



FIRE4CAST – UMA NOVA FERRAMENTA PARA MONITORIZAÇÃO DE POMARES E PREVISÃO DE SURTOS DA DOENÇA DO FOGO BACTERIANO

Após a deteção dos primeiros focos da doença do fogo bacteriano na região Oeste, foram desenvolvidos esforços conjugados pelos produtores, organizações e serviços oficiais com vista à implementação de medidas eficazes no controlo da doença. Presentemente, a gestão desta doença nos pomares continua a ser necessária, dada a importância económica da fileira. Descrevem-se de seguida os estudos realizados em pomares de pereira na região do Oeste para o desenvolvimento de uma ferramenta de previsão de surtos de fogo bacteriano e de gestão sustentável do seu controlo, adaptada aos sistemas de produção e condições edafoclimáticas portuguesas.

Leonor Cruz^{1,2}, Rogério Tenreiro², Ana Tenreiro², Francisco Pinto², Margarida Gama-Carvalho², Daniel McGuire¹, Joana Cruz¹, Telma Costa², Rui Sousa¹, Miguel Leão de Sousa¹ & Carmo Martins³

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



² Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas (BioISI)



³ Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional



Introdução

Na sequência de grandes focos da doença do fogo bacteriano, na região Oeste em 2010, foram implementadas novas medidas de controlo pelos serviços oficiais, organizações e produtores, conjugadas num Plano de Ação Nacional.

Paralelamente, foram desenvolvidos estudos com financiamento público que visaram, entre outros, otimizar o diagnóstico e proteger o património fitogenético nacional. O projeto internacional Euphresco Phytfire permitiu introduzir e harmonizar as melhores práticas laboratoriais de diagnóstico para deteção de *Erwinia amylovora*, agente causal da doença, na presença de sintomas ou de infeções latentes, quer em pomares quer em viveiros.

Por outro lado, os trabalhos do projeto Proder Inov-Pomo permitiram fazer o saneamento de algumas coleções de recursos fitogenéticos que incluíram clones de pereira ‘Rocha’ e variedades autóctones de pereiras e macieiras, protegendo a diversidade genética existente e evidenciando potenciais fontes de melhoramento genético em função da resistência/tolerância de clones de pereira ‘Rocha’ a *E. amylovora*.

À semelhança dos Estados Unidos e de outros tantos países da Europa, a erradicação da doença não foi até agora possível e a sua gestão continua a ser necessária, dada a importância económica da fileira. Presentemente, o fogo bacteriano afeta as principais regiões de produção de peras e maçãs em Portugal. A doença tornou-se endémica e o seu controlo eficaz requer vigilância exaustiva e a deteção precoce de árvores doentes. O comportamento da bactéria e o aparecimento de novos focos no início de cada ciclo vegetativo ainda não se encontram completamente esclarecidos e a previsão atempada e fidedigna de surtos apresenta fragilidades, apesar da implementação de modelos de previsão da doença. No âmbito do projeto FCT Fire4CAST, entre 2019 e 2022, foram realizados estudos, na região de Alcobça, baseados em dados epidemiológicos e climáticos, avaliando a presença e atividade bacteriana ao longo do ciclo vegetativo em pomares de pereira ‘Rocha’. Estes estudos permitiram esclarecer a atividade de *E. amylovora* e desenvolver uma nova ferr-

menta desenhada para a previsão e gestão da doença do fogo bacteriano nos pomares portugueses.

Enquadramento

Erwinia amylovora afeta uma grande variedade de espécies agrícolas da família das Rosáceas, tendo como principais hospedeiros agrícolas em Portugal as pereiras e as macieiras. A pereira ‘Rocha’ mostra-se particularmente suscetível, tendo a doença vindo a causar elevadas perdas económicas decorrentes do impacto na produção, com potencial destruição das árvores e pomares gravemente afetados ou daqueles em que a gestão da doença é realizada de forma menos eficiente.

A reduzida aderência dos modelos de previsão convencionais à realidade portuguesa, e o seu consequente baixo poder preditivo, leva muitas vezes ao uso errático de tratamentos fitossanitários preventivos e à incapacidade para controlo da infeção.

Algumas falhas destes modelos resultam das particularidades do sistema de produção que associa a presença de uma quase monocultura de um hospedeiro, particularmente sensível, à presença de condições climáticas com temperaturas amenas e condições de elevada humidade relativa, ao longo de todo o ano.

A influência destes fatores permite a observação de uma atividade bacteriana visível durante os meses de inverno, período em que ocorre o repouso ve-



Figura 1 – Sintomas de cancrs ativos nos troncos de árvores de pereira ‘Rocha’ com produção de gotículas de exsudado bacteriano durante os meses de inverno, na região de Alcobça (Fonte: R. Sousa).

getativo do hospedeiro (Figura 1), com produção de gotículas de exsudado bacteriano.

Estas observações em pomares com historial da doença permitem especular acerca do papel do inóculo basal no desenvolvimento das infeções primárias que se observam na primavera e no papel que este poderá ter na antecipação de focos da doença, tradicionalmente associados à floração.

A confirmação destas observações através do estudo e caracterização da bactéria e da epidemiologia da doença nos sistemas de produção prevalentes em Portugal, nomeadamente na região Oeste, foi realizada no âmbito do projeto FCT Fire4CAST. Este estudo permitiu redesenhar o ciclo biológico de *E. amylovora* associado à pereira ‘Rocha’ e desenvolver e implementar um novo modelo preditivo baseado em variáveis climáticas e biológicas, aplicável à gestão mais sustentável de medidas profiláticas e de tratamentos químicos (Figura 2).

Determinação do perfil de *Erwinia amylovora* associado à infeção em *Pyrus*

O acompanhamento de pomares com histórico de fogo bacteriano entre 2019 e 2022 permitiu monitorizar a presença de focos de infeção ao longo de cada ano e avaliar a presença e desenvolvimento de populações bacterianas, em condições naturais de infeção. Foram selecionados pomares produtivos em que a gestão de doenças e pragas decorreu

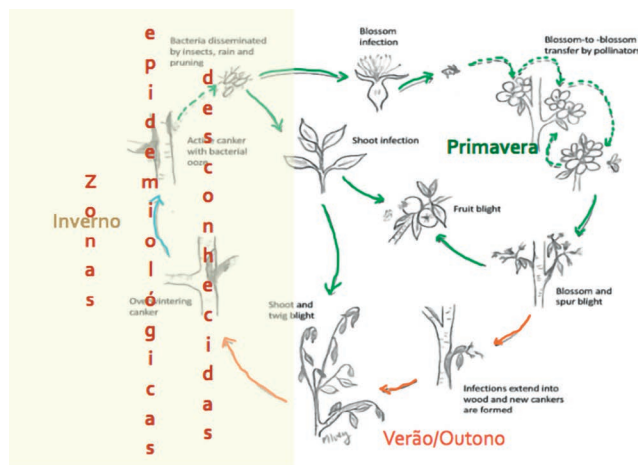


Figura 2 – Ciclo epidemiológico da doença do fogo bacteriano das Rosáceas (adaptado).

através de esquemas de tratamento habituais no controlo da doença do fogo bacteriano.

A par do estudo da atividade bacteriana em tempo real, foi também realizada a caracterização genómica de todas as estirpes de uma coleção de isolados portugueses obtidos desde 2010 e de isolados europeus que fazem parte da coleção de recursos microbiológicos do INIAV. Pretendeu-se deste modo fazer a avaliação de determinantes que condicionam a natureza e virulência das populações portuguesas da bactéria e presentes nesta região, verificando-se a existência de pelo menos duas introduções de material infetado na região, com origens geográficas externas e distintas (Figura 3).

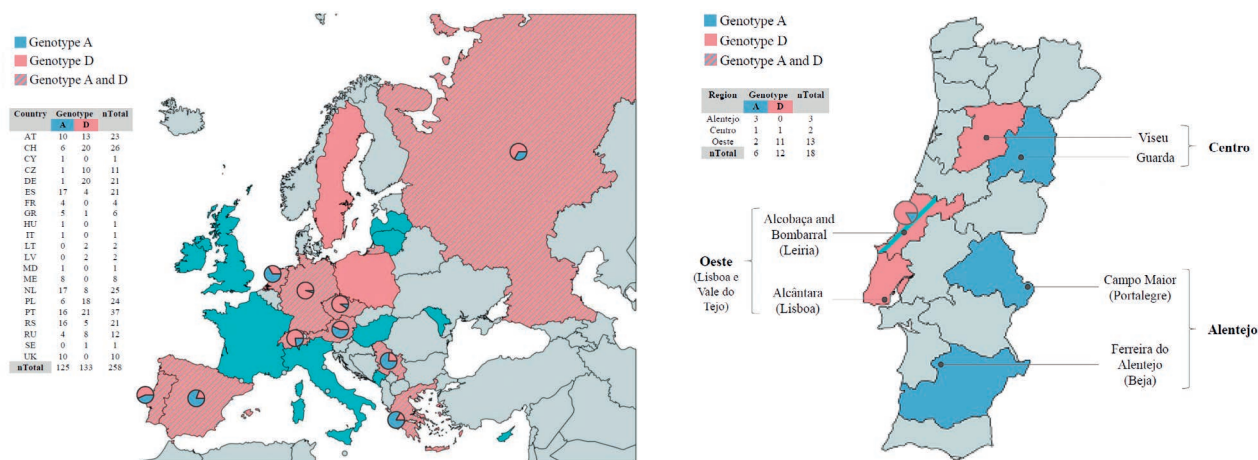


Figura 3 – Diversidade de genótipos (CRISPR) de estirpes de *Erwinia amylovora* que afetam as principais regiões produtoras de peras e maçãs na Europa e em Portugal.

Monitorização da atividade de *Erwinia amylovora* na região Oeste

A monitorização da presença e atividade de *E. amylovora* foi realizada em dois pomares produtivos, selecionados na região de Alcobaça com afastamento geográfico, pertencentes a duas freguesias distintas. Entre os meses de fevereiro e junho, de 2019 a 2022, foram colhidas amostras num conjunto de árvores de cada pomar, tendo-se realizado cerca de 20 amostragens, em paralelo, para cada pomar. Foi também realizada a recolha contínua de dados climáticos através das estações meteorológicas presentes nestes pomares.

O estudo de dados citológicos e genómicos de *E. amylovora* foi realizado com base na utilização conjugada de métodos de diagnóstico imunocitométricos e biomoleculares com vista, não só à deteção da sua presença, mas também à avaliação da sua viabilidade/capacidade patogénica.

A conjugação dos resultados destes testes laboratoriais permitiu documentar e confirmar a suspeita de que uma população bacteriana residual mantinha a atividade nos meses mais frios do ano, tendo a capacidade de manter cancrois ativos no hospedeiro, constituindo um inóculo basal estabelecido e apto para promover infeções inesperadas de fogo bacteriano em condições climáticas específicas, antecipando de forma relevante o risco de infeção muito antes da floração (Figura 4).

Criação e implementação do Modelo Epidemiológico Fire4CAST

Os modelos de previsão convencionais para o fogo bacteriano assentam sobretudo na análise de dados meteorológicos dos pomares e alguns têm também em conta o desenvolvimento vegetativo da espécie hospedeira. De entre os mais conhecidos contam-se o Modelo Marblight, CougarBlight ou o BIS que constituem ferramentas de auxílio à tomada de decisão sobre a gestão de tratamentos fitossanitários e que têm vindo a ser implementados na região Oeste, com uso de dados climáticos específicos da região e tendo em conta os estados de desenvolvimento fenológico da pereira.

Estes modelos não têm, contudo, em conta a presença e atividade microbiana das estirpes autóctones de *E. amylovora*. Assim, no desenvolvimento do modelo preditivo Fire4CAST foram tidos em conta, além de todos os dados climáticos disponibilizados pelas estações meteorológicas locais, os dados fenológicos da variedade de pereira 'Rocha' e os dados biológicos de *E. amylovora* durante o processo epidemiológico, para modelação das condições de infeção, ajustadas à realidade portuguesa (Figura 5). O modelo Fire4CAST baseia-se em oito regras que maximizam o número de alarmes previstos e a percentagem de alarmes verdadeiros. Os alarmes são produzidos sempre que, pelo menos, uma das regras seja cumprida, podendo ser maximizado o

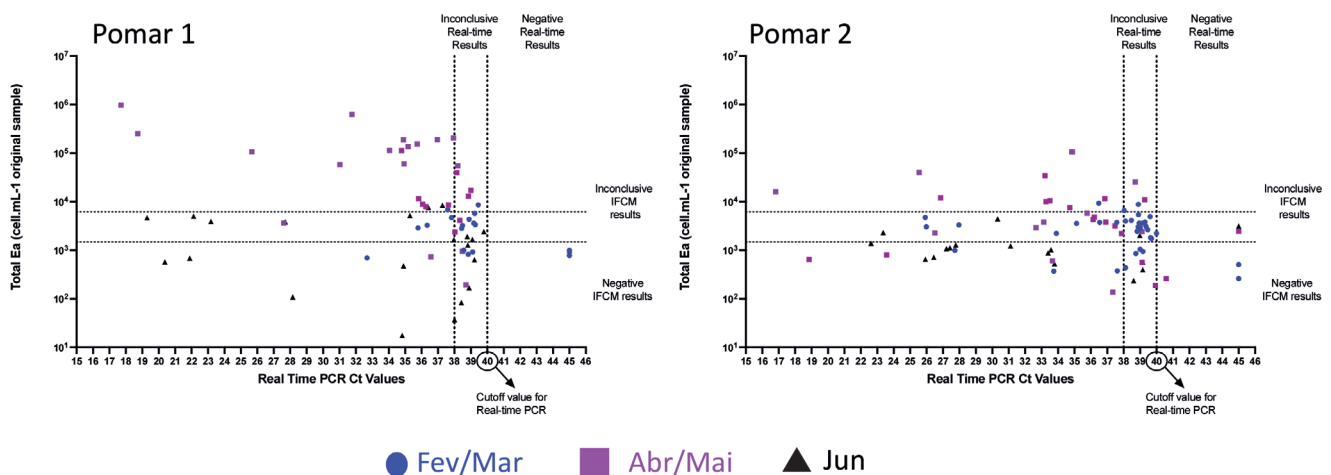


Figura 4 – Distribuição de amostras de ambos os pomares, representadas pela relação obtida entre os resultados dos testes citológicos e biomoleculares, para diferentes amostragens durante o ciclo vegetativo de pereira 'Rocha', evidenciando alterações de atividade e concentração das populações de *Erwinia amylovora*.

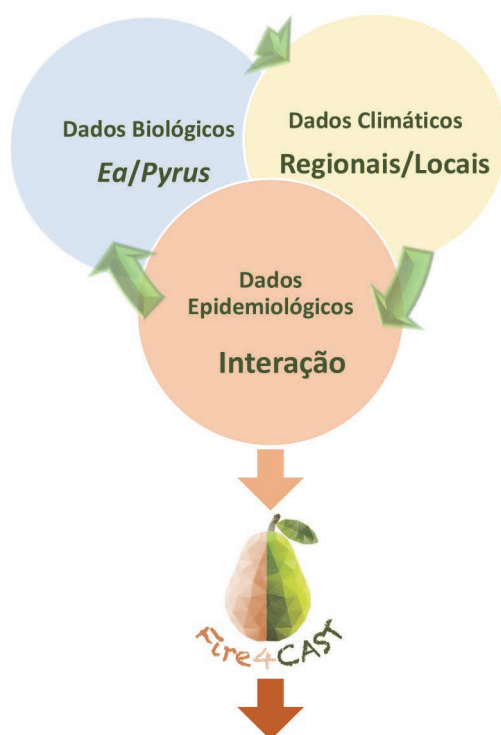


Figura 5 – Representação das componentes utilizadas para modelação epidemiológica e criação do Modelo Fire4CAST.

rigor em função das regras utilizadas. Os melhores resultados são obtidos com valores acumulados nos 4 dias anteriores à emissão do alarme. A análise dos dados obtidos entre 2019 e 2022 identificaram 18 eventos reais de alarme, definidos pelo aumento do número de árvores comprovadamente infetadas

através de análises laboratoriais. A análise comparativa com o modelo CougarBlight permitiu verificar que, enquanto o modelo Fire4CAST fez a previsão de 20 alarmes, dos quais 14 foram reais e apenas seis foram falsos, o modelo clássico fez previsão de 14 alarmes, dos quais apenas seis foram reais e oito considerados falsos. O modelo Fire4CAST demonstrou elevada aderência epidemiológica apresentando assim maior precisão que o Modelo CougarBlight (Figura 6).

Progressos na gestão da doença do fogo bacteriano – aplicabilidade & perspectivas

A caracterização das estirpes portuguesas de *E. amylovora* permitiu observar grande homogeneidade genómica e de virulência para a área geográfica e hospedeiro em estudo.

Os estudos implementados permitem detetar *E. amylovora* em pereiras naturalmente infetadas e distinguir células bacterianas vivas e mortas. A sua conjugação permitiu esclarecer parte desconhecida do ciclo epidemiológico de *E. amylovora* associado aos sistemas de produção e condições climáticas portuguesas, tendo sido confirmada a sua atividade em árvores assintomáticas de pomares com histórico de fogo bacteriano, durante o repouso vegetativo do hospedeiro, com a presença de populações viáveis nos meses mais frios de inverno.

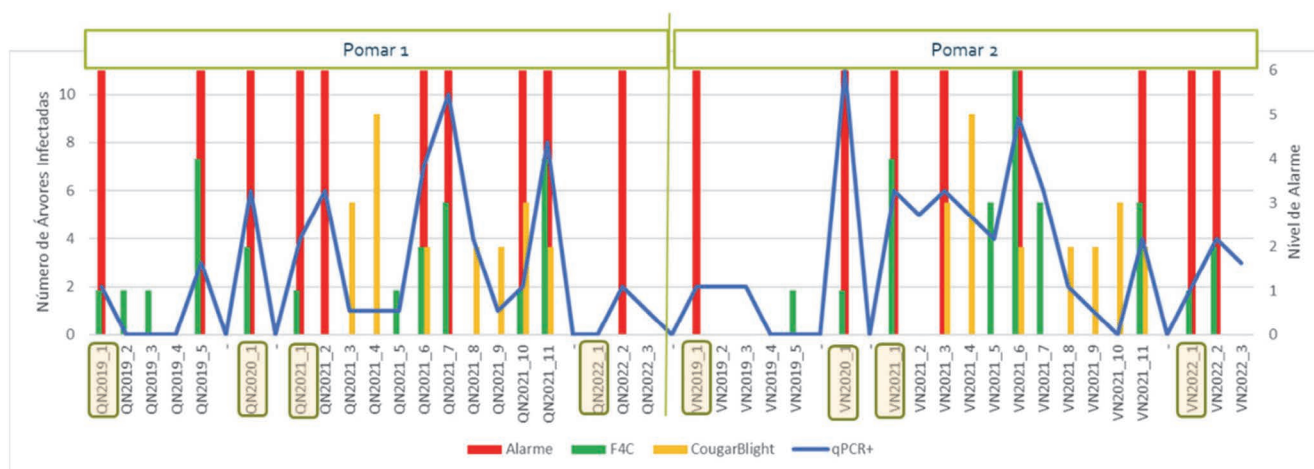


Figura 6 – Apresentação gráfica dos alarmes de fogo bacteriano produzidos pelo modelo Fire4CAST e pelo modelo convencional CougarBlight comparativamente com os alarmes reais comprovados por estudos laboratoriais.

Abril e maio foram considerados os meses em que se determinou a presença de um maior número de células viáveis em pomares produtivos com doença endémica, sendo mesmo abril o mês onde foi detetada maior viabilidade, conforme esperado.

O desenvolvimento da versão expandida do modelo Fire4CAST produziu alertas mais precoces em pomares assintomáticos com histórico de doença, identificando a possibilidade de implementar medidas preventivas precoce e atempadamente com elevado rigor e precisão, uma vez que, tratando-se de um modelo epidemiológico, se encontra adaptado às condições climáticas e sistemas de produção portugueses. 🌱

Financiamento

O projeto Fire4CAST: Uso de tecnologias imunocitométricas e moleculares para modelação epidemiológica do Fogo Bacteriano das Rosáceas (PTDC/ASP-PLA/28305/2017), foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional.

Bibliografia

- Cruz, L. (2011). O Fogo Bacteriano das Rosáceas. Boletim Técnico. INRB/L-INIA/UIPP (BT-05). 2 pp.
- Cruz, L. (2012). Programa de Monitorização do Fogo Bacteriano das Rosáceas. INRB(L-INIA) UIPP 01/12. 15 pp.
- Cruz, L. (2013). Agente causal: deteção e identificação, caracterização fenética e filogenética. In: Cadernos Técnicos n.º 2 Fogo Bacteriano – *Erwinia amylovora*. Eds. Sustinia, Agricultura Sustentável, Lisboa, Portugal. 42 pp.
- DGAV (2014). Plano Nacional de Controlo do Fogo Bacteriano. DGAV, Lisboa, Portugal. 22 pp.
- Gerd, I. (2014). Fire Blight (*Erwinia amylovora*) situation in South Tyrol. Applied Research at Laimburg research centre against flower infection. *First International Workshop: Molecular Basis of Fire Blight*. Abstract Book. Free University of Bolzano. Bolzano, Itália. 1 pp.
- Rezzonico et al. (2011). Diversity, Evolution, and Functionality of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Regions in the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:(11):3819–3829



CRIMOLARA

Produtos Químicos, S.A.



Atens
AGROTECNOLOGIAS NATURAIS S.L.

Bioestimulante radicular para controlo de fungos de solo.



Condor Shield




CRIMOLARA

Produtos Químicos, S.A.

FERTILIZANTE
ORGÂNICO

NPK 6,8I5 + 56% de M.O.



MICORRIZAS

APLICAÇÃO
MANUAL



PLANTAÇÃO
MECÂNICA



Campo Grande, 30 . 8ªH . 1700-093 LISBOA
217 818 940 . geral@crimolara.pt . www.crimolara.pt