

Abordagem integrada na identificação dos fatores de risco associados à *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria que provoca um impacto económico, social e ambiental profundo, em qualquer país onde se estabelece. Para a miríade de hospedeiros desta bactéria, de momento, não existem meios de luta direta, pelo que as medidas de luta assentam principalmente na prevenção.

Paula Sá Pereira . INIAV, I.P.



O agente patogénico

Xylella fastidiosa Wells et al. (1987), é uma bactéria classificada como organismo de quarentena, estando incluída na Lista A1 da Organização Europeia e Mediterrânica para a Proteção das Plantas (EPPO) desde 1981. É uma bactéria restrita ao xilema, disseminada por insetos picadores-sugadores de fluido xilémico, e tem uma ampla gama de hospedeiros (mais de 300 espécies), muitos de grande importância económica para o nosso país, como as oliveiras, citrinos, videiras, fruteiras, bem como numerosas espécies ornamentais. Para esta espécie são reconhecidas 4 subespécies (ISPP-CTPPB):

- *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* que infeta maioritariamente a vinha, o cafeiro, amendoeira, citrinos, sendo esta subespécie a mais bem estudada (EFSA, 2013);
- *X. fastidiosa* subsp. *pauca*, que causa a Clorose Variegada dos Citrinos, infeta igualmente o cafeiro (Helvécio & Sousa, 2014). Foi uma variante desta subespécie – a CoDIRO – que provocou os diversos surtos em oliveira, em Itália, tendo sido um hospedeiro não considerado até 2013. Esta variante infetou outras espécies, nomeadamente o loendro, amendoeiras e outras (Saponari & Boscia, 2014; Cariddi et al., 2014).

- *X. fastidiosa* subsp. *sandyi*, afeta o loendro (*Nerium oleander*), cujos isolados não estão ainda bem caracterizados (Yuan et al., 2010).
- *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*, que até agora, tem a gama mais ampla de hospedeiros em termos de espécies de plantas expressando os sintomas da doença, como a amendoeira, pessegueiro, ameixeira, carvalhos, frutos vermelhos, etc., (Nunney et al., 2013), tendo sido uma variante desta subespécie que foi identifica-

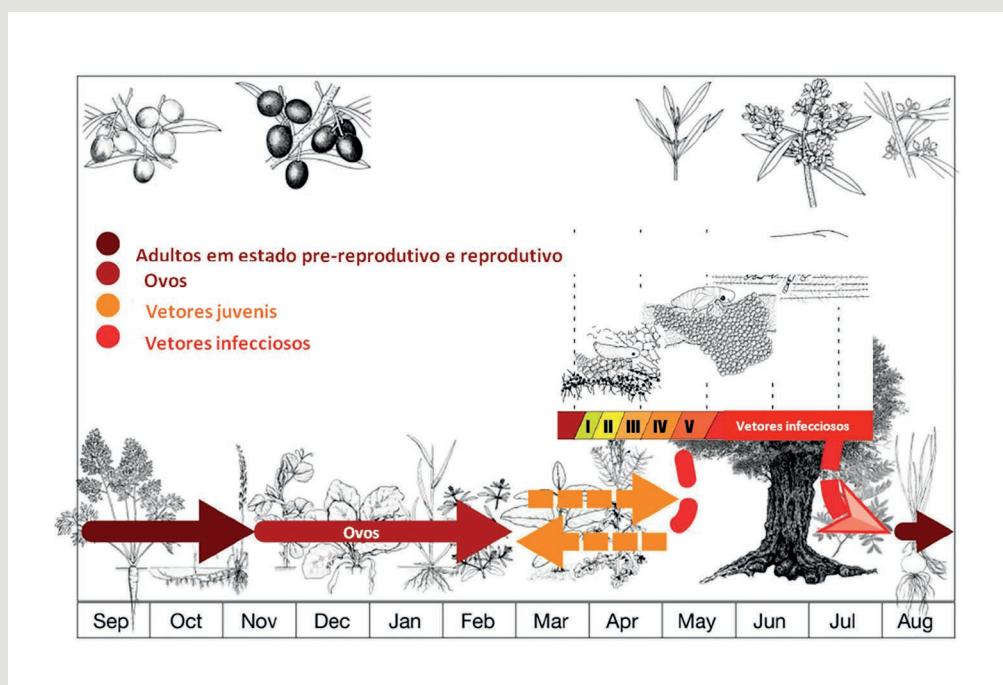


Figura 1 – Ciclo biológico do *Philaenus spumarius* (Adaptado de Cornara et al., 2014)

da em França, numa planta ornamental, a *Polygala myrtifolia*.

Foi proposta a subespécie *tashke* (Randall et al., 2009), cujo único hospedeiro é a *Chitalpa tashkentensis*. No entanto, por até hoje não ter sido identificado mais nenhum genótipo semelhante, não lhe foi atribuída uma subespécie reconhecida (Janse et al., 2010), apesar de constar das listas oficiais das plantas hospedeiras de *Xylella fastidiosa*. Mais recentemente foi proposta a *X. fastidiosa* subsp. *morus* (Nunney et al., 2014a,b) que infeta a amoreira.

Os novos surtos na Europa

X. fastidiosa está, maioritariamente, estabelecida no continente americano, cobrindo

uma ampla gama de latitudes. Está presente no Canadá, no norte da Argentina, nos Estados Unidos, México, Costa Rica, Venezuela, Brasil e Paraguai, tendo sido também identificada em Taiwan e no Irão.

Desde 2013, em que foi detetado o primeiro surto em Itália (Apulia, província de Lecce), em oliveiras, tendo sido identificado o principal disseminador da doença, o inseto-vetor picador-sugador de fluido xilémico, *Philaenus spumarius* (Figura 1). Desde então, várias diretivas têm sido produzidas pela CE integrando medidas legislativas aperfeiçoadas, com o objetivo de prevenir a entrada da *X. fastidiosa* em países europeus isentos da bactéria.

A Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2015), emitiu um parecer



Figura 2a e b) - Sintomatologia da *Xylella fastidiosa*, estirpe CoDIRO, em oliveira

científico sobre os riscos associados à entrada da *Xylella fastidiosa* no território da UE, com a identificação e avaliação das opções de redução do risco. Ainda em 2015, é comunicada oficialmente a presença da bactéria em França, na Córsega, e posteriormente em Nice (Provence-Alpes-Côte d'Azur), estando assinalados atualmente cinco focos naquela região, associados à *Polygala myrtifolia* e à subespécie *multiplex* da bactéria. É importante referir que a subespécie que infeta a oliveira - *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (variante CoDIRO) - não é a mesma que infeta a polígala - *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* - o que diminui os níveis de risco de contaminação cruzada.

Sintomatologia da infecção por *Xylella fastidiosa*

A deteção precoce por via da observação é muitas vezes difícil, devido à sua semelhança com carências nutricionais, stress hídrico, etc., o que poderá levar a menosprezar situações observadas em campo, sendo fundamental o diagnóstico laboratorial. A sintomatologia da infecção varia também de acordo com a espécie hospedeira, no entanto, as queimaduras foliares são um sintoma mais característico, na zona apical e/ou marginal das folhas, apresentando cloroses com gradiente entre amarelo e castanho nas zonas imediatamente adjacentes às queimaduras (em oliveira, Figura 2a,b), com morte progressiva da planta da zona apical para a raiz (dieback).

Na videira aparecem, por vezes, ilhas verdes nos feixes e as folhas caem, ficando o pecíolo preso aos feixes (Figura 3).

Nos citrinos, os sintomas são diferentes, chamando-se a doença Clorose Variegada dos Citrinos. Surgem pequenas manchas amareladas, com distribuição não uniforme, na página superior de folhas adultas, que correspondem a lesões cor de palha na página inferior. Essas manchas evoluem pa-



Figura 3 - Sintomatologia da doença de Pierce



Figura 4 - Sintomatologia da Clorose Variegada dos Citrinos

ra lesões acastanhadas (Figura 4).

Em plantas ornamentais como o loendro (*Nerium oleander*) e a *Polygala myrtifolia*, a planta ornamental identificada como primeiro hospedeiro na Córsega, podem ser vistos sintomas de queimaduras foliares marginais e apicais (Figura 5a,b).

Deteção precoce

Para diagnosticar a doença, entre as metodologias disponíveis, temos como a mais fiável a reação da polimerase em cadeia (PCR, convencional, e tempo real), baseada em marcadores moleculares, que tem apresentado resultados bastante satisfatórios. Apresenta inúmeras vantagens em relação aos outros métodos também disponibilizados e validados pela OEPP, PM7/24 (1). No entanto, devido à diversidade de hospedeiros efetivos da *Xylella fastidiosa*, que incluem espécies herbáceas e lenhosas, o desenvolvimento e otimização de protocolos expeditos para englobar a maioria das espécies vegetais é um processo moroso, devido à presença de inibidores no ADN extraído a partir da amostra e da baixa concentração da bactéria, no início do estabelecimento da infecção. Esta presença de inibidores, se não for considerada, poderá constituir um fator de geração de falsos negativos, pelo que é absolutamente necessária a utilização de controlos internos de todos os processos para que possamos assegurar a qualidade e robustez, e fiabilidade do resultado final.

Uma correta e rápida identificação da sintomatologia no campo, só pode ser possível se for suportada numa rede de informação privilegiada, que contemple as Direções Regionais de Agricultura (DRAP) e Autoridade Fitossanitária Nacional, a Direção-Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV) e o Laboratório Nacional de Referência para a Sanidade Vegetal, pertencente ao INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP).



Figura 5 - Sintomatologia em Loendros a) e em *Polygala myrtifolia* b)

Controlo da doença

Para a miríade de hospedeiros da *Xylella fastidiosa*, de momento, não existem meios de luta direta contra esta bactéria, pelo que as medidas de luta assentam principalmente na prevenção. A lista específica de géneros e espécies hospedeiras identificadas como suscetíveis às subespécies da bactéria detetadas no território da União Europeia (Itália e França) está disponível numa base de dados da Comissão, sempre a ser atualizada (EFSA, 2016_9 fevereiro). O risco de introdução no nosso país é elevado porque as importações de material vegetal de países nos quais esta bactéria foi detetada, corresponde a muitas das espécies hospedeiras em que a infecção é, frequentemente, assintomática. Por outro lado, não estão implementadas medidas de controlo nos aeroportos, nas zonas de acesso/controlo de passageiros de bagagens, na cabina dos aviões, para despiste/eliminação da presença de vetores potencialmente infetados, o que poderá constituir um risco de disseminação adicional. Assim, forçosamente a abordagem a seguir para prevenção da disseminação da doença terá de ter uma perspetiva integrada, em que todas as entidades que integram as fileiras de cada espécie em risco, e operadores económicos associados, terão de estar fortemente ligadas por uma rede de informação rápida e eficaz que permita, se for o caso, a identificação e eliminação simultânea do foco detetado.

O conhecimento profundo de todas as condições que estão associadas à produção das espécies hospedeiras em cada região, permitirá associar a cada caso, o nível de risco de infecção, sendo essencial o registo para correlação posterior, os seguintes parâmetros:

- Registo da proveniência das plantas cultivadas;
- Registo criterioso das práticas culturais utilizadas, como o modo de condução das culturas, tipos de fertilização (com registo de todos os componentes, quantidades utilizadas e modo de aplicação) – cadernos de campo atualizados;
- Características do solo em que as culturas estão implantadas;
- Microclima das regiões;
- Constituição do sobcoberto vegetal de culturas como a oliveira, vinha, citrinos, etc.;
- Controlo da presença de insetos-vetores potenciais portadores da bactéria em material vegetal, com aplicação de tratamento adequado antes da entrada no país.

Casos de sucesso

Para controlo da doença de Pierce, podem ser utilizadas cultivares resistentes: as cultivares Sylvaner, White Riesling, Chenin Blanc, Thompson Seedless e Ruby Cabernet que são relatadas como mais tolerantes à doença; as variedades Petite Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Napa Gamay, Grey Riesling, Crimson Seedless, Flame Seedless, Ruby Seedless e Sauvignon Blanc são as menos suscetíveis e as cultivares Mission, Barbera, Pinot Noir, Chardonnay, Emperor, Fiesta e Red Globe são mais suscetíveis à bactéria (Lima, 2014). Existe também a indicação de algum sucesso na utilização de tratamento térmico de estacas pela imersão em água à temperatura de 45 °C por um período de 3 horas (EFSA, 2015b).

Para a Clorose Variegada dos Citrinos e para o Coffea Leaf Scorch, tem sido implementada uma abordagem integrada para a minimização dos sintomas, com base numa adubação adequada e equilibrada de N-P-K, evitando o stress hídrico e a poda de ramos que apresentam sintomas iniciais da doença (FP5-INCO 2), o que tem resultado num menor impacto da bactéria nestes hospedeiros. O INIAV irá disponibilizar no seu site (www.iniav.pt), um Banco de Imagens, com fotografias de qualidade para consulta, que contemplará a sintomatologia visualizada em campo, e confirmada em laboratório, de espécies vegetais afetadas noutros países. Irá disponibilizar igualmente um site para consulta e troca de informações sobre as doenças provocadas por *Xylella fastidiosa*, promovendo ações de formação especializadas sobre a doença e os seus insetos-vetores. Pretende-se facilitar a identificação da infecção a todos cidadãos, reforçando a aplicação do ponto 2 do art.º 4 da Decisão de Execução da Comissão n.º 2012/697/EU de 8 de novembro, em que se estabelece a obrigação de qualquer pessoa que saiba ou suspeite da presença de *Xylella fastidiosa* no nosso País, dar conhecimento deste facto aos serviços oficiais. Desta forma poderemos, todos, acelerar todo o processo de diagnóstico, o que permitirá minimizar o risco e alocar recursos de uma forma muito mais direcionada e eficaz. ☺

Bibliografia

- Cariddi et al. (2014). Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology*, 96(3), 1-5.
- EFSA (2013). Statement of EFSA on host plants, entry and spread pathways and risk reduction options for *Xylella fastidiosa* Wells et al.: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3468.pdf.
- EFSA (2015a). Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3989>.
- EFSA (2015b). Hot water treatment of *Vitis* sp. for *Xylella fastidiosa*: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4225.pdf.
- EFSA (2016). Update of a database of host plants of *Xylella fastidiosa*: 20 November 2015 (Versão 9 fevereiro): http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4378.pdf.
- FP5-INCO 2 - ICA4-CT-2001-10005. Integrated approaches to the sustainable management of *xylella* diseases of citrus and coffee.
- Helvécio CFD & Sousa AA (2014). Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. *Citrus Res & Technol*, Cordeirópolis, 35(1):19-33.
- ISPP-CTPPB. International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria.
- Lima MF (2014). Capítulo 4. Doenças Bacterianas. In: *Uva Fitossanidade*. Frutas do Brasil 35:63-71
- Nunney L et al. (2013). Recent evolutionary radiation and host plant specialization in the *Xylella fastidiosa* subspecies native to the United States. *Appl Environ Microbiol* 79: 2189–2200.
- Nunney L et al. (2014b). Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Appl Environ Microbiol* 80: 3025–3033.
- Nunney L et al. (2014a). The Complex Biogeography of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*: Genetic Evidence of Introductions and Subspecific Introgression in Central America. *PLoS ONE* 9(11): e112463.
- Randall et al. (2009). Genetic Analysis of a novel *Xylella fastidiosa* Subspecies found in the Southwestern United States *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5631.
- Saponari M & Boscia D (2014). National Research Council, Instituto de Defesa Sustentável de Plantas, Bari, Itália, comunicação pessoal.
- Schaad NW et al. (2004). *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 290-300.
- Schuenzel EL et al. (2005). A Multigene Phylogenetic Study of Clonal Diversity and Divergence in North American Strains of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 3832-3839.
- Yuan X et al. (2010). Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. *Phytopathol* 100: 601–611.