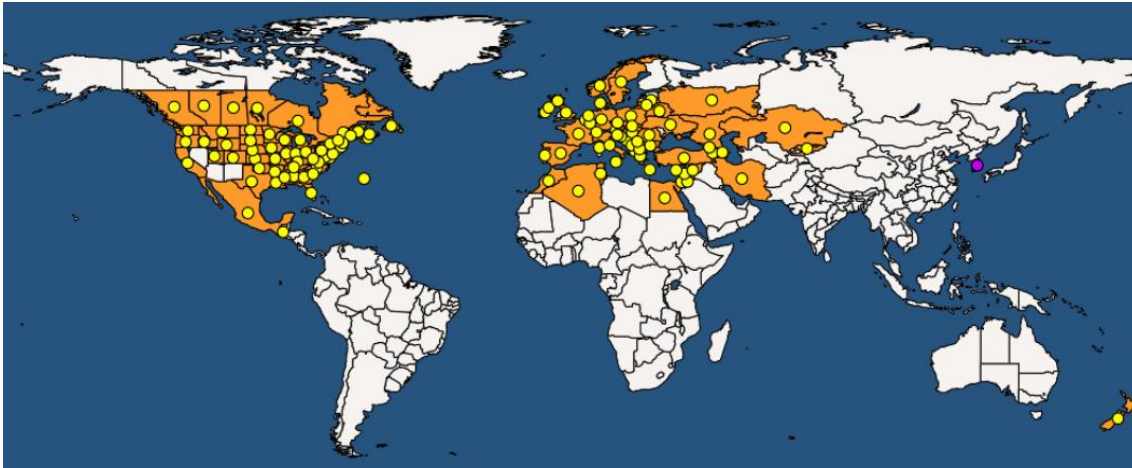


Figura 6 - Distribuição geográfica de *Erwinia amylovora* assinalada a amarelo. A roxo os locais onde se encontra em fase de contenção. Mapa obtido em *Erwinia amylovora (ERWIAM)[World distribution]* EPPO Global Database.

Hospedeiros

Erwinia amylovora afeta plantas da família *Rosaceae*, em particular pertencentes à subfamília *Maloideae*, que inclui árvores de fruto economicamente importantes (EPPO, 2023b), e globalmente designadas de pomóideas: macieira (*Malus domestica*) e pereira (*Pyrus communis*). Neste contexto, Ea representa uma grande ameaça para a produção destas culturas (Pedroncelli & Puopolo, 2023). Devido à severidade dos impactos causados pelo fogo bacteriano, em alguns países e estados dos EUA, várias variedades de pera suscetíveis foram largamente abandonadas (EPPO, 2023b). A suscetibilidade dos hospedeiros a Ea varia consoante a espécie (Pedroncelli & Puopolo, 2023).

Algumas espécies pertencentes às subfamílias *Rosoideae* e *Amygdaloideae* também podem ser considerados hospedeiras (EPPO, 2023b). Géneros da subfamília *Spiraeoideae* foram reportados como hospedeiros com base em inoculações artificiais ou foram ocasionalmente encontrados infetados, e.g., *Spiraea prunifolia* (EPPO, 2023b). A maioria das estirpes de Ea isoladas de um hospedeiro não são específicas, i.e., são também patogénicas noutros hospedeiros. Contudo, as estirpes isoladas em *Rubus* (e.g. silva) na América do Norte são específicas do hospedeiro i.e., patogénicas em silvas, mas não em macieiras e pereiras (EPPO, 2023b). Ocasionalmente a Ea foi isolada de *Rosa canina* e *Rosa rugosa*, mas não há indícios de desenvolver doença em roseiras cultivadas comercialmente (EPPO, 2023b).

A maior parte dos hospedeiros de Ea estão amplamente distribuídos na região da EPPO que possui as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da doença, quer como plantas cultivadas, quer como plantas selvagens autóctones. As espécies

selvagens de *Pyrus* (*P. amygdaliformis* e *P. syriaca*), desempenham um papel importante como fonte de inóculo no sul da Europa e na zona mediterrânica, devido à sua abundância nestas áreas, assim como os hospedeiros ornamentais cultivados perto dos pomares (EPPO, 2023b). O género *Crataegus* (*C. laevigata* e *C. monogyna*) e algumas plantas ornamentais (*Pyracantha*, *Cotoneaster*, *Sorbus*) são fontes importantes de inóculo para macieiras e pereiras na Europa (EPPO, 2023b).

Sintomatologia, ciclo de vida e epidemiologia

Os sintomas do fogo bacteriano observam-se essencialmente na parte aérea das plantas hospedeiras e são caracterizados por: murchidão e morte dos cachos de flores, que ficam secas e de cor castanho-escuro a preta (normalmente permanecem agarradas à planta); murchidão e morte de rebentos e galhos (dobram-se de forma característica, formando o sintoma conhecido como “bengala”); manchas necróticas nas folhas infetadas; murchidão dos frutos, que adquirem uma coloração castanho-escuro a preto e permanecem agarrados à planta com uma aparência mumificada (EPPO, 2023b). Na Figura 7 apresentam-se alguns exemplos.

A partir das flores, dos rebentos ou dos frutos infetados, a doença é propagada através dos esporões para galhos e ramos maiores, causando cancrios que podem desenvolver-se até aos troncos. Os cancrios provocam a morte rápida dos ramos ou de toda a árvore (EPPO, 2023b). Os cancrios destacam-se, pois, a sua superfície é ligeiramente afundada e varia em tamanho, é rodeada por fissuras irregulares na casca, internamente os seus tecidos apresentam uma descoloração ligeiramente alaranjada, vermelha ou castanha e têm um aspeto encharcado (EPPO, 2023b).

A presença de *Ea* numa planta não significa que ocorra o desenvolvimento da doença, sendo que esta é resultado de múltiplas interações estabelecidas entre as células de *Ea*, a microbiota do hospedeiro, os insetos vetores e o ambiente (condições de humidade, chuva e temperatura afetam fortemente o crescimento de *Ea*) (Pedroncelli & Puopolo, 2023).

Após a infeção primária, em condições de temperaturas superiores a 15°C e humidade relativa superior a 80%, há produção de exsudado bacteriano que será disperso (EPPO, 2023b). As epidemias de fogo bacteriano nessas condições climáticas são mais severas do que em regiões caracterizadas por um clima mais frio e seco (Khan *et al.*, 2012). *Ea* é disseminada a partir de lesões ativas naturais (e.g. nectários, estomas, hidátodos) ou acidentais (e.g. feridas) durante a floração ou o crescimento dos rebentos, através de insetos polinizadores, aves, salpicos de chuva, vento e ferramentas de poda contaminadas, tudo isto a curtas distâncias. A longas distâncias, o organismo patogénico

é principalmente transmitido pelo comércio de plantas hospedeiras infetadas de forma latente ou que têm cancos indetetáveis (EPPO, 2023b). Os insetos, assim que há o desenvolvimento da infecção, tornam-se potenciais vetores de Ea e desempenham um papel importante na sua dispersão, pois a bactéria pode sobreviver na sua superfície e também dentro do seu corpo (Pedroncelli & Puopolo, 2023). Excetuando as sementes, todos os órgãos das plantas são considerados potenciais fontes de disseminação do organismo patogénico, mas é amplamente aceite que os frutos, na prática, apresentam um risco insignificante (EPPO, 2023b).

Uma das questões mais importantes relacionadas com a Ea é a capacidade de a bactéria sobreviver de um inverno para o outro em cancos, sendo uma característica significativa no desenvolvimento da doença, e como consequência a existência de novos surtos na primavera (Sobiczewski *et al.*, 2017). A capacidade de sobreviver de um inverno para o outro sugere que a Ea pode ter a capacidade de alterar o seu modo de colonização de biotrófico para necrotófico. Alguns estudos demonstraram a capacidade de Ea sobreviver como endófito colonizando hospedeiros assintomáticos, tendo um papel importante no estabelecimento e desenvolvimento do fogo bacteriano (Sobiczewski *et al.*, 2017).

Em hospedeiros suscetíveis, a infecção desenvolve-se rapidamente, levando à morte da planta num curto espaço de tempo (i.e. após o aparecimento dos primeiros sintomas), tornando-se numa doença devastadora e de difícil controlo (Pedroncelli & Puopolo, 2023). O fogo bacteriano causa danos consideráveis aos hospedeiros suscetíveis e é destrutivo para as colheitas do ano (cujo rendimento é afetado ou até mesmo nulo), mas também tem repercussões nos anos subsequentes, equivalendo a um impacto económico enorme (Pedroncelli & Puopolo, 2023).

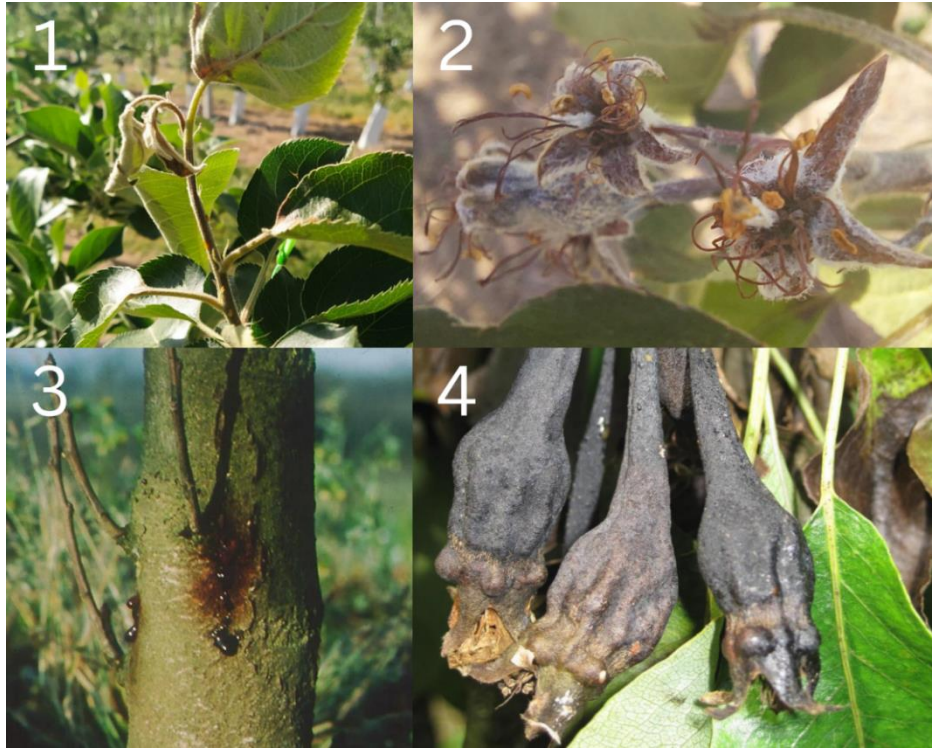


Figura 7 - Sintomas da doença provocada por *Erwinia amylovora*: 1 - Murchidão e morte de galhos (dobram-se de forma característica, formando o sintoma conhecido como “bengala”); 2 – Murchidão e morte em cachos de flores de uma pereira infetada; 3 – Cancro com exsudado; 4 - Frutos de pera imaturos mumificados com pequenas gotas de exsudado. Fotografias 1 e 2 cedidas por Daniela Figueira e Sara Rodrigues; Fotografias 2 e 3 obtidas em *Erwinia amylovora* (ERWIAM)[Photos]| EPPO Global Database.

***Erwinia amylovora* em Portugal**

A propagação de Ea, após a sua introdução na Europa em 1967, foi relativamente rápida. Portugal, chegou a ser considerado o único país da União Europeia com área integral protegida, até que em 2006 se registou o aparecimento do primeiro foco da doença no centro do país (DGAV, 2015). As autoridades sanitárias tomaram medidas de controlo e erradicação, aparentemente bem-sucedidas, até que em 2010 surgiram diversos focos desta doença (DGAV, 2015), dificultando os esforços para conter o organismo patogénico. Atualmente a Ea está presente em vários concelhos do país na região de Lisboa e Vale do Tejo assim como na região do Oeste (DGAV, 2022a).

Medidas de controlo e prevenção

À semelhança de outros organismos relevantes no contexto fitossanitário, não há medidas de controlo eficazes para a doença do fogo bacteriano (Khan *et al.*, 2012). No

entanto, o seu controlo é baseado em medidas profiláticas focadas na: vigilância das colheitas (para prevenir ou erradicar a propagação); remoção manual de rebentos infetados (para a redução do inóculo bacteriano); e imposição de medidas fitossanitárias rigorosas, como os passaportes fitossanitários para a garantia de qualidade fitossanitária das plantas para plantar (EPPO, 2023b).

As inspeções fitossanitárias devem ser realizadas durante a estação de crescimento (altura em que os sintomas são visíveis), sendo as inspeções variáveis consoante o hospedeiro e a localização geográfica (EPPO, 2023b). Durante o inverno, em plantas dormentes, a deteção da doença é complexa visto que os cancrios nem sempre são visíveis (EPPO, 2023b). A erradicação é geralmente tentada em áreas recentemente infetadas, no entanto, quando a doença se estabelece nos pomares ou em hospedeiros selvagens, as medidas de erradicação são muito dispendiosas e, na maioria das zonas, ineficazes (EPPO, 2023b).

Existem alguns antibióticos e agentes de controlo biológico que se revelaram eficazes no controlo da doença, no entanto, para além do elevado custo e dificuldade de aplicação, constituem uma preocupação para o ambiente e para a saúde e consequentemente, foram regulados e proibidos em alguns países (Khan *et al.*, 2012), como é o caso de Portugal. Para além disso, o uso de antibióticos repetidamente contribui para o desenvolvimento de populações bacterianas de *Ea* resistentes (Khan *et al.*, 2012).

Na ausência de tratamentos químicos eficazes, a plantação de genótipos resistentes é altamente recomendada (Sobiczewski *et al.*, 2017). A melhoria genética da resistência ao fogo bacteriano em macieiras e pereiras é a melhor alternativa para reduzir os danos causados pela doença, a perda de colheitas e a perda de pomares inteiros (Khan *et al.*, 2012).

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares de *Ea*, das interações entre o organismo patogénico e o hospedeiro e da influência das condições ambientais, é essencial e contribui para o desenvolvimento de estratégias eficazes para a prevenção e controlo do fogo bacteriano (Khan *et al.*, 2012).

2.2.2. Materiais e métodos

A detecção e identificação molecular de *Ea* foi realizada segundo o procedimento de ensaio IPN/FITOLAB/PE302.02 baseado na norma PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora* da EPPO (2013). Na Figura 8, está representado o fluxograma do ensaio para a detecção molecular e identificação de *Ea*, através de um protocolo de RT-PCR (Pirc *et al.*, 2009) e PCR convencional (Taylor *et al.*, 2001).

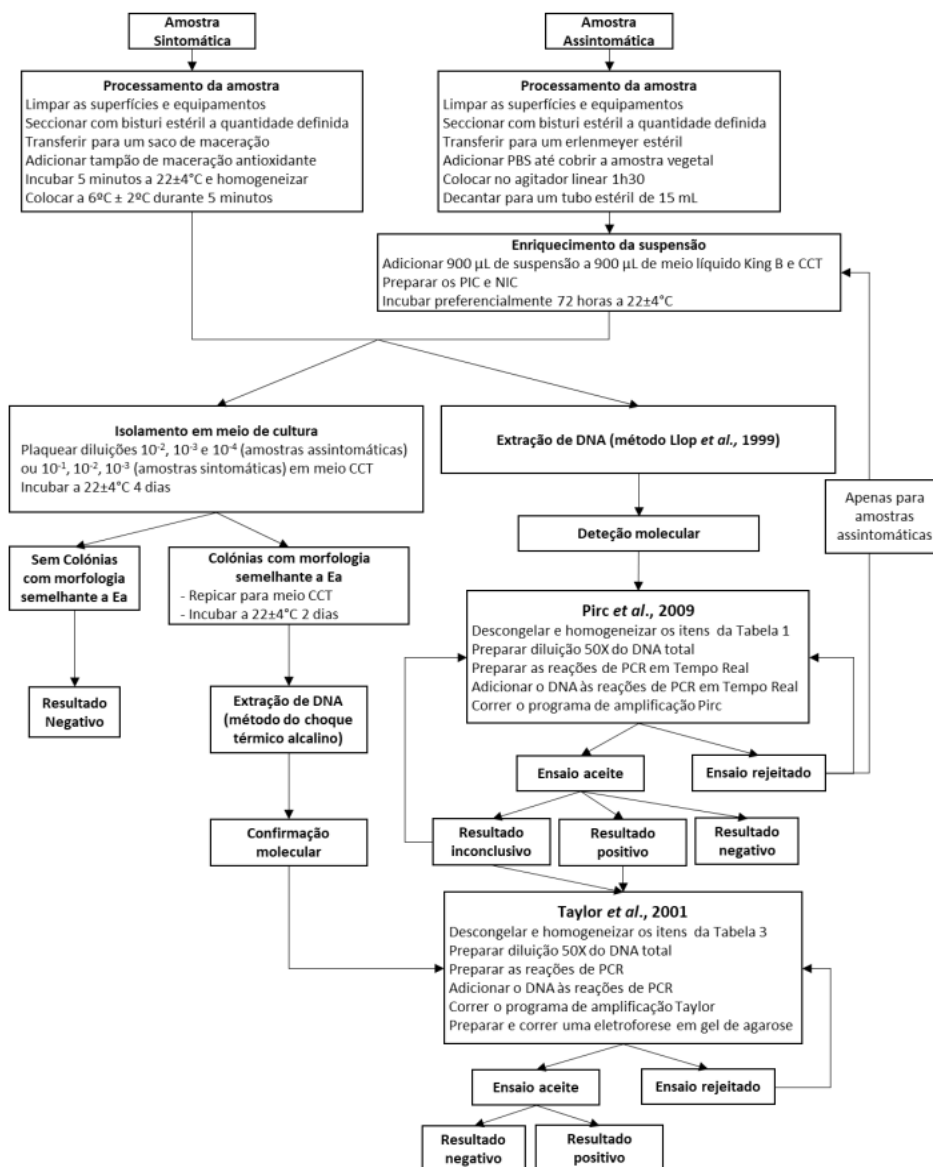


Figura 8 - Fluxograma do ensaio para a detecção molecular e identificação de *Erwinia amylovora*, de acordo com o protocolo experimental adotado no FITOLAB (IPN/FITOLAB/PE302.02).

Segundo a norma PM 7/20 (2), a identificação de Ea deve ser suportada por dois ou mais testes baseados em diferentes princípios biológicos, incluindo pelo menos um teste PCR. À semelhança do ensaio de deteção de Psa, o ensaio para a deteção de Ea pode ser realizado em plantas sintomáticas ou assintomáticas. Os procedimentos de ensaio variam consoante a tipologia da amostra de forma a otimizar a sua deteção.

Na primeira etapa do ensaio, foi realizado o processamento da amostra, no qual foram selecionadas seções do material vegetal posteriormente colocadas em tampão e incubadas com agitação. Da suspensão foram recolhidas alíquotas para o enriquecimento da suspensão e para o isolamento em meio de cultura. O DNA total das amostras em enriquecimento foi extraído pelo método descrito por Llop *et al.* (1999), e de seguida foi realizado um protocolo de RT-PCR de acordo com Pirc *et al.* (2009) que amplifica uma região do DNA cromossomal de Ea, a *Ams*. Essa região codifica a síntese do polissacarídeo capsular que parece ser único para Ea (Bereswill *et al.*, 1995).

O enriquecimento da suspensão foi realizado com o objetivo de aumentar a densidade bacteriana de Ea, pois, devido a condições adversas ou ao elevado número de inibidores, é expectável que haja uma baixa população bacteriana desta espécie (EPPO, 2013). Como a composição e a microbiota da amostra são desconhecidas, utilizam-se dois meios de cultura diferentes, o KB e o CCT. O KB é um meio não seletivo para Ea, onde é expectável que haja crescimento de diferentes organismos (nomeadamente *Pseudomonas* e *Erwinia*) e o CCT é um meio semi-seletivo que permite diferenciar populações de Ea de populações de *Erwinia* sp. (Ishimaru, 1984).

Em paralelo, foi realizado o isolamento de colónias putativas de Ea. Este procedimento é baseado no espalhamento em meio de cultura CCT (Ishimaru & Klos, 1984) de diluições em série. As colónias com morfologia idêntica a Ea foram selecionadas para extração de DNA total e posterior confirmação molecular, através de uma PCR convencional de acordo com Taylor *et al.* (2001).

No contexto deste ensaio foram analisadas três amostras assintomáticas de pereira, identificadas com os códigos 4, 5 e 6.

Tipificação e processamento

A tipificação da amostra foi realizada através da observação e avaliação do estado de conservação e sintomatologia presente na amostra. Todas as informações foram registadas no impresso IPN/FITOLAB/I322.04 “Registo de ensaio: Deteção e Identificação de *Erwinia amylovora*”.

O processamento das amostras incluiu a seleção de segmentos de material vegetal de ramos, com cerca de 2 cm de comprimento, representativos do estado fitossanitário de cada amostra. Os segmentos foram transferidos para um Erlenmeyer, submersos com uma solução de PBS-Tween-20 a 1% (Anexo 1, secção 1.1.1.) e colocados num agitador linear por 1h30m a 150 rpm.

Após agitação, a suspensão foi filtrada através de uma gaze estéril para um tubo estéril de 15 mL. Por cada amostra, foram preparados dois microtubos estéreis com 15-25% de glicerol esterilizado (>99,5%), aos quais foram adicionados 1,5 ml do extrato para conservação a -80°C, permitindo repetir os ensaios em caso de necessidade.

Enriquecimento

O enriquecimento da suspensão foi realizado numa câmara de fluxo laminar sob condições estéreis. Por cada amostra foram preparados dois tubos tipo *Falcon* estéreis, aos quais se adicionaram 900 µL de meio líquido, KB e CTT, respetivamente, preparados tal como descrito no (Anexo 1, secção 1.2.). De seguida, foram adicionados 900 µL da suspensão da respetiva amostra a cada um dos tubos preparados.

Em paralelo, foram preparados os seguintes controlos para cada meio: PIC (PIC KB e PIC CCT), que é preparado por inoculação do meio, com uma ansa de 10 µL estéril, de uma colónia da estirpe de referência de *Ea* CFBP1232 (*CIRM-CFBP*), e ao qual se adicionaram 900 µL de PBS-Tween-20 utilizado no processamento da amostra e permite confirmar a viabilidade do meio para o crescimento do organismo alvo; NIC (NIC KB e NIC CCT), que é preparado com a adição de 900 µL de PBS-Tween-20, utilizado no processamento da amostra, a cada meio e que monitorizam a contaminação dos meios e soluções utilizadas. Os enriquecimentos foram incubados à temperatura ambiente (22±2°C) durante 72 horas. Após o período de incubação iniciou-se o processo de extração de DNA total das amostras e dos controlos (PIC e NIC).

Após a incubação, foi dispensado 1 mL do enriquecimento de cada amostra e dos controlos para um microtubo estéril, que foi usado para a extração de DNA total, e 0,7 mL da suspensão para outro microtubo estéril que foi usado para o isolamento em meio de cultura.

Isolamento em meio de cultura

O isolamento em meio de cultura realizou-se numa câmara de fluxo laminar sob condições estéreis, a partir do remanescente da suspensão obtida. Para cada tubo de enriquecimento foram preparadas as seguintes diluições em série: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴

utilizando PBS 10 mM (Anexo 1, secção 1.1.1.) como solvente. Foram espalhados 100 µL das diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para as placas de meio de cultura CCT, previamente preparadas e identificadas. Em paralelo, foram espalhadas 100 µL da suspensão de cada controlo (NIC KB e NIC CCT, PIC KB e PIC CCT) em placas de meio CCT.

Foram preparados os seguintes controlos de isolamento: PIC, através do espalhamento de uma estirpe de referência de *Ea* CFBP1232 (*CIRM-CFBP*), que confirma a viabilidade do meio para o crescimento do organismo alvo; NIC, através do espalhamento da solução de PBS 10 mM utilizada na preparação das diluições, que monitoriza a contaminação da solução utilizada.

As placas de CCT foram incubadas a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 4 dias, e o seu crescimento observado à lupa diariamente. Após o período de incubação, foram feitas as verificações dos controlos. O ensaio de isolamento foi aceite se ocorrer crescimento de alguma CFU de *Ea* nos PIC(s) e se não se observar qualquer CFU nos NIC(s). No caso de haver colónias com morfologia semelhante à *Ea*, procede-se à repicagem das mesmas para meio de cultura CCT até se obterem culturas puras.

Extração de DNA total

A extração de DNA total das amostras 4, 5 e 6, e dos controlos NIC KB e NIC CCT, PIC KB e PIC CCT, foi realizada a partir da suspensão enriquecida, pelo método descrito por Llop *et al.* (1999). O tampão de extração Llop (TEA) utilizado na extração foi preparado tal como descrito no (Anexo 1, secção 1.1.3). Em paralelo, foi preparado o controlo negativo da extração (NEC), que consistiu na realização de uma extração extra sem a adição da colónia, de forma a monitorizar os reagentes utilizados.

Para iniciar a extração do DNA total, foi centrifugado 1 mL de cada um dos enriquecimentos a 10.000 g durante 5 minutos, com o objetivo de sedimentar as bactérias em suspensão. De seguida, foram adicionados 500 µl do tampão de extração Llop e colocados a agitar no vórtex durante 1h.

Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação (4.000 g durante 10 minutos) e foram transferidos 400 µl do sobrenadante para um microtubo estéril. Foram adicionados 450 µl de isopropanol (4°C) a cada uma das amostras, homogeneizados por inversão e incubados a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1h. Decorrido o tempo de incubação, foi recuperado o precipitado por centrifugação (10.000 g durante 5 minutos) e foram colocados os microtubos abertos na *hotte* até que o precipitado ficasse totalmente seco. Por fim, o precipitado seco foi ressuspenso em 200 µl de água miliQ estéril. O DNA total obtido foi armazenado a -20°C até à sua utilização.

Deteção molecular por RT-PCR

A deteção molecular de Ea foi realizada através de uma RT-PCR descrita por Pirc *et al.* (2009), tal como descrito no (Anexo 2, secção 2.4.). Por cada amostra a analisar, foram preparadas quatro reações de PCR: duas utilizando o DNA total extraído da suspensão do KB e do CCT, respetivamente, e as outras duas utilizando diluições de 1:50. Em paralelo, foi preparado o PAC com a adição de 2 µL de DNA proveniente da estirpe de referência de Ea CFBP1232 (material de referência monitorizado e disponibilizado pelo FITOLAB), e o NAC, ao qual se adicionou o mesmo volume de água miliQ estéril. A mistura de reação foi preparada numa câmara de UV-PCR, em condições estéreis. O ensaio de RT-PCR foi realizado no termociclador CFX Connect™ *Real-Time System* (Bio-Rad) seguindo as condições descritas na Tabela XII (Anexo 2).

Terminada a RT-PCR, os resultados foram visualizados e registados recorrendo ao software *Bio-Rad CFX Maestro*.

Verificação dos controlos dos métodos de enriquecimento, extração de DNA total, deteção molecular e interpretação de resultados

A verificação dos controlos preparados para o método de enriquecimento e para a extração de DNA pelo método de Llop *et al.* (1999) foi realizada aquando da deteção molecular por RT-PCR Pirc *et al.* (2009).

O resultado do ensaio molecular foi aceite se o PAC apresentasse uma curva de amplificação exponencial e se não houvesse amplificação no NAC.

O enriquecimento das suspensões e a extração de DNA total são válidos se: não se visualizar uma curva de amplificação exponencial nos controlos NIC KB, NIC CCT e NEC; e se ocorrer amplificação de uma curva exponencial nos controlos PIC KB, PIC CCT.

No que diz respeito à interpretação de resultados: o resultado do ensaio foi considerado positivo quando pelo menos uma das reações de RT-PCR por amostra (original e diluições) apresentasse uma curva de amplificação exponencial; considerado negativo quando todas as reações de RT-PCR por amostra não apresentassem amplificação; e foi considerado inconclusivo quando existisse amplificação nos RT-PCR, mas o perfil da curva não fosse exponencial.

Deteção molecular por PCR convencional

De acordo com a norma PM 7/20 (2), em caso da deteção molecular de Ea por RT-PCR descrita por Pirc *et al.* (2009), seria necessário confirmar o resultado através da PCR convencional descrita por Taylor *et al.* (2001), descrita no (Anexo 2, secção 2.2.). Para cada amostra foram preparadas duas reações de PCR: uma utilizando o DNA total e outra uma diluição de 1:50 do DNA total. A mistura de reação foi preparada numa câmara de UV-PCR, em condições estéreis. Em paralelo, foi preparado o PAC através da adição de 5 µL de DNA proveniente da estirpe de referência de Ea CFBP1232 (material de referência monitorizado e disponibilizado pelo FITOLAB), e o NAC no qual o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água miliQ estéril. O PAC permite garantir a especificidade e sucesso da reação enquanto o NAC afere que não houve contaminação durante o processo, não sendo expectável a sua amplificação. O ensaio da PCR convencional foi realizado no termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições descritas na tabela VIII (Anexo 2).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) em tampão TBE 1x (Anexo 1, secção 1.1.2.) ao qual foi adicionado o corante *GreenSafe Premium* (NZYTech). Foram carregados 8 µL do produto de PCR de cada amostra no gel e foi aplicada uma corrente de 75V durante 40 minutos. A corrida de eletroforese foi monitorizada com o marcador molecular *NZYDNA Ladder III* (NZYTech), que produz um padrão de bandas que variam de 200 a 10000 bp. Terminada a corrida, os produtos de PCR foram visualizados e registados com um transiluminador *Molecular Imager Doc™ XR+* (Bio-Rad).

O resultado do ensaio foi aceite se o PAC apresentasse uma banda com o peso molecular de 187 pb e o NAC não apresentasse amplificação de qualquer banda. O resultado foi considerado positivo quando pelo menos uma das reações de PCR por amostra (original e diluição) apresentasse uma banda com 187 pb. O resultado foi considerado negativo se não ocorrer amplificação de banda ou se apresentassem amplificação de uma banda com peso molecular diferente de 187 pb.

2.2.3. Resultados e discussão

Avaliação da conformidade e tipificação das amostras

As amostras 4, 5 e 6 eram compostas (i.e., constituídas por material vegetal pertencente a diferentes plantas da mesma espécie, neste caso ramos de pereiras sem folhas) e foram consideradas conforme e assintomáticas.

Isolamento em meio de cultura

O ensaio foi aceite após análise dos resultados dos controlos: verificou-se crescimento de Ea no PIC KB, PIC CCT e PIC, e não se observou nenhuma CFU no NIC KB, NIC CCT e NIC. Nas amostras em análise, não foram observadas colónias com morfologia semelhante a Ea (i.e., de cor violeta pálida, circulares, altamente convexas e arredondadas, lisas e mucóides). Neste contexto, o isolamento em meio de cultura foi considerado negativo para a presença de Ea.

As amostras chegaram ao laboratório no mês de fevereiro, em pleno inverno e ainda em estado de dormência. Esta condição pode ter dificultado o isolamento do organismo, daí não ter sido possível identificar a Ea por este método. A análise de plantas assintomáticas deve ser realizada no verão ou no início do outono para aumentar a probabilidade da deteção molecular de Ea (EPPO, 2013).

Extração de DNA total e deteção molecular por RT-PCR

A extração de DNA total foi realizada para cada uma das amostras em análise (4, 5 e 6), a partir do enriquecimento de 48h das suspensões.

A verificação do sucesso da extração a partir da suspensão enriquecida é verificada aquando da análise molecular, através da observação do resultado dos controlos do isolamento (PIC KB, PIC CCT, NIC KB e NIC CCT) e do NEC extraídos. A deteção molecular por RT-PCR foi realizada a partir do DNA total extraído do enriquecimento das suspensões de cada amostra. Os resultados relativos à RT-PCR, podem ser observados na Figura 9. O ensaio foi aceite tendo em conta a amplificação do PAC e ausência de amplificação do NAC.

Os resultados obtidos foram aceites após avaliação da conformidade dos meios. Em detalhe, não se verificou qualquer amplificação nos NIC(s) relativos aos meios utilizados no enriquecimento, NIC KB e NIC CCT, nem no NEC. Por outro lado, os PIC(s) em análise,

PIC KB e PIC CCT, apresentaram uma curva de amplificação exponencial na diluição de 1:50.

Analisando os resultados do ensaio, as amostras 5 e 6 não apresentaram amplificação em nenhum dos enriquecimentos, ou seja, o resultado foi considerado negativo. A amostra 4 obteve uma curva de amplificação exponencial no enriquecimento do meio KB (solução original Cq 18,43 e diluição Cq 23,19), e na diluição do enriquecimento do meio CCT (Cq 20,88), o que significa que a amostra 4 teve um resultado positivo. À semelhança do que acontece com as reações PIC KB e PIC CCT, a amostra 4 CCT só obteve amplificação na respetiva diluição (4 CCT d), uma possível justificação para esta observação é a elevada concentração de DNA na solução original, o que pode dificultar a ligação dos primers e inibir a reação de RT-PCR.

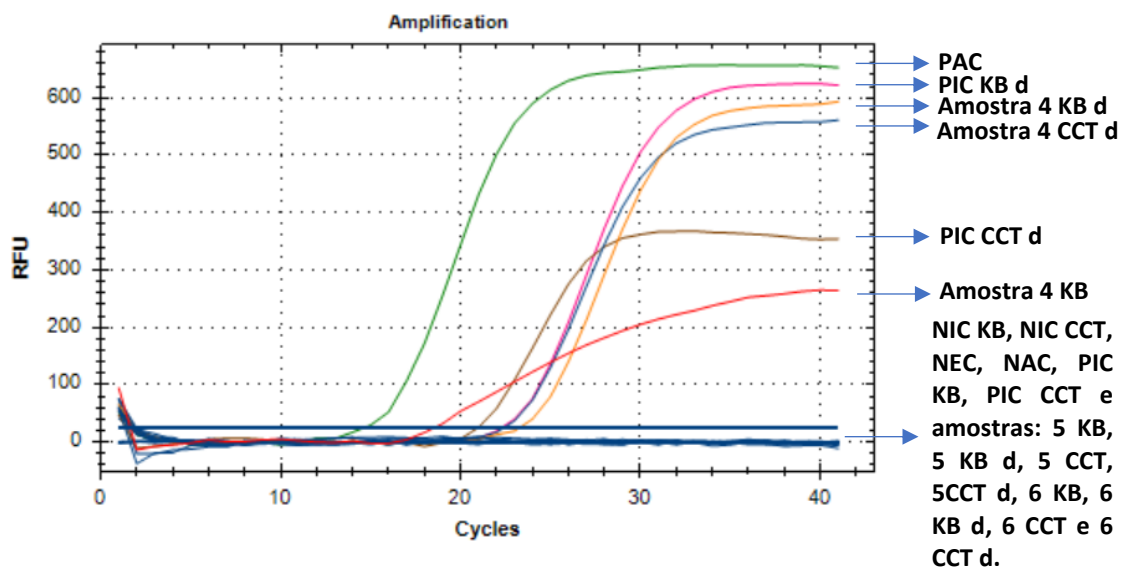


Figura 9 - Resultados obtidos para as amostras 4, 5 e 6, no protocolo de *real time polymerase chain reaction* descrito por Pirc *et al.* (2009). Amostras 4 KB, 4KB d, 5 KB, 5KB d, 6 KB e 6KB d – DNA total das amostras 4, 5 e 6 extraídas a partir da suspensão enriquecida do meio KB e respetiva diluição de 1:50 (d); Amostras 4 CCT, 4 CCT d, 5 CCT, 5 CCT d, 6 CCT e 6 CCT d - DNA total das amostras 4, 5 e 6 extraídas a partir da suspensão enriquecida do meio CCT e respetiva diluição de 1:50 (d); PAC - controlo positivo de amplificação; NAC – controlo negativo de amplificação; PIC KB e PIC KB d – DNA total do controlo positivo do isolamento extraído a partir da suspensão enriquecida do meio KB e respetiva diluição de 1:50 (d); PIC CCT e PIC CCT d – DNA total do controlo positivo do isolamento extraído a partir da suspensão enriquecida em meio CCT e respetiva diluição de 1:50 (d); NIC CCT e NIC KB – DNA total do controlo negativo do isolamento extraído a partir da suspensão enriquecida em meio CCT e em meio KB, respetivamente; NEC – controlo negativo da extração.

Deteção molecular por PCR convencional

A amostra 4 obteve um resultado positivo no protocolo de Pirc *et al.* (2009) de deteção molecular de Ea por RT-PCR, pelo que, seguindo as indicações da norma PM 7/20 (2) a deteção de Ea teve de ser confirmada pelo protocolo de PCR convencional de Taylor *et al.* (2001).

O ensaio relativos à confirmação da deteção molecular de Ea por PCR convencional de acordo com Taylor *et al.* (2001) foi aceite uma vez que o PAC apresentou amplificação de uma banda de 187 pb e não houve amplificação no NAC (Figura 10).

Na amostra 4, foi observada uma banda com o peso molecular correspondente a 187 pb em ambas as amostras de DNA total extraídas do enriquecimento de KB e de CCT. A amplificação ocorreu quer na solução original (4KB e 4 CCT) quer na respetiva diluição (4KB d e 4CCT d), pelo que o resultado foi considerado positivo (Figura 10).

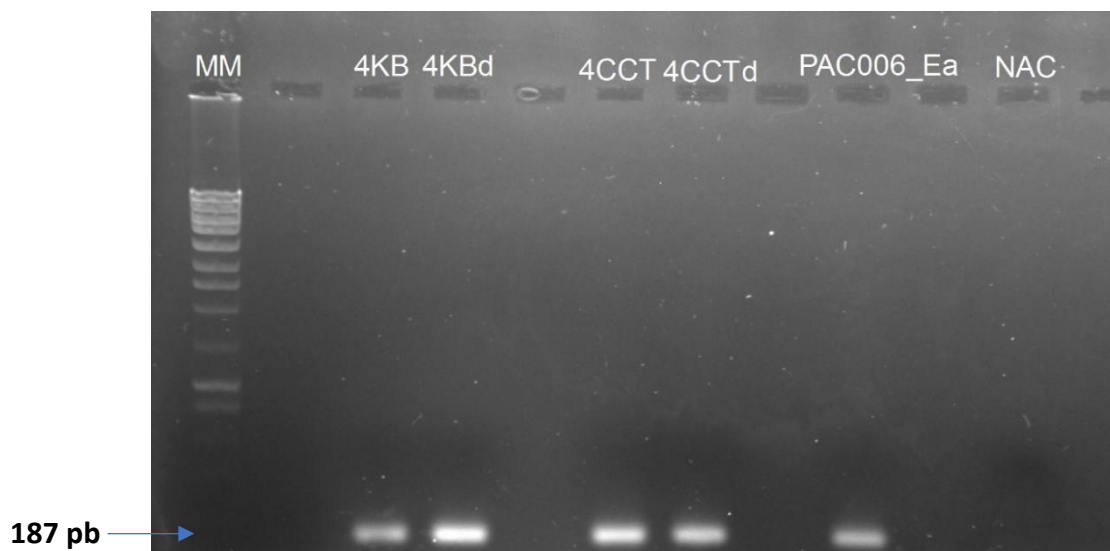


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação da *polymerase chain reaction convencional* descrita por Taylor *et al.* (2001). MM – NZYDNA Ladder III; 4KB e 4KBd – Amostra 4 enriquecida em meio KB e respetiva diluição; 4CCT e 4CCTd - Amostra 4 enriquecida em meio CCT e respetiva diluição (d); PAC006_Ea - controlo positivo de amplificação; NAC - controlo negativo de amplificação (NAC).

2.2.4. Conclusão

Nas amostras 5 e 6 não foi detetada Ea uma vez que não foram isoladas colónicas com morfologia semelhante a Ea e o teste molecular de RT-PCR de Pirc *et al.* (2009) obteve um resultado negativo.

Na amostra 4 foi detetada Ea, mas não identificada, uma vez que o teste molecular de RT-PCR de Pirc *et al.* (2009) e o PCR de Taylor *et al.* (2001) obtiveram um resultado positivo, mas não foram isoladas colónias de Ea.

2.3. Deteção de *Xylella fastidiosa*

2.3.1. Introdução

Classificação e morfologia

Descrita por Wells *et al.* (1987), Xf é considerado um dos organismos mais perigosos das plantas a nível global e tem um grande impacto económico para a agrofloresta e ambiente devido à variedade de doenças que causa (European Commission, 2023). Xf é um organismo regulado de quarentena inserido na lista A2 da EPPO (pontualmente presentes no território EPPO e sob controlo oficial). Relativamente à União Europeia, encontra-se incluído no Anexo IIB da Diretiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de maio de 2000.

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram negativa da família *Xanthomonadaceae*, e caracteriza-se pela forma de bastonete, parede celular ondulada, ausência de flagelo e pelas suas dimensões estimadas de 0,25 a 0,5 µm de diâmetro e 0,9 a 4,0 µm de comprimento (Wells *et al.*, 1987). De crescimento lento (Janse & Obradovic, 2010), com um ótimo entre os 26°C e 28°C, Xf é estritamente aeróbia e tem a peculiaridade de colonizar o xilema das plantas hospedeiras e o aparelho bucal dos insetos vetores (Wells *et al.*, 1987).

O género *Xylella* tem uma única espécie, Xf, e até ao momento, seis subespécies identificadas: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, subsp. *multiplex*, subsp. *pauca*, subsp. *sandyi*, subsp. *tashke* e subsp. *morus* (EPPO, 2023c). Com base na metodologia *Multi-Locus Sequence Type* foi possível avaliar a diversidade genética de cada subespécie de Xf, tendo sido identificados diversos *Sequence Types* que suportam a existência de diversificação genética (DGAV, 2021).

História e distribuição geográfica

Xylella fastidiosa é uma bactéria nativa do continente americano, onde permaneceu restrita durante muitos anos, até ser detetada no continente asiático (Denancé *et al.*, 2017). Foi reportada nos EUA após massivo declínio de *Vitis* spp. (videiras) e tornou-se numa epidemia com um impacto devastador nessa indústria, sendo nomeada de *Pierce's disease* (Sicard *et al.*, 2018). Mais de um século depois, *Pierce's disease* continua a ser um problema para os produtores de videiras. (Janse & Obradovic, 2010). Posteriormente foi detetada no Brasil, associada a doenças em citrinos, abrindo caminho para anos de investigação intensa e preocupação com este organismo que,

após ser descrito por Wells *et al.* (1987), foi encontrado em várias espécies vegetais hospedeiras (Janse & Obradovic, 2010).

Apesar de existirem relatos esporádicos (não confirmados) de Xf na Europa, apenas em 2013, foi feita a sua associação com uma nova doença que dizimou centenas de oliveiras no sul de Itália (região da Apúlia), com impacto socioeconómicas sem precedente (Sicard *et al.*, 2018). Análises genéticas suportam que Xf subsp. *pauca*, responsável pela epidemia em Apúlia, originária da Costa Rica ou das Honduras, foi introduzida através de plantas de café infetadas (Godefroid *et al.*, 2019). Posteriormente, a Comissão Europeia implementou diversos planos de prospeção, tendo detetado a presença de Xf em vários países da região mediterrânica, reemergindo como um organismo patogénico de importância global (Sicard *et al.*, 2018). Xf está presente numa vasta gama de zonas climáticas, áreas tropicais e subtropicais e em regiões de clima temperado (EPPO, 2023c).

O mapa da sua distribuição atual encontra-se na Figura 11. Atualmente está presente em grande parte do continente americano; no continente asiático, em Taiwan, no Irão, em Israel e no Líbano; e no continente europeu, em Portugal, Espanha, França e Itália (EPPO, 2023c). Face aos potenciais locais onde o clima favorece o estabelecimento de Xf, é expectável que o número de países afetados aumente nos próximos anos (Godefroid *et al.*, 2019).

Um estudo realizado com o objetivo de perceber a aptidão climática na Europa para a disseminação de Xf subsp. *fastidiosa*, Xf subsp. *multiplex* e Xf subsp. *pauca*, concluiu que toda a zona mediterrânica e costeira atlântica têm condições climáticas suscetíveis ao desenvolvimento dessas subespécies. Além disso, ainda que menos relevante, também se observa uma aptidão climática favorável nas regiões a norte e leste da Europa, e.g., Bélgica, Países Baixos, Alemanha, entre outros (Godefroid *et al.*, 2019).

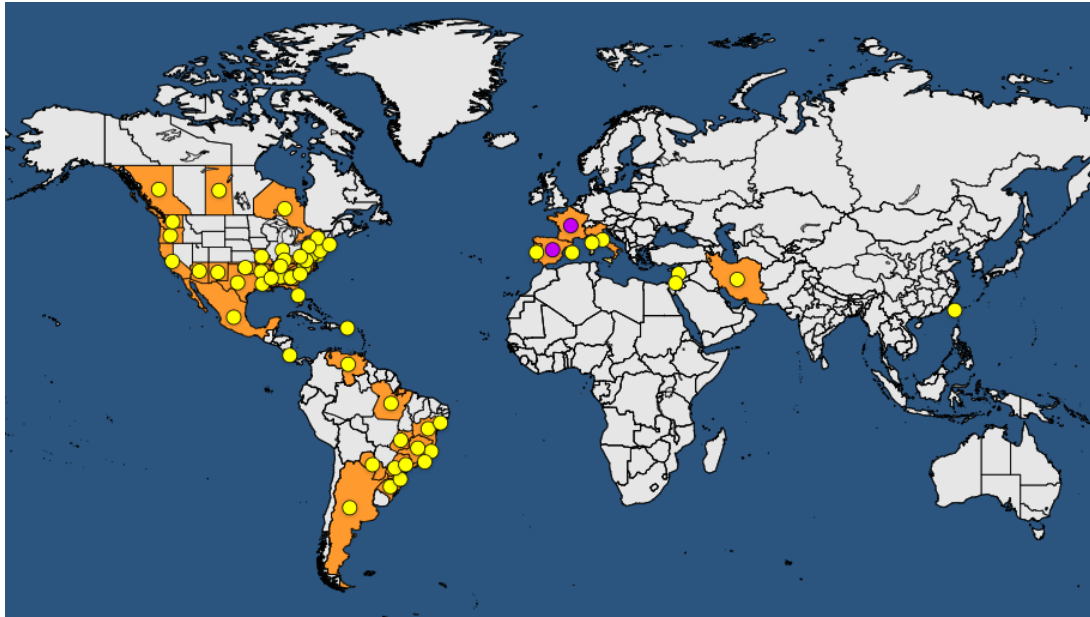


Figura 11 - Distribuição geográfica de *Xylella fastidiosa* assinalada a amarelo. A roxo os locais onde a *Xylella fastidiosa* está em fase de contenção. Mapa obtido em *Xylella fastidiosa (XYLEFA)[Datasheet] | EPPO Global Database*.

Sintomatologia, ciclo de vida e epidemiologia

Xylella fastidiosa afeta um elevado leque de hospedeiros. A última atualização do relatório semestral da *European Food Safety Authority* (EFSA), que reviu toda a literatura até à data de 31 de dezembro de 2022, aponta para a existência de 690 espécies de hospedeiros, que correspondem a 306 géneros e 88 famílias (EFSA, 2023). Os hospedeiros não são todos suscetíveis a todas as subespécies ou STs de Xf (EFSA, 2023).

A bactéria pode causar graves danos a diversas culturas, e consoante a espécie que infeta, a doença desenvolvida pode ter vários nomes: em oliveiras - *Olive quick decline syndrome*; em videiras - *Pierce's disease*; em citrinos - *Citrus variegated chlorosis*; em amendoeiras - *Almond leaf scorch disease*; em loendros - *Oleander leaf scorch*; em pessegueiros - *Phony peach disease*; entre outras. A gravidade dos sintomas das doenças causadas por Xf tem vindo a aumentar como consequência do aquecimento global (Godefroid *et al.*, 2019).

Os sintomas podem variar desde a ausência dos mesmos até à morte da planta num período limitado, e dependem de diversos fatores: do hospedeiro; da inoculação da bactéria; da subespécie envolvida; das condições climáticas e da presença de vetores (European Commission, 2023). *Xylella fastidiosa* é restrita ao xilema da planta formando biofilmes. Quando uma planta é infetada, a função do xilema de transportar água das

raízes até às folhas das plantas fica comprometida, pois os vasos xilémicos são bloqueados devido à formação de biofilmes de bactérias no seu interior, impedindo o transporte de água, e conduzindo a planta a uma morte lenta (EFSA, 2023). Desse modo, os sintomas causados por Xf são muitas vezes confundidos com sintomas relacionados com stress hídrico (EPPO, 2023c).

No geral, os sintomas incluem: clorose foliar (manchas amareladas ou avermelhadas) que se pode espalhar a toda a planta; murchidão das folhas; queda prematura das folhas; morte de plantas jovens; assimetrias em folhas jovens e nanismo; entre outros (EPPO, 2023c). Na Figura 12 apresentam-se alguns exemplos dos sintomas causados pela infeção por Xf em algumas culturas. Contudo, muitas das plantas hospedeiras são assintomáticas, i.e., não expressam qualquer sintoma (EPPO, 2023c), o que representa um problema sério na deteção em tempo útil da bactéria e consequentemente na prevenção da transmissão.



Figura 12 - Sintomas de necrose e clorose foliar provocados por *Xylella fastidiosa* em: 1 - videira (*Pierce's disease*); 2 - citrino (*Citrus variegated chlorosis*); 3 - loendro (*Oleander leaf scorch*); 4 - amendoeira (*Almond leaf scorch disease*). Fotografias obtidas em *Xylella fastidiosa* (XYLEFA)[Photos]| EPPO Global Database.

Insetos vetores e transmissão

Em virtude de ser uma bactéria restrita ao xilema, a Xf é transmitida exclusivamente por insetos que se alimentam do fluído xilémico, sendo que essa transmissão ocorre a curtas distâncias (100-150 metros) e por vezes a longas distâncias quando há interferência da ação do vento nos insetos (EPPO, 2023c). A principal causa da introdução de Xf em novos locais (i.e., longas distâncias) é o comércio de plantas contaminadas. O transporte fortuito, e.g. no calçado e vestuário, de insetos vetores, também pode ser uma causa da introdução de novos focos de Xf (EPPO, 2023c). Em caso de infeção, as células bacterianas podem permanecer restritas ao ponto de entrada ou, em plantas mais suscetíveis, podem proliferar pelos vasos xilémicos e invadir todos os órgãos da planta (EPPO, 2023c).

Os insetos vetores mais comuns pertencem às famílias *Cicadellinae*, *Aphrophoridae* e *Cercopidae*. A espécie *Philaenus spumarius* é atualmente considerada o principal vetor na região da Apúlia e encontra-se amplamente distribuído na Europa (EFSA, 2023). As cigarrinhas (família *Cicadellinae*), ao se alimentarem de plantas infetadas adquirem a bactéria e transmitem-na a outras plantas, pois a bactéria mantém-se nas suas peças bucais (Bodino *et al.*, 2021). *P. spumarius* é uma espécie generalista que se alimenta de mais de 500 espécies de plantas hospedeiras de Xf, de maneira que é possível que transmita a bactéria a outras espécies que ainda não estejam incluídas na lista de hospedeiros de Xf e que possam ser suscetíveis (Bodino *et al.*, 2021).

Não existe um período de latência para os vetores, i.e., desde que um vetor adquire a bactéria está apto para a transmitir (Sicard *et al.*, 2018). *Xylella fastidiosa*, uma vez presente no vetor, sobrevive de uns anos para os outros, embora não haja a transmissão aos ovos e não persista entre estados ninfais (DGAV, 2021). O período de incubação na planta (período entre a infeção e o aparecimento de sintomas) varia de alguns meses a vários anos, dependendo de vários fatores como: genótipo da Xf; espécie hospedeira; idade da planta; e condições de ambientais (EPPO, 2023c).

A eficiência da transmissão de Xf depende de vários fatores: a espécie do vetor e a sua biologia; o genótipo do organismo patogénico; a espécie hospedeira e a sua biologia (e.g. microbiota); as condições ambientais, como a temperatura; as práticas de gestão de culturas; entre outros (Sicard *et al.*, 2018). Consequentemente, apesar de, devido à baixa especificidade da relação vetor-planta, todos os insetos que se alimentem do fluído xilémico serem um potencial vetor (EFSA, 2023), são poucos os que são epidemiologicamente relevantes (Sicard *et al.*, 2018). Sabe-se que o clima desempenha um papel extremamente importante para a colonização da planta por Xf (EPPO, 2023c; Godefroid *et al.*, 2019).

***Xylella fastidiosa* em Portugal**

Xylella fastidiosa é um organismo regulado de quarentena (EU) 2016/2031 e está sujeito a medidas de proteção especiais. Portugal tem pelo menos quatro fatores que favorecem a introdução e estabelecimento de Xf: a posição geográfica, importante para o comércio global; o clima temperado; a presença de vários insetos identificados como vetores eficientes, e.g. *P. spumarius*; e a presença de espécies hospedeiras que representam uma importância enorme para a economia portuguesa (Pereira, 2019). Em 2019, e no âmbito do plano anual de prospeção, foi detetada pela primeira vez a em Portugal, no concelho de Vila Nova de Gaia (DGAV, 2021). Atualmente em Portugal existem 18 zonas demarcadas sendo a Área Metropolitana do Porto das mais afetadas (DGAV, 2021).

Medidas de controlo e prevenção

Sem tratamento que reduza as repercussões desta ameaça global, a propagação da bactéria representa um grande risco para o sistema agroflorestal e ambiental na Europa (Ribal *et al.*, 2022), e pode causar perdas anuais de 5,5 mil milhões de euros, afetando diretamente muitas espécies de alto valor económico (European Commission, 2023). As perdas globais estão a aumentar a um ritmo alarmante e com isso, surge a necessidade de adotar medidas fitossanitárias rigorosas de prevenção e controlo (European Commission, 2023; EPPO, 2023c). Na União Europeia (UE), as medidas fitossanitárias são descritas em pormenor na Decisão (UE) 2015/789 (UE, 2015).

No território da UE, todos os Estados-Membros devem realizar prospeções anuais específicas e, para o efeito, foram definidas listas de plantas hospedeiras especificadas (EPPO, 2023c). No caso de um novo surto de Xf, devem ser aplicadas medidas de erradicação ou contenção através da delimitação de zonas infetadas e de zonas tampão, onde são aplicadas medidas oficiais adequadas, consoante a zona em causa (EPPO, 2023c). Essas medidas podem incluir: destruição de plantas infetadas e de potenciais plantas hospedeiras localizadas na sua proximidade; prospeções específicas (incluindo amostragem e testes intensivos); restrições à circulação de plantas hospedeiras; e medidas de controlo adequadas contra os vetores e as plantas que podem hospedar esses vetores; etc. (EPPO, 2023c). A par dessas medidas, é recomendado aos países que façam inquéritos para verificar a ausência ou a presença de Xf no seu território (EPPO, 2023c).

Há diversos esforços para encontrar um possível tratamento para a Xf e focam-se em três diferentes alvos: as plantas infetadas, a bactéria e os insetos vetores (Bucci, 2018).

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico específicos e mais sensíveis, bem como ferramentas capazes de detetar a presença de Xf precocemente, são cruciais para o sucesso de um dos maiores desafios que enfrentamos atualmente, na área da fitossanidade (EPPO, 2023c).

2.3.2. Materiais e métodos

A deteção molecular de Xf é realizada segundo a norma PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* da EPPO (2019). Na Figura 13, está representado o fluxograma do ensaio para a deteção molecular de Xf, através de dois protocolos de RT-PCR, Harper *et al.*, (2010; *erratum* 2013) e Ouyang *et al.* (2013).

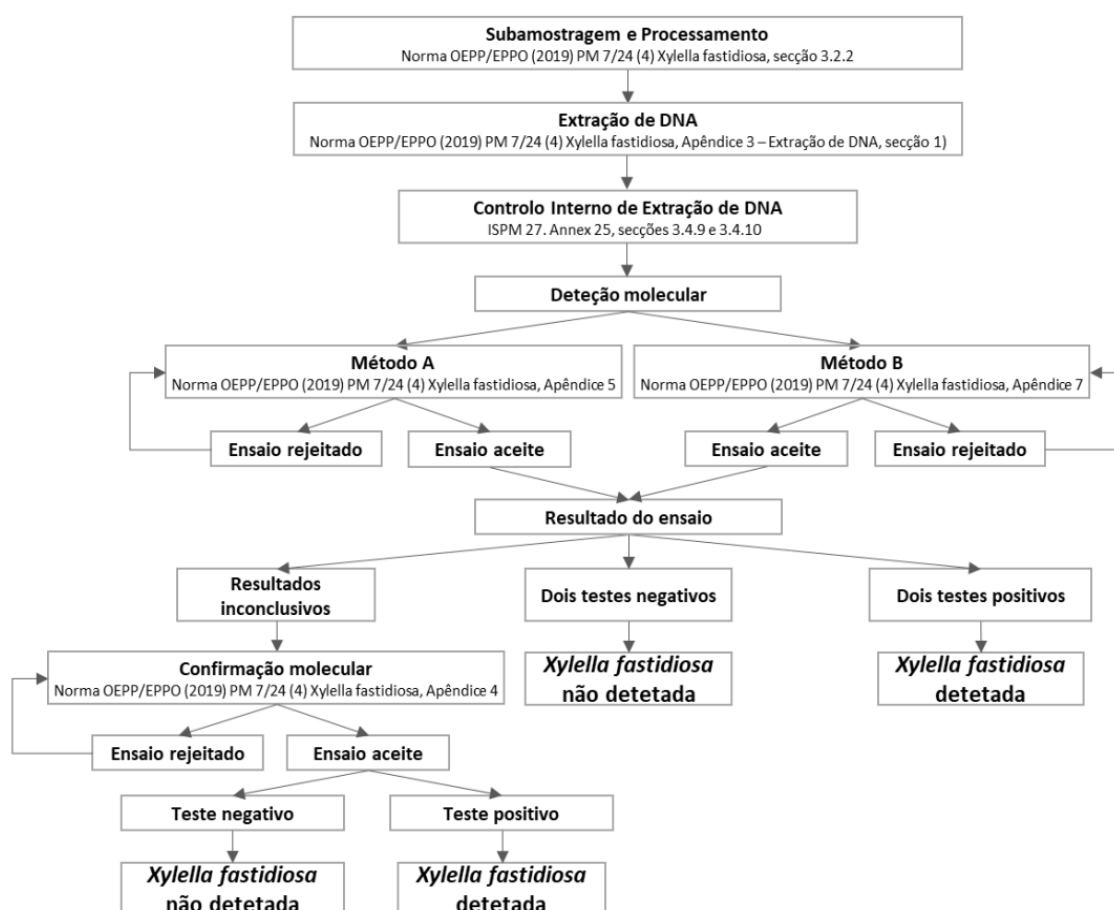


Figura 13 - Fluxograma do ensaio para a deteção molecular de *Xylella fastidiosa*, de acordo com o protocolo experimental adotado no FITOLAB (IPN/FITOLAB/PE302.06).

Segundo a norma PM 7/24 (4), a identificação de Xf deve ser suportada por dois ou mais testes baseados em diferentes princípios biológicos, incluindo pelo menos um teste molecular PCR.

No FITOLAB, é comum receber amostras provenientes de viveiros ou centros de jardinagem (amostras críticas) comumente tipificadas como amostras assintomáticas e que integram a lista de plantas obrigatórias à inspeção fitossanitária de Xf. Em paralelo, o FITOLAB também recebe amostras provenientes dos programas de prospeção nacionais, que podem ser tipificadas como sintomáticas ou assintomáticas, e que englobam um elevado número de espécies de plantas hospedeiras, desde espécies florestais a espécies ornamentais.

Em resumo, na primeira etapa do ensaio realiza-se o processamento da amostra no qual são selecionadas seções do material vegetal, nomeadamente nervura central e pecíolo com recurso a um bisturi estéril. O material vegetal foi macerado em PBS 10mM com recurso ao equipamento Homex (BIOREBA) até à obtenção de um extrato. Do extrato, foram recolhidas alíquotas para a extração de DNA total pelo método de Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB) e para armazenamento a -80°C. O DNA total foi utilizado de seguida em dois protocolos de RT-PCR, de acordo com Harper *et al.* (2010; erratum 2013) e Ouyang *et al.* (2013), que utilizam dois pares de primers que amplificam regiões distintas do genoma da bactéria. O protocolo descrito por Harper *et al.* (2010), foi concebido para amplificar uma parte do gene *rimM* da proteína de processamento do 16S rRNA (FAO, 2018). No protocolo de (Ouyang *et al.*, 2013) a sequência alvo é o gene codificador da proteína da cobalamina (Ouyang *et al.*, 2013). Quando aplicável, a deteção foi confirmada por PCR de acordo com Minsavage *et al.* (1994). No contexto deste ensaio foram analisadas três amostras assintomáticas de oliveira, identificadas com os códigos 7, 8 e 9.

Tipificação e processamento das amostras vegetais

A tipificação da amostra foi realizada através da observação e avaliação do estado de conservação e sintomatologia presente na amostra. Todas as informações foram registadas no impresso IPN/FITOLAB/I359.0 “Registo de ensaio: Deteção de *Xylella fastidiosa*”.

O processamento da amostra consistiu na seleção de 100 folhas, das quais foi cortado com um bisturi estéril parte da nervura central e do pecíolo. O material vegetal selecionado foi pesado e colocado num saco de homogeneização (BIOREBA), ao qual, por cada 1 g de material vegetal, foram adicionados 5 mL de PBS 10mM.

Por cada amostra, foram preparados dois microtubos estéreis com 15-25% de glicerol (>99,5%), aos quais foram adicionados 1,5 mL do macerado para conservação a -80°C, permitindo repetir os ensaios em caso de necessidade. Em paralelo foram adicionados 0,75 mL do macerado a um microtubo para extração de DNA total por CTAB.

Extração de DNA total e verificação da qualidade da extração

A extração de DNA total das amostras, a partir do material vegetal selecionado aquando do processamento, foi realizada de acordo com o método de extração CTAB. Foram adicionados aos microtubos com 0,75 mL do macerado preparados no passo anterior, 0,75 mL de CTAB a 4%, preparado de acordo com o (Anexo 1, secção 1.1.4.). Os microtubos foram incubados por 30 minutos a $65\pm 2^\circ\text{C}$, promovendo a lise celular. Em paralelo, foi substituído o volume do macerado pelo mesmo volume de PBS usado na maceração para preparar NEC. Os microtubos foram centrifugados a 16000 g durante 5 minutos com o objetivo de sedimentar detritos celulares, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado com 1 mL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1), promovendo a separação da fase orgânica da fase aquosa, desnaturando as proteínas e os compostos fenólicos. O sobrenadante obtido após centrifugação, foi transferido para um novo microtubo e homogeneizado por inversão com 2-propanol (frio). Seguiu-se um passo de incubação *overnight* a $-20\pm 5^\circ\text{C}$ de modo a promover a precipitação do DNA total. Após o período de incubação, foi realizada um passo de centrifugação (16000g, 20min), permitindo a recuperação do DNA total precipitado. Seguidamente foram realizados dois passos de lavagem com etanol a 70% por centrifugação (16000g, 10 min). Por fim, depois de o *pellet* estar bem seco, o mesmo foi ressuspenso por adição de 0,1 mL de água miliQ estéril. O DNA total extraído foi armazenado a -20°C até à sua utilização.

O controlo da qualidade da extração de DNA total e a ausência de inibidores foi aferida através da realização de uma RT-PCR desenhada por Weller *et al.* (2000), com o objetivo de limitar a possibilidade de falsos negativos na PCR. Este protocolo combina o *set* de primers COX-F/R e a sonda COX-P (Anexo 2, secção 2.3.), desenhados a partir de uma sequência do gene COX da batata (Weller *et al.*, 2000). A amplificação nesta reação de RT-PCR comprova a presença de DNA dos tecidos da planta na amostra de DNA total, permitindo assim, confirmar se a extração realizada foi bem-sucedida e se apresenta quantidade e qualidade de DNA total suficiente para a sua utilização. Este procedimento funciona como um controlo interno positivo da extração.

Deteção molecular por RT-PCR

A deteção molecular foi realizada através da realização de dois protocolos de RT-PCR Harper *et al.* (2010; erratum 2013) e Ouyang *et al.* (2013), tal como descrito no Anexo 1, secções 2.5. e 2.6., respetivamente.

Por cada amostra a analisar, e por cada método utilizado, foram preparadas duas reações de RT-PCR: uma utilizando o DNA total extraído e outra utilizando um diluição de 1:50 correspondente. A preparação das misturas de reação foi realizada numa câmara de UV-PCR, em condições estéreis. Em paralelo, foi preparado para cada reação um PAC com a adição de 2 µL de DNA no protocolo de Harper *et al.* (2010; erratum 2013) e 1 µL de DNA no protocolo de Ouyang *et al.* (2013), proveniente da estirpe de referência de Xf subsp. multiplex, ICMP 15199 (*International Collection Of Microorganisms*), e um NAC no qual o DNA foi substituído pelo mesmo volume de água miliQ estéril, respetivamente. Os ensaios de RT-PCR foram realizados no termociclador CFX Connect™ *Real-Time System* (Bio-Rad), seguindo as condições descritas na tabela x (ver anexo x). Terminada a RT-PCR, os resultados foram visualizados e registados recorrendo ao software *Bio-Rad CFX Maestro*.

No que diz respeito à interpretação de resultados, o resultado de cada um dos ensaios foi considerado positivo quando pelo menos uma das reações de RT-PCR por amostra (original e diluições) apresentasse uma curva de amplificação exponencial; e considerado negativo quando todas as reações de RT-PCR por amostra não apresentassem amplificação. Foi considerado inconclusivo quando existisse amplificação nos RT-PCR, mas o perfil da curva não fosse exponencial.

2.3.3. Resultados e discussão

Tipificação e processamento das amostras

As amostras 7, 8 e 9 eram críticas (provenientes de um *garden center*) e compostas, i.e., constituídas por material vegetal pertencente a diferentes plantas da mesma espécie, neste caso por ramos de oliveira com folhas e foram consideradas assintomáticas e conformes. Após o processamento, as amostras 7, 8 e 9 pesavam 1,4g, 1,25g e 1,5g respetivamente, tendo sido maceradas em 7mL, 6,25 mL e 7,5mL de PBS 10 mM, respetivamente.

Extração de DNA total e verificação da qualidade da extração

A extração de DNA total pelo método de CTAB foi realizada para cada uma das amostras em análise, a partir de 0,75 mL do macerado obtido.

Os resultados relativos à verificação do controlo da qualidade da extração de DNA total e ausência de inibidores, podem ser observados na Figura 14. O ensaio foi aceite tendo em conta a amplificação do PAC e ausência de amplificação do NAC. Foi obtida amplificação nas amostras 7 (Cq 15,95), 8 (Cq 18,05) e 9 (Cq 16,17), confirmando que a extração de DNA total foi realizada com sucesso, tendo quantidade e qualidade passível de ser analisado nos procedimentos subsequentes.

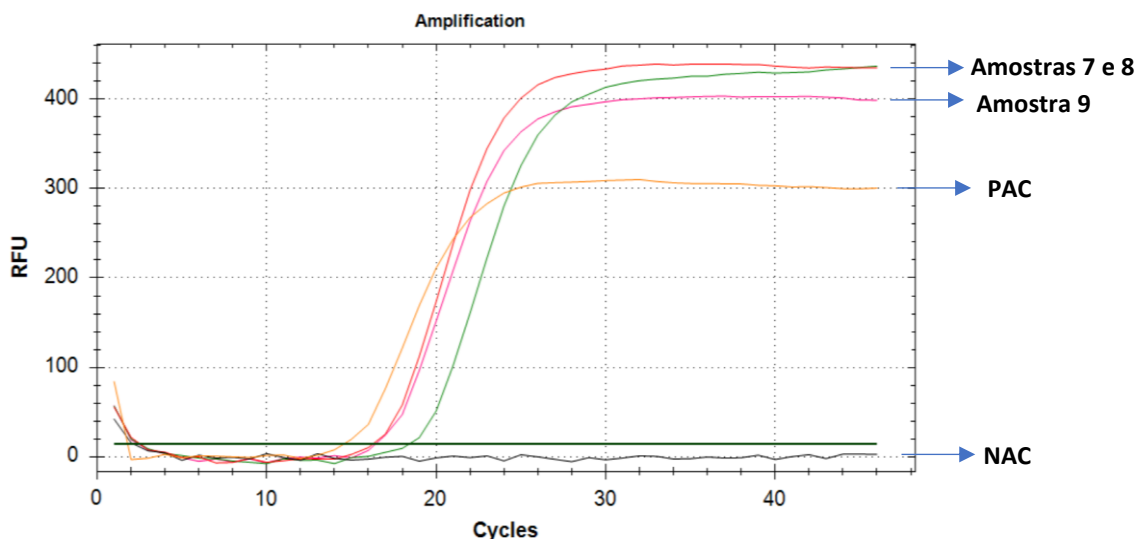


Figura 14 - Resultados obtidos para as amostras, 7, 8 e 9 no protocolo de *real time polymerase chain reaction* descrito por Weller *et al.* (2000). PAC - controlo positivo de amplificação; NAC - controlo negativo de amplificação.

Deteção molecular por RT-PCR de acordo com Harper *et al.* (2010; erratum 2013)

Os resultados relativos à RT-PCR descrita por Harper *et al.* (2010; erratum 2013) podem ser observados na Figura 15. O ensaio foi aceite tendo em conta a amplificação do PAC e ausência de amplificação do NAC. Não foi obtida amplificação em nenhuma das amostras analisadas (7, 8 e 9), pelo que o resultado foi considerado negativo.

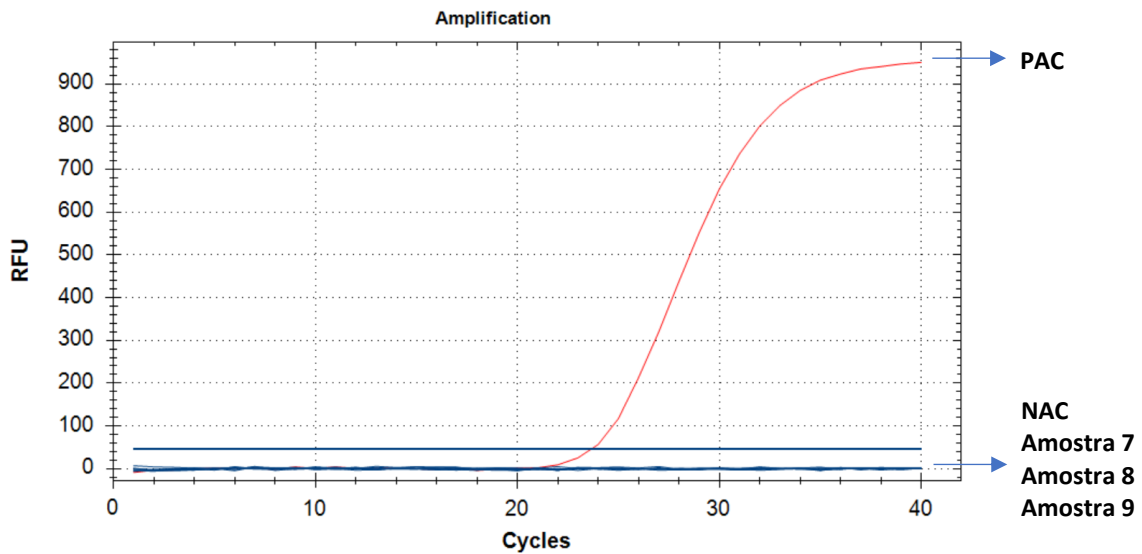


Figura 15 - Resultados obtidos para as amostras 7, 8 e 9 no protocolo de *real time polymerase chain reaction* descrito por Harper *et al.* (2010; erratum 2013). PAC - Controlo positivo de amplificação; NAC - controlo negativo de amplificação.

Deteção molecular por RT-PCR de acordo com (Ouyang *et al.*, 2013)

Os resultados obtidos relativos à RT-PCR descrita por Ouyang *et al.* (2013) podem ser observados na Figura 16. O ensaio foi aceite tendo em conta a amplificação do PAC e ausência de amplificação do NAC. Não foi obtida amplificação em nenhuma das amostras em análise (7, 8 e 9), pelo que o resultado foi considerado negativo.

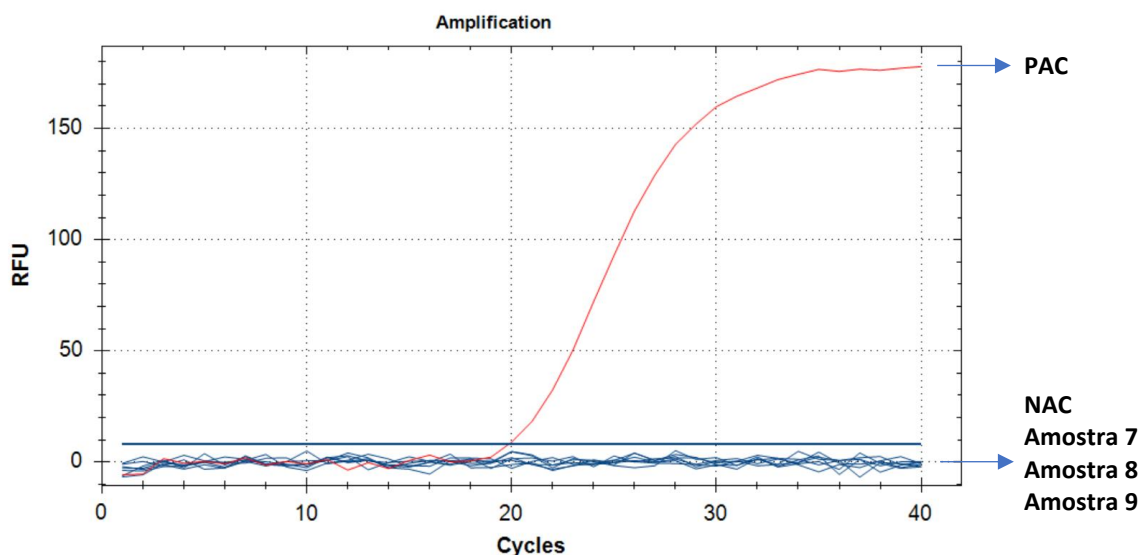


Figura 16 - Resultados obtidos para as amostras 7, 8 e 9 no protocolo de *real time polymerase chain reaction* descrito por Ouyang *et al.* (2013). PAC - Controlo positivo de amplificação; NAC - controlo negativo de amplificação.

2.3.4. Conclusão

Não foi detetada a presença de Xf nas amostras 7, 8 e 9, uma vez que todas obtiveram um resultado negativo em ambos os protocolos de deteção molecular realizados.

Capítulo 3

Avaliação da incidência das doenças associadas aos pomares de *Prunus* na região da Beira Interior

3.1. Contextualização

O trabalho realizado neste capítulo está inserido no projeto de investigação XylOut - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus*, financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), I.P. e focado na Beira Interior (BI), região nacional mais produtiva em cereja (*Prunus avium*) e pêsego (*Prunus persica*), dois recursos agroalimentares cruciais para a economia regional e nacional (XylOut, 2023). A ocorrência de doenças em *Prunus* spp. reflete-se em perdas crescentes no rendimento, sendo a recente implementação de sistemas intensivos de *Prunus dulcis* (amendoal) na região um fator relevante para a dinâmica do agroecossistema ao nível da sanidade vegetal (XylOut, 2023). Um dos desafios críticos para o diagnóstico é o desenvolvimento de estirpes adaptadas e/ou ocorrência de fenómenos de coevolução associados à expansão e ascensão de novas doenças, potenciado pela coexistência de organismos patogénicos nas mesmas plantas (XylOut, 2023).

Assim, o projeto XylOut tem como objetivo o estudo e compreensão do agroecossistema da BI, com foco na identificação e caracterização dos agentes causais de doenças; na determinação do impacto das doenças associadas aos pomares de *Prunus* na microbiota e na análise do potencial de expansão dos organismos patogénicos (XylOut, 2023). Neste contexto, a equipa do Laboratório de Fitossanidade (FITOLAB) caracterizou a diversidade estrutural da microbiota foliar e floral de plantas sintomáticas através de métodos independentes de cultivo baseados na sequenciação de longa cadeia *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) do gene que codifica a sub-unidade 16S do rRNA (bacterioma) e da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) (microbioma). Resultados preliminares permitiram identificar grupos taxonómicos com potencial impacto para o contexto fitossanitário, nomeadamente a deteção dos géneros *Erwinia* sp. e *Pseudomonas* sp. em *P. persica* (pessegueiro) (Garcia *et al.*, comunicação pessoal).

Neste enquadramento, pretendeu-se em particular com este trabalho proceder à deteção de *Erwinia amylovora* (Ea), organismo incluído na Lista de pragas regulamentadas não sujeitas a quarentena (RNQP) descritas no Anexo IV da Diretiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de maio de 2000, e *Xylella fastidiosa* (Xf), organismo

inserido na lista A2 da EPPO, incluída no Anexo IIB da Diretiva 2000/29/CE do Conselho de 8 de maio de 2000.

Erwinia amylovora é o agente causal da doença vulgarmente designada por Fogo Bacteriano, detetado pela primeira vez na Europa, em 1957, no sul de Inglaterra e desde então disseminado por todo o continente europeu. A doença provoca graves prejuízos económicos na produção mundial de pomóideas. Os prejuízos podem ser causados pela diminuição da rentabilidade do pomar e pela morte das plantas, bem como pela impossibilidade de efetuar exportações para países onde a doença está ausente. O Fogo Bacteriano é uma doença muito contagiosa e de rápida difusão. Na presença de condições climáticas favoráveis e de variedades muito sensíveis, a doença progride rapidamente, provocando quebra na produção e conseqüentemente uma diminuição da rentabilidade do pomar (EPPO, 2023b). O Fogo Bacteriano possui como hospedeiros espécies rosáceas (pereira, macieira, marmeleiro e nespereira) e diversas espécies ornamentais ou silvestres dos géneros *Crataegus*, *Cotoneaster*, *Pyracantha*, *Sorbus* e *Chaenomeles* (EPPO, 2023b). No contexto da BI, a produção de pomóideas tem crescido em termos de área nos últimos anos como alternativa às prunóideas, sendo que a presença da bactéria em hospedeiros resistentes constitui um elo importante na epidemiologia e biologia da doença.

Xylella fastidiosa, é uma bactéria nociva com ampla distribuição no continente americano e europeu, responsável por diversas doenças relevantes em inúmeras espécies de plantas de grande importância económica (EPPO, 2019). De acordo com a bibliografia mais recente, estão descritos mais de 600 hospedeiros confirmados (EFSA, 2023). O nome atribuído às doenças causadas por este organismo patogénico está relacionado com o hospedeiro infetado, e.g.: *Olive quick decline syndrome* em oliveiras, *Pierce's disease* em videiras, *Citrus variegated chlorosis* em citrinos, *Phony peach disease* em pessegueiros e a *Almond leaf scorch disease* em amendoeiras, entre outras (DGAV, 2021). A presença da bactéria foi confirmada pela primeira vez na Europa em 2013, no sul de Itália, na região da Apúlia e responsável pela devastação de uma grande área de olivais e pelo impacto em várias plantas ornamentais. Desde 2015, têm sido identificados vários focos na União Europeia: Córsega em julho de 2015, região de Provence-Alpes-Côte d'Azur no continente francês em outubro de 2015, Saxônia na Alemanha em junho de 2016, Ilhas Baleares em novembro de 2016, Valência em junho de 2017, região de Madrid em abril de 2018 e Monte Argentário, Toscana, Itália em dezembro de 2018. Em janeiro de 2019, foi assinalada pela primeira vez a presença de Xf no concelho de Vila Nova de Gaia. Em Portugal existem vários focos da doença ativos (DGAV, 2023), com especial preocupação em espécies hospedeiras com interesse económico como a videira, oliveira, amendoeira, pessegueiro, laranjeira, lavanda, entre outras (DGAV, 2021). Na região da Cova da Beira, foi detetado um foco em amendoeiras

colhidas em Alcaria no Fundão (Despacho nº 87/G/2022, 2022) reforçando a pertinência do diagnóstico no âmbito do projeto XylOut. Os ensaios realizados não se enquadram no âmbito da prestação de serviços e não cumprem com os requisitos de um ensaio acreditado.

A deteção molecular de Ea e Xf foi realizada através de várias *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) específicas para a identificação de cada organismo.

3.2. Metodologia

3.2.1. Amostras analisadas

Foram realizados dois protocolos distintos de RT-PCR para a deteção molecular de Ea e Xf, em 98 amostras de flores ou folhas de plantas de *P. avium* (cerejeira) e *P. persica* (pessegueiro) recolhidas pela equipa do FITOLAB no âmbito do projeto XylOut. A colheita e processamento das amostras, assim como a extração de *deoxyribonucleic acid* (DNA) total e respetiva avaliação da qualidade e quantidade do DNA total foram realizadas previamente pela equipa do FITOLAB. As amostras de DNA total foram preservadas a -20°C.

3.2.2. Deteção molecular de *Erwinia amylovora* e *Xylella fastidiosa*

A deteção molecular de Ea foi realizada por RT-PCR de acordo com Pirc *et al.* (2009), detalhado no Anexo 2, secção 2.4.. A deteção molecular de Xf foi realizada por RT-PCR segundo Harper *et al.* (2010; erratum 2013), e descrito no Anexo 2, secção 2.5. e 2.6.

Em cada ensaio foram preparadas duas reações RT-PCR por amostra em que numa foi adicionado DNA total e na outra a respetiva diluição de 1:50. Em paralelo, e para cada protocolo, foi preparado o controlo positivo de amplificação (PAC), que permite garantir a eficiência da reação e o controlo negativo de amplificação (NAC), que garante que não houve contaminação dos reagentes durante o procedimento. Cada PAC foi preparado com a adição de 2 µL de DNA total de estirpes de referências: CFBP1232 (CIRM-CFBP *French Collection for Plant Associated Bacteria*) para Ea e a ICMP 15199 (*Internacional Collection of Microorganisms*) de Xf subespécie *multiplex*. Para a preparação de cada NAC, em substituição do volume de DNA total da amostra, foi adicionado o mesmo volume de água miliQ estéril.

As misturas das reações foram preparadas numa câmara de UV-PCR (em condições estéreis) de forma independente, e foram seguidas as instruções de trabalho internas

de limpeza e desinfecção de materiais e equipamentos – IPN/FITOLAB/IT315.02, para evitar contaminações e não comprometer os restantes ensaios do laboratório.

Os ensaios de RT-PCR para a deteção molecular de Ea e Xf foram realizados no termociclador CFX Connect™ *Real-Time System* (Bio-Rad) seguindo as condições descritas na Tabela XII (anexo 2) e na tabela XIV (anexo 2), respetivamente. Terminadas as RT-PCR, os resultados foram visualizados e registados recorrendo ao software *Bio-Rad CFX Maestro*.

3.2.3. Verificação dos controlos dos métodos de deteção molecular e interpretação dos resultados

O resultado do ensaio foi aceite se pelo menos um PAC apresentasse uma curva de amplificação exponencial e não houvesse amplificação no(s) NAC(s). O resultado do ensaio não foi aceite se ocorresse amplificação em algum NAC.

O resultado do ensaio foi considerado positivo quando pelo menos uma das reações de RT-PCR por amostra (original e diluição) apresentasse uma curva de amplificação exponencial. O resultado do ensaio foi considerado negativo quando todas as reações de RT-PCR por amostra não apresentassem amplificação. O resultado do ensaio foi considerado inconclusivo quando existissem amplificação nos RT-PCR, mas o perfil da curva não fosse exponencial.

3.3. Resultados e discussão

Ensaio para a deteção de Ea e Xf foram realizados em 98 amostras de DNA total previamente extraído de folhas e flores de *P. avium* (cerejeira) e *P. persica* (pessegueiro) de pomares amostrados na Cova da Beira.

Os ensaios de deteção molecular de Ea por RT-PCR (Pirc *et al.*, 2009) realizados para as 98 amostras, foram considerados válidos, tendo em conta a amplificação do PAC CFBP1232 e a ausência de amplificação do NAC. O resultado da deteção molecular de Ea foi considerado negativo para todas as amostras analisadas, não tendo sido obtida qualquer curva de amplificação. Na Figura 17 apresenta-se um exemplo de resultados obtidos na análise de deteção molecular de Ea.

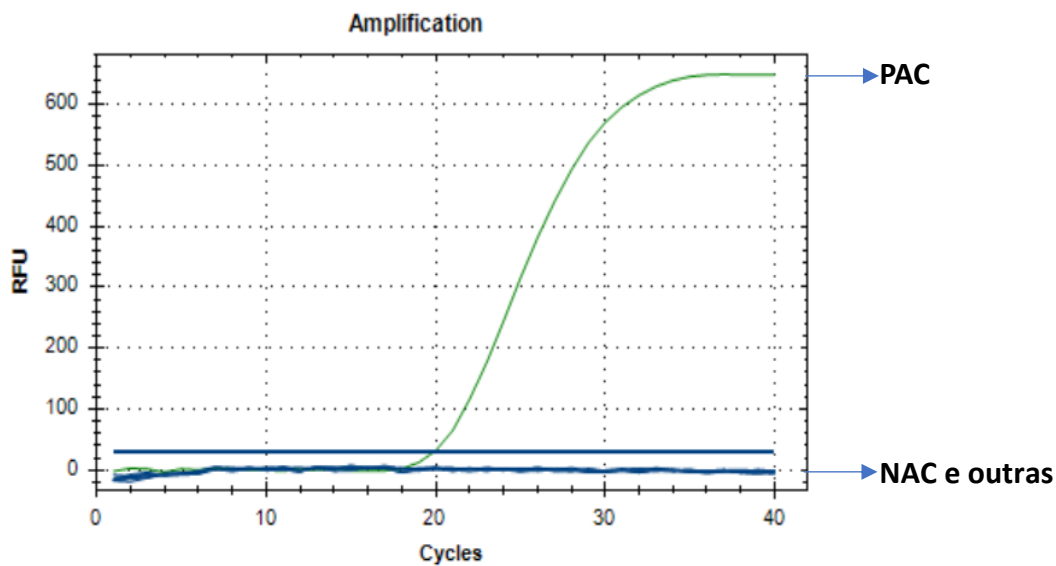


Figura 17 - Curvas de amplificação da *real time polymerase chain reaction* de acordo com Pirc *et al.* (2009) para a detecção molecular de *Erwinia amylovora*. A verde, o controlo positivo de amplificação (PAC CFBP1232); a azul, o controlo negativo de amplificação (NAC) e restantes amostras analisadas.

Erwinia amylovora tem vários hospedeiros que incluem árvores de fruto economicamente importantes, as pomóideas, como a macieira (*Malus domestica*) e a pereira (*Pyrus communis*). Em prunóideas (*Prunus*), a Ea tem como hospedeiros conhecidos quatro espécies: *P. armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. domestica* e *P. salicina* (EPPO, 2023b). Nenhum dos hospedeiros conhecidos corresponde às espécies de plantas das amostras analisadas neste trabalho. O que leva a supor que a espécie do género *Erwinia* identificada nos resultados preliminares de ONT (Garcia *et al.*, comunicação pessoal), pertence a outra espécie que não a Ea.

Os ensaios para a detecção molecular de Xf por RT-PCR descrita por Harper *et al.* (2010; erratum 2013) realizados para as 98 amostras, foram aceites, uma vez que ocorreu a amplificação do PAC ICMP15199 e não ocorreu amplificação no NAC. Na Figura 18, apresenta-se um exemplo de um dos gráficos obtidos nesta análise.

Das 98 amostras analisadas, apenas uma apresentou um resultado positivo no protocolo de RT-PCR Harper, tendo sido observada uma curva de amplificação exponencial consistente, quer no DNA total (Cq 29,08), quer na respetiva diluição de 1:50 (Cq 35,67) (Figura 18). A amostra com resultado positivo foi extraída das folhas de uma planta de *P. avium* (cerejeira), amostrada na Cova da Beira.

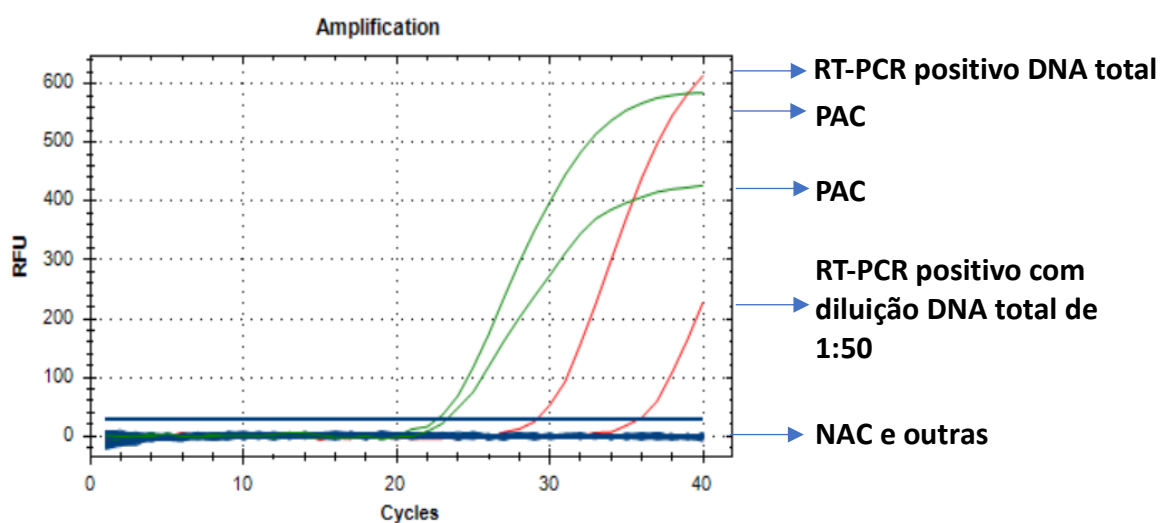


Figura 18 - Curvas de amplificação da *real time polymerase chain reaction* de acordo com Harper *et al.* (2010; erratum 2013). A verde, os controlos positivos de amplificação (PAC ICMP15199); a vermelho, a amostra positiva de *Prunus avium* (solução original e diluição de 1:50); a azul, o controlo negativo de amplificação (NAC) e restantes amostras analisadas.

Xylella fastidiosa é uma bactéria de quarentena e integra o Plano de Contingência definido pela Direção-Geral de Agricultura e Veterinária (DGAV), de acordo com as normas estabelecidas no Regulamento de Execução (EU) 2020/1201 da Comissão, de 14 de agosto de 2020, que estabelece as medidas para impedir a introdução e propagação na União Europeia de Xf (DGAV, 2022b). Assim sendo, a sua deteção deve ser confirmada e reportada às autoridades nacionais. Segundo a norma PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa* da EPP0 (2019), a deteção de Xf deve ser suportada por dois ou mais testes baseados em diferentes princípios biológicos, incluindo pelo menos um teste molecular *polymerase chain reaction* (PCR). Após o resultado positivo na RT-PCR descrita por Harper *et al.* (2010; erratum 2013), foi realizado pela equipa do FITOLAB um ensaio de confirmação com um protocolo de RT-PCR descrito por Ouyang *et al.* (2013), tal como descrito no capítulo 2. O ensaio RT-PCR Ouyang obteve um resultado positivo, sendo confirmada assim a deteção de Xf numa amostra de *P. avium* (cerejeira), num pomar de *Prunus sp.* na Cova da Beira.

Perante o cenário de uma deteção de Xf, foi imperativo avisar as autoridades competentes, no caso, a DGAV para que fossem tomadas as ações devidas. Desde 2014, que Portugal implementou um programa nacional de prospeção anual – determinante para o sucesso da erradicação, de Xf em todo o seu território, levado a cabo pela DGAV, na qualidade de Autoridade Fitossanitária Nacional e que integra o plano de contingência de Xf. O plano de contingência Xf e os seus vetores, escrito de acordo com

o Regulamento de Execução (EU) 2020/1201 da Comissão, atualmente em vigor, tem como objetivo estabelecer um conjunto de ações com vista a garantir uma resposta célere e eficaz em caso da deteção de Xf no território português (DGAV, 2021).

Uma vez confirmada a presença da Xf num determinado território, são tomadas medidas, evitando a sua dispersão e garantindo a erradicação, que se baseiam no estabelecimento de uma zona demarcada que engloba a zona infetada (faixa de 50 m de raio) onde as medidas aplicadas são: destruição de todas as plantas das espécies infetadas na zona demarcada, prospeção intensiva, aplicação de tratamentos contra vetores, proibição de plantação de espécies hospedeiras e proibição de movimento de qualquer planta, e a “zona tampão” (faixa de 2,5 km de raio) onde as medidas aplicadas são: levantamento de existência de viveiros e centros de jardinagem e notificação de imobilização, prospeção intensiva, aplicação anual de práticas agrícolas para o controlo da população de vetores e proibição de movimento de qualquer planta (DGAV, 2022b). A *P. avium* (cerejeira) é um hospedeiro conhecido da Xf, no entanto, em Portugal, ainda não tinha sido detetada nenhuma planta infetada dessa espécie.

Atualmente existem 18 zonas demarcadas de Xf em Portugal, sendo uma delas a zona demarcada de Castelo Novo, no concelho do Fundão (região centro). Essa zona demarcada engloba parcialmente quatro freguesias, Alpedrinha, Póvoa de Atalaia, Atalaia do Campo e Castelo Novo. A presença da bactéria Xf foi recentemente confirmada laboratorialmente numa amostra de *Vitis vinifera* (videira) (DESPACHO N.º 22/G/2023, 2023) colhida na freguesia de Castelo Novo.

A amostra onde foi detetada a Xf encontra-se na zona demarcada de Castelo Novo, no entanto, representa a presença de Xf em cerejeira (*P. avium*), pela primeira vez em Portugal.

Segundo a literatura, não há evidências de que a cerejeira seja um hospedeiro suscetível à infeção por Xf, mas, hospedeiros como o pessegueiro (*Phony peach disease*) (Johnson *et al.*, 2021) e a amendoeira (*Almond leaf sorch*) (Teviotdale & Connell, 2003) já são considerados altamente suscetíveis (EPPO, 2023c) e estão na lista de espécies que representam maior preocupação por parte da DGAV (DGAV, 2022b) dado o interesse económico.

Os principais países produtores desta cultura, por ordem decrescente são: Turquia, Rússia, Polónia, Ucrânia, Irão, EUA, Sérvia e Hungria (DRAPCentro, 2021). Na maioria dos países produtores de *P. avium* a produção é destinada prioritariamente ao consumo doméstico com algumas exceções, e.g., o Chile (exporta cerca de 80% da produção interna), sendo que as exportações têm valores residuais (DRAPCentro, 2021). O

comércio externo nacional da cereja é caracterizado por um volume de importações de cerca de 20% da produção nacional e por exportações com valores residuais (DRAPCentro, 2021).

A produção nacional anual de cereja ronda as 19000 toneladas, numa área de cerca de 6450ha, abrangendo cerca de 11100 explorações, sendo que a Cova da Beira é a zona mais importante na produção desta cultura, cujo valor estimado na economia regional, é refletido em cerca de 20 a 25 milhões de euros anuais (DRAPCentro, 2021).

Sendo a Cova da Beira uma região com um agroecossistema onde é comum a existência de pomares de *Prunus* sp. de carácter misto, i.e., produção de pêsegos, cerejeiras e mais recentemente a instalação de pomares de exploração intensiva de amendoeira (DRAPCentro, 2021), é possível que a presença desta bactéria traga desafios à produção de prunóideas nesta região. A severidade da doença e o padrão de evolução dos sintomas variam consoante a suscetibilidade da cultivar e das condições climáticas (CNCFS, 2017).

Numa perspetiva futura, uma melhor compreensão da incidência da Xf em *P. dulcis* (amendoeira), *P. avium* (cerejeira) e *P. persica* (pessegueiro), do desenvolvimento de doenças e da sua epidemiologia, bem como do possível impacto na microbiota e na modulação das restantes doenças já instaladas na região, é crucial para o controlo e prevenção, para inferir e antecipar riscos de doenças em cenários de alterações climáticas e para garantir a fitossanidade vegetal.

Capítulo 4

Avaliação do efeito da matriz na qualidade e quantidade de DNA total extraído – COX

4.1. Contextualização

No Laboratório de Fitossanidade (FITOLAB) realizam-se, em média, 5000 ensaios moleculares por ano para a detecção de *Xylella fastidiosa* (Xf) em material vegetal (procedimento descrito na seção 2.3.2.), número esse com tendência a aumentar. Estes ensaios pressupõem a extração de *deoxyribonucleic acid* (DNA) total a partir de material vegetal, processo frequentemente problemático uma vez que as plantas contêm níveis elevados de metabolitos secundários que interferem com algumas reações, nomeadamente a *polymerase chain reaction* (PCR) (Tahmasebi & Nasrollahi, 2023).

As normas para a detecção molecular de Xf (EPPO, 2019), preconizam a utilização de kits comerciais ou do método Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) para a extração de DNA total. Este último, descrito no capítulo II, seção 2.3.2, é o método mais usado no FITOLAB tendo em conta o seu baixo custo e flexibilidade de adaptação a diferentes matrizes, em comparação com os kits comerciais. No entanto, a espécie vegetal, ou seja, a matriz vegetal analisada, deve ser considerada uma vez que pode influenciar o rendimento e qualidade do DNA total extraído devendo ser definido qual o método de extração mais adequado.

Com o objetivo de avaliar o rendimento e qualidade do DNA total extraído e a ausência de inibidores, o FITOLAB implementou a metodologia descrita inicialmente por Weller *et al.* (2000) (capítulo II, seção 2.3.2.), doravante denominada por COX, e prevista no documento normativo (ISPM 27. Annex 25. *Xylella fastidiosa* (2018). Rome, IPPC, FAO). Este ensaio baseia-se na amplificação em tempo real do gene que codifica a citocromo oxidase, expresso constitutivamente e presente nos cloroplastos, sendo ubíquo em plantas. A amplificação deste gene no âmbito do ensaio COX permite confirmar se foi bem-sucedida a extração de DNA total, avaliar a ausência de inibidores que colocariam em causa a relevância do resultado e aferir se a quantidade de DNA total é suficiente para a utilização nos protocolos moleculares subsequentes, limitando a possibilidade de falsos negativos.

Analisando o histórico dos resultados obtidos com esta metodologia no FITOLAB, tornou-se evidente que muitas amostras apresentam um resultado negativo no COX,

evidenciando problemas no processo da extração de DNA total, obrigando à realização de novas reações COX com utilização de diluições do DNA, à realização de novas extrações de DNA total (muitas delas por kit comercial), com a consequente alocação de recursos e aumento do tempo de emissão do relatório de ensaio.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar, através de uma análise sistematizada dos registos de ensaios para a deteção molecular de Xf, com foco na verificação da qualidade da extração do DNA total (Weller *et al.*, 2000), se a matriz vegetal (espécie vegetal analisada) teria influência na qualidade do DNA total obtido por extração pelo método de CTAB; e a verificar-se um padrão, identificar esses géneros de forma a implementar procedimentos que permitam otimizar o ensaio.

4.2. Metodologia

Foram realizados no FITOLAB, 7766 ensaios para a deteção molecular de Xf de acordo o procedimento de ensaio IPN/FITOLAB/I340.01 (PE), entre maio de 2021 e dezembro de 2022. As fichas de registo correspondentes foram analisadas para os resultados obtidos pelo método COX, tendo sido recolhidas informações sobre a matriz vegetal das amostras, os resultados considerados no passo de verificação da qualidade da extração do DNA total (COX) e quais os procedimentos a seguir previstos no PE em caso de resultado negativo no COX (Figura 19).

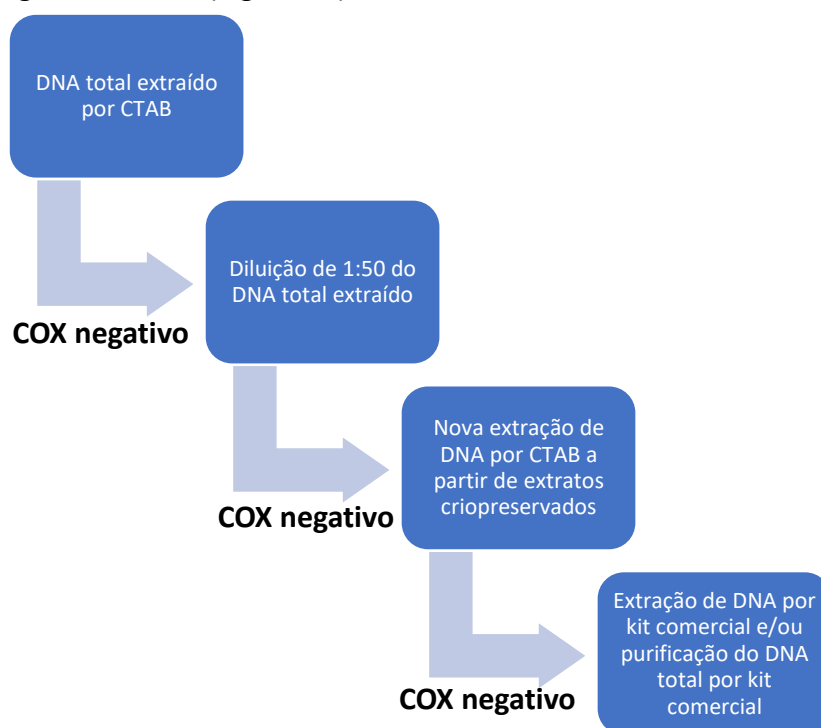


Figura 19 - Procedimentos previstos no procedimento de ensaio IPN/FITOLAB/I340.01 em caso de resultado negativo no passo de verificação da qualidade do DNA total (COX) segundo Weller *et al.* (2000).

Neste contexto, foram compilados todos os géneros com resultados positivos no COX e todos os géneros com pelo menos um resultado negativo no COX. Posteriormente, e de forma a determinar a frequência de resultados negativos no COX por género, foram calculadas as percentagens de amostras com resultados negativos no COX por género pelo número total de amostras de cada género. Essa percentagem foi obtida da seguinte forma:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de amostras com resultados negativos no COX por género}}{N^{\circ} \text{ total de amostras por género}}$$

Nas análises subsequentes foram apenas considerados os géneros em que a percentagem de amostras com resultados negativos no COX em relação ao número total de amostras por género foi superior a 30%, tendo sido considerado este limiar para a realização de medidas corretivas.

De acordo com o PE, após um resultado negativo no COX, o ensaio é repetido com uma diluição de 1:50 do DNA total da amostra, e, a verificar-se um resultado positivo, prossegue-se para o ensaio de deteção molecular. Assim, foi calculada, para cada género previamente selecionado, a percentagem de amostras com resultados positivos no COX após utilização da diluição de 1:50 do DNA total recorrendo à seguinte equação:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de amostras com resultados positivos COX após diluição de 1: 50 do DNA total}}{N^{\circ} \text{ de amostras com resultados negativos no COX com DNA da solução original}}$$

Os géneros em que a diluição de 1:50 do DNA total permitiu obter 100% de resultados positivos no COX foram identificados e removidos das análises subsequentes uma vez que a medida mitigadora foi identificada.

Ainda de acordo com o PE, amostras que continuem a apresentar um resultado negativo no COX após utilização da diluição de 1:50 do DNA total, pressupõe a realização de uma nova extração do DNA total por CTAB a partir do extrato vegetal criopreservado, sendo a qualidade da extração novamente verificada pelo COX (Figura 19). Neste contexto, foi calculada, a percentagem de amostras com resultado positivo no COX após a 2ª extração por CTAB, recorrendo à seguinte equação:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de amostras com resultados positivos COX após 2}^{\text{a}} \text{ extração de DNA total por CTAB}}{N^{\circ} \text{ de amostras com resultados negativos COX após diluição de 1: 50 do DNA total}}$$

Os géneros em que a segunda extração por CTAB permitiu obter 100% de resultados positivos no COX foram identificados. Por fim, o PE prevê que nas amostras em que o resultado do COX se mantenha negativo, mesmo após a segunda extração de DNA total por CTAB, o responsável técnico (RT) deve decidir se se realiza uma nova extração de DNA total por kit comercial ou um passo adicional de purificação do DNA total através de um kit comercial. Este passo não foi considerado nesta análise.

4.3. Resultados e Discussão

As 7766 amostras analisadas para a deteção de Xf no FITOLAB entre maio de 2021 e dezembro de 2022, encontram-se divididas por 258 géneros vegetais. Destas, em 86% das amostras (6705 amostras), o passo de extração de DNA total foi bem-sucedido, tendo sido considerada positiva a verificação da qualidade da extração de DNA total por COX, i.e., cumpria com os requisitos para prosseguir com o ensaio de deteção molecular de Xf. Estas amostras encontram-se divididas por 157 géneros, correspondendo a 61% do total de géneros analisados, nomeadamente: *Abelia*, *Abutilon*, *Acanthus*, *Achillea*, *Actinidia*, *Adenocarpus*, *Aesculus*, *Agapanthus*, *Ageratina*, *Albizia*, *Aloysia*, *Alstroemeria*, *Ammi*, *Amorpha*, *Anthyllis*, *Antirrhinum*, *Araujia*, *Arbutus*, *Argyranthemum*, *Asparagus*, *Aster*, *Atriplex*, *Aucuba*, *Bergenia*, *Betula*, *Bidens*, *Bougainvillea*, *Buxus*, *Callicarpa*, *Calystegia*, *Camellia*, *Canna*, *Carduus*, *Catharanthus*, *Cercis*, *Chamaecyparis*, *Cirsium*, *Clivia*, *Coleus*, *Colutea*, *Coprosma*, *Coreopsis*, *Cornus*, *Coronilla*, *Cortaderia*, *Corylus*, *Crataegus*, *Crocasmia*, *Cuphea*, *Cupressus*, *Cymbopogon*, *Datura*, *Davallia*, *Digitaria*, *Dimorphoteca*, *Diosma*, *Diospyros*, *Dodonaea*, *Dracaena*, *Eriobotrya*, *Eugenia*, *Euphorbia*, *Fagus*, *Fatsia*, *Ficus*, *Fragaria*, *Fuchsia*, *Fumaria*, *Gardenia*, *Ginkgo*, *Helleborus*, *Hemerocallis*, *Hydrangea*, *Hypericum*, *Hypochaeris*, *Ipomoea*, *Iris*, *Iva*, *Jacaranda*, *Jasminum*, *Juglans*, *Lamium*, *Lantana*, *Laphangium*, *Lapsana*, *Leucadendron*, *Leucospermum*, *Liriodendron*, *Lotus*, *Lycianthes*, *Malus*, *Medicago*, *Melianthus*, *Melilotus*, *Melissa*, *Mirabilis*, *Myoporum*, *Nandina*, *Parthenocissus*, *Passiflora*, *Persea*, *Phagnalon*, *Phillyrea*, *Photinia*, *Phyllostachys*, *Physalis*, *Pistacia*, *Plectranthus*, *Polygala*, *Polygonum*, *Polypodium*, *Populus*, *Portulaca*, *Potentilla*, *Protea*, *Psidium*, *Psoralea*, *Pterospartum*, *Punica*, *Pyracantha*, *Raphanus*, *Raphiolepis*, *Reichardia*, *Retama*, *Rhamnus*, *Rhododendron*, *Robinia*, *Ruta*, *Sambucus*, *Sassafras*, *Satureja*, *Schefflera*, *Schinus*, *Sechium*, *Setaria*, *Silene*, *Sinapis*, *Spartium*, *Suaeda*, *Tamarix*, *Tanacetum*, *Taxus*, *Thuja*, *Thymus*, *Tilia*, *Tradescantia*, *Trifolium*, *Tropaeolum*, *Tulbaghia*, *Vaccinium*, *Verbascum*, *Verbena*, *Viburnum*, *Vinca*, *Westringia*, *Wisteria*, e *Yucca*.

No entanto, 14% das amostras (1061 amostras) apresentaram pelo menos um resultado negativo no COX, obrigando à implementação de medidas mitigadoras previstas no PE e resumidas na Figura 19. Estas amostras encontram-se divididas por 101 géneros (39%

dos géneros totais analisados), e a respetiva percentagem de resultados negativos no COX pelo número total de amostras analisadas encontram-se compiladas na Tabela 1.

Tabela 1 - Número total de amostras analisadas por COX organizadas por género, número de amostras com resultados negativos COX e correspondente percentagem. A cinzento estão assinalados os géneros cuja percentagem de amostras com resultados negativos no COX em relação ao número total de amostras analisadas por género se encontra abaixo de 30%.

Género	# total de amostras	# amostras com resultado negativo no COX	% de amostras com resultado negativo no COX
<i>Acacia</i>	472	11	2%
<i>Acer</i>	137	20	15%
<i>Alnus</i>	4	1	25%
<i>Amaranthus</i>	13	3	23%
<i>Aralia</i>	1	1	100%
<i>Artemisia</i>	2	2	100%
<i>Arum</i>	5	1	20%
<i>Athyrium</i>	6	2	33%
<i>Berberis</i>	12	1	8%
<i>Brassica</i>	12	1	8%
<i>Callistemon</i>	45	8	18%
<i>Calluna</i>	25	4	16%
<i>Castanea</i>	4	3	75%
<i>Celtis</i>	7	2	29%
<i>Chelidonium</i>	2	1	50%
<i>Chenopodium</i>	13	3	23%
<i>Cistus</i>	94	16	17%
<i>Citrus</i>	201	1	0%
<i>Clematis</i>	1	1	100%
<i>Convolvulus</i>	7	2	29%
<i>Conyza</i>	32	4	13%
<i>Crepis</i>	1	1	100%
<i>Cyperus</i>	6	1	17%
<i>Cytisus</i>	17	4	24%
<i>Dactylis</i>	1	1	100%
<i>Dimorphotheca</i>	6	1	17%
<i>Dittrichia</i>	56	2	4%
<i>Elaeagnus</i>	4	1	25%
<i>Echium</i>	2	2	100%
<i>Erica</i>	36	1	3%
<i>Erigeron</i>	15	2	13%
<i>Erodium</i>	6	1	17%
<i>Eschscholzia</i>	1	1	100%
<i>Eucalyptus</i>	11	5	45%

Tabela 1 (Continuação) - Número total de amostras analisadas por COX organizadas por género, número de amostras com resultados negativos COX e correspondente percentagem. A cinzento estão assinalados os géneros cuja percentagem de amostras com resultados negativos no COX em relação ao número total de amostras analisadas por género se encontra abaixo de 30%.

Género	# total de amostras	# amostras com resultado negativo no COX	% de amostras com resultado negativo no COX
<i>Euonymus</i>	36	1	3%
<i>Eupatorium</i>	1	1	100%
<i>Euryops</i>	39	21	54%
<i>Foeniculum</i>	4	1	25%
<i>Frangula</i>	49	1	2%
<i>Fraxinus</i>	60	7	12%
<i>Galinsoga</i>	2	2	100%
<i>Gazania</i>	10	4	40%
<i>Genista</i>	49	1	2%
<i>Grevillea</i>	5	1	20%
<i>Hebe</i>	136	6	4%
<i>Hedera</i>	38	9	24%
<i>Helianthus</i>	4	1	25%
<i>Helichrysum</i>	4	1	25%
<i>Hibiscus</i>	69	21	30%
<i>Ilex</i>	53	33	62%
<i>Juniperus</i>	3	1	33%
<i>Lactuca</i>	3	1	33%
<i>Lagerstroemia</i>	57	4	7%
<i>Laurus</i>	100	3	3%
<i>Lavandula</i>	147	48	33%
<i>Ligustrum</i>	48	1	2%
<i>Liquidambar</i>	108	2	2%
<i>Lonicera</i>	23	6	26%
<i>Magnolia</i>	81	2	2%
<i>Malva</i>	9	4	44%
<i>Mentha</i>	12	2	17%
<i>Metrosideros</i>	191	13	7%
<i>Morus</i>	5	1	20%
<i>Myrtus</i>	40	1	3%
<i>Nephrolepis</i>	1	1	100%
<i>Nerium</i>	344	39	11%
<i>Olea</i>	1083	2	0%
<i>Otospermum</i>	10	4	40%
<i>Parietaria</i>	9	5	56%
<i>Paspalum</i>	5	1	20%
<i>Pelargonium</i>	116	11	9%
<i>Persicaria</i>	98	1	1%

Tabela 1 (Continuação) - Número total de amostras analisadas por COX organizadas por género, número de amostras com resultados negativos COX e correspondente percentagem. A cinzento estão assinalados os géneros cuja percentagem de amostras com resultados negativos no COX em relação ao número total de amostras analisadas por género se encontra abaixo de 30%.

Género	# total de amostras	# amostras com resultado negativo no COX	% de amostras com resultado negativo no COX
<i>Phoenix</i>	2	2	100%
<i>Phlomis</i>	2	1	50%
<i>Phytolacca</i>	5	2	40%
<i>Pittosporum</i>	8	3	38%
<i>Plantago</i>	26	1	4%
<i>Platanus</i>	25	4	16%
<i>Prunus</i>	624	17	3%
<i>Pteridium</i>	106	56	53%
<i>Pyrus</i>	31	3	10%
<i>Quercus</i>	1360	423	31%
<i>Rosa</i>	65	6	9%
<i>Rosmarinus</i>	421	2	0%
<i>Rubus</i>	206	65	32%
<i>Rumex</i>	11	1	9%
<i>Salix</i>	20	1	5%
<i>Salvia</i>	148	38	26%
<i>Santolina</i>	54	32	59%
<i>Senecio</i>	1	1	100%
<i>Solanum</i>	13	2	15%
<i>Sonchus</i>	6	5	83%
<i>Spiraea</i>	9	1	11%
<i>Strelitzia</i>	30	4	13%
<i>Taraxacum</i>	2	1	50%
<i>Teucrium</i>	10	1	10%
<i>Ulex</i>	200	4	2%
<i>Ulmus</i>	15	5	33%
<i>Urtica</i>	2	1	50%
<i>Vitis</i>	49	3	6%
<i>Zantedeschia</i>	6	1	17%

Analisando os resultados obtidos, os 64 géneros assinalados a cinzento na Tabela 1 correspondem a um total de 5609 amostras (72% das amostras analisadas) e apresentam uma percentagem inferior a 30% de amostras com resultados negativos no COX tendo sido, por isso, excluídos das análises subsequentes. Este valor foi considerado pela equipa do FITOLAB como aceitável, não requerendo a adoção de medidas mitigadoras à partida.

Neste contexto, foram selecionados 37 géneros (14% em relação ao total de géneros analisados), correspondendo a 2157 amostras (28% em relação ao número total de amostras) para as análises seguintes: *Aralia*, *Artemisia*, *Athyrium*, *Castanea*, *Chelidonium*, *Clematis*, *Crepis*, *Dactylis*, *Echium*, *Eschscholzia*, *Eucalyptus*, *Eupatorium*, *Euryops*, *Galinsoga*, *Gazania*, *Hibiscus*, *Ilex*, *Juniperus*, *Lactuca*, *Lavandula*, *Malva*, *Nephrolepis*, *Otospermum*, *Parietaria*, *Phoenix*, *Phlomis*, *Phytolacca*, *Pittosporum*, *Pteridium*, *Quercus*, *Rubus*, *Santolina*, *Senecio*, *Sonchus*, *Taraxacum*, *Ulmus*, e *Urtica*. Nestes géneros, 90% (688 amostras) das amostras com um resultado negativo no primeiro COX (763 amostras), obtiveram um resultado positivo no COX após a utilização de uma diluição de 1:50 do DNA total, tendo por isso sido possível prosseguir com o ensaio de deteção molecular de Xf (Tabela 2).

Os géneros assinalados a cinzento na Tabela 2 apresentam uma percentagem de 100% de amostras com resultado positivo COX após a diluição de 1:50, correspondendo a um total de 101 amostras (15% das amostras). Contudo, 75 amostras (10% das amostras) mantiveram pelo menos um resultado negativo no COX após a diluição de 1:50 e correspondem aos géneros *Aralia*, *Athyrium*, *Castanea*, *Clematis*, *Eupatorium*, *Euryops*, *Galinsoga*, *Ilex*, *Lavandula*, *Nephrolepis*, *Parietaria*, *Pteridium*, *Quercus* e *Rubus*. Por outro lado, nos géneros *Aralia*, *Clematis*, *Eupatorium*, *Nephrolepis* todas as amostras permanecem com resultados negativos no COX após diluição de 1:50. O género *Pteridium* também se destaca uma vez que a percentagem de amostras com COX positivo após a diluição do DNA se mantém muito baixa (20%).

Tabela 2 - Número de amostra por género com resultado negativo no COX, amostras com resultados positivos no COX após diluição de 1:50 e respetiva percentagem. A cinzento estão os géneros com percentagem de sucesso após a diluição de 1:50 de 100%.

Género	# amostras com resultado negativo no COX	# amostras com resultado positivo no COX após diluição de 1:50	% de amostras com resultado positivo no COX após diluição de 1:50
<i>Aralia</i>	1	0	0%
<i>Artemisia</i>	2	2	100%
<i>Athyrium</i>	2	1	50%
<i>Castanea</i>	3	2	67%
<i>Chelidonium</i>	1	1	100%
<i>Clematis</i>	1	0	0%
<i>Crepis</i>	1	1	100%
<i>Dactylis</i>	1	1	100%
<i>Echium</i>	2	2	100%
<i>Eschscholzia</i>	1	1	100%
<i>Eucalyptus</i>	5	5	100%
<i>Eupatorium</i>	1	0	0%
<i>Euryops</i>	21	16	76%
<i>Galinsoga</i>	2	1	50%
<i>Gazania</i>	4	4	100%
<i>Hibiscus</i>	21	21	100%
<i>Ilex</i>	33	28	85%
<i>Juniperus</i>	1	1	100%
<i>Lactuca</i>	1	1	100%
<i>Lavandula</i>	48	47	98%
<i>Malva</i>	4	4	100%
<i>Nephrolepis</i>	1	0	0%
<i>Otospermum</i>	4	4	100%
<i>Parietaria</i>	5	4	80%
<i>Phoenix</i>	2	2	100%
<i>Phlomis</i>	1	1	100%
<i>Phytolacca</i>	2	2	100%
<i>Pittosporum</i>	3	3	100%
<i>Pteridium</i>	56	11	20%
<i>Quercus</i>	423	414	98%
<i>Rubus</i>	65	63	97%
<i>Santolina</i>	32	32	100%
<i>Senecio</i>	1	1	100%
<i>Sonchus</i>	5	5	100%
<i>Taraxacum</i>	1	1	100%
<i>Ulmus</i>	5	5	100%
<i>Urtica</i>	1	1	100%

De seguida, procedeu-se à compilação dos géneros em que as amostras apresentaram resultado positivo no COX após a 2ª extração de DNA total por CTAB (Tabela 3) com o objetivo de avaliar o sucesso deste procedimento.

Tabela 3 - Número de amostras por género com resultado negativo no COX após utilização da diluição de 1:50 do DNA total, amostras com resultados positivos no COX após 2ª extração de DNA total por CTAB e respetiva percentagem. A cinzento estão assinalados os géneros com valores de 100% de resultado positivo para o COX após a 2ª extração de DNA total por CTAB.

Género	# amostras com resultado negativo após diluição de 1:50	# amostras com resultado positivo no COX após 2ª extração de DNA total por CTAB	% amostras com resultado positivo no COX após 2ª extração de DNA total por CTAB
<i>Aralia</i>	1	1	100%
<i>Athyrium</i>	1	0	0%
<i>Castanea</i>	1	1	100%
<i>Clematis</i>	1	1	100%
<i>Eupatorium</i>	1	1	100%
<i>Euryops</i>	5	5	100%
<i>Galinsoga</i>	1	1	100%
<i>Ilex</i>	5	5	100%
<i>Lavandula</i>	1	0	0%
<i>Nephrolepis</i>	1	1	100%
<i>Parietaria</i>	1	1	100%
<i>Pteridium</i>	45	21	47%
<i>Quercus</i>	9	4	44%
<i>Rubus</i>	2	1	50%

Após a 2ª extração de DNA total por CTAB, 57% das amostras selecionadas (43 amostras) apresentaram resultado positivo no COX e foi possível prosseguir com o ensaio de deteção molecular de Xf. No entanto, 43% das amostras (32 amostras) mantiveram um resultado negativo no COX após a 2ª extração de DNA total por CTAB. Os géneros *Aralia*, *Castanea*, *Clematis*, *Eupatorium*, *Euryops*, *Galinsoga*, *Ilex*, *Nephrolepis* e *Parietaria*, apresentam uma percentagem de 100% de amostras com resultado positivo no COX com a 2ª extração de DNA total por CTAB.

Para os géneros *Athyrium* e *Lavandula*, este procedimento não permitiu obter resultados positivos no COX. É de ressaltar que apenas foi analisada uma amostra por género, pelo que os resultados obtidos não permitem fazer extrapolações. Os géneros *Pteridium*, *Quercus* e *Rubus*, apesar de terem uma percentagem de sucesso semelhante, têm um impacto distinto no volume de amostras analisado. No género *Rubus* apenas uma amostra apresentou resultado negativo no COX após 2ª extração de DNA total por CTAB, num total de 206 amostras. No género *Quercus* apenas quatro amostras apresentaram

um resultado negativo no COX após 2ª extração de DNA total por CTAB, num total de 1360 amostras. O género *Pteridium* foi aquele em esta abordagem teve menor sucesso uma vez que 21 das 106 amostras (20% das amostras totais) mantiveram o resultado negativo nos vários COX realizados.

Em paralelo, pretendeu-se determinar qual o aumento do custo do ensaio nos diversos cenários em que foi necessário repetir o RT-PCR COX tendo por base o valor fornecido pelo FITOLAB de 3,29€/COX. Este custo contabiliza os reagentes e o custo/tempo alocado de recursos humanos ao ensaio. Neste contexto, para uma amostra com resultado negativo no primeiro COX e positivo após a utilização de uma diluição de 1:50 do DNA total, o valor duplica e é de 6,52€. Noutro caso, para uma amostra cujo resultado COX seja sempre negativo, e em que se repetiu o COX com a diluição de 1:50 do DNA total e se procedeu a segunda extração de DNA total por CTAB, o custo triplica 9,87€, ao qual se deve ainda somar o custo da segunda extração. Esse acréscimo de despesa multiplicado por centenas de amostras, traduz-se em gastos consideráveis.

Pelo que através da análise sistematizada dos resultados previamente descritos pretendeu-se determinar de que forma o processo de extração de DNA total pode ser mais eficiente considerando à partida os 37 géneros selecionados à priori (identificados na Tabela 2) a analisar. Os géneros *Aralia*, *Artemisia*, *Athyrium*, *Castanea*, *Chelidonium*, *Clematis*, *Crepis*, *Dactylis*, *Echium*, *Eschscholzia*, *Eucalyptus*, *Eupatorium*, *Galinsoga*, *Gazania*, *Juniperus*, *Lactuca*, *Malva*, *Nephrolepis*, *Otospermum*, *Parietaria*, *Phoenix*, *Phlomis*, *Phytolacca*, *Pittosporum*, *Senecio*, *Sonchus*, *Taraxacum*, *Ulmus* e *Urtica*, apesar de constarem da seleção de géneros com percentagem elevada de resultados COX negativos, em termos de número de amostras analisadas o seu impacto é bastante diminuto (menos de 15 amostras), não suportando alteração aos métodos utilizados para a deteção molecular de Xf. Contudo, se o volume de amostras destes géneros aumentar, o laboratório deverá estar atento ao padrão de resultados obtidos na extração de DNA total e ponderar adotar medidas mitigadoras.

Os géneros *Lavandula*, *Hibiscus*, *Santolina* e *Rubus*, apresentaram percentagens de resultados negativos no COX entre os 30% e os 59% (Tabela 1), que obtiveram uma percentagem de sucesso acima dos 97% após a utilização da diluição de 1:50 do DNA total (Tabela 2).

Os géneros *Euryops* e *Ilex* apresentaram uma percentagem de resultados negativos no COX de 54% e 62%, respetivamente (Tabela 1). Os resultados obtidos no COX para estes géneros foram semelhantes após a utilização de uma diluição de 1:50 do DNA total resolvendo 76% e 85% dos resultados negativos, respetivamente (Tabela 2). As restantes amostras (5 amostras de cada género) necessitaram de ser submetidas a uma nova extração, que resultou numa percentagem de resolução de 100% (Tabela 3). O

número de amostras analisadas de *Euryops* (39 amostras) e *Ilex* (53 amostras) corresponde a um número reduzido quando comparado com o número total de amostras (7766 amostras). No entanto, as percentagens de resultados negativos no COX são preocupantes, i.e acima dos 50%, o que os torna géneros passíveis de dificultarem a rotina do laboratório no caso da sua frequência aumentar. No seguimento destes resultados, propõem-se ao FITOLAB que o procedimento de verificação da qualidade da extração de DNA total COX seja realizado com a diluição de 1:50 do DNA total.

O género *Quercus*, é um género frequentemente analisado no laboratório. Os resultados negativos no COX desse género correspondem a 40% do total de resultados negativos obtidos pelo FITOLAB, o que o torna em termos de custos, um género muito dispendioso. Os resultados negativos no COX foram resolvidos em 98% das amostras com a utilização da diluição de 1:50 do DNA total (Tabela 2). Contudo, dos 2% que restam, apenas 44% das amostras obtiveram um resultado positivo no COX com a 2ª extração de DNA pelo método de CTAB (Tabela 3). Dado que estes 2% correspondem a um total de 9 amostras e que foram analisadas um total de 1360 amostras de *Quercus*, esta questão pode ser considerada pouco relevante.

No período analisado, foram despendidos 5895,68€ no COX relativo a amostras do género *Quercus*. Com base na análise efetuada, propõem-se ao FITOLAB que o procedimento de verificação da qualidade da extração de DNA total COX seja realizado com a amostra de DNA diluída (1:50 do DNA total). Com esta proposta de alteração o custo das análises seria reduzido para 4504,01€, refletindo uma poupança de 1391,67€ (valor mínimo, os gastos da 2ª extração de DNA total por CTAB e de outros procedimentos não estão incluídos).

O género *Pteridium*, apesar de não ser tão frequentemente analisado no FITOLAB como o género *Quercus*, tem um elevado número de amostras das quais foi difícil a extração de DNA total. Esta dificuldade chegou a tornar-se limitante, e impediu a realização do ensaio de deteção de Xf em 20% das amostras por não ter sido possível extrair DNA em quantidade e qualidade. Uma informação cedida pela equipa do FITOLAB, e que importa evidenciar, é o facto de que grande parte das amostras de *Pteridium* que chegaram ao laboratório apresentavam uma matriz vegetal parcialmente seca e cumpriam no limite com os critérios de conformidade do material vegetal. Face aos resultados analisados, propõem-se a utilização do DNA total diluído (1:50), no entanto, a melhor abordagem seria a adoção de um novo método de extração para as amostras do género *Pteridium*, nomeadamente por kit comercial especializado neste tipo de matrizes.

Em resumo, através desta análise, sugere-se ao FITOLAB que realize a verificação da qualidade da extração do DNA total utilizando uma diluição de 1:50 para os géneros

Hibiscus, Santolina, Euryops, Ilex, Lavandula, Quercus e Rubus. Para o género *Pteridium*, é sugerida a alteração do método de extração de DNA total.

É importante compreender que estes resultados e análises são referentes a amostras do período de maio de 2021 até dezembro de 2022, isto é, não há garantia que os futuros resultados sigam os mesmos padrões pois a composição do tecido vegetal das amostras varia consoante as características do hospedeiro (idade, espécie, estado de integridade do material vegetal, etc.), i.e., não há matrizes constantes.

Iniciar a verificação da qualidade da extração com a amostra diluída tem prós e contras. Pelo lado positivo, torna-se o procedimento mais eficiente, poupando uma quantidade significativa de dinheiro e tempo. Pelo lado negativo, não é garantido que os resultados do COX que foram positivos na solução original, mas que apresentavam pouca quantidade de DNA, continuem positivos na amostra diluída, tornando-se num fator limitante. Apesar disso, a experiência do laboratório diz que na maior parte das vezes os resultados positivos no COX da solução original, se vão manter positivos na sua diluição de 1:50, sendo por isso, a maneira mais viável de tornar o ensaio de deteção molecular de Xf em alguns géneros mais eficiente e menos moroso.

A matriz vegetal tem influência na obtenção de DNA de qualidade pois muitas espécies vegetais têm na sua composição um alto conteúdo de polissacarídeos, lípidos e compostos que, tornam a extração mais desafiadora pois obtêm DNA fraco em qualidade e quantidade (Tamari & Hinkley, 2016). Para além dos constituintes físicos das amostras, há outros fatores críticos que têm influência nos resultados da verificação da qualidade da extração, e.g., idade do tecido (quanto mais jovem menor a quantidade de metabolitos secundários); a presença/ausência de sintomas; a integridade da amostra; a humidade; o processamento do material vegetal; e outros.

O método de CTAB é o método mais utilizado para extração de DNA de tecidos vegetais devido à sua capacidade de romper as membranas, separar os contaminantes na fase orgânica e os ácidos nucleicos na fase aquosa (Tahmasebi & Nasrollahi, 2023b) e desde o seu aparecimento em 1980, permitiu o avanço da ciência na biologia molecular (Murray & Thompson, 1980). No entanto, esse método apresenta algumas limitações, como o uso de reagentes tóxicos e a extensão do protocolo (Dairawan & Shetty, 2020). No caso do FITOLAB, o protocolo da extração por CTAB adotado tem uma duração mínima de execução de 48h.

Existem centenas de estudos de otimizações do método CTAB para determinados géneros mais problemáticos. A obtenção de DNA total em quantidade e qualidade é um passo fundamental para o diagnóstico de doenças bacterianas e não existe um

procedimento que se possa aplicar a todos os contextos da extração de DNA (Dairawan & Shetty, 2020). Por conseguinte, há uma necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de processos da extração de DNA mais eficientes e de perceber internamente de que maneira é possível otimizar o método de CTAB para atingir os objetivos do FITOLAB ou então, adotar novos métodos da extração de DNA – nomeadamente com recurso a equipamentos automatizados (robot da extração) que dispõe de kits da extração comerciais específicos.

Capítulo 5

Considerações finais

O diagnóstico de doenças bacterianas reguladas de plantas, baseado em normas bem definidas, validadas e verificadas, é um passo primordial para garantir a segurança alimentar e a produção agrícola sustentável.

Os ensaios de deteção dos organismos regulados *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), *Erwinia amylovora* (Ea) e *Xylella fastidiosa* (Xf) realizados foram efetuados com sucesso no âmbito de controlos oficiais tendo sido obtidos resultados positivos que confirmaram a presença de alguns destes organismos patogénicos (Ea e Psa) nas amostras vegetais testadas. No diagnóstico rápido efetuado no âmbito do projeto XylOut foi detetada, pela primeira vez em Portugal, a presença de Xf em *Prunus avium* (cerejeira), espécie com um elevado interesse económico para a Região da Beira Interior, cuja presença em pomares mistos de *Prunus* spp. com espécies consideradas altamente suscetíveis à presença da bactéria, e.g. *P. persica* (pessegueiro) e *P. dulcis* (amendoeira), representa uma série ameaça à produtividade da região. Numa perspetiva futura, é essencial uma melhor compreensão da incidência desta bactéria de quarentena em *Prunus* spp. para serem delineadas medidas de controlo e prevenção eficientes, tendo em conta o cenário de alterações climáticas, garantindo a fitossanidade vegetal.

A otimização de métodos de diagnóstico, adaptados a cada matriz vegetal, contribuiu para a celeridade e eficiência do diagnóstico, muitas vezes problemático, devido à elevada quantidade de metabolitos secundários presentes em alguns géneros vegetais, o que dificulta a extração de *deoxyribonucleic acid* (DNA). Neste âmbito, os resultados obtidos no estudo de avaliação do efeito da matriz vegetal na qualidade e quantidade de DNA total extraído, sugerem a existência de géneros que dificultam o processo de extração de DNA total de qualidade pelo método de Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB). Os géneros *Hibiscus*, *Santolina*, *Euryops*, *Ilex*, *Lavandula*, *Quercus*, *Rubus* e *Pteridium* foram os que se destacaram pela negativa. Com o objetivo de tornar o procedimento de ensaio mais eficiente na análise dos géneros referidos, foi sugerida a alteração aos protocolos usados no Laboratório de Fitossanidade (FITOLAB), especificamente na verificação da qualidade da extração do DNA total utilizando uma diluição de 1:50 do DNA total da amostra para os géneros *Hibiscus*, *Santolina*, *Euryops*, *Ilex*, *Lavandula*, *Quercus* e *Rubus*. Para o género *Pteridium*,

frequentemente problemático, foi sugerida a alteração do método de extração de DNA total.

O bem-estar humano depende dos serviços dos ecossistemas, sendo que o diagnóstico de pragas e doenças e a implementação de controlos adequados são passos essenciais para a mitigação dos organismos patogénicos no ambiente e para a economia, contribuindo para a sustentabilidade social, ambiental e económica.

Referências

Ares, A., Pereira, J., Garcia, E., Costa, J., & Tiago, I. (2021). The Leaf Bacterial Microbiota of Female and Male Kiwifruit Plants in Distinct Seasons: Assessing the Impact of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytobiomes Journal*, 5(3), 275–287. <https://doi.org/10.1094/Pbiomes-09-20-0070-R>

Balestra, G. M., Renzi, M., & Mazzaglia, A. (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports*, 22(1), 10–10. <https://doi.org/10.5197/J.2044-0588.2010.022.010>

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmuller, I., & Geider, K. (1995). Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2636–2642. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.7.2636-2642.1995>

Bodino, N., Cavaliere, V., Dongiovanni, C., Simonetto, A., Saladini, M. A., Plazio, E., Gilioli, G., Molinatto, G., Saponari, M., & Bosco, D. (2021). Dispersal of *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae), a Vector of *Xylella fastidiosa*, in Olive Grove and Meadow Agroecosystems. *Environmental Entomology*, 50(2), 267–279. <https://doi.org/10.1093/EE/NVAA140>

Bucci, E. M. (2018). *Xylella fastidiosa*, a new plant pathogen that threatens global farming: Ecology, molecular biology, search for remedies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 502(2), 173–182. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.05.073>

Chapman, J. R., Taylor, R. K., Weir, B. S., Romberg, M. K., Vanneste, J. L., Luck, J., & Alexander, B. J. R. (2012). Phylogenetic Relationships Among Global Populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-12-0064-R>

CNCFS. (2017). Manual técnico – Amendoeira: estado da produção.

Costanza, R., D’Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O’Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P., & Van Den Belt, M. (1997). The value of the world’s ecosystem services and natural capital. *Nature* 1997 387:6630, 387(6630), 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>

Cultivar (2022). Rede de competências para o desenvolvimento sustentável e inovação no setor Agroalimentar. <https://icultivar.pt>

Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M. A., Manceau, C., & Vanneste, J. L. (2015). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, *64*(3), 582–596. <https://doi.org/10.1111/PPA.12297>

Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). *To Cite This Article: Preetha J Shetty, The Evolution of DNA Extraction Methods*. *1*, 2020–2028. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2020.08.001234>

Denancé, N., Legendre, B., Briand, M., Olivier, V., de Boisseson, C., Poliakoff, F., & Jacques, M. A. (2017). Several subspecies and sequence types are associated with the emergence of *Xylella fastidiosa* in natural settings in France. *Plant Pathology*, *66*(7), 1054–1064. <https://doi.org/10.1111/PPA.12695>

DGAV. (2015). Plano de Ação Nacional para o Controlo do Fogo Bacteriano

DGAV. (2021). Plano de contingência - *Xylella fastidiosa* e seus vetores.

DGAV. (2022a). Despacho n.º 27/G/2022 – Freguesias com zonas contaminadas com *Erwinia amylovora*.

DGAV. (2022b). Plano de contingência - *Xylella fastidiosa* e seus vetores.

DRAPCentro. (2021). A produção de Cereja na Cova da Beira – Cadernos temáticos.

Donati, I., Buriani, G., Cellini, A., Mauri, S., Costa, G., & Spinelli, F. (2014). New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*). *Journal of Berry Research*, *4*(2), 53–67. <https://doi.org/10.3233/JBR-140073>

Donati, I., Cellini, A., Sangiorgio, D., Vanneste, J. L., Scortichini, M., Balestra, G. M., & Spinelli, F. (2020). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, Infection Dynamics, and Disease Epidemiology. *Microbial Ecology*, *80*(1), 81–102. <https://doi.org/10.1007/S00248-019-01459-8>

EFSA. (s.d). <https://www.efsa.europa.eu/en>

- EPPO. (2013). PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. <https://doi.org/10.1111/epp.12019>
- EPPO. (2019). PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. <https://doi.org/10.1111/epp.12575>
- EPPO. (2014). PM 7/120 (1) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. <https://doi.org/10.1111/epp.12171>
- EPPO. (2021). PM 7/120 (2) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. <https://doi.org/10.1111/epp.12782>
- EPPO. (2023a). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int>
- EPPO. (2023b). *Erwinia amylovora*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int>
- EPPO. (2023c). *Xylella fastidiosa*. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int>
- EPPO. (2023d). European and Mediterranean Plant Protection Organization. https://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/about_eppo
- European Commission. (2023). Food safety. *Xylella fastidiosa*. *Xylella fastidiosa* (europa.eu)
- FAO. (2019). International Year of Plant Health 2020. International Year of Plant Health 2020 - Protecting plants, protecting life (fao.org)
- Figueira, D., Garcia, E., Ares, A., Tiago, I., Veríssimo, A., & Costa, J. (n.d.). *microorganisms Genetic Diversity of Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Seasonal and Spatial Population Dynamics. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060931>
- Gallelli, A., L'Aurora, A., & Loreti, S. (2011). Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Developing diagnostic protocols. *Journal of Plant Pathology*, 93(2), 425–435.
- Garcia *et al.* (2023, fevereiro, 9-10). Epidemiologia e ecogenómica de doenças reguladas de *Prunus* na Cova da Beira (Apresentação em poster). 5º Simpósio Nacional de Fruticultura.

Godefroid, M., Cruaud, A., Streito, J. C., Rasplus, J. Y., & Rossi, J. P. (2019). *Xylella fastidiosa*: climate suitability of European continent. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-45365-Y>

Harper, S. J., Ward, L. I., Clover, G. R. G. (2010). Development of LAMP and real-time PCR methods for the rapid detection of *Xylella fastidiosa* for quarantine and field applications. *Phytopathology*, 100(12), 1282–1288. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-10-0168>

Instituto Pedro Nunes (s.d.). *O IPN*. <https://www.ipn.pt/>

Instituto Pedro Nunes (s.d.). *FITOLAB*. <https://www.ipn.pt/laboratorio/FITOLAB>

Ishimaru, C. (1984). New Medium for Detecting *Erwinia amylovora* and Its Use in Epidemiological Studies. *Phytopathology*, 74(11), 1342. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-74-1342>

Janse, J. D., Obradovic, A. (2010). *Xylella fastidiosa*: Its biology, diagnosis, control, and risks. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 35–48

Johnson, K. A., Bock, C. H., & Brannen, P. M. (2021). Phony peach disease: past and present impact on the peach industry in the southeastern U.S.A. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S43170-021-00049-4/FIGURES/1>

Khan, M. A., Zhao, Y., & Korban, S. S. (2012). Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(2), 247–260. <https://doi.org/10.1007/S11105-011-0334-1/FIGURES/3>

Kim, G. H., Jung, J. S., & Koh, Y. J. (2017). Occurrence and Epidemics of Bacterial Canker of Kiwifruit in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 33(4), 351–361. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.01.2017.0021>

Leemans, R., & Groot, R. S. de. (2003). *Millennium Ecosystem Assessment: Ecosystems and human well-being: a framework for assessment*.

Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., & López, M. M. (2000). Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2071–2078. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2071-2078.2000>

Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC & Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84, 45, 6–461. DOI: 10.1094/Phyto-84-456

Miyoshi, T., Shimizu, S., & Sawada, H. (1994). Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit. *Korean J. Plant Pathol.*, 10(2), 68–72. <https://doi.org/10.3186/JPHYTOPATH.78.92>

Murray, M. G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19), 4321–4326. <https://doi.org/10.1093/NAR/8.19.4321>

Oliveira, T. M. dos S. (2010). *PCR em tempo real: métodos e aplicações*. <https://ria.ua.pt/handle/10773/7230>

Ouyang, P., Arif, M., Fletcher, J., Melcher, U., & Ochoa Corona, F. M. (2013). 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*, 8(11), e81647. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081647>

Pedroncelli, A., & Puopolo, G. (2023). This tree is on fire: a review on the ecology of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease. *Journal of Plant Pathology* 2023, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S42161-023-01397-Y>

Pereira, P. S. (2019). *Xylella fastidiosa* – a new menace for portuguese agriculture and forestry. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(2), 149–154. <https://doi.org/10.19084/rca.16907>

Pirc, M., Ravnkar, M., Tomlinson, J., & Dreo, T. (2009). Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. *Plant Pathology*, 58(5), 872–881. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2009.02083.X>

Quiñones, V., Zanlungo, S., Holuigue, L., Litvak, S., & Jordana, X. (1995). The cox1 initiation codon is created by RNA editing in potato mitochondria. *Plant Physiology*, 108(3), 1327. <https://doi.org/10.1104/PP.108.3.1327>

Rees-George, J., Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Pushparajah, I. P. S., Yu, J., Templeton, M. D., & Everett, K. R. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S–23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, *59*(3), 453–464. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.2010.02259.X>

Reglinski, T., Vanneste, J. L., Wurms, K., Gould, E., Spinelli, F., & Rikkerink, E. (2013). Using fundamental knowledge of induced resistance to develop control strategies for bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Frontiers in Plant Science*, *4*(FEB), 43166. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00024/BIBTEX>

Renzi, M., Mazzaglia, A., & balestra, G. (2012). Widespread distribution of kiwifruit bacterial canker caused by the European em *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* genotype in the main production areas of Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, *51*(2). https://doi.org/10.14601/PHYTOPATHOL_MEDITERR-9488

Ribal, J., Marques-Perez, I., & Segura, M. (2022). A farm compensation model to reduce the risk of pest spreading: An application for *Xylella fastidiosa* in Mediterranean agriculture. *NJAS: Impact in Agricultural and Life Sciences*, *94*(1), 112–136. <https://doi.org/10.1080/27685241.2022.2108732>

Sawada, H., & Fujikawa, T. (2019). Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, pathogen of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology*, *68*(7), 1235–1248. <https://doi.org/10.1111/PPA.13040>

Sawada, H., Kondo, K., & Nakaune, R. (2016). Novel biovar (biovar 6) of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, *82*(2), 101–115. <https://doi.org/10.3186/JPHYTOPATH.82.101>

Scortichini, M. (1994). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy. *Plant Pathology*, *43*(6), 1035–1038. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3059.1994.TB01654.X>

Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., & Firrao, G. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular Plant Pathology*, *13*(7), 631–640. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2012.00788.X>

Serizawa, S., Ichikawa, T., Takikawa, Y., Tsuyumu, S., & Goto, M. (1989). Occurrence of Bacterial Canker of Kiwifruit in Japan Description of Symptoms, Isolation of the Pathogen and Screening of Bactericides. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55(4), 427–436. <https://doi.org/10.3186/JPHYTOPATH.55.427>

Sicard, A., Zeilinger, A. R., Vanhove, M., Schartel, T. E., Beal, D. J., Daugherty, M. P., & Almeida, R. P. P. (2018). *Xylella fastidiosa*: Insights into an Emerging Plant Pathogen. *Annual Review of Phytopathology Annu. Rev. Phytopathol*, 8, 181–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417>

Sobiczewski, P., Iakimova, E. T., Mikiciński, A., Węgrzynowicz-Lesiak, E., & Dyki, B. (2017). Necrotrophic behaviour of *Erwinia amylovora* in apple and tobacco leaf tissue. *Plant Pathology*, 66(5), 842–855. <https://doi.org/10.1111/PPA.12631>

Tahmasebi, A., & Nasrollahi, F. (2023a). Comparison of DNA extraction methods from *Halocnemum strabilaceum* (Amaranthaceae). *Journal of Wildlife and Biodiversity*, 7(1), 81–97. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6498963>

Tahmasebi, A., & Nasrollahi, F. (2023b). Comparison of DNA extraction methods from *Halocnemum strabilaceum* (Amaranthaceae). *Journal of Wildlife and Biodiversity*, 7(1), 81–97. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6498963>

Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., & Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov. The Causal Bacterium of Canker of Kiwifruit in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 55(4), 437–444. <https://doi.org/10.3186/JPHYTOPATH.55.437>

Tamari, F., & Hinkley, C. S. (2016). *Extraction of DNA from Plant Tissue: Review and Protocols*. 245–263. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3185-9_17

Taylor, R. K., Guilford, P. J., Clark, R. G., Hale, C. N., & Forster, R. L. S. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29(1), 35–43. <https://doi.org/10.1080/01140671.2001.9514158>

Teviotdale, B. L., & Connell, J. H. (2003). UC Agriculture & Natural Resources Farm Title Almond Leaf Scorch Permalink Publication Date. *Almond Leaf Scorch*, 1–4. <https://doi.org/10.3733/UCANR.8106>

Vanneste, J. L., Kay, C., Onorato, R., Yu, J., Cornish, D. A., Spinelli, F., & Max, S. (2011). Recent advances in the characterization and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. *Acta Horticulturae*, 913, 443–456. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2011.913.59>

Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2853–2858. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>

Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H.-Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., & Brenner, D. J. (1987). *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(2), 136–143. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-2-136>

Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., & Smith', G. H. (n.d.). *The families and genera of the bacteria final report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types*. <https://journals.asm.org/journal/jb>

XylOut (2020). Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus*. <https://xylout.pt>

Anexos

Anexo 1

Tampões e meios de cultura

Todos os tampões e meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos, exceto quando indicado de outra forma. O pH foi ajustado, quando aplicável, com recurso a uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1M (CHEM-LAB NV) ou uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 5M (CHEM-LAB NV).

1.1. Tampões

1.1.1. Tampão fosfato-salino com Tween-20 (PBS-Tween-20)

Os reagentes e respetivas quantidades utilizadas para fazer o Tampão fosfato-salino (PBS) encontram-se descritos na Tabela I.

Tabela I - Reagentes e respetivas quantidades utilizadas na preparação da solução tampão fosfato salino (PBS) 10 mM.

Reagentes	Peso (g)
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9
KH ₂ PO ₄	0,2
Água destilada	Perfazer até 1 L

O pH foi ajustado a 7.2. Posteriormente foi adicionado 1 mL de Tween-20 (1%) estéril e a solução foi homogeneizada por agitação.

1.1.2 Tris-Borate-EDTA (TBE)

O TBE utilizado foi obtido através de uma diluição 1:10 em água de uma solução TBE 10x (*Fisher bioreagents*) obtida comercialmente.

1.1.3. Tampão de extração Llop (Llop *et al.*, 1999)

Os reagentes e respectivas quantidades utilizadas para fazer o tampão de extração Llop (Llop *et al.*, 1999) encontram-se descritos na Tabela II.

Tabela II – Reagentes e respectivas quantidades utilizadas na preparação do tampão de extração Llop (Llop *et al.*, 1999).

Reagentes	Peso (g)
Tris HCl	31,52
NaCl	14,6
EDTA	9,3
SDS	5
Polivinilpirrolidona (PVP-10)	20
Água destilada	Perfazer até 1 L

O pH foi ajustado a 7.5 e posteriormente esterilizado por filtração (0,2 µm).

1.1.4. Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB)

Os reagentes e respectivas quantidades utilizadas para preparar o CTAB encontram-se descritos na Tabela III.

Tabela III - Reagentes e respectivas quantidades utilizadas na preparação de Brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB).

Reagentes	Quantidades
CTAB	2 g
TRIS (1 M pH 8.0 autoclavado)	10 mL
EDTA (0,5 M pH 8.0 autoclavado)	4 mL
NaCl (5 M autoclavado)	28 mL
PVP-40	1 g
Água destilada autoclavada	Perfazer até 100 mL

Todos os reagentes utilizados na preparação de CTAB foram previamente preparados e esterilizados por autoclavagem (121°C, 15 minutos).

1.2. Meios de cultura

1.2.1. *King B* (KB) e *King B* modificado (KBC)

O meio de cultura *King B* (KB) (Mohan & Schaad, 1987) é seletivo para bactérias Gram negativas e foi utilizado como meio de crescimento para os isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. A composição do KB está descrita na Tabela IV. Todos os reagentes foram pesados e dissolvidos, exceto o ágar bacteriológico que foi adicionado separadamente. O pH foi ajustado a 7,2 com pastilhas de KOH e o volume da solução foi ajustado para 1000 mL. O meio foi esterilizado e distribuído em placas de Petri estéreis e armazenado à temperatura ambiente.

O meio de cultura KB líquido foi preparados da mesma forma, mas sem a adição do agar técnico, e foi conservado em frascos tipo Shott a 4°C.

Tabela IV – Composição do meio KB (King *et al.*, 1954).

Reagentes	Quantidades
Protease peptone	20 g
Glicerol	10 mL
K ₂ HPO ₄	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g
Agar bacteriológico	15 g
Água destilada	Perfazer até 1 L

O meio sólido KBC (Mohan & Schaad, 1987) foi preparado da mesma forma que o KB, mas o volume final foi ajustado para 884 mL. Após autoclavagem, foram adicionados 100 mL de ácido bórico (1,5%) estéril e duas soluções esterilizadas de antibióticos, 8 mL de uma solução aquosa a 25 mg/mL⁻¹ de cicloheximida e 8 mL de uma solução aquosa a 10 mg/mL⁻¹ de cefalexina. O meio foi dispensado em placas de Petri estéreis e conservado a 4°C por um mês.

1.2.2. Cycloheximide-Crystal violet-Thallium Nitrate (CCT)

Os reagentes e respectivas quantidades utilizadas para preparar o meio de cultura Cycloheximide-Crystal violet-Thallium Nitrate (CCT) (Ishimaru & Klos, 1984) encontram-se descritos na Tabela V. Todos os reagentes foram pesados e dissolvidos, exceto o ágar bacteriológico que foi adicionado separadamente. O pH foi ajustado a 7.2 e esterilizado por autoclavagem. Após autoclavagem, foram adicionados 2 ml de uma solução de nitrato de tálio (1% w/v solução aquosa) e 1 ml de uma solução de cicloheximida (50

mg/mL), previamente preparadas e esterilizadas por filtração. O meio foi posteriormente distribuído em placas de Petri estéreis e conservado a 4°C por um mês.

O meio de cultura CCT líquido foi preparado da mesma forma, mas sem a adição do agar técnico e foi conservado em frascos tipo Shott a 4°C.

Tabela V – Composição do meio CCT (Ishimaru & Klos, 1984).

Reagentes	Quantidades
Sacarose	100 g
Sorbitol	10 g
Niaproof	1,2 mL
Cristal Violeta (sol. 0,1% álcool)	2 mL
Nutriente Agar	23 g
Água destilada	Perfazer até 1 L

Anexo 2

Protocolos de *polymerase chain reaction* (PCR) e *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR)

2.1. Duplex PCR de acordo com Gallelli *et al.* (2011)

O protocolo de PCR convencional descrito por Gallelli *et al.* (2011) foi utilizado para identificar *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. A reação de amplificação foi realizada utilizando dois pares de primers, KN-F/R e AvrDdpx-F/R (Tabela VI) que amplificam dois fragmentos com o peso molecular de 492 pb e 230 pb, respectivamente (Gallelli *et al.*, 2011).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 25 µl, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela VII. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 2 µl de DNA previamente extraído da estirpe de referência de Psa CFBP 7286 (Balestra *et al.*, 2009). Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA). A reação de PCR foi realizada num termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições: desnaturação inicial (95°C durante 3 min), 30 ciclos repetidos compostos por um passo de desnaturação (94°C durante 30 segundos), um passo de hibridização (63°C durante 45 segundos) e um passo de extensão (72°C durante 50 segundos), seguido de passo final de extensão (72°C durante 5 min).

Tabela VI - Sequências de primers e condições físicas para as reações de PCR convencional de acordo com Gallelli *et al.* (2011).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
KN-F	5' - CACGATACATGGGCTTATGC – 3'	Temperatura	Tempo	Ciclos
		95°C	3'	1
KN-R	5' - CTTTTTCATCCACACTCCG – 3'	94°C	30'	30
		63°C	45''	
		72°C	50''	
AvrDdpx-F	5' - TTTCGGTGGTAACGTTGGCA - 3'	72°C	5'	1
		72°C	5'	1
AvrDdpx-R	5' - TTCCGCTAGGTGAAAAATGGG – 3'	('= minutos; '' = segundos)		

Tabela VII – Mistura para a reação de *Duplex* PCR convencional (Gallelli *et al.*, 2011).

Reagentes	Volume (μ L)	Concentração
H ₂ O	17,2	N.A.
Buffer	2,5	1x
MgCl ₂	0,75	1,5 mM
d’NTPs	0,5	0,2 mM
KN-F	0,5	0,5 μ M
KN-R	0,5	0,5 μ M
AvrDdpx-F	0,4	0,4 μ M
AvrDdpx-R	0,4	0,4 μ M
<i>Platinum Taq DNA Polymerase</i> (Invitrogen)	0,25	0,05 U/ μ L

2.2. PCR de acordo com Taylor *et al.* (2001)

O protocolo de PCR convencional descrito por Taylor *et al.* (2001) foi utilizado para identificar *Erwinia amylovora*. A reação de amplificação foi realizada utilizando um par de primers, G1-F e G2-R (Tabela VIII) que amplifica fragmentos com o peso molecular de 187 pb (Taylor *et al.*, 2001).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 25 μ l, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela IX. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 5 μ l de DNA previamente extraído da estirpe de referência de Ea CFBP1232 (*CIRM-CFBP*). Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA).

A reação de PCR foi realizada num termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições: desnaturação inicial (95°C durante 3 min), 40 ciclos repetidos compostos por um passo de desnaturação (94°C durante 30 segundos), um passo de hibridização (60°C durante 30 segundos) e um passo de extensão (72°C durante 1 minuto), seguido de passo final de extensão (72°C durante 5 min).

Tabela VIII - Sequências de primers e condições físicas para as reações da PCR convencional de acordo com Taylor *et al.* (2001).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
G1-F	5' - CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG - 3'	95°C	3'	1
		94°C	30''	40
		60°C	30''	
G2-R	5' - GCTACCACTGATCGCTCGAATCAAATCGGC - 3'	72°C	1'	1
		72°C	5'	
		('= minutos; '' = segundos)		

Tabela IX – Mistura para a reação da PCR convencional (Taylor *et al.*, 2001).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H ₂ O	14,3	N.A.
Buffer	2,5	1x
MgCl ₂	0,75	1,5 mM
d'NTPs	0,25	0,1 mM
G1-F	1	0,4 µM
G2-R	1	0,4 µM
<i>NZYTaq II DNA polymerase</i>	0,2	1 U/µL

2.3. RT-PCR de acordo com Weller *et al.* (2000)

O protocolo de RT-PCR descrito por Weller *et al.* (2000) foi utilizado para aferir a qualidade da extração de DNA total utilizando o set de primers COX-F/R e a sonda COX-P (Tabela X).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 10 µl, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela XI. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 2 µl de DNA previamente extraído e verificado de uma matriz vegetal. Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA). A reação de PCR foi realizada num termociclador CFX Connect™ *Real-Time System* (Bio-Rad) seguindo as condições: passo inicial a 50°C durante 2 min e um passo de desnaturação

a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos compostos por um passo inicial a 95°C durante 15 segundos e um passo a 60°C durante 1 minuto.

Tabela X - Sequências de primers e condições físicas para as reações da RT-PCR de acordo com Weller *et al.* (2000).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
COX-F	5' - CGTCGCATTCCAGATTATCCA - 3'	50°C	2'	1
		95°C	10'	1
COX-R	5' - CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAAGT - 3'	95°C	15''	45
		60°C	1'	
COX-P (Fluoróforo HEX)	5' - [HEX] TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT [BHQ1] - 3'	('= minutos; '' = segundos)		

Tabela XI – Mistura para a reação da RT-PCR (Weller *et al.*, 2000).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H ₂ O	1	N.A.
<i>NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix</i>	5	1x
COX-F	0,9	0,9 µM
COX-RW	0,9	0,9 µM
COX-P	0,2	0,2 µM

2.4. RT-PCR de acordo com Pirc *et al.* (2009)

O protocolo de RT-PCR descrito por Pirc *et al.* (2009) foi utilizado para identificar *Erwinia amylovora*. A reação de amplificação foi realizada utilizando um par de primers AmsF/R e a sonda Ams141T (Tabela XII) (Pirc *et al.*, 2009).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 10 µl, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela XIII. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 2 µl de DNA previamente extraído da estirpe de referência de Ea CFBP1232 (*CIRM-CFBP*). Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA). A reação de PCR foi realizada num termociclador termociclador CFX Connect™ *Real-Time System* (Bio-Rad) seguindo as condições: passo inicial de 50°C durante 2 min e um passo de desnaturação a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos compostos por um passo inicial a 95°C durante 15 segundos e um passo a 60°C durante 1 minuto.

Tabela XII – Sequência de primers e condições físicas para as reações da RT-PCR de acordo com Pirc *et al.* (2009).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
Ams116F	5' - TCCCACATACTGTGAATCATCCA – 3'	50°C	2'	1
		95°C	10'	
Ams189R	5' - GGGTATTTGCGCTAATTTTATTCG – 3'	95°C	15''	40
		60°C	1'	
Ams141T	5' - FAM-CCAGAATCTGGCCCGCGTATACCG-TAMRA - 3'	(‘= minutos; '' = segundos)		

Tabela XIII – Mistura para a reação da RT-PCR (Pirc *et al.*, 2009).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H ₂ O	1	N.A.
<i>NZYSpeedy qPCR Probe Master mix</i>	5	1x
Ams116F	0,9	0,9 µM
Ams189R	0,9	0,9 µM
Ams141T	0,2	0,2 µM

2.5. RT-PCR de acordo com Harper *et al.* (2010)

O protocolo de RT-PCR descrito por Harper *et al.* (2010) foi utilizado para identificar *Xylella fastidiosa*. A reação de amplificação foi realizada utilizando um par de primers, XF-F/R e a sonda XF-P (Tabela XIV) (Harper *et al.*, 2010).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 20 µl, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela XV. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 2 µl de DNA previamente extraído da estirpe de referência de Xf subsp. multiplex, ICMP 15199 (*International Collection Of Microorganisms*). Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA). A reação de PCR foi realizada num termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições: passo inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos repetidos compostos por um passo de desnaturação a 94°C durante 10 segundos e um passo a 62°C durante 40 segundos.

Tabela XIV - Sequência de primers e condições físicas para as reações da RT-PCR de acordo com Harper *et al.* (2010).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
XF-F	5' - CACGGCTGGTAACGGAAGA - 3'	95°C	10'	1
		94°C	10''	40
XF-R	5' - GGGTTGCGTGGTCAAATCAAG - 3'	62°C	40''	
		('= minutos; '' = segundos)		
Probe XF-P	5' - 6-FAM-TCGCATCCCGTGGCTCAGTCC-BHQ-1 - 3'			

Tabela XV – Mistura para a reação da RT-PCR (Harper *et al.* 2010).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H ₂ O	6,48	N.A.
<i>NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix</i>	10	1x
BSA (Sigma)	0,12	0,3 µg.µL ⁻¹
XF-F	0,6	0,3 µM
XF-R	0,6	0,3 µM
XF-P	0,2	0,1 µM

2.6. RT-PCR de acordo com Ouyang *et al.* (2013)

O protocolo de RT-PCR descrito Ouyang *et al.* (2013) foi utilizado para identificar *Xylella fastidiosa*. A reação de amplificação foi realizada utilizando um par de primers, Xf.Csp6-F/R e a sonda Xf.Csp6-P (Tabela XVI) (Ouyang *et al.*, 2013).

As reações de amplificações foram preparadas num volume final de 10 µl, através da adição sequencial dos reagentes constantes na Tabela XVII. Em cada conjunto de reações foi preparado um controlo positivo através da adição de 1 µl de DNA previamente extraído da estirpe de referência de Xf subsp. multiplex, ICMP 15199 (*International Collection Of Microorganisms*). Para verificar a ausência de contaminações por DNA exógeno, foi incluído um controlo "em branco" (sem adição de DNA). A reação de PCR foi realizada num termociclador Bio-Rad T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad) seguindo as condições: passo inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40

ciclos compostos por um passo de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um passo a 60°C durante 60 segundos.

Tabela XVI - Sequência de primers e condições físicas para as reações da RT-PCR de acordo com Ouyang *et al.* (2013).

NOME	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	CONDIÇÕES DE PCR		
		Temperatura	Tempo	Ciclos
Xf.Csp6F	5' - CCCATTACGCTTCAACCATT - 3'	95°C	10'	1
		95°C	15''	40
Xf.Csp6R	5' - CCCAATCCATACGACTTGCT - 3'	60°C	60''	
		('= minutos; '' = segundos)		
Probe Xf.Csp6P	5' - 6-FAM-GGTGTCATT[ZEN]CGCAGCAACGGC-IBFQ - 3'			

Tabela XVII – Mistura para a reação da RT-PCR (Ouyang *et al.*, 2013).

Reagentes	Volume (µL)	Concentração
H2O	3,3	N.A.
<i>PerfeCTa qPCR ToughMix</i>	5	1x
Xf.Csp6F	0,3	0,3 µM
Xf.Csp6R	0,3	0,3 µM
Xf.Csp6P	0,1	0,1 µM