

Bacteriose da nogueira: epidemiologia de um relevante problema fitossanitário em Portugal

***Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* é o agente causal da bacteriose da nogueira, doença mundialmente reportada e responsável por perdas económicas significativas nas principais regiões produtoras de noz. Em Portugal, o conhecimento adquirido nos últimos anos sobre a epidemiologia da bacteriose da nogueira encontra-se enquadrado na atividade I&D desenvolvida pelo INIAV e CIBIO-InBIO.**

Camila Fernandes, Rui de Sousa, Leonor Cruz
INIAV, I.P.



Leonor Martins, Fernando Tavares
FCUP - CIBIO-InBIO



Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* é uma bactéria capaz de infetar folhas e frutos da nogueira provocando manchas necróticas nestes órgãos, queda precoce da noz e/ou necrose do embrião no interior do fruto, levando a consideráveis perdas de produção e avultados prejuízos económicos. Apesar da sua relevância, pouco se sabe sobre a ocorrência da bacteriose da nogueira em Portugal e sobre as características de patogenicidade e virulência das bactérias responsáveis. Neste artigo pretende-se dar a conhecer algumas das atividades de I&D desenvolvidas, desde 2014, pelo INIAV e CIBIO-InBIO no sentido de compreender melhor a biologia dos agentes etiológicos e as suas características epidemiológicas. Espera-se que o conhecimento detalhado da diversidade e distribuição de diferentes populações destas bactérias fitopatogénicas, em função de diferentes metadados, e os estudos de genómica comparativa ainda em curso, permitam a otimização de medidas fitossanitárias de controlo desta doença das nogueiras para que os produtores possam encarar com otimismo uma cultura tradicionalmente importante da nossa agroeconomia.

***Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* como o agente causal da bacteriose da nogueira**

Xanthomonas arboricola pv. *juglandis* (*Xaj*) foi descrito, pela primeira vez, no início do século XX (Pierce, 1901) como o agente res-

ponsável da bacteriose da nogueira, a doença bacteriana mais conhecida e comum nos pomares de nogueira. Esta doença é reportada por todo o mundo e a sintomatologia que provoca afeta maioritariamente a qualidade do fruto. A bacteriose afeta diferentes órgãos da nogueira, em particular folhas e frutos. Estes, quando infetados, apresentam sintomas caracterizados por manchas necróticas, sem causar normalmente lesões internas no fruto (Figura 1). Os sintomas característicos da bacteriose da nogueira encontram-se também dispersos pelos pomares em Portugal, onde o primeiro registo desta doença foi descrito em 1935 (Oliveira & Cabral, 1942). *Xaj* encontra-se dispersa pelo mundo, acompanhando a distribuição e o desenvolvimento das cultivares da espécie *Juglans regia* (nogueira-comum), que possui uma grande importância comercial. *Xaj* também acompanhou as mudanças nos sistemas de gestão cultural da noz, onde o rendimento e a qualidade dos frutos da nogueira aumentaram consideravelmente, devido ao crescimento de pomares de monocultura intensiva com a implementação de tratamentos de poda, fertilização, irrigação e produtos químicos. Essas práticas tornaram-se comuns na maioria dos pomares, conduzindo à criação de um ambiente mais favorável à infecção, tornando *Xaj* um patógeno mais destrutivo. De facto, ao longo das últimas três décadas, a manifestação da doença causada por *Xaj* alterou-se consideravelmente. *Xaj* emergiu como o principal agente de novos aspectos sintomáticos (como a necrose apical do fruto e a exsudação do tronco), ocorrendo também um aumento da severidade da infecção. A necrose apical do fruto foi o nome dado ao sintoma necrótico que aparece na cicatriz do estigma de frutos imaturos, e que pode atingir o interior do fruto causando lesões na noz em formação (Figura 1). A redução da produtividade pode ser superior a 40% e, em alguns casos, pode até existir a perda total

da produção, devido à queda prematura da noz infetada. Este novo sintoma já é também comumente observado em pomares de nogueira em várias regiões do mundo, mas foi primeiramente reportado na Europa no final dos anos 90 (Belisario *et al.*, 2002). O sintoma necrose apical do fruto encontra-se presente também em Portugal. A informação disponível sugere a sua presença em pomares portugueses antes de 2000 (Martins *et al.*, 1997, Moreira & Coutinho, 2008), mas a sua confirmação foi devidamente documentada recentemente (Fernandes *et al.*, 2017). A presença de exsudação do tronco é o outro sintoma causado por estirpes de *Xaj* que afeta principalmente os troncos e os ramos de nogueiras, sendo particularmente importante em árvores jovens nos viveiros. A evolução desta manifestação pode também originar cancros e deformações devido ao desenvolvimento anormal dos tecidos (Figura 1). Este sintoma foi descrito, pela primeira vez, no ano de 2004 em França (Menard *et al.*, 2004) e, até à data, não existem casos reportados noutros países. Embora não exista informação sobre a situação atual da doença, é possível prever impactos económicos negativos relacionados com a possível contribuição de viveiros para a dispersão de *Xaj*, devido à propagação de nogueiras infetadas e consequente devastação de pomares jovens.

Atualmente, *Xaj* é considerado o principal agente bacteriano que afeta a nogueira, não só pelos vários sintomas que provoca, mas principalmente, e também pelas consequências que acarreta para a produtividade, estando associado com a diminuição da qualidade da noz, com a redução da produtividade nos pomares e com o aumento dos custos de manutenção das nogueiras nos viveiros. Consequentemente, a produção de noz tem vindo a ter grandes perdas de rendimento, com prejuízos socioeconómicos em todo o mundo. Estes efeitos negativos têm sido ob-

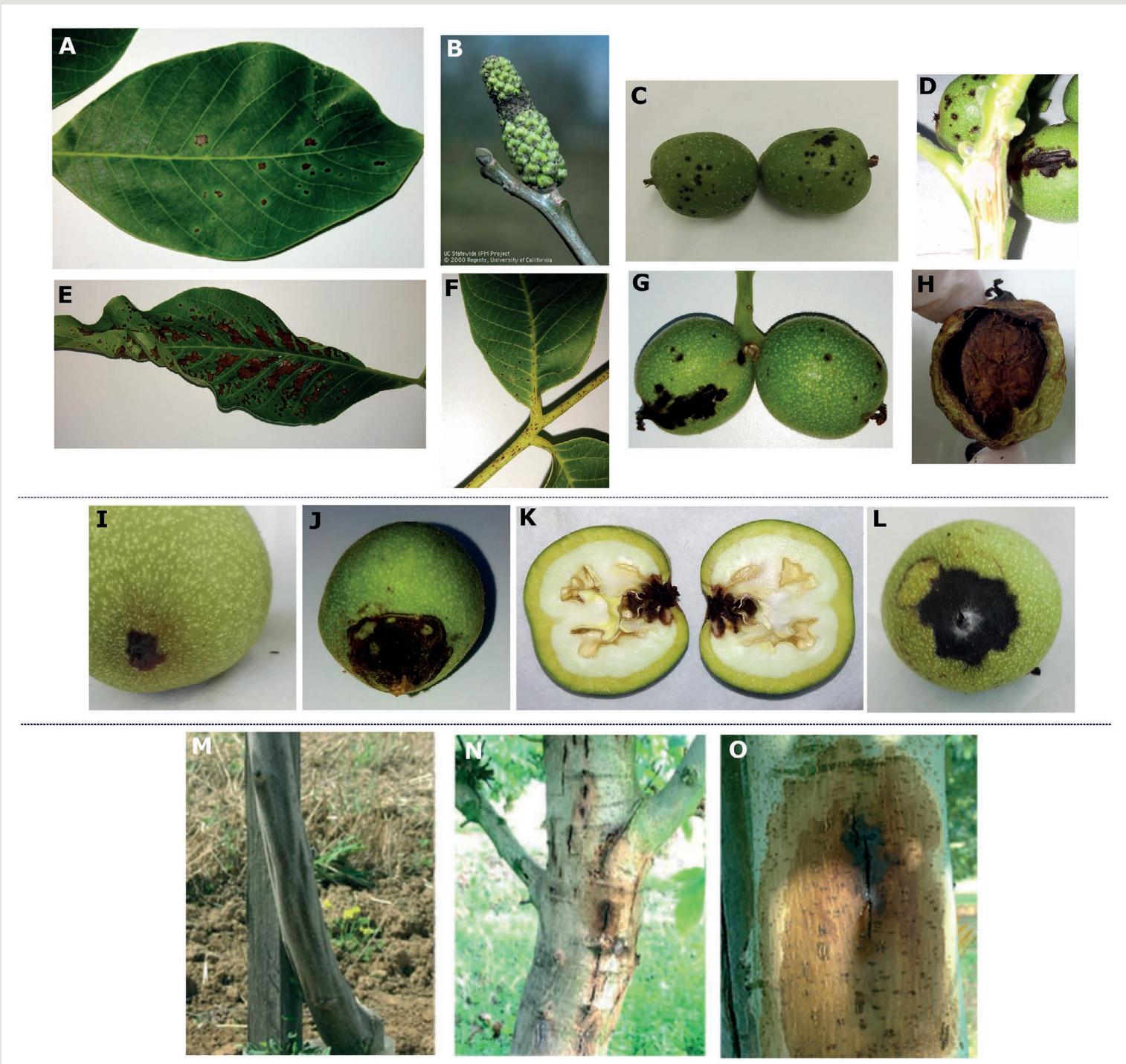


Figura 1 – Principais sintomas causados por *Xaj* observados em noqueiras. A-H: Diferentes órgãos que apresentam sintomas de manchas necróticas característicos da bactériose da noqueira. I-L: Frutos imaturos que apresentam o sintoma necrose apical do fruto, com diferentes graus de infecção. M-O: Troncos de noqueira que apresentam o sintoma de exsudação do tronco, destacando-se a possível evolução do sintoma com deformações (M) e cancros (N e O) (Fontes: C. Fernandes; Hajri *et al.*, 2010)

servados, sobretudo, nos principais países produtores de noz na Europa mediterrânea, onde a ocorrência de surtos da doença causados por *Xaj* é mais frequente, e onde *Xaj* constitui atualmente uma das principais ameaças à cultura da noqueira.

Embora a importância de *Xaj* seja reconhecida, as informações sobre a sua biologia e epidemiologia, incluindo a sua diversidade genética, dinâmica populacional, e a sua capacidade de adaptação ao hospedeiro e ao ambiente permanecem desconhecidas, pre-

judicando o fornecimento de informações relevantes para a implementação de medidas fitossanitárias mais adequadas para a prevenção e controlo dos sintomas.

Progressos efetuados no estudo da população de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* em Portugal

Desde setembro de 2014 que decorre em Portugal um estudo sobre *Xaj*, no âmbito de dois projetos de doutoramento e do projeto FCT EVOXANT. O estudo encontra-se te-

maticamente centrado nos pomares de noqueira em Portugal e, até à data, já obteve resultados promissores, particularmente para a avaliação abrangente da diversidade genética presente nas populações de *Xaj* existentes em Portugal, que serão enunciados de seguida neste artigo.

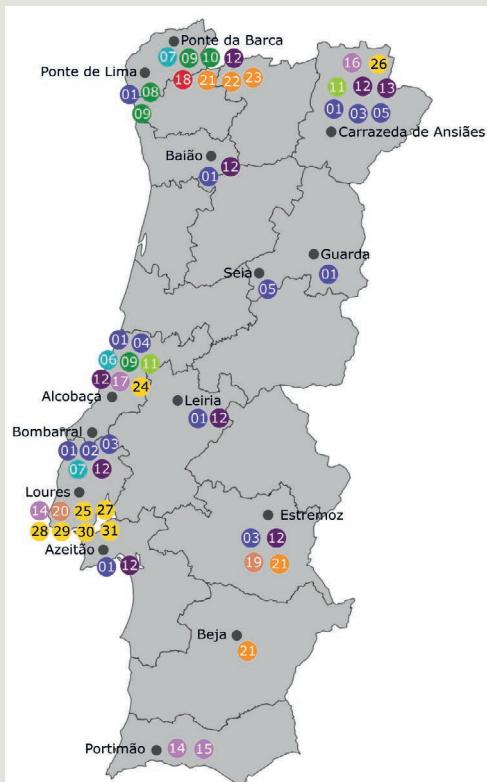
Importância dos pomares portugueses para o estudo de *Xaj*

O cultivo de noz encontra-se distribuído por diferentes regiões geográficas do país,

que estão sujeitas a distintas condições bioclimáticas, principalmente associadas com a temperatura do ar e a humidade relativa, e caracterizados por diferentes estratégias de gestão e práticas culturais. Estes fatores são conhecidos como sendo particularmente importantes para a epidemiologia de *Xaj*, favorecendo a infecção e o desenvolvimento de doença, tornando Portugal um bom exemplo para estudos da sua estrutura populacional. Desta forma, incidimos o nosso estudo (Fernandes et al., 2018a) em mais de uma centena de isolados bacterianos obtidos a partir de um rastreio extensivo de amostras de folhas, frutos, ramos, gomos e amentilhos de mais de sessenta árvores de nogueiras sintomáticas, distribuídas pelas principais regiões produtoras do país. A caracterização da diversidade genética da população de *Xaj* presente em Portugal foi efetuada num período consecutivo de três anos, atendendo a vários fatores que podem influenciar o comportamento epidemiológico das populações bacterianas, tais como aspectos climáticos, biogeográficos, tipo de produção, cultivares de nogueiras, órgãos de planta, entre outros.

As árvores amostradas encontravam-se distribuídas por 14 regiões portuguesas delimitadas por quatro regiões bioclimáticas distintas. Destacam-se aqui as regiões amostradas mais relevantes para o cultivo de noz no país, como a região de Trás-os-Montes, com seca intensa no verão e invernos rigorosos; a região do Alentejo, com temperaturas regularmente quentes e clima seco; e a região do Minho, com alta precipitação anual e verões relativamente amenos. Estas regiões possuem também diferentes condições culturais, a região de Trás-os-Montes é maioritariamente caracterizada por ter uma produção de noz mais tradicional, amplamente baseada em nogueiras de origem seminal muito antigas, enquanto as últimas duas regiões (Alentejo e Minho) são caracterizadas por possuirem pomares de elevada produtividade, plantados com cultivares de *Juglans regia* devidamente selecionadas. Os pomares nestas regiões podem ser constituídos por uma única cultivar ou por diferentes cultivares de origem francesa, americana e portuguesa. De entre as cultivares, pode-se referir as tradicionalmente mais utilizadas, como "Amigo" e "Lara", ou as cultivares recentemente introduzidas, como, por exemplo, "Hartley", "Chandler" e "Franquette".

Verificou-se também a implementação de práticas de gestão fitossanitária em pomares de cultivo mais intensivo, bem como pomares mais antigos não mobilizados. Além



disso, apesar das diferentes medidas profiláticas aplicadas nos diferentes sistemas, incluindo práticas culturais, como melhoria dos sistemas de cultivo, saneamento, gestão de resíduos da cultura, e/ou aplicação de compostos cúpricos, a maioria das árvores infetadas apresentavam um fraco rendimento com noz de menor qualidade, ou uma queda prematura da noz infetada, reduzindo a produtividade do pomar e conduzindo a uma preocupação geral entre os produtores portugueses de noz.

A população de *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* presente em Portugal

A metodologia aplicada neste estudo permitiu caracterizar a população bacteriana eventualmente associada aos surtos da doença causada por *Xaj* em Portugal. Os resultados demonstraram que a população se encontra dispersa pelo país e foi constituída por 31 linhagens bacterianas, geneticamente heterogéneas e que se encontraram distribuídas por 10 grupos filogenéticos diferentes. Os resultados revelaram ainda que a diversidade existente nas bactérias do género *Xanthomonas*, onde se inclui *Xaj*, associada às nogueiras em Portugal, é mais complexa do que inicialmente se esperava, evidenciando a existência de uma popu-

lação caracterizada pela presença de um consórcio de estirpes distintas, não necessariamente pertencentes ao mesmo grupo que *Xaj*, ou seja, à espécie de *Xanthomonas arboricola* ou à patovar *juglandis* (Fernandes et al., 2018a).

Obviamente que as linhagens identificadas como estirpes bacterianas de *Xaj* foram as mais representativas dentro da população. Entre estas linhagens, destacam-se as potencialmente mais problemáticas para o país, embora seja sempre necessário a elaboração de mais estudos para determinar a incidência correta dessas linhagens, avaliar a sua virulência e identificar características específicas de adaptação que possam explicar a sua disseminação. As linhagens Lino1 e Lin12 (Figura 2) parecem estar bem estabelecidas e prevalentes no país, uma vez que possuem uma vasta distribuição e foram continuamente identificadas em árvores amostradas em anos consecutivos. As linhagens Lino6 e Lin17 (Figura 2) demonstraram possuir uma presença mais persistente em alguns pomares que, provavelmente, estão sobre pressão de específicas condições ambientais, climáticas ou culturais (Fernandes et al., 2018a).

Adicionalmente, este trabalho também demonstrou que a colonização de um mesmo hospedeiro por estirpes distintas é frequente. Investigações adicionais são importantes para determinar se as nogueiras poderão ser infetadas simultaneamente por diferentes estirpes de *Xaj*, e se estas estirpes poderão causar sintomas distintos em diferentes órgãos da planta.

A presença da bacteirose em árvores de nogueira-pecã

Além das dezenas de isolados pertencentes a *Xaj*, a extensa amostragem efetuada no âmbito desta investigação também permitiu identificar estirpes semelhantes a *Xaj* numa outra espécie, a nogueira-pecã (*Carya illionensis*), pertencente à mesma família de plantas da nogueira (família Juglandaceae). As folhas das árvores pecã colhidas neste estudo apresentavam sintomas semelhantes aos característicos da bacteirose encontrada em folhas de nogueira-comum (Figura 3). As estirpes bacterianas, isoladas a partir das folhas sintomáticas de pecã, foram identificadas como pertencentes à mesma espécie de *Xaj* (*Xanthomonas arboricola*), mas não à mesma patovar (*juglandis*), constituindo desta forma um novo subgrupo bacteriano (Fernandes et al., 2018b). A nogueira-pecã é economicamente importante na América do Norte e encontra-se amplamente cultivada em muitos países, possuindo ainda uma



Figura 3 – Sintomas da bacteriose em folhas de nogueira-pecã, observados em Portugal (Fonte: Fernandes et al., 2018b)

menor relevância comercial em Portugal. A descrição da bacteriose em nogueira-pecã, efetuada neste estudo, é um alerta para os principais países produtores de noz-pecã e para uma possível expansão da gama de hospedeiros de *X. arboricola* a outras espécies de árvores frutíferas.

Identificação de uma nova espécie de *Xanthomonas* sp. em nogueiras com bacteriose

Estudos de genotipagem dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de nogueiras com sintomas de bacteriose permitiram identificar um conjunto de estípulas atípicas de *Xanthomonas* com genótipo distinto do característico de isolados de *Xaj*. Através da sequenciação dos genomas de três destes isolados atípicos de *Xanthomonas* e posterior análise de genómica comparativa com *Xaj* e outras espécies de *Xanthomonas*, foi possível concluir que estes isolados atípicos constituem uma nova espécie de *Xanthomonas* distinta das descritas até à data. Curiosamente, ensaios de patogenicidade em folhas de plântulas de nogueira mostraram que esta nova espécie de *Xanthomonas* inclui estípulas patogénicas e não patogénicas que apresentam diferenças significativas no património genético de determinantes de patogenicidade e virulência, nomeadamente nos genes do sistema de secreção tipo III (T3SS) e nos respetivos efeitos (T3E) (Fernandes et al., 2018a, 2018c). No seu conjunto, estas características, que colocam esta espécie na interface entre a patogenicidade e um aparente comportamento comensal, tornam este novo grupo bacteriano um modelo único para compreender a evolução da patogenicidade de *Xanthomonas* em nogueiras. Espera-se que desta investigação em curso se possa identificar marcadores moleculares de patogenicidade e virulência em *Xanthomonas* patogénicas para a nogueira, essenciais para

desenvolver modelos de avaliação de risco biológico, e instruir práticas fitossanitárias que visem o controlo e a mitigação da bacteriose das nogueiras.

Considerações finais

O levantamento epidemiológico das populações de *Xaj* associados à bacteriose da nogueira em diversas regiões de Portugal continental sujeitas a diferentes regimes bioclimáticos, nomeadamente em relação à sua diversidade, dinâmica da infecção e identificação de novos genótipos e de genótipos mais prevalentes, realizado nos últimos anos, aponta para um problema fitossanitário que importa não negligenciar. Adicionalmente, a identificação de estípulas patogénicas de *X. arboricola* em nogueira-pecã e ainda de estípulas patogénicas e não patogénicas pertencentes a uma nova espécie de *Xanthomonas* representam avanços significativos sobre o conhecimento da biologia desta doença infeciosa e que deverão ser tidas em consideração para rastreios mais eficazes e elaboração de medidas correctivas que, a médio prazo, reduzam a disseminação das infecções e permitam, a mais longo prazo, a irradicação da bacteriose da nogueira nos pomares. O laboratório de fitobacteriologia do INIAV e o CIBIO-InBIO, através do seu grupo de investigação em Diversidade e Evolução Microbiana, continuarão a colaborar no sentido de encontrar soluções que permitam aos produtores de noz encarar com otimismo o seu investimento nesta cultura frutícola de grande valor acrescentado. ☺

Agradecimentos

Aos agricultores de norte a sul do país que contribuíram com a total disponibilidade para saídas de campo e recolha de material nos pomares de nogueira.

Estudo cofinanciado pelos Fundos Europeus Estruturais e de Investimento (FEEI) através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (COMPETE 2020) e por Fundos Nacionais através da Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT), no âmbito do programa de trabalho do projeto EVOXANT (PTDC/BIA-EVF/3635/2014 – POCI-01-0145-FEDER-016600) e no âmbito das bolsas de doutoramento, financiadas pela FCT, SFRH/BD/95913/2013 e SFRH/BD/137079/2018.



Referências bibliográficas

- Belisario et al. (2002). *Plant Disease*, **86**:599-602.
 Fernandes et al. (2017). *Plant Disease*, **101**:858-865.
 Fernandes et al. (2018a). *bioRxiv*:397703.
 Fernandes et al. (2018b). *Plant Disease*, **102**:2632.
 Fernandes et al. (2018c). *Microbiology Resource Announcements*, **7**, e00921-18.
 Hajri et al. (2010). *Plant Pathology*, **59**:1014-1022.
 Martins et al. (1997). *Acta Horticulturae*, **442**:367-372.
 Menard et al. (2004). *Plant Disease*, **88**:220.
 Moreira & Coutinho (2008). *Ficha Técnica 14. Bacteriose da nogueira*. *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Norte (D.R.A.P.N.).
 Oliveira & Cabral (1942). *Revista Agronómica*, **XXX**:176-184.
 Pierce (1901). *Botanical Gazette*, **31**:272-273.