

Estudo das interações nemátode-fungos na doença da murchidão do pinheiro - PineEnemy | MycoExplorer

Cláudia Vicente^{1,2} e Maria de Lurdes Inácio¹

¹INIAV, I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Quinta do Marquês, 2780-159 Oeiras, Portugal

²MED - Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Pólo da Mitra, Ap. 94, 7006-554 Évora, Portugal

Introdução

A doença da murchidão do pinheiro (DMP) é uma das maiores ameaças para as florestas de coníferas em todo o mundo, resultando num impacto socioeconómico e ecológico severo nos países afetados. A DMP foi inicialmente detetada em países asiáticos (1905, Japão; 1982-88, China, Coreia do Sul e Taiwan), chegando à Europa e a Portugal em 1999, com a sua deteção na península de Setúbal (Mota *et al.*, 1999). Posteriormente, foi assinalada na ilha da Madeira (Fonseca *et al.*, 2012) e em Espanha (Abelleira *et al.*, 2011), não havendo até hoje nenhuma deteção noutra país europeu. A identificação do agente causal da DMP, o nemátode da madeira do pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, em Portugal levou de imediato à atuação concertada das autoridades nacionais e europeias para a tomada de decisões estratégicas de controlo da dispersão do NMP. Como consequência, foi implementado o plano estratégico de controlo da DMP por parte das autoridades da administração pública, como a Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) e o Instituto da Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) em articulação com unidades de I&D, Federações e Organizações de Produtores Florestais. A atual estratégia nacional de combate à DMP desenvolve-se em diferentes frentes, nomeadamente, na prospeção, amostragem e abate de árvores em declínio; na instalação de armadilhas para o controlo do inseto-vetor do NMP; no tratamento térmico da madeira destinada à circulação dentro e fora de Portugal; na fiscalização do cumprimento das normativas em vigor por parte das autoridades competentes; na promoção de ações de informação e sensibilização dos públicos-alvo; e no investimento em investigação científica nas diferentes vertentes com o objetivo de ampliar o conhecimento acerca da DMP e desenvolver soluções práticas e aplicáveis ao seu combate (Rodrigues *et al.*, 2013).

Os sintomas associados à DMP incluem a redução da produção de resina, amarelecimento e murchidão das agulhas, e secura parcial ou total da copa (Figura 1). Contudo, esta sintomatologia poderá ser igualmente provocada por outros fatores bióticos ou abióticos (como sucede com as árvores afogueadas), obrigando, portanto, à necessária verificação da presença do NMP

em laboratórios designados para a função (e.g., NemaINIAV, sendo o INIAV o Laboratório Nacional de Referência para a Sanidade Vegetal).



Figura 1 - Sintomas da doença da murchidão do pinheiro em pinhal bravo, em Portugal: árvores com a copa seca e acastanhada, rodeadas de árvores sem sintomas (copa verde). Foto de NemaINIAV

Interações Biológicas na DMP

A DMP resulta de uma complexa interação biológica entre três agentes muito distintos: o NMP, *B. xylophilus*; o seu inseto-vetor, *Monochamus* spp. (Coleoptera: Cerambycidae) que permite o transporte e dispersão do NMP; e a árvore hospedeira, maioritariamente *Pinus* spp. (e.g., pinheiro bravo, *P. pinaster*) (Figura 2). A infeção pelo NMP ocorre através da alimentação do inseto-vetor em árvores saudáveis (conhecida por transmissão primária). O NMP entra na árvore e dispersa-se pelo sistema vascular e canais resinosos, alimentando-se das células vivas do parênquima (fase fitófaga do NMP). O ciclo de vida do nemátode é composto por 4 estados juvenis (J_I-J_{IV}) até finalmente passar para o estado adulto, com machos e fêmeas. Em condições favoráveis, o NMP reproduz-se rapidamente podendo completar o ciclo de vida (de ovo a adulto) em apenas 6 dias. Como resultado, os nemátodes bloqueiam a condução de água no xilema, induzindo a produção anormal de metabolitos que contribuem para a cavitação dos vasos condutores, e consequente morte do hospedeiro. Em condições desfavoráveis, como falta de alimento, o NMP muda para estádios de dispersão (J_{III} e J_{IV}), adaptados à transmissão pelo inseto vetor. À medida que a árvore entra em declínio, o NMP passa a alimentar-se dos fungos que coabitam esse hospedeiro, nomeadamente os fungos do azulado da madeira (fase micetófaga do nemátode). Os números de NMP na árvore infetada

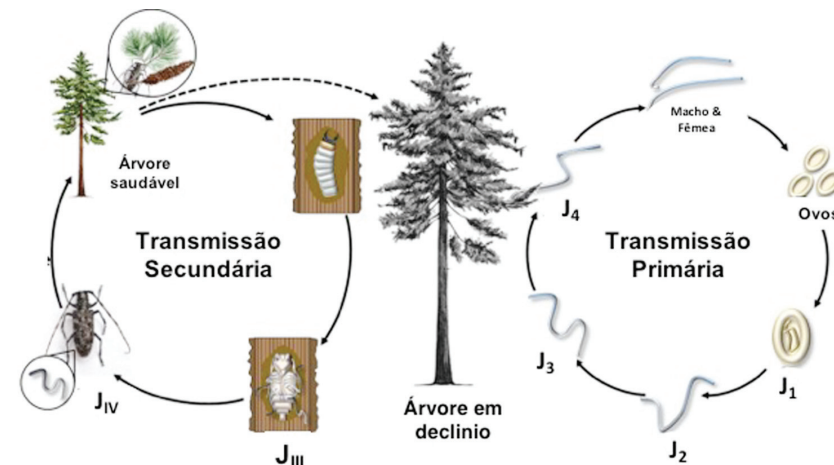


Figura 2 - Ciclo de vida do nemátode da madeira do pinheiro *Bursaphelenchus xylophilus* (Adaptado de Lee *et al.*, 2020, MCT 17: 1-13)

podem variar entre 1000 e 10000 nemátodes por grama de madeira, dependendo da idade do hospedeiro e da extensão de colonização pelos fungos do azulado. As árvores mortas ou em declínio são ambientes atrativos para a oviposição do inseto-vetor através da qual o NMP pode ser de novo transmitido (transmissão secundária). Antes da emergência do inseto-vetor, os NMPs evoluem para o estado J_{IV}, também conhecido por estágio *dauer*, agregando-se nas câmaras pupais até entrarem para os insetos através das suas aberturas naturais (e.g., espiráculos) (Futai, 2013). Para além dos agentes da DMP já descritos, outros fatores são considerados como adjuvantes da doença, nomeadamente as condições climáticas (e.g., temperaturas elevadas permitem acelerar o ciclo de vida do NMP e consequentemente o declínio da árvore) bem como as comunidades microbianas (bactérias e fungos) da árvore hospedeira.

Investigação & Desenvolvimento: do PineEnemy ao MycoExplorer

Financiado em 2018 através do Programa Operacional Regional de Lisboa e do Alentejo no âmbito dos projetos de Investigação Científica e Tecnológica da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), o projeto **PineEnemy** - Estudo das interações nemátode-fungos na doença da murchidão do pinheiro (LISBOA-01-0145-FEDER-028724) (c.a. 202.350,00 euros), liderado pelo INIAV, tem como principal objetivo o esclarecimento da estrutura e dinâmica das interações entre o nemátode e a comunidade fúngica que lhe está associada no contexto da DMP, de modo a contribuir para a implementação de novas abordagens para o controlo da doença. A micobiota (comunidade de fungos) associada à DMP foi caracterizada em três regiões do país (considerados focos graves da doença em Portugal) através de duas abordagens distintas e complementares: isolamento dos fungos em cultura e descrição por análise metagenómica recorrendo a tecnologias de sequenciação massiva. Foram assim identificados fungos antagonistas do NMP com propriedades nematocidas capazes de reduzir significativamente a multiplicação do nemátode (em

cerca de 80-90%, dados não publicados). O **MycoExplorer** - Micobiota antagonista no combate da doença da murchidão do pinheiro, surgiu do decorrer destes trabalhos, e visa explorar o potencial do biocontrolo da micobiota natural do pinheiro bravo para o desenvolvimento de um produto biológico natural, de fácil aplicação em árvores já afetadas pelo NMP. É composto por quatro fases: duas fases inerentes à investigação com análise transcriptómica [estudo do conjunto de transcritos (RNAs) sendo, portanto, o reflexo direto da expressão dos genes], e análise metabólica [identificação e quantificação dos metabolitos produzidos] dos fungos já identificados pela sua ação nematocida relativamente ao NMP; uma terceira fase de aplicação em campo, também conhecida por *proof-of-concept*, e a fase final de transferência de conhecimento à comunidade e principais *stakeholders*. O **MycoExplorer** irá desvendar e compreender quais os compostos bioativos da micobiota responsáveis pelo efeito nematocida do fungo. O carácter inovador do projeto **PineEnemy|MycoExplorer** foi distinguido na 7ª Edição do Prémio Empreendedorismo e Inovação 2020 organizado pelo Crédito Agrícola na categoria de Sustentabilidade na Produção e Transformação (valor de 5000 euros).



Figura 3 - Equipa do NemaINIAV (da direita para a esquerda): Filomena Nóbrega, Maria João Camacho, Margarida Fontes, Lourdes Silva, Maria de Lurdes Inácio, Leidy Rusinque, Marina Cardoso, Cláudia Vicente

Referências

Mota *et al.*, 1999. *Nematology* 727-734.
Abelleira *et al.*, 2011. *Plant Diseases*, 95:76.
Fonseca *et al.*, 2012. *Helminthologia* 49:96-103.
Rodrigues *et al.*, 2013. *Doença da Murchidão do Pinheiro na Europa: Interações Biológicas e Gestão Integrada*. FNAPP, pág.13-32