

# OCORRÊNCIA DE *PHYTOPHTHORA RAMORUM* EM PORTUGAL SOBRE *VIBURNUM* SPP

## OCCURRENCE OF *PHYTOPHTHORA RAMORUM* IN PORTUGAL ON *VIBURNUM* SPP

MARIA DE JESUS GOMES<sup>1</sup>, PALMIRA TEODÓSIO AMARO<sup>1</sup>

### RESUMO

O patogéneo *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov. consta da Lista de Alerta OEPP (EPPO, 2002) e está sujeito a medidas regulamentares de emergência, estabelecidas pelas Decisões da Comissão Europeia: n<sup>os</sup> 2002/757/CE, 2004/426/CE e 2007/201/CE. Portugal, para dar cumprimento a estas medidas, pôs em execução um programa nacional de prospecção deste organismo prejudicial. No âmbito desse programa, em Novembro de 2006 e pela primeira vez no nosso país, foi detectada e identificada *P. ramorum*, em *Viburnum* spp. A identificação foi feita com base nas características culturais e morfológicas dos isolados. A patogenicidade deste organismo foi comprovada em folhas destacadas de *Viburnum* sp.

**Palavras-chave:** Lista de Alerta OEPP, *Phytophthora ramorum*, prospecção, *Viburnum* spp.

### ABSTRACT

The pathogen *Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov. is part of the EPPO Alert List (EPPO, 2002) and is subject to emergency regulation measures, established by the decisions no. 2002/757/CE, 2004/426/CE and 2007/201/CE of the European Commission. To comply with these decisions, Portugal has put in execution a national program to survey this harmful organism. As part of this program, in November 2006 and for the first time in Portugal, *P. ramorum* was detected and identified on *Viburnum* spp. The identification was made using the morphological and cultural characteristics of the isolates. The pathogenicity of this organism was verified on detached leaf of *Viburnum* sp.

**Key-words:** EPPO Alert List, *Phytophthora ramorum*, survey, *Viburnum* spp.

### INTRODUÇÃO

*Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in't Veld sp. nov., é um patogéneo grave em plantas ornamentais e florestais, na Europa e Estados Unidos. Foi identificado pela primeira vez na Alemanha e Holanda em 2001, a partir de plantas de *Viburnum* e *Rhododendron* (Werres *et al.*, 2001), causando morte de ramos e necroses foliares, podendo mesmo levar à morte das plantas. Em 2002, Rizzo e colaboradores identificam *Phytophthora ramorum* como agente responsável pela grande mortalidade de várias espécies de carvalhos nos Estados Unidos,

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB), Tapada da Ajuda, Edifício 1, 1349-018 Lisboa

Comunicação apresentada no 5<sup>o</sup> Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, Coimbra, 2007

onde a doença é conhecida por “sudden oak death” (SOD) (Rizzo *et al.*, 2002).

Na União Europeia têm sido tomadas medidas de emergência desde 2002, para evitar a introdução e dispersão da doença. Apesar de todos os esforços, *Phytophthora ramorum* está hoje presente na grande maioria dos países europeus, e a lista de plantas susceptíveis aumenta dia a dia, sabendo-se hoje, que já foi detectada em mais de 50 espécies vegetais.

A partir de 2003, Portugal pôs em execução um programa nacional de prospecção, no âmbito do qual foram analisadas 104 amostras de plantas ornamentais e florestais, 25 das quais se revelaram positivas. Neste trabalho descrevem-se os estudos realizados que conduziram à detecção e identificação de *Phytophthora ramorum*, assim como os ensaios de patogenicidade realizados para dar cumprimento aos postulados de Koch.

## MATERIAL E MÉTODOS

As análises incidiram sobre 104 amostras, de plantas ornamentais, fundamentalmente *Viburnum* spp., *Rhododendron* spp., *Camellia japonica* e de algumas espécies florestais susceptíveis (*Quercus rubra*, *Ilex* sp., *Acer* sp., *Arbutus unedo*), provenientes das regiões agrárias do Ribatejo e Oeste, Beira Litoral, Alentejo e Entre Douro e Minho

O material vegetal com sintomas foi lavado em água corrente durante 4 horas, para eliminar os contaminantes existentes à superfície. A seguir, fragmentos retirados da zona de transição das lesões foram lavados em água esterilizada, secos em papel de filtro e semeados em placas de Petri contendo “Cornmeal agar” a que se adicionou pimaricina, ampicilina, rifampicina, pentacloronitrobenzeno (PCNB) e himexazol (P<sub>5</sub>ARP-H) (Jeffers & Martin, 1986). As placas foram incubadas a 22 °C, no escuro, durante 5 dias. Ao fim deste período, todos os isolados suspeitos foram repicados para placas contendo “Carrot piece agar” (CPA) (Werres *et al.*, 2001), incubadas a 22 °C com fotoperíodo de 12 horas, durante 5 dias.

Para um despiste rápido do patogéneo, fragmentos da zona de transição das lesões foram também colocados em solução de Petri, com vista à formação das frutificações do patogéneo.

Para a formação dos órgãos sexuais, foram realizados cruzamentos interespecíficos. Todos os isolados em estudo foram cruzados com os de *Phytophthora cryptogea* de compatibilidade conhecida, A1 e A2, gentilmente cedidos pela Dra. Sabine Werres (BBA 65909 A1 e BBA 63651 A2). Os cruzamentos interespecíficos foram realizados de acordo com Werres (comunicação pessoal). De cada isolado foi retirado um disco da margem da colónia e colocado numa placa de Petri contendo CPA. Na mesma placa e em posição diametralmente oposta, foi colocado um disco contendo um isolado de *Phytophthora cryptogea* de compatibilidade conhecida (A1 ou A2). As placas foram incubadas a 20 °C, às escuras e observadas à lupa semanalmente, até se detectar a presença dos órgãos sexuais. Placas de controlo foram preparadas do mesmo modo, emparelhando o isolado de *Phytophthora cryptogea* “mating type” A1 com o isolado de *Phytophthora cryptogea* “mating type” A2.

Os ensaios de patogenicidade realizaram-se em folhas destacadas de *Viburnum* sp.. Utilizaram-se dois métodos de inoculação distintos. No primeiro método, as folhas foram cortadas e desinfectadas com hipoclorito de sódio, a seguir lavadas com água estéril e, por fim, mergulhadas durante cinco minutos em água esterilizada à qual se havia adicionado meio de cultura (CPA) contendo o isolado em estudo. Posteriormente foram colocadas em câmara húmida e incubadas a 20-22 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante oito dias. Os controlos negativos foram preparados de igual modo, tendo sido inoculados com água estéril contendo CPA. No segundo método, as folhas foram desinfectadas com hipoclorito de sódio, lavadas com água estéril, e feridas ligeiramente. Sobre as feridas foi depositada uma gota de água estéril, na qual se colocou um disco de gelose que continha o isolado em estudo e as folhas foram

depois tratadas como no método anterior. Os controlos negativos foram preparados de igual modo, tendo sido inoculados com discos de CPA. Após o período de incubação, procedeu-se ao reisolamento do patogéneo, semeando fragmentos da zona de transição das lesões em meio de cultura (P<sub>5</sub>ARP-H).

## RESULTADOS

Só os isolados obtidos a partir das amostras de *Viburnum* spp. se revelaram positivos.



**Figura 1** – Manchas necróticas nas folhas.



**Figura 2** – Planta com necroses.

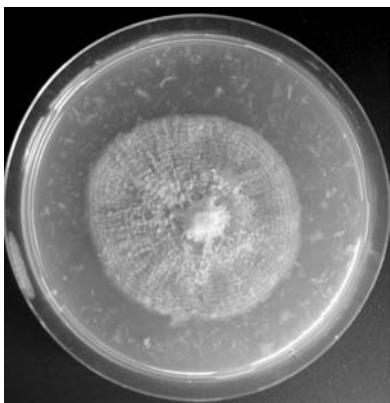
As plantas apresentavam necroses foliares, queda de folhas e morte de raminhos. Nas folhas observaram-se manchas necróticas irregulares com margem difusa, por vezes circundadas por um halo hidrópico e formavam-se geralmente no ápice ou junto ao pecíolo, mas podiam surgir em qualquer parte do limbo (Figuras 1 e 2). As manchas podiam coalescer e necrosar toda a folha, que acabava por cair prematuramente. Os raminhos apresentavam-se necróticos, com o ápice morto, sem folhas, e as flores geralmente mortas, ficavam presas aos raminhos.

Os isolados obtidos em P<sub>5</sub>ARP-H apresentavam colónias com crescimento lento, micélio imerso no agar fracamente coraloide e sem hifas “swellings”, micélio aéreo muito escasso. Quando repicados para CPA apresentavam colónias com crescimento lento, anéis concêntricos bem visíveis e ligeiro aspecto de roseta no centro, micélio sem hifas “swellings”, micélio aéreo escasso (Figura 3).

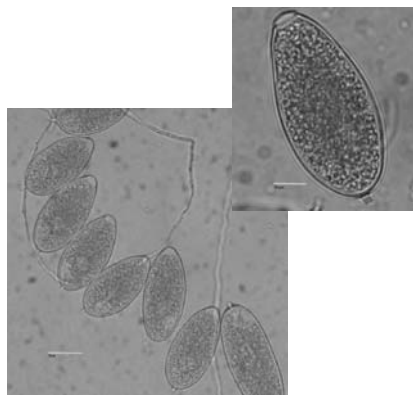
Em CPA todos os isolados obtidos, produziram zoosporângios e clamidósporos. Os zoosporângios formavam-se simples ou em grupos, dispostos simpodialmente ao longo do zoosporângioforo e frequentemente eram elipsóides, mas ocasionalmente podiam ser fusiformes ou ovóides, caducos, com um pedicelo curto (menor que 5µm), ou sem pedicelo. Os esporângios eram semi papilados, com uma papila estreita (5-7,5µm de diâmetro), menos pronunciada nos esporângios jovens. Os zoosporângios mediam 37,5 – 85µm de comprimento por 20 – 32,5µm de largura e a média da relação comprimento/largura variava entre 2,15 e 2,31 (Figura 4).

Os clamidósporos produziram-se abundantemente em CPA, hialinos, mais tarde castanho dourados, globosos, geralmente de parede fina, intercalares ou terminais, ocasionalmente laterais, de diâmetro compreendido entre 32,5 e 77,5µm (Figuras 5 e 6).

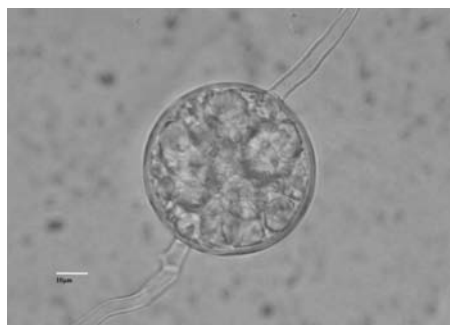
Os isolados estudados (excepto dois) produziram oógonios e anterídios ao fim de quatro semanas, quando cruzados com o isolado de *P. cryptogea* “mating type” A2. Os gâmetas formaram-se em conexão com



**Figura 3** – Isolado em CPA.



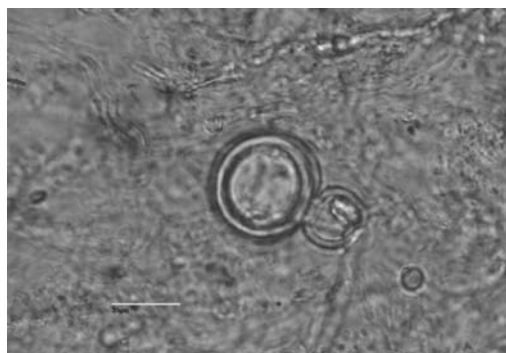
**Figura 4** – Grupo de zoosporângios. Barra = 20 $\mu$ m.  
Zoósporângio isolado. Barra = 10 $\mu$ m.



**Figura 5** – Clamidósporo intercalar. Barra = 10 $\mu$ m.



**Figura 6** – Clamidósporo intercalar e terminal.  
Barra 20 $\mu$ m.

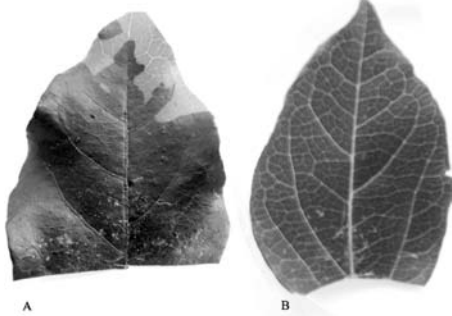


**Figura 7 e 8** – Oogónios e anterídios. Barra = 20 $\mu$ m.

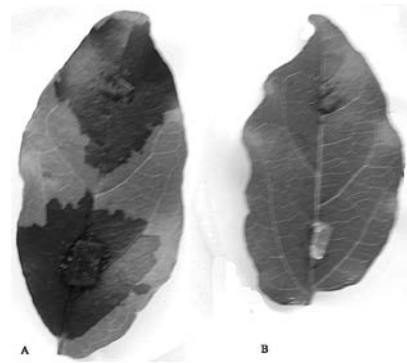
os pedaços de cenoura existentes no meio de cultura. Os oógonios formaram-se terminal ou lateralmente, lisos, quase esféricos com um diâmetro compreendido entre 30 e 37,5  $\mu\text{m}$ . Os anterídios eram sempre anfigenos, variando entre esféricos a forma de barril (Figuras 7 e 8).

Os ensaios de patogenicidade foram positivos. Todos os isolados em estudo indu-

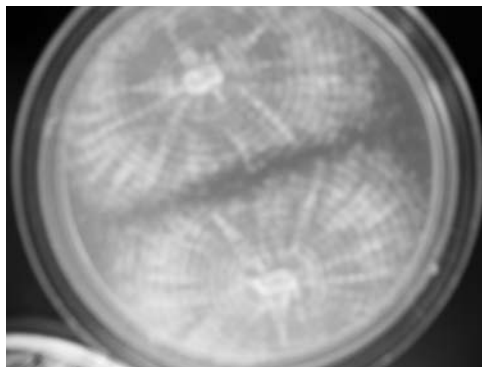
ziram ao fim de oito dias, manchas necróticas semelhantes às observadas nas folhas das amostras de *Viburnum* spp. analisadas, enquanto os controlos negativos permaneceram sem sintomas (Figuras 9 e 10). Os isolados obtidos a partir destas manchas apresentavam características culturais e morfológicas idênticas às descritas anteriormente (Figuras 11, 12 e 13).



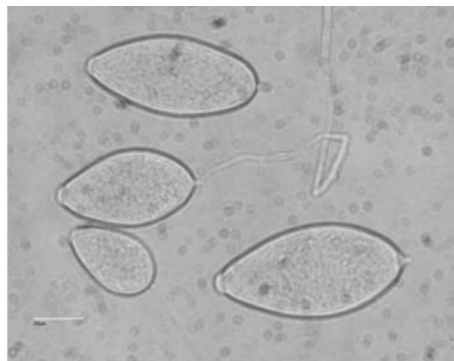
**Figura 9** – Ensaio de patogenicidade: A, Folha inoc.; B, Controlo negativo.



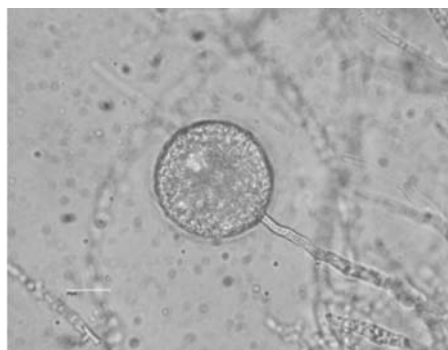
**Figura 10** – Ensaio de patogenicidade: A, Folha inoc.; B, Controlo negativo.



**Figura 11** – E. de patog.: Reisolado em CPA.



**Figura 12** – E. de patogenicidade: Zoosporângios. Barra = 20µm.



**Figura 13** – E. de patogenicidade: Clamidósforo. Barra = 20µm.

## DISCUSSÃO

Os sintomas que se observaram em folhas de *Viburnum* spp. eram muito semelhantes aos de *Phytophthora ramorum* constantes nas imagens publicadas pela DEFRA (DEFRA, 2003). Contudo, na bibliografia disponível não se encontrou uma descrição exaustiva dos sintomas sobre plantas de *Viburnum* spp. Apenas há referências a manchas nas folhas e morte de raminhos (Varela *et al.*, 2004). No nosso caso não se observaram as necroses na base do caule que conduzem à morte das plantas, como referem outros autores (Garbelotto *et al.*, 2002).

As características culturais dos isolados obtidos em P<sub>5</sub>ARP-H e CPA estão de acordo com as descritas por Werres *et al.* (2001), Moralejo & Werres (2002), Varela *et al.* (2004), OEPP/EPP (2006), para *Phytophthora ramorum*.

As características morfológicas dos isolados em CPA estão de acordo com as descritas por Werres *et al.* (2001), Varela *et al.* (2004), OEPP/EPP (2006), para *Phytophthora ramorum*.

Os isolados de *Phytophthora ramorum* obtidos neste estudo são heterotáticos, excepto dois que não formaram gâmetas, quer quando cruzados com isolados “mating type” A1, quer com “mating type” A2 de *Phytophthora*

*cryptogea* e serão objecto de estudo futuro. Os restantes isolados formaram órgãos sexuais quando confrontados com isolados de *Phytophthora cryptogea* “mating type” A2, levando a concluir que se estava em presença de isolados do tipo A1, como a maior parte dos isolados que têm sido identificados na Europa (Werres *et al.*, 2001); (Varela *et al.*, 2004).

A patogenicidade do organismo foi comprovada em folhas destacadas de *Viburnum* sp., por ambos os métodos ensaiados. Com o isolamento do patogéneo a partir das folhas inoculadas com sintomas, deu-se cumprimento aos postulados de Koch.

## CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que o agente responsável pelas necroses foliares e morte dos raminhos observados nas plantas de *Viburnum* spp., era o patogéneo *Phytophthora ramorum*.

*Phytophthora ramorum* foi identificada em 25 das 104 amostras analisadas. Todos os isolados positivos foram obtidos a partir de plantas de *Viburnum* spp.

Tanto quanto se sabe, trata-se da primeira ocorrência de *Phytophthora ramorum* em Portugal.



**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Doutora Sabine Werres (Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry) pela cedência das culturas de *Phytophthora cryptogea* e pelas sugestões dadas para a realização dos ensaios de compatibilidade.

Agradecemos também à Técnica Profissional de Laboratório Maria Emília Martins toda a colaboração prestada, e ao Eng<sup>o</sup> Técnico Agrário Henrique Vaz pela realização das fotografias no campo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- DEFRA (2003) - *Phytophthora ramorum*. Disponível em <http://www.defra.gov.uk/planth/pramor.htm>
- Garbelotto, M.; Rizzo, D. M.; Davidson & Frankel, S. J. (2002) – How to recognize symptoms of diseases caused by *Phytophthora ramorum*, causal agent of Sudden Oak Death. Disponível em <http://nature.berkeley.edu/garbelotto>
- Jeffers, S. N. & Martin, S. B. (1986) - Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium*. *Plant Disease* 70: 1038-1043.
- Moralejo, E. & Werres, S. (2002) - First report of *Phytophthora ramorum* on *Rhododendron* sp. in Spain. *Plant Disease* 86, 9: 1052.
- OEPP/EPP (2002) - Alert list – *Phytophthora ramorum*. Disponível em <http://www.eppo.org>.
- OEPP/EPP (2006) - EPP Standard PM 7/66 Diagnostics *Phytophthora ramorum*. *Bulletin OEPP/EPP Bulletin* 36, 1: 145 – 155.
- Rizzo, D. M.; Garbelotto, M.; Davidson, J. M.; Slaughter, G. W. & Koike, S. T. (2002) - *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* 86, 3: 205- 214.
- Varela, C. P.; Vázquez, J. P. M. & Casal, O. A. (2004) - *Phytophthora ramorum* Nuevo patógeno en España sobre *Camellia japónica* y *Viburnum tinus*. *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 97-111.
- Werres, S.; Marwitz, R.; Man In't Veld, W. A.; De Cock, A. W. A.; Bonants, P. J. M.; De Weerd, M.; Themann, K.; Ilieva, E. & Baayen, R. P. (2001) - *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on *Rhododendron* and *Viburnum*. *Mycological Research* 105: 1155-1165.