

# Bacteriose da noqueira: epidemiologia de um relevante problema fitossanitário em Portugal

***Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* é o agente causal da bacteriose da noqueira, 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 noqueira 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 noqueira 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 noqueira 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 noqueiras 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 noqueira**

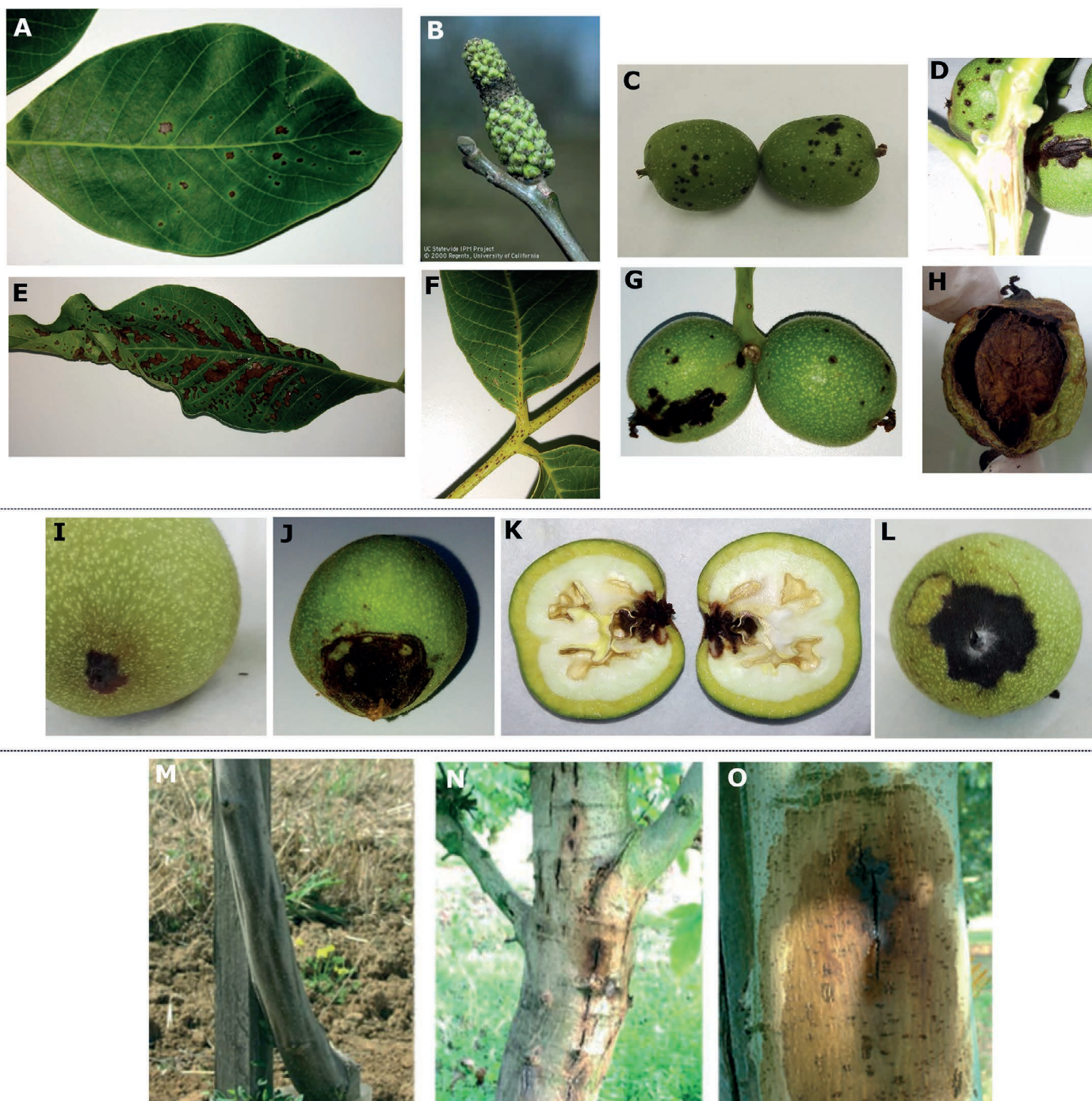
*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (*Xaj*) foi descrito, pela primeira vez, no início do século XX (Pierce, 1901) como o agente res-

ponsável da bacteriose da noqueira, a doença bacteriana mais conhecida e comum nos pomares de noqueira. 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 noqueira, 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 noqueira 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* (noqueira-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 noqueira 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 infeção, 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 aspetos sintomáticos (como a necrose apical do fruto e a exsudação do tronco), ocorrendo também um aumento da severidade da infeção. 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 noqueira 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 noqueiras, sendo particularmente importante em árvores jovens nos viveiros. A evolução desta manifestação pode também originar cancrios 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 noqueiras infetadas e consequente devastação de pomares jovens.

Atualmente, *Xaj* é considerado o principal agente bacteriano que afeta a noqueira, 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 noqueiras 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 nogueiras. A-H: Diferentes órgãos que apresentam sintomas de manchas necróticas característicos da bacteriose 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 cancrios (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***

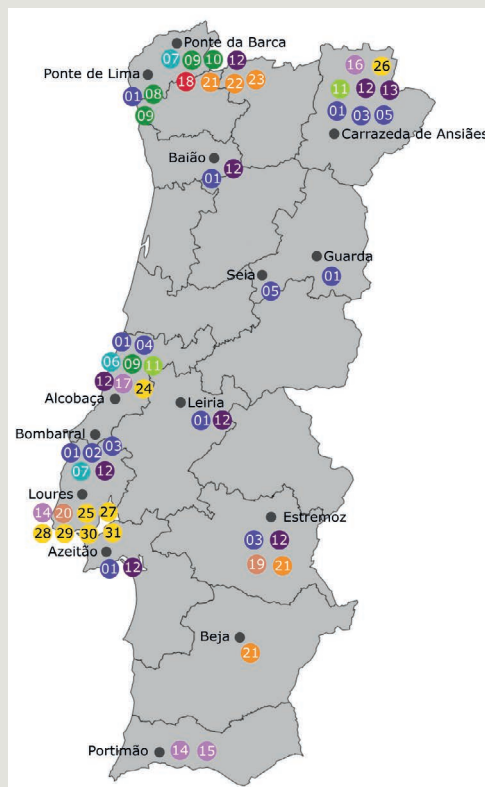
O cultivo de noz encontra-se distribuído por diferentes regiões geográficas do país,



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 infeção 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 aspetos 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 possuírem 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



**Figura 2** – Distribuição das linhagens bacterianas identificadas no estudo populacional de *Xaj*, pelas 14 regiões portuguesas incluídas na amostragem. As 31 linhagens estão enumeradas de 1 a 31. As linhagens pertencentes a um mesmo grupo estão representadas por uma mesma cor (Fonte: Fernandes *et al.*, 2018a)

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 heterogêneas 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 Lino2 (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 Lino17 (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 bacteriose 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 bacteriose 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 noqueira-pecã, observados em Portugal (Fonte: Fernandes *et al.*, 2018b)

menor relevância comercial em Portugal. A descrição da bacteriose em noqueira-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 fruteiras.

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

Estudos de genotipagem dos isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de noqueiras com sintomas de bacteriose permitiram identificar um conjunto de estirpes 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 noqueira mostraram que esta nova espécie de *Xanthomonas* inclui estirpes 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 efetores (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 noqueiras. Espera-se que desta investigação em curso se possa identificar marcadores moleculares de patogenicidade e virulência em *Xanthomonas* patogénicas para a noqueira, essenciais para

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

### Considerações finais

O levantamento epidemiológico das populações de *Xaj* associados à bacteriose da noqueira em diversas regiões de Portugal continental sujeitas a diferentes regimes bioclimáticos, nomeadamente em relação à sua diversidade, dinâmica da infeção 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 estirpes patogénicas de *X. arboricola* em noqueira-pecã e ainda de estirpes patogénicas e não patogénicas pertencentes a uma nova espécie de *Xanthomonas* representam avanços significativos sobre o conhecimento da biologia desta doença infecciosa e que deverão ser tidas em consideração para rastreios mais eficazes e elaboração de medidas corretivas que, a médio prazo, reduzam a disseminação das infeções e permitam, a mais longo prazo, a erradicação da bacteriose da noqueira 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 noqueira.

Estudo cofinanciado pelos Fundos Europeus Estruturais e de Investimento (FEEL) 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 noqueira. 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.