

XylOut - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação de Doenças Reguladas de Prunus

Garcia, E^{1,2}; Figueira, D^{1,2}; Marrão, R³; Santos, A³; E; Espírito-Santo, C^{1,4}; Bento, A⁵; Costa, J^{1,2}

¹ Centre for Functional Ecology, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Portugal; ² Fitolab, Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes, Coimbra, Portugal; ³ CNCFS - Centro Nacional de Competências dos Frutos Secos, Bragança, Portugal; ⁴ CATAA - Centro de Apoio Agro-Alimentar de Castelo Branco, Portugal.

RESUMO

O impacto das doenças das plantas aumentou drasticamente devido à intensificação, globalização e alterações climáticas sendo responsáveis por mais de 15% das perdas totais apesar do investimento na proteção e controlo. A produção de Prunus não é exceção, sendo severamente afetada pela ocorrência de doenças cuja intensidade e gravidade está a aumentar sem que todos os agentes etiológicos tenham sido identificados.

Neste contexto, o projeto XylOut pretende caracterizar as doenças associadas aos pomares de amêndoa através de métodos dependentes de cultivo e estudar a sua epidemiologia utilizando sequenciação de cadeia longa da Oxford Nanopore Technologies (ONT). Pretende-se ainda conhecer os determinantes de virulência, gama de hospedeiros e avaliar o efeito dos organismos relacionadas com doença na estrutura e funções da microbiota da filosfera de Prunus para identificar grupos taxonómicos relevantes nos mecanismos de proteção das plantas, formando uma base biológica de controlo das doenças. Com base em modelos espaciais baseados nos dados ecológicos e ambientais recolhidos no projeto, inferir e antecipar o risco do estabelecimento e disseminação de doenças em cenários de alterações climáticas.

Foram selecionados amendoais num gradiente de intensidade de boas práticas e ocorrência de doenças para a recolha de material vegetal utilizado para o isolamento de fungos potencialmente patogénicos e caracterização da microbiota (bactérias e fungos). Resultados preliminares permitiram isolar diversos organismos associados à ocorrência de doença em amendoeira pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botryotinia*, *Diaporthe*, *Monilinia*, *Nigrospora*. É de salientar a ocorrência do fungo *Dothiorella ibérica* da família *Botryosphaeriaceae* responsável por cancos no tronco associados a elevados prejuízos.

A caracterização da microbiota destas amostras está em curso o que permitirá determinar a estrutura das populações bem como a ocorrência de outros organismos relevantes no contexto da sanidade vegetal.

MÉTODOS

Na primavera de 2022 foi recolhido e processado material vegetal sintomático (Fig. 1), nomeadamente raminhos e frutos, em diversos pomares de amendoeira selecionados num gradiente de intensidade de boas práticas e ocorrência para o isolamento de fungos potencialmente patogénicos e caracterização da microbiota por métodos independentes de cultivo (bactérias e fungos). Brevemente, segmentos de ramos e frutos sintomáticos foram esterilizados em hipoclorito de sódio a 10% e lavados três vezes em água destilada estéril. O material vegetal foi inoculado em meio de cultura (Potato dextrose agar – PDA), incubado no escuro a 22°C e observados diariamente para o aparecimento de colónias. Todos os isolados foram repicados até à obtenção de culturas puras (Fig. 2), tendo sido posteriormente extraído o seu ADN seguindo o protocolo do kit REDExtract-N-Amp™, tendo a sua integridade sido verificada com recurso a um gel de eletroforese. A identificação dos isolados foi realizada pela amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rRNA com os primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') por PCR convencional, desenvolvido por White et al., (1990). Os amplificados foram purificados e sequenciados através de um serviço subcontratado (STABVIDA). A identificação foi realizada através da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI).



Figura 1. Sintomatologia associada às amostras processadas para isolamento de fungos potencialmente patogénicos

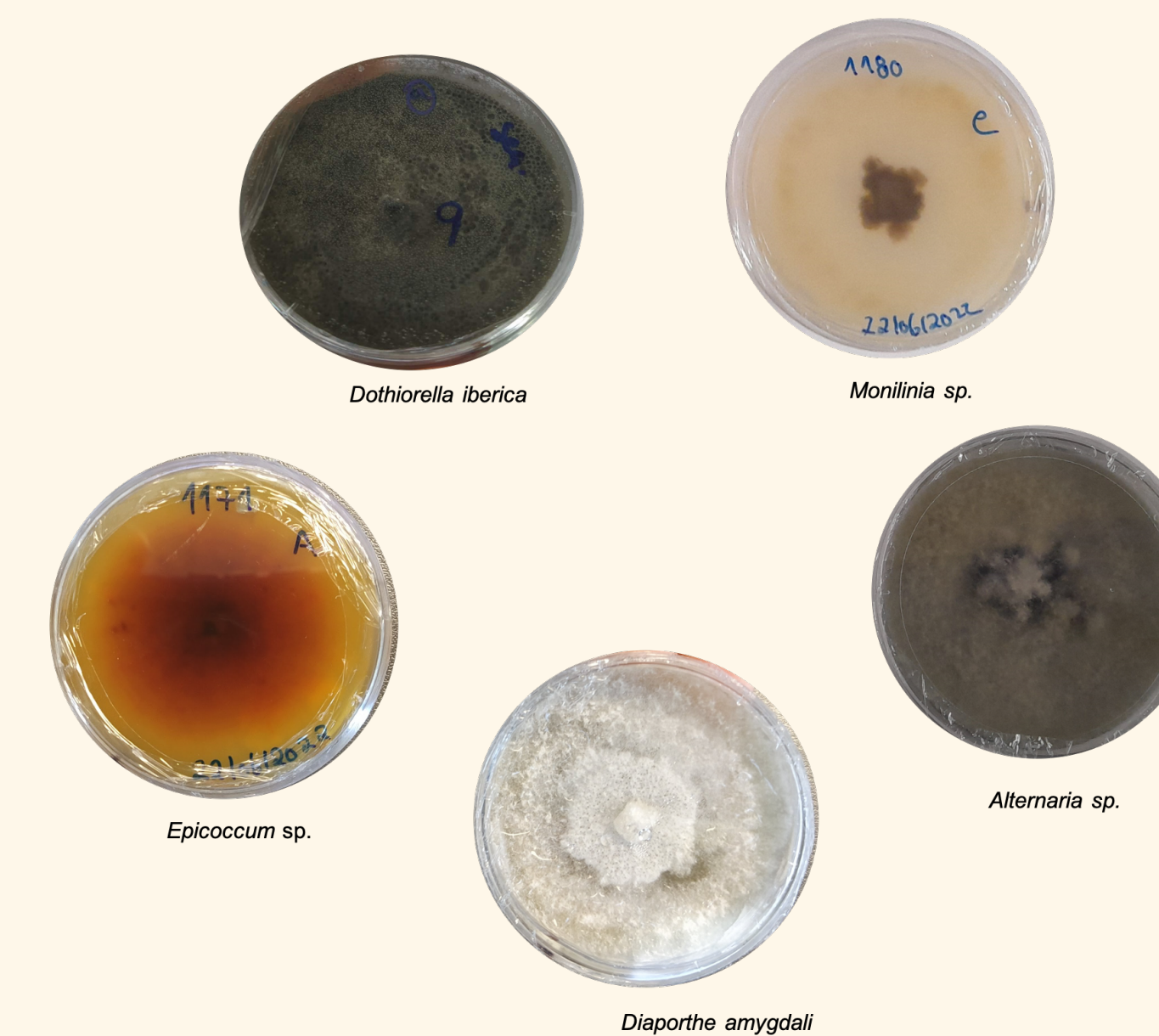


Figura 2. Alguns dos fungos fitopatogénicos isolados a partir de amostras sintomáticas.

RESULTADOS PRELIMINARES

Resultados preliminares permitiram isolar diversos organismos associados à ocorrência de doença em amendoeira pertencentes aos géneros *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botryotinia*, *Diaporthe*, *Monilinia*, *Nigrospora*. A ocorrência destes fungos não é generalizada, estando a sua deteção limitada. Acresce que os géneros *Botryotinia*, *Didymella*, *Fusarium*, *Nigrospora* e *Pithomyces* foram apenas detetados numa das localizações (Fig. 3).

É de salientar a identificação do fungo *Dothiorella ibérica*, da família *Botryosphaeriaceae*, responsável por cancos no tronco associados a elevados prejuízos. A próxima amostragem terá em consideração este resultado reforçando a sua monitorização. Os resultados das análises da microbiota por métodos independentes de cultivo que se encontram em curso permitirão completar estes dados sobre a presença fungos e bactérias potencialmente patogénicas para a cultura da amêndoa.

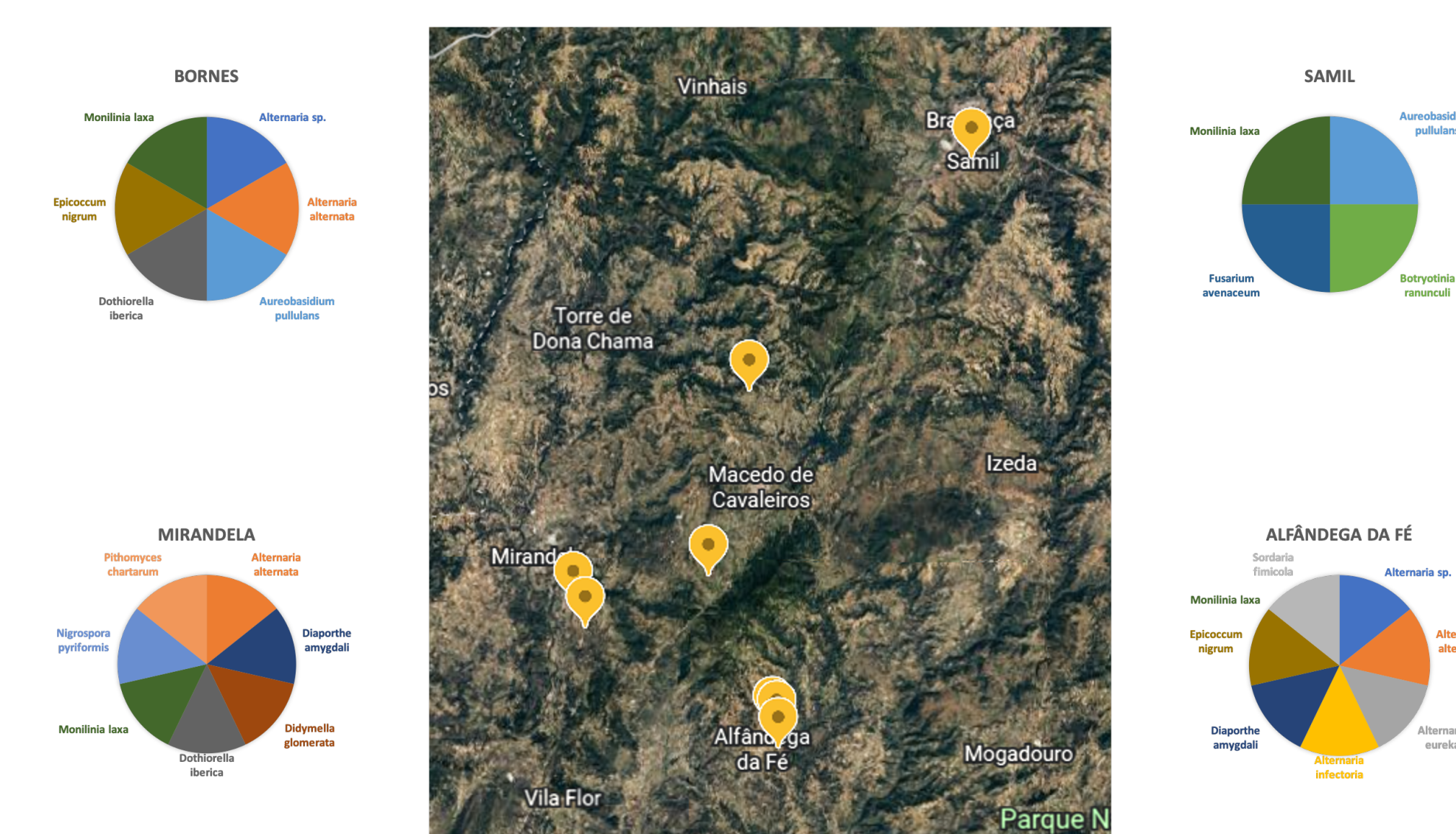


Figura 3. Locais de amostragem e espécies de fungos isoladas por local