

‘*Candidatus Phytoplasma Rubi*’: uma ameaça para a produção de *Rubus* em Portugal

Esmeraldina Sousa, Céu Mimoso, Célia Mateus & Pedro B. Oliveira

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária., UEIS-SAFSV, Av. da República, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, esmeraldina.sousa@iniav.pt.

Resumo

A confirmação por PCR (Polymerase chain reaction) de que o fitoplasma ‘*Ca phytoplasma rubi*’ era o responsável pelos sintomas severos observados em *Rubus* spp. cultivadas e em espécies espontâneas (sebes de silvas) na região de Odemira (Franová, 2016), demonstrou a urgência em se definir uma Estratégia Integrada e Sustentável de controlo da doença, visto a produção de *Rubus* estar em expansão no país. Esta estratégia passa pelo conhecimento do modo de dispersão da doença (vetores) e da definição de meios de controlo eficazes para o qual são necessários estudos de epidemiologia. São apresentados trabalhos de pesquisa em curso no INIAV e aspetos da doença e do seu vetor como forma de alerta e aumento dos conhecimentos gerais por parte dos produtores de amoras de silva.

Palavras-chave: cultura de amora, fitoplasmas, vetores, controle.

Abstract

The confirmation by PCR (Polymerase chain reaction) that the phytoplasma ‘*Ca phytoplasma rubi*’ was responsible for the severe symptoms seen in *Rubus* spp. cultivated and wild species in Odemira region (Franová, 2016), demonstrated the urgent need to define an Integrated and Sustainable Strategy for controlling the disease, since the production of *Rubus* is expanding in the country. This strategy needs the knowledge of how the disease is spread (vectors) and the definition of effective control means; for this we need epidemiological studies. Ongoing research in INIAV will be presented at this conference as well as some aspects of the disease and its vector as a way to alert and increase the general knowledge of blackberries producers.

Keywords: Blackberry crop, phytoplasma, vectors, control.

A doença

Rubus stunt disease (RSD) afeta severamente as diferentes espécies de *Rubus* (framboesa, amora, loganberry, etc); é causada por um fitoplasma designado como ‘*Candidatus phytoplasma rubi*’ que tem como principais vetores os cicadelídeos da espécie *Macropsis* (*Auchenorrhyncha*). O inseto indicado na bibliografia como o vetor mais efetivo é *Macropsis fuscula* Zett (de Fluiter & van der Meer, 1953) presente em Portugal, embora ainda não identificado no sudoeste Alentejano, onde decorrem os trabalhos de pesquisa visando a identificação dos prováveis vetores responsáveis pela transmissão e dispersão da doença na região de Odemira (Mateus et al., 2015).

A identificação das espécies vectoras e a confirmação da sua capacidade de transmitir o fitoplasma entre plantas cultivadas de *Rubus* e/ou entre plantas espontâneas é um dos aspetos epidemiológicos a esclarecer para um controlo eficaz da dispersão da doença na região e/ou entre regiões vizinhas.

Agente causal: fitoplasma e modo de transmissão

Fitoplasmas são organismos unicelulares, procariotas da classe Mollicutes que perderam a parede celular por mutação (erro genético), o que conduziu a uma redução do tamanho do genoma (530 a 1350 kilobases) e à perda de genes como o gene da formação da parede celular; uma membrana lipídica que delimita o conteúdo celular (Weisberg et al., 1989). Vivem à custa do hospedeiro (planta e/ou inseto) e são parasitas obrigatórios de órgãos e tecidos de eucariotas (Weintraub & Beanland, 2006). Localizam-se e sobrevivem em meios isotónicos (hemolinfa dos insetos e floema das plantas vasculares) (fig. 1), reproduzindo-se alternadamente nas células do floema das plantas e nas células do inseto vetor. São responsáveis por centenas de doenças em diversas culturas em todo o mundo.

Hospedeiros

A amora de silva é um membro da família Rosaceae, classificada no género *Rubus*, que contém centenas de espécies. As espécies conhecidas como hospedeiras da doença *Rubus stunt disease* ou dos seus vetores, não está restrito à família Rosaceae (wild *Rubus*; *Rosa canina*), mas também a outros hospedeiros herbáceos (infestantes) como *Malva sylvestris* (Malvaceae). Qualquer espécie de *Rubus* propagada vegetativamente (i.e., excluindo sementes) pode ser hospedeira de RSD.

Os fitoplasmas têm um genoma com capacidade codificante limitada, tendo-se tornado parasitas obrigatórios. Possuindo poucas vias biossintéticas os sintomas visíveis de infeção são tipicamente os mesmos em todas as espécies e cultivares de *Rubus*.

Nas plantas de *Rubus* os sintomas mais vulgares incluem a proliferação dos gomos axilares, sintoma designado como «vassoura de bruxa» (Fig. 2a), com uma profusão anormal dos laterais (emanjericado) (Fig. 2b), numerosos lançamentos, pequenos e finos na base dos lançamentos, ananicamento das plantas e malformação dos frutos com diminuição do seu valor comercial. Como não permite a normal renovação dos lançamentos, em casos mais severos pode levar à morte da planta (Fig. 2c), que será mais rápida caso as mesmas se encontrem afetadas por outras doenças.

Os sintomas podem ser mais ou menos evidentes dependendo de vários fatores e, em particular, da maior ou menor tolerância das variedades e da apetência dos vetores.

As fases de propagação da doença através dos cicadelídeos vetor são as seguintes (Torrubiano, 1998) (fig. 3):

1. fase de aquisição, na qual o inseto adquire o agente patogénico enquanto se alimenta numa planta infetada;
2. fase de multiplicação, em que o fitoplasma atravessa a parede do intestino médio do inseto e se multiplica até alcançar as glândulas salivares (período de incubação);
3. fase de inoculação, durante a qual o inseto infecta outras plantas; a planta uma vez infetada permanece infetada durante o resto da sua vida.

Os cicadelídeos que são vetores do fitoplasma em *Rubus* spp., veiculam a doença planta a planta, durante a alimentação. A longas distâncias o fitoplasma é propagado através de materiais de multiplicação infetados (CFIA, 2012).

Importância económica

A produção de *Rubus*, em particular da amora, está em expansão; nos EUA e em alguns países da Europa ocupava, em 2011, o quarto lugar no consumo de pequenos frutos frescos, a seguir ao morango, mirtilos e framboesa (Strik et al., 2012). Tradicionalmente a amora de silva tem sido considerada a espécie de fruteira menos

afetada por doenças e pragas. No entanto, com o aumento do número de explorações cultivadas com esta espécie e a consequente intensificação das práticas culturais, o número de pragas e doenças tem vindo a aumentar (Clark & Finn, 2011).

As espécies de *Rubus* são propagadas vegetativamente, ficando sujeitas a doenças provocadas por fungos, vírus e fitoplasmas durante o seu desenvolvimento, propagação e frutificação.

De acordo com van der Meer (1987), a RSD pode ter grande impacto económico com graves perdas de colheitas em locais onde a doença se torne epidémica. O primeiro relato sobre a ocorrência de *Rubus stunt disease* em Portugal foi publicado em 1999, por Parente que refere a sua existência em *Rubus* spp. silvestres, na região norte do país (deteção por microscopia eletrónica). Desde o ano 2000 que tem sido referido a presença de sintomas de *Rubus stunt disease* em diversas cultivares de amora no sudoeste alentejano. A situação mais grave ocorreu em 2004, numa plantação em túnel da cultivar Brazos provocando a destruição completa de um hectare de cultura de amora e o posterior abandono por parte do agricultor da produção desta espécie.

Acresce a preocupação de a doença poder dispersar-se para a cultura da framboesa, mais importante na região.

Proteção das culturas contra a RSD

Controlo

Como se referiu, *Rubus stunt disease* é uma doença que pode afetar severamente as espécies de *Rubus*. Não é conhecido germoplasma de *Rubus* spp. imune à doença, daí que se torne indispensável encontrar uma estratégia integrada de gestão da cultura que envolva as várias componentes do sistema (cultura, patogéneo, vetor, infestantes, condições climáticas) (fig. 4) que possa controlar a incidência da doença e conter ou, pelo menos, minorar a sua dispersão.

Para além do uso de material de propagação são nas novas plantações, a gestão fitossanitária das doenças provocadas por fitoplasmas tem de ser enquadrada nas práticas culturais correntes, sempre que a cultura esteja afetada. Devido ao fato de não haver tratamentos curativos contra fitoplasmas, os meios de proteção disponíveis são, na sua maioria, de origem preventiva, culturais e de combate ao vetor:

- usar plantas sãs na instalação das culturas (certificadas);
- efetuar tratamento das estacas de *Rubus* spp. com água quente (“hot-water treatment”);
- eliminar os focos de infeção (inspeção visual dos sintomas e arranque das plantas doentes);
- gerir a envolvente da cultura (e.g. hospedeiros secundários, infestantes...);
- diminuir as populações de insetos vetores, por tratamento com inseticidas químicos ou biotécnicos ou através de outros meios de proteção.

Para que estas medidas sejam realmente eficazes alguns fatores têm de ser conhecidos:

- sensibilidade varietal/cultivar ao patogéneo;
- hospedeiros secundários (focos secundários);
- insetos vetores e a sua capacidade de transmissão.

O desconhecimento da existência de diferentes subgrupos do *Ca. Phytoplasma rubi* numa determinada região, pode levar, por um lado, a erros de diagnóstico e, por outro, a subestimar outros vetores que não os referidos na bibliografia. A gravidade dos sintomas depende também do grau de virulência da ‘estirpe’ do fitoplasma causador da doença. A dispersão depende grandemente da eficácia de transmissão do inseto vetor.

Ponto da situação no sudoeste alentejano

Na Herdade Experimental do INIAV, I.P., localizada na região de Odemira, foram observadas em algumas cultivares diferentes níveis de tolerância à doença, ocorrendo mesmo severos sintomas e morte rápida em algumas cultivares. Recentemente, o fitoplasma *Ca. Phytoplasma rubi* tem sido detetado no hospedeiro secundário *Rubus* spp. silvestres (sebes junto aos caminhos) do sistema agrário da Herdade e, também, em plantas da coleção de espécies existente na Herdade. Foram particularmente atacadas as espécies *Rubus hochstetterorum* e *Rubus henriquesii*. A espécie *Rubus ulmifolius*, ecótipo de ‘Barrancos’, apresentou uma maior tolerância à doença com um período de latência maior e menor intensidade de sintomas, indicando que o grau de suscetibilidade estará relacionado com um fator genético, pois todas as espécies se encontram plantadas nas mesmas condições e próximas, em filas paralelas sob abrigo em rede aberta.

Em 2015 foram realizados estudos de identificação e caracterização molecular do agente causal de RSP em material sintomático de plantas de *Rubus*, em que se confirmou ser o *Ca. Phytoplasma rubi*, fitoplasma do grupo 16srV (Lee et al., 1998) o responsável pela doença. Demonstrou-se ainda que este fitoplasma apresentava um perfil electroforético diferente dos já existentes, pelo que foi proposto um novo subgrupo I, 16 srV-I para este tipo de fitoplasma (Franová et al., 2016).

Os ensaios em curso no INIAV irão contribuir para a definição de uma estratégia integrada de proteção contra a doença. Após identificação específica no laboratório dos insetos potenciais vetores, além de *Macropsis* spp., está, neste momento em curso, a ser realizada a confirmação da infecciosidade destes vetores por nested-PCR/sequenciação ou realtime-PCR. Subsequentemente, serão efetuados ensaios de transmissão, em laboratório, para confirmar se estes são capazes de inocular o patógeno em meio artificial e na fase seguinte, estão previstos ensaios de transmissão em plantas. Nas análises laboratoriais efetuadas em insetos da família Cicadellidae não foram, até ao momento, encontradas espécies infetadas (ensaios a decorrer).

Uma lista das espécies vegetais invasoras que pode ser repositório dos agentes patogénicos e/ou os seus insetos vetores ou a presença no interior ou na zona envolvente das plantações de *Rubus* spp., de plantas consideradas como hospedeiros alternativos, passíveis de funcionarem como focos de infeção ou reintrodução da doença, é, como se referiu atrás, indispensável nos estudos ligados à epidemiologia da doença, ou seja, no esclarecimento do papel que as mesmas desempenham na difusão para outras regiões ou espécies ou na permanência sistemática da doença em determinada região.

Referências

- Clark J.R. & Finn C.E. 2011. Blackberry breeding and genetics. Fruit, vegetable and cereal. Science and Biotechnology 5:27–43.
- CFIA 2012. RMD-09-01: *Rubus* stunt phytoplasma (RSP), the cause of *Rubus* stunt disease. PRA 2000-40. <http://www.inspection.gc.ca/plants/plant-pests-invasive-species/directives/risk-management/rmd-09-01/eng/1330474804915/1330474882989>
- de Fluiter, H.J. & van der Meer, F.A. 1953. *Rubus* stunt, a leafhopper-borne virus disease. Tijdschrift over Plantenziekten 59:195–197.
- Fránová, J., de Sousa, E., Koloniuk, I., Mimoso, C., Matos, J., Cardoso, F., Contaldo, N., Paltrinieri, S. & Bertaccini, A. (2016). Multigene characterization of a new ‘*Candidatus* *Phytoplasma rubi*’-related strain associated with blackberry witches’

- broom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1438–1446.
- Lee, I.M, Gunderson-Rindal, D.E., Davis, R.E & Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153–1169.
- Parente, A.M., Abreu, I. & Salema, R. 1999. Immunodetection of phytoplasmas in wild blackberry in northern Portugal. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106(6):618–623.
- Strik, B.C., Clark, J.R., Finn, C.E. & Buller, G. 2012. Management of primocane fruiting blackberry. Impacts on yield, fruiting season, and cane architecture. *HortScience* 47:593–598.
- Weintraub, P.G. & Beanland, L.A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91–111

Quadros e figuras

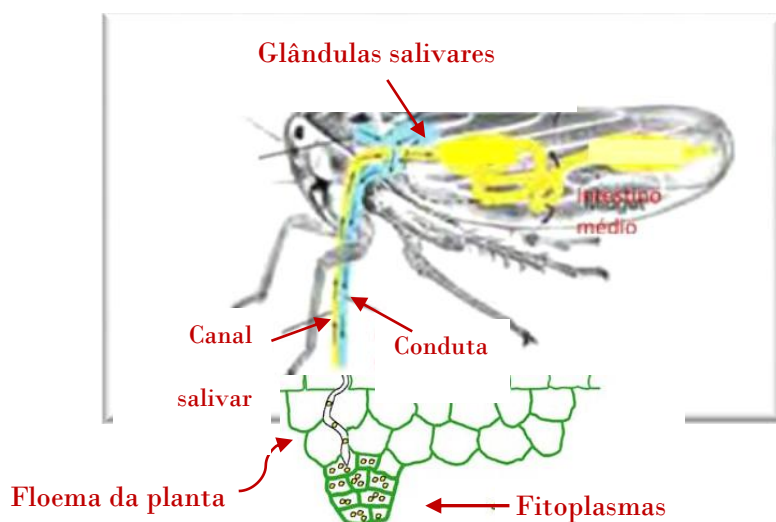
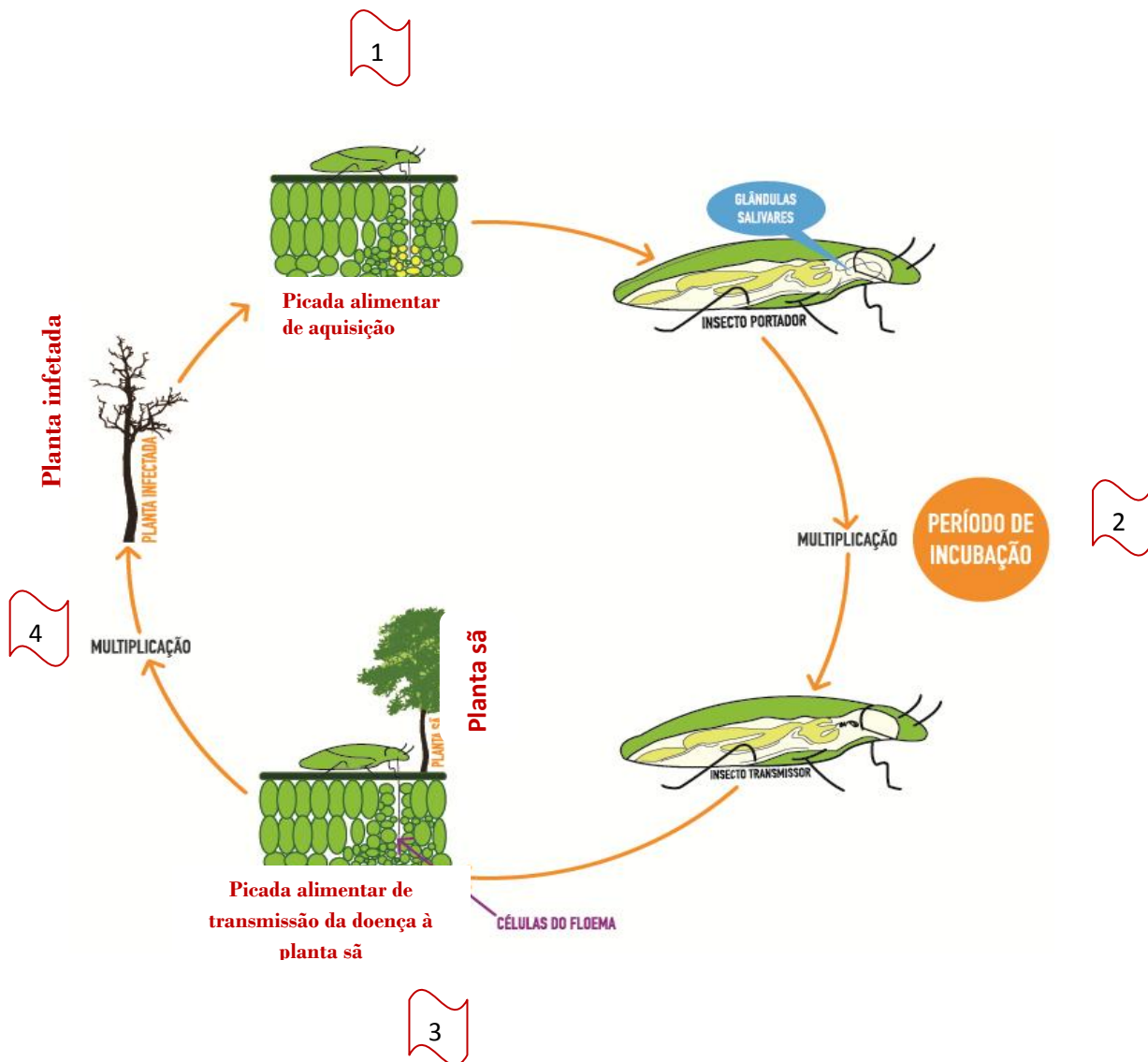


Figura 1. Representação esquemática da aquisição do fitoplasma pelo inseto vetor quando se alimenta nas células das plantas infetadas



Figura 2: Sintomas do fitoplasma *Ca. phytoplasma rubi* em amora de silva ((A) ‘vassoura de bruxa’, (B) emanjericado e (C) quase morte da planta).

Ciclo Hospedeiro / Vector / Fitoplasma



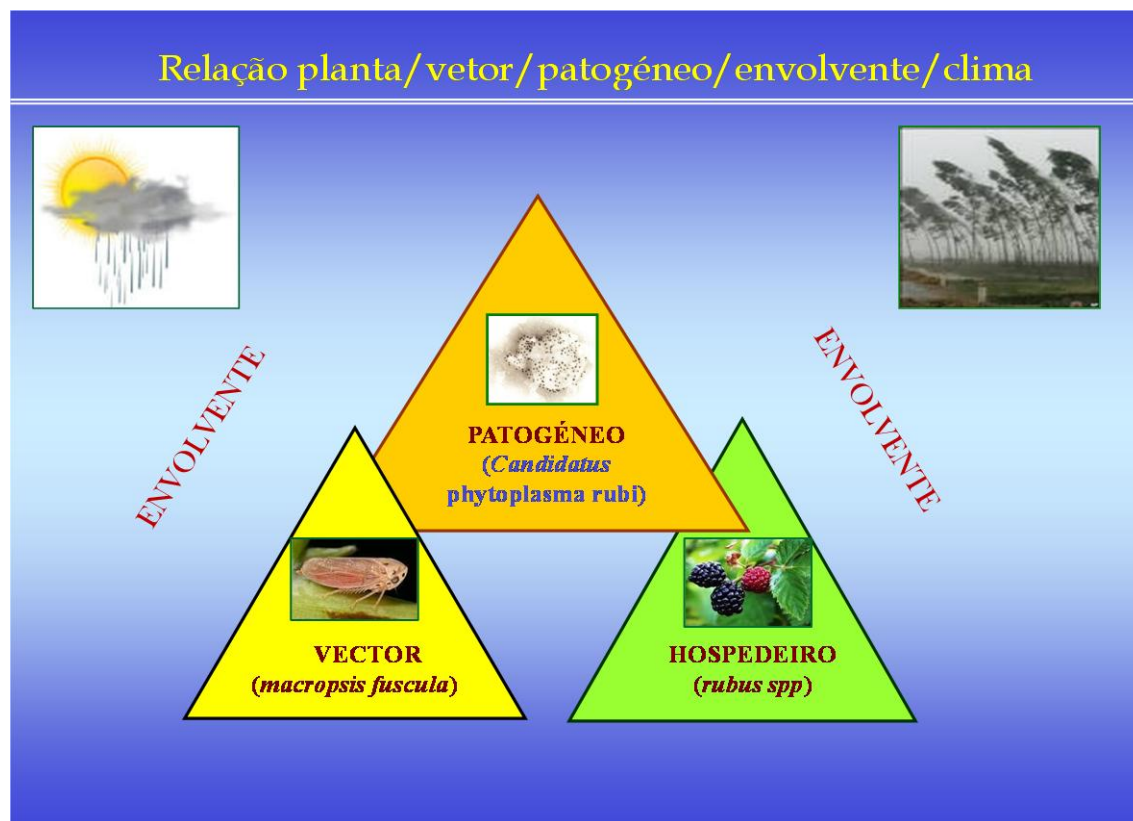


Figura 4. Fatores a ter em conta numa estratégia de proteção integrada das culturas de *Rubus spp.* afetadas por fitoplasmas.