

Primeira deteção em Portugal de *Monilinia fructicola* em pomares de *Prunus persica*

Elsa Baltazar¹ e Joana Costa^{1,2}

¹Universidade de Coimbra, Centre for Functional Ecology – Science for People & the Planet, Laboratório Associado TERRA, Departamento de Ciências da Vida, Coimbra; ²Instituto Pedro Nunes, Laboratório de Fitossanidade, Coimbra

A principal área de produção de *Prunus persica* em Portugal situa-se na região da **Cova da Beira**, caracterizada pela produção de **várias espécies de prunóideas**, nomeadamente, cereja, pêssago e nectarina.

Em **2021 foi reportado um declínio anormal de pessegueiros** na região da Cova da Beira com morte parcial ou total de algumas plantas. No decorrer do projeto Cultivar, e em colaboração com as associações de produtores locais APPIZEZERE e AAPIM, foram realizadas nas primaveras de **2021 e de 2022 inspeções e prospeções de campo** em pomares de pessegueiro e nectarina na tentativa de identificar o agente responsável.

A sintomatologia observada era diversa, mais proeminente na **região a norte da Serra da Gardunha**, delimitada a vermelho na **Figura 1**. Os **sintomas mais observados** incluíam: cancos nos ramos e troncos, presença abundante de gomose em algumas árvores, ramos secos, **abortamento floral com libertação de goma de cor âmbar, presença de frutos mumificados nas árvores e morte parcial ou total de algumas plantas**.

Com base na sintomatologia observada focou-se a investigação na **deteção e identificação de fungos** potencialmente fitopatogénicos.

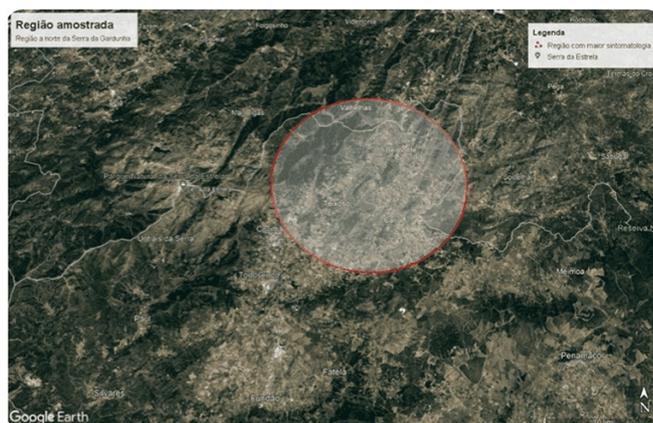


Figura 1. Delimitação da região amostrada localizada a Norte da Serra da Gardunha

PODRIDÃO CINZENTA (*MONILINIA SP.*)

A podridão cinzenta ou moniliose é causada por **três espécies de fungos** do género *Monilinia*, *M. fructigena*, *M. laxa* e *M. fructicola*, sendo a **última classificada como organismo de quarentena** pertencente à Lista A2 da OEEP/EPPO em pessegueiros, responsável pelo declínio e morte gradual das plantas.

M. fructicola encontra-se presente na **América, Austrália e Japão** (van Leeuwen et al., 2001). Em **contexto**

europeu foi detetada em inúmeros países: Áustria, República Checa, França, Alemanha, Hungria, Itália, Suíça, Reino Unido e Espanha, entre outros (EPPO, 2018). Este agente patogénico foi detetado pela **primeira vez em França em 2001** em pomares de pessegueiro (EPPO, 2002). Já em **Espanha foi detetado em março de 2006** em pêsegos mumificados localizados em pomares de Sudanell (Lleida, Espanha).

Flores, ramos e frutos são os principais órgãos vegetativos afetados por este fungo, sendo o sintoma mais observado a necrose da flor; já nos ramos provoca cancrios. Os frutos são também suscetíveis permanecendo mumificados e presos à árvore. Estes sintomas foram observados em alguns dos pomares amostrados (Figura 2).



Figura 2. Sintomas de moniliose observados na Cova da Beira.

A presença de moniliose na região está descrita há **vários anos com sintomatologia característica**, mas **sem grande impacto na produção**. Esta ocorrência fez com que até à data fosse atribuída à presença de espécies *Monilinia* sp. menos agressivas (*M. laxa*, *M. frutigena* e *M. polystoma*). No entanto, a **elevada mortalidade e severidade dos sintomas observados** entre as campanhas em alguns dos pomares de *P. persica* levou-nos a questionar qual a espécie presente.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a identificação do agente causal responsável pelo declínio de pessegueiros recentemente observado em algumas produções da região da Cova da Beira.

METODOLOGIA

Foram recolhidas amostras de material vegetal sintomático (ramos e flores) de pomares de pêsego e nectarina da região da Cova da Beira. O material vegetal foi acondicionado no frio e processado no laboratório em menos de 24h. Os raminhos sintomáticos foram seccionados em pedaços menores e divididos em duas subamostras analisadas separadamente **através da identificação molecular dos isolados e pela identificação molecular a partir de ADN total extraído de tecidos infetados** (Figura 3).

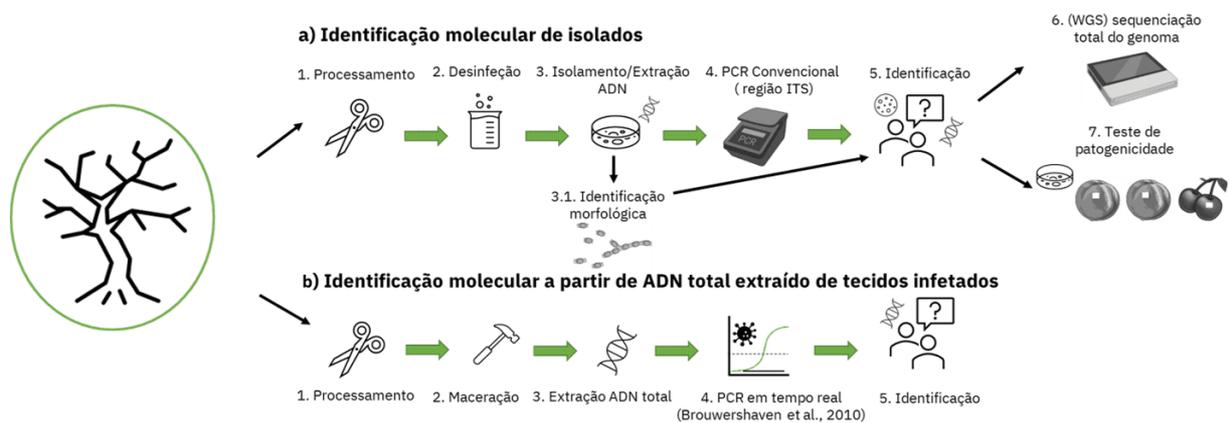


Figura 3. Diferentes abordagens para a identificação molecular de *Monilinia* sp.

Identificação molecular de isolados

A superfície do material vegetal foi previamente desinfetada com **hipoclorito de sódio** e lavada em água destilada estéril dentro de uma câmara de fluxo laminar vertical. O **material vegetal foi inoculado** em placas de petri contendo **meio de cultura PDA**, adicionado de 0,5 (g/l) de estreptomicina para prevenir o aparecimento de bactérias e **incubadas a 22°C ao escuro**. As placas foram observadas diariamente com o objetivo de **identificar morfológicamente** diferentes estruturas fúngicas, seguindo-se o seu **isolamento e repicagem** até à obtenção de cultura pura. A identificação molecular foi realizada a partir da extração de ADN da cultura pura isolada com o kit REExtract-N-Amp™, através da 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 de comparação das sequências obtidas com a da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI)**.

Identificação molecular a partir de ADN total extraído de tecidos infetados

A **extração de ADN** total de fragmentos sintomáticos recolhidos diretamente **a partir de material vegetal** foi realizada de acordo com a **Norma OEPP/EPPO (2020) PM 7/18 (3) *Monilinia fructicola***, Apêndice 3, por kit de extração de DNA comercial DNeasy Plant Kit (Qiagen), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. A **identificação molecular** foi realizada através do protocolo de PCR em tempo real descrito na Norma OEPP/EPPO (2020) PM 7/18 (3) *Moniliniafructicola*, Apêndice 3, que permite distinguir *M. fructicola* de *M. laxa*, *M. frutigena* e *M. polystoma*.

Sequenciação total do genoma e teste de patogenicidade

De forma a inequivocamente confirmar a deteção de *M. fructicola* foi realizada a **sequenciação total do genoma** de um dos isolados. Para tal o ADN total foi extraído com o KIT LUCIGEN (Biosearch Technologies). A sequenciação foi realizada com **recurso à plataforma Nanopore Oxford Technology** em colaboração com o Centro de Apoio Agro-Alimentar de Castelo Branco (CATAA).

Para confirmar que a sintomatologia observada em campo e típica de moniliose era causada pelos isolados identificados como *M. fructicola*, foram aplicados os princípios do postulado de Koch. Um dos isolados de *M.*

fructicola foi inoculado em pêssego, nectarina e cereja. Como controlo foi usado um conjunto de frutos inoculados com meio de cultura PDA sem fungo. Os frutos foram incubados em câmara húmida a 22°C e observados diariamente durante cinco dias. Após cinco dias, o micélio presente nos frutos inoculados foi reisolado em meio de cultura PDA e a identificação do fungo realizada por PCR em tempo real como previamente descrito na norma anteriormente referida.

RESULTADOS

Identificação morfológica

As colónias suspeitas de *Monilinia sp.* apresentavam **tons acinzentados** (Figura 4.B) e produziam **conídios abundantes**. A esporulação apresentou anéis concêntricos e os **macroconídios eram elipsoides unicelulares**, hialinos (cinza-amarelo/bege) e em forma de limão (Figura 4.C), correspondendo aos critérios morfológicos descritos na norma OEPP/EPPO (2020).



Figura 4. A. Imagem representativa da inoculação de material vegetal em meio de cultura PDA; B. *M. fructicola* isolada em placa de petri; C. Estruturas morfológicas de micélio de *M. fructicola* coradas com azul de algodão.

Ainda segundo a mesma norma, as espécies de *Monilinia sp.* são muito difíceis de distinguir, embora seja possível combinar características da cultura, como parâmetros de crescimento e características morfológicas (Van Leeuwen & Van Kesteren, 1998; De Cal & Melgarejo, 1999). No entanto, os métodos clássicos não são suficientes para o diagnóstico fitossanitário, pelo que a **norma obriga à identificação molecular por PCR convencional ou em tempo real, diretamente a partir da amostra (tecido hospedeiro ou micélio), ou após isolamento.**

Identificação molecular

O isolamento de *M. fructicola* foi confirmado em **cinco amostras oriundas de dois pomares** com base na sequenciação do primer ITS4, as sequências foram comparadas com as existentes na base de dados **NCBI revelado que partilha 99% de similaridade** com sequências de isolados de *M. fructicola* da Holanda (MH864497.1) e da Sérvia (MT804333.1).

A metodologia com base na Norma OEPP/EPPO (2020) PM 7/18 (3) aplicada aos extratos vegetais de ADN total de ramos sintomáticos, permitiu a **deteção de *M. fructicola* em 10 amostras oriundas de quatro pomares** através de PCR em tempo real.

Sequenciação total do genoma e teste de patogenicidade

A **sequenciação total** do genoma da estirpe (160E) confirmou a sua identificação.

O **teste de patogenicidade foi considerado positivo** quando se observou o aparecimento de micélio cinzento (Figura 6 d,e,f) característico de *Monilinia* sp. nos frutos inoculados, não se registando sintomatologia característica de moniliose nos frutos controlo (Figura 6 a,b,c). **O ensaio molecular confirmou a identificação de *M. fructicola* após o teste de patogenicidade.**

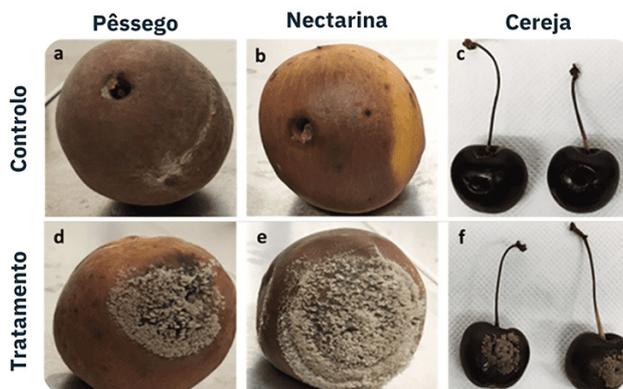


Figura 6. Teste de patogenicidade, com inoculação de isolado de *M.fructicola* em frutos, imagens recolhidas após 5 dias de incubação, (1) pêssego, (2) nectarina e (2) cereja.

CONCLUSÃO

M. fructicola foi detetada em **cinco amostras** oriundas de **dois pomares da região da Cova da Beira, confirmada morfológica e molecularmente**. Foi ainda detetada molecularmente em outras 10 amostras de quatro outros pomares da região. A sequenciação total do genoma confirmou mais uma vez a identificação como *M. fructicola*. **O teste de patogenicidade foi considerado positivo**. Com base nos resultados obtidos reportamos a **primeira deteção em Portugal** de *M. fructicola* em pomares de *P. persica*.

BIBLIOGRAFIA

- De Cal, A., & Melgarejo, P. (1999). Effects of long-wave UV light on *Monilinia* growth and identification of species. *Plant Disease*, 83(1). <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.1.62>
- EPPO (2002) Reporting Service 2002/003 First reports of *Monilinia fructicola* in France No. 1. Paris, 2002-01-01. <https://gd.eppo.int/media/data/reporting/rs-2002-01-en.pdf> (última consulta 09/01/2023)
- EPPO (2018) EPPO Global database. <https://gd.eppo.int/> (última consulta 09/01/2023).
- EPPO (2020) PM 7/18 (3) *Monilinia fructicola*. EPPO Bulletin, 50(1). <https://doi.org/10.1111/epp.12609>
- Van Leeuwen GCM, Baayen RP & Jeger MJ (2001) Pest risk analysis (PRA) for the countries of the European Union as PRA area on *Monilinia fructicola*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31, 481–487.
- Van Leeuwen, G. C. M., & Van Kesteren, H. A. (1998). Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 76(12). <https://doi.org/10.1139/cjb-76-12-2042>