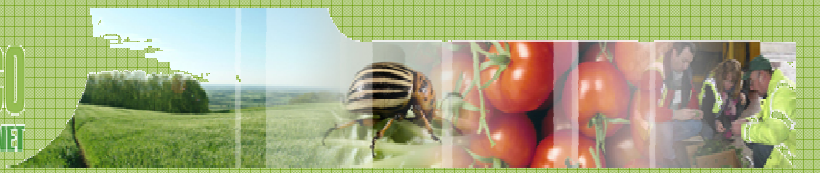
Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Diagnóstico Fitossanitário, detecção on-site e ferramentas epidemiológicas no controlo do Fogo Bacteriano

2 Outubro 2012

Knowing fire blight in Portugal

Leonor Cruz



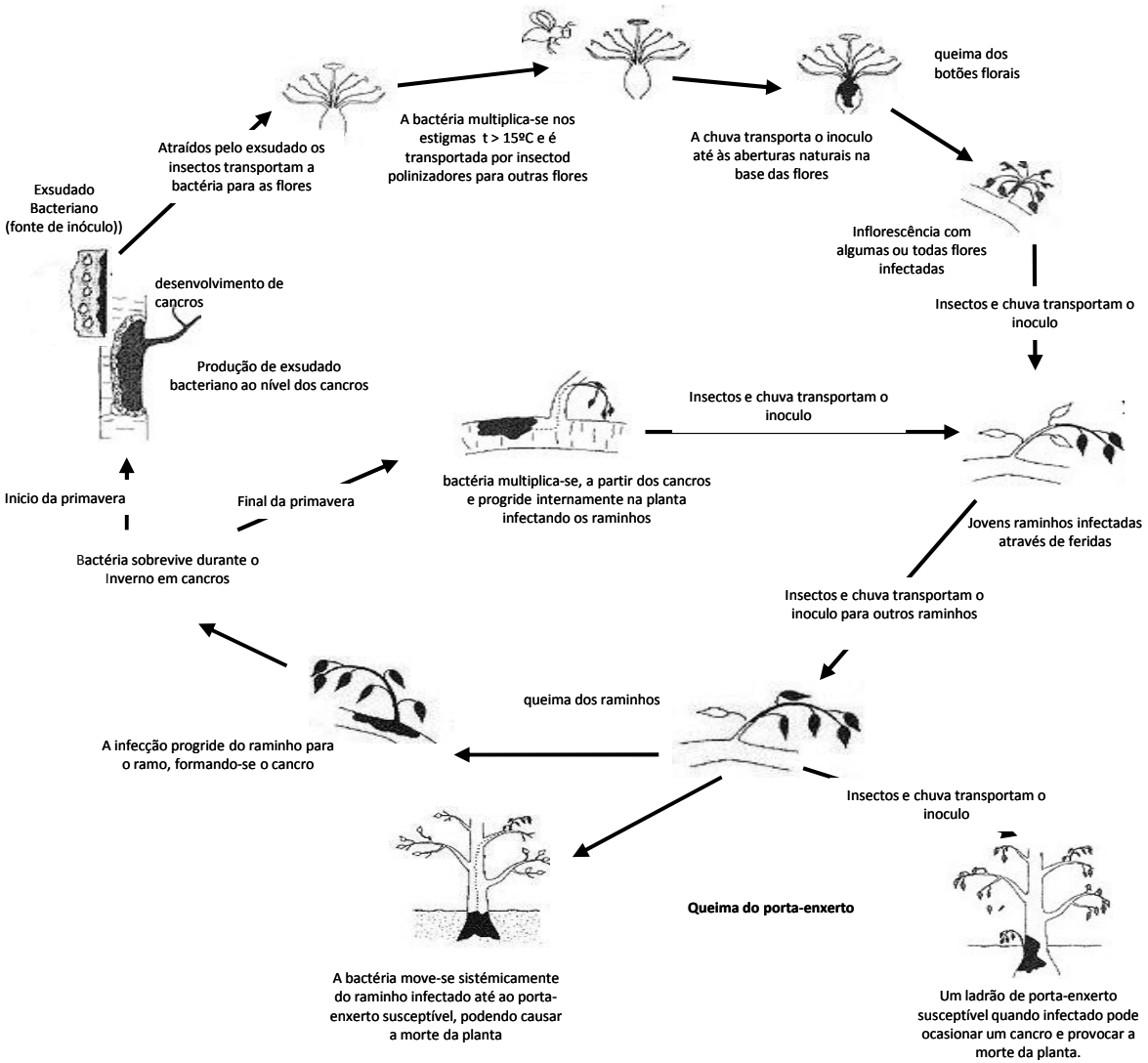
GOVERNO DE PORTUGAL | MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO MAR, DO AMBIENTE E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

Sumário

- ✓Ciclo Biológico
- ✓Monitorização e Prospecção
  - ✓Factores de Risco
  - ✓Precauções sanitárias
  - ✓Acções gerais de prospecção preconizadas
  - ✓Amostragem
- ✓Diagnóstico Precoce
  - ✓Identificação Laboratorial
  - ✓Caracterização de Estirpes
  - ✓Epidemiologia
- ✓Controlo

Ciclo Biológico de *Erwinia amylovora*

- ✓**Infecções primárias surgem na Primavera**
  - ✓**Inoculo primário**
  - ✓**Tempo quente e húmido**
  - ✓**Infecção das flores com lesões hidrópicas, murchidão, desidratação e queima**
- ✓**Progressão da doença no Verão**
  - ✓**Infecção dos raminhos**
  - ✓**Infecção dos frutos**
- ✓**Fim do ciclo biológico no Outono**
  - ✓**Desenvolvimento de cancros**
  - ✓**Quiescência da bactéria**



Principais Factores de Risco Ambientais

- ✓ Presença de elevados níveis de inoculo
- ✓ Temperatura >15ºC durante o período de floração
- ✓ Presença de insectos polinizadores
- ✓ Elevada HR (55% estigma flor - 80% hipanto)
- ✓ Presença de gomos secundários em pereira

Programa Prospecção Pereira *et al*. (2008) *vs*. Epidemiologia

"Anualmente as prospecções poderão decorrer em duas épocas no período de tempo que vai desde o início da Primavera até meados do Outono. (…) A 1ª época poderá ir de 1de Maio a 30 de Julho e a 2ª época deverá corresponder ao período entre 1 de Setembro e 30 de Novembro."

Conhecimentos adquiridos em 2010-2011

✓Encontram-se identificadas as áreas de maior risco ao nível do Concelho e da Freguesia

✓Mapeamento DAGADR e DRAPs

✓É conhecida a existência de desfasamento relativamente à actividade vegetativa dos hospedeiros *vs*. área geográfica.

✓InfoAgro COTHN, DRAPs, etc..

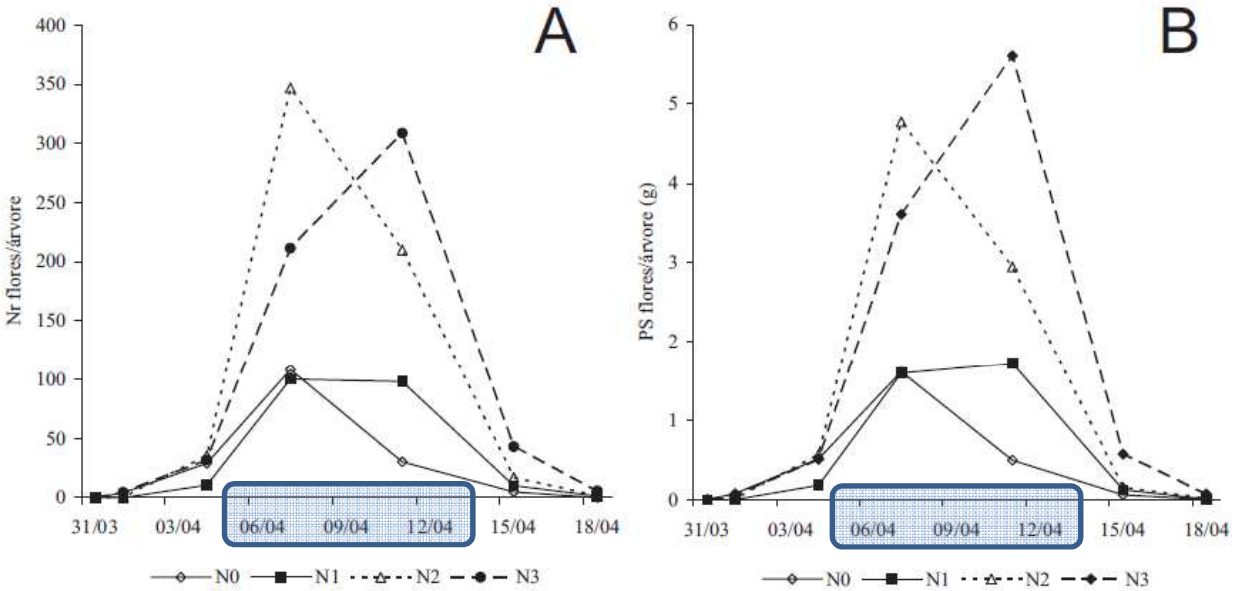
✓É conhecida a fase do ano e do ciclo vegetativo do hospedeiro em que o risco de aquisição da doença é maior

✓Introdução de novos métodos de diagnóstico em rotina

Estados fenológicos *vs*. epidemiologia

Pereira Região Oeste		Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Pré-abrolhamento													
Abrolhamento													
Ponto Verde													
Botão Branco													
Floração													
Queda Pétalas													
Vingamento													
Frutos em desenvolvimento													

Ciclo vegetativo do hospedeiro vs. epidemiologia

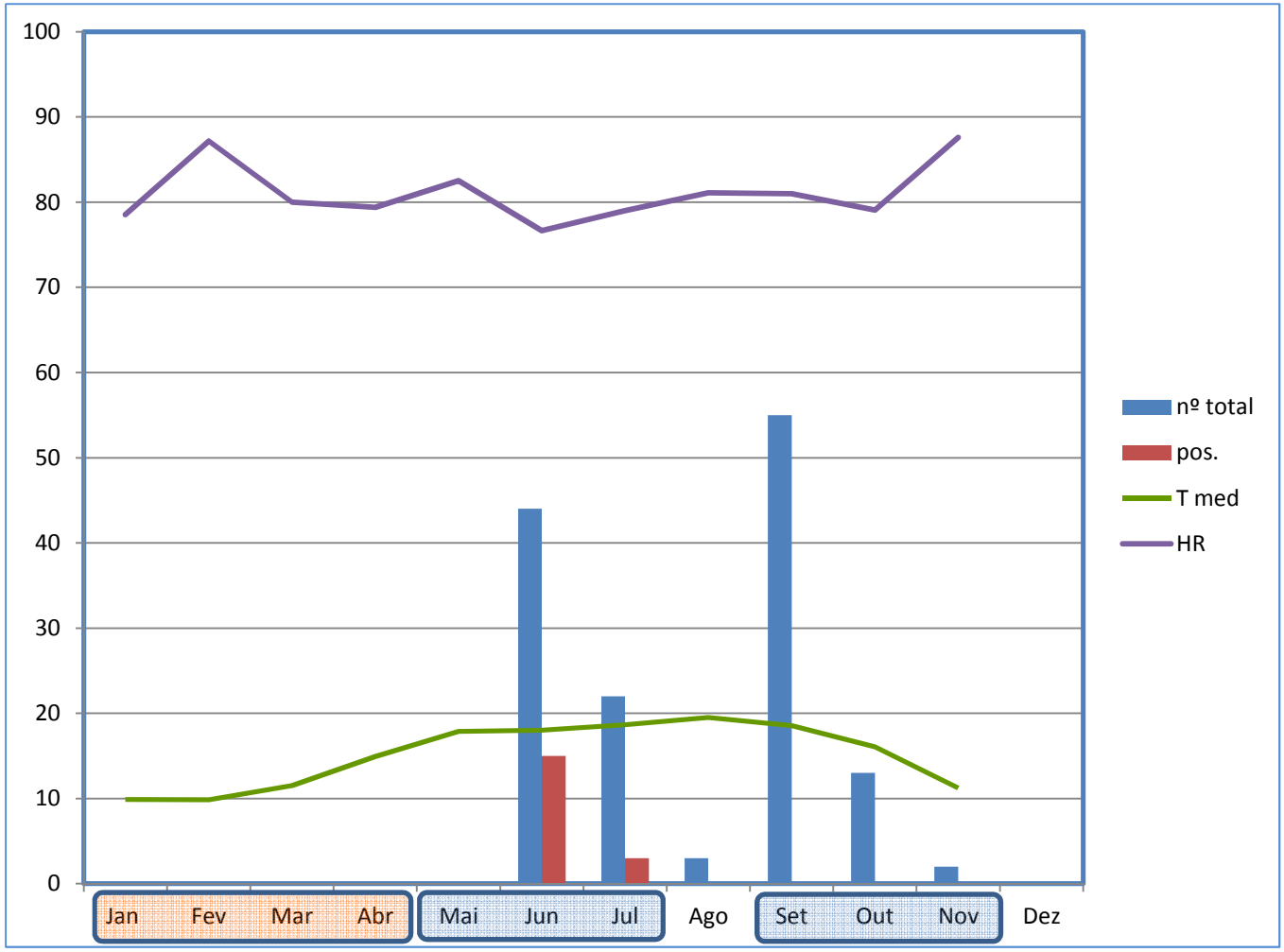


I Simpósio Nacional de Fruticultura
Alcobaça, 12 e 13 de Outubro de 2006

O azoto no crescimento e na produtividade de jovens pereiras 'Rocha'

Cláudia Neto[1,2], Corina Carranca[1], Amarilis de Varennes[2], Inês Rocha[1], Justino Sobreiro[3] & Josué Clemente[4]

Clima vs. epidemiologia



Monitorização e Prospecção

- ✓ Novas épocas de amostragem do Programa Nacional de Prospecção do Fogo Bacteriano
- ✓ Redefinição dos métodos de amostragem
- ✓ Necessidade de proceder precocemente à detecção de novos focos de acordo com o início da actividade vegetativa

Pereira

- ✓ Maior incidência de amostragem nas zonas de segurança definidas na Portaria 2011
- ✓ Avaliação da incidência/prevalência de novos casos nas zonas de contenção e de segurança tendo em conta variáveis climáticas e medidas fitossanitárias aplicadas
- ✓ Avaliação da dispersão a áreas com menor intensificação cultural e ainda não afectadas

Sensibilização

- ✓ No decurso das prospecções dos pomares, viveiros, e de outras culturas protegidas e de ar livre, para a realização de inspecções ou colheita de amostras, **os Inspectores, técnicos e/ou produtores poderão contribuir de forma involuntária para a disseminação de *E. amylovora*.**

Aspectos a ter em conta

- ✓ Representatividade da **amostra colhida**
- ✓ Definição de **ponto de prospecção**
- ✓ Selecção dos **pontos de prospecção**
- ✓ Alteração das **épocas de prospecção**
- ✓ Redefinição da **dimensão das amostras**
- ✓ Identificação **adequada das amostras**
- ✓ Acondicionamento **cuidado das amostras**
- ✓ Cumprimento de **normas de higiene**
- ✓ Arquivo de **registos** (rastreabilidade da amostra ,histórico de tratamentos)

Monitorização e Detecção

- ✓ Triagem (screening) com tiras de difusão em latex para acompanhamento de pomares onde foram efectuadas podas sanitárias e de novos focos nas zona contaminadas
  - Plantas sintomáticas (sensibilidade 10^5cfu/ml)
  - Especificidade *E. amylovora* vs. *Erwinia* spp.
  - Confirmação laboratorial para a "zona de segurança"

Diagnóstico a evolução

- ✓ **CAMAR -** ***The development and application of nucleic acid probe thecnology for the rapid and reliable detection and identification of quarantine bacteria*****. EC - Project 8001 - CT 91-0202.**
- ✓ **DIAGPRO–** ***Diagnostic Protocols for Organisms Harmful to Plants*****. EU Project SMT4-CT98-2252**
- ✓ EUPHRESCO – Development and validation of inovative diagnostic tools for the detection of fire blight (*Erwinia amylovora*) (ERWINDECT 2008-2009)
- ✓ **EUPHRESCO -** ***"Phylogenetic Identification of Quarantine Bacterial Plant Pathogens"*****. (2009-2010)**
- ✓ **EUPHRESCO II -** ***Phytosanitary diagnostic, on-site detection and epidemiology tools for Erwinia amylovora*** (PHYTFIRE início 2012)

Diagnóstico oficial

Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
European and Mediterranean Plant Protection Organization

Normes OEPP
EPPO Standards

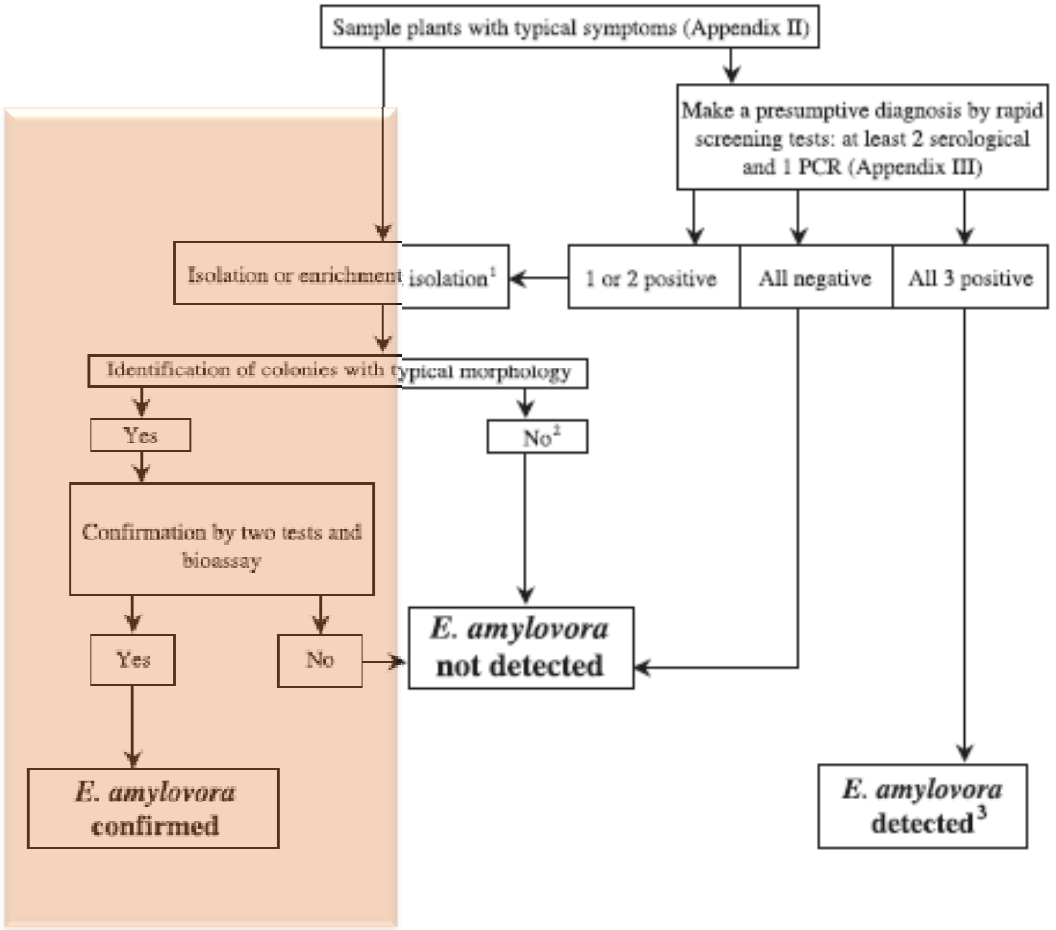
Diagnostic protocols for regulated pests
Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés

Acknowledgements

This protocol was originally drafted by: M. M. López, M. Keck, P. Llop, M. T. Gorris, J. Peñalver, V. Donat and M. Cambra., IVIA, Moncada (Valencia) (ES).

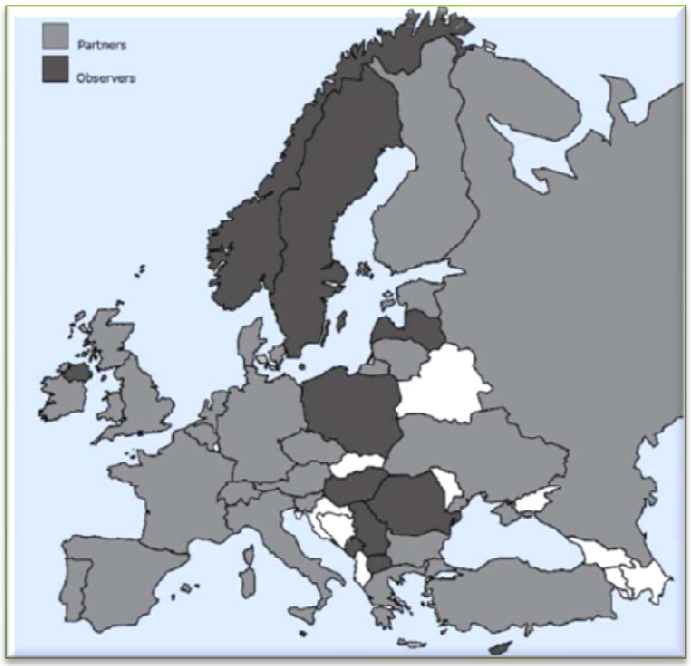
This protocol was ring-tested in different European laboratories[2].

[2]J. Janse, Plant Protection Service, Wageningen, NL; M. Keck, Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Vienna, AT; A. Sletten, Plant Protection Centre, Ås, NO; M. A. Cambra, Centro de Protección Vegetal, Zaragoza, ES; J. L. Palomo, Centro Regional de Diagnóstico, Aldearrubia Salamanca, ES; S. Simpkins, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, GB; T. T. Duarte, Direcção Geral de Protecção das Culturas, Lisbon, PT; F. Poliakoff, LNPV Unité Bactériologie, Angers, FR; J. Van Vaerenbergh, Rijkstation voor Plantenziekten, Merelbeke, BE; M. M. López, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, ES.



Novas Ferramentas de Diagnóstico

EUPHRESCO Non-Competitive Project Entitled: Phylogenetic Identification of Quarantine Bacterial Plant Pathogens



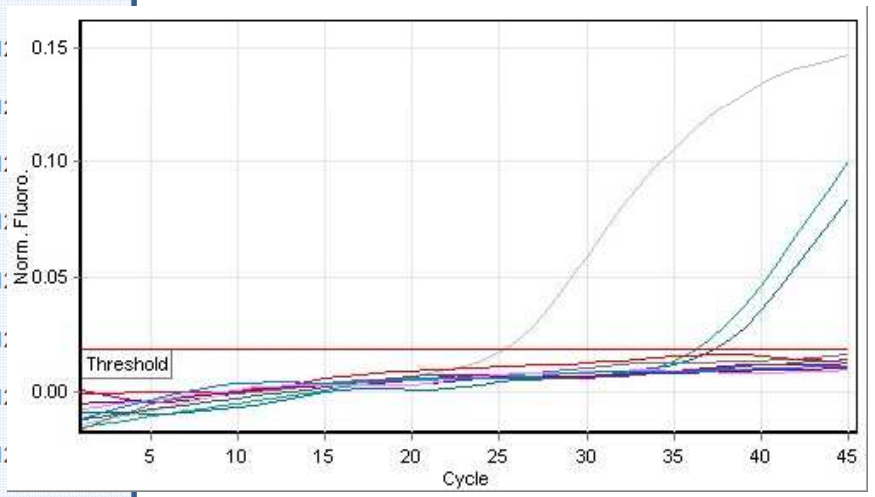
EPPO Listed organism
Dickeya dianthicola
Erwinia amylovora
Pseudomonas syringae pv. *persicae*
Ralstonia solanacearum race 3
Ralstonia solanacearum race 2
Xanthomonas arboricola pv. *corylina*
Xanthomonas arboricola pv. *pruni*
Xanthomonas axonopodis pv. *allii*
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*
Xanthomonas axonopodis pv. *dieffenbachiae*
Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli
Xanthomonas axonopodis pv. *poinsettiicola*
Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*
Xanthomonas vesicatoria
Xanthomonas fragariae
Xanthomonas translucens pv. *translucens*
Xanthomonas oryzae
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola

Partner	Contact person
UK–FERA	John Elphinstone,
UK-SASA	David Kenyon
ES-IVIA	Maria Milagros Lopéz
CZ-NAAR	Jaroslav Horky
DE-JKI	Petra Műller
FR-LNPV	Helene Soubelet
FR-INRA	Charles Manceau
FR-CIRAD	Olivier Pruvost/ Philippe Prior
PT-INRB	Leonor Cruz
NL-NAK	Jacob Dirk Janse
BE-ILVO	Johan van Verenbergh
IT-CRA-PAV	Stefania Loreti
AT-AGES-PGH	Richard Gottsberger/ Helga Reisenzein
DK-PD	Eigil de Neergaard
BG-PPI	Maria Stoyanova
NL-PD	Maria Bergsma-Vlami
SI-NIB	Tanja Dreo/Maja Ravnikar

Novas Ferramentas de Diagnóstico

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FR719187.1	Erwinia amylovora ATCC BAA-2158, whole genome shotgun sequence, contig 7	462	462	100%	4e-127	100%
FN434113.1	Erwinia amylovora CFBP1430 complete genome	462	462	100%	4e-127	100%
FN666575.1	Erwinia amylovora ATCC 49946 chromosomal sequence	462	462	100%	4e-127	100%
FJ217158.1	Erwinia amylovora strain NCPPB 683 recombinase A (recA) gene, partial cds	462	462	100%	4e-1	
DQ859884.1	Erwinia amylovora strain ICMP 1540 recombinase A (recA) gene, partial cds	462	462	100%	4e-1	
AM055588.1	Erwinia amylovora partial recA gene for recombinase	462	462	100%	4e-1	
AY217068.1	Erwinia amylovora strain IL6 recombinase A (recA) gene, partial cds	462	462	100%	4e-1	
AY217067.1	Erwinia amylovora strain Ka6 recombinase A (recA) gene, partial cds	462	462	100%	4e-1	
AY217066.1	Erwinia amylovora strain 684 recombinase A (recA) gene, partial cds	462	462	100%	4e-1	
AY217071.1	Erwinia amylovora strain Kp1 recombinase A (recA) gene, partial cds	457	457	100%	2e-1	
AY217070.1	Erwinia amylovora strain Earb7 recombinase A (recA) gene, partial cds	457	457	100%	2e-1	
AY217069.1	Erwinia amylovora strain P1 recombinase A (recA) gene, partial cds	457	457	100%	2e-125	99%
FM252040.1	Erwinia pyrifoliae partial recA gene for recombinase A, strain Ejp556	390	390	100%	2e-105	94%
CP002124.1	Erwinia sp. Ejp617, complete genome	383	383	98%	3e-103	94%
FN392235.1	Erwinia pyrifoliae DSM 12163 complete genome, culture collection DSM:12163	383	383	98%	3e-103	94%

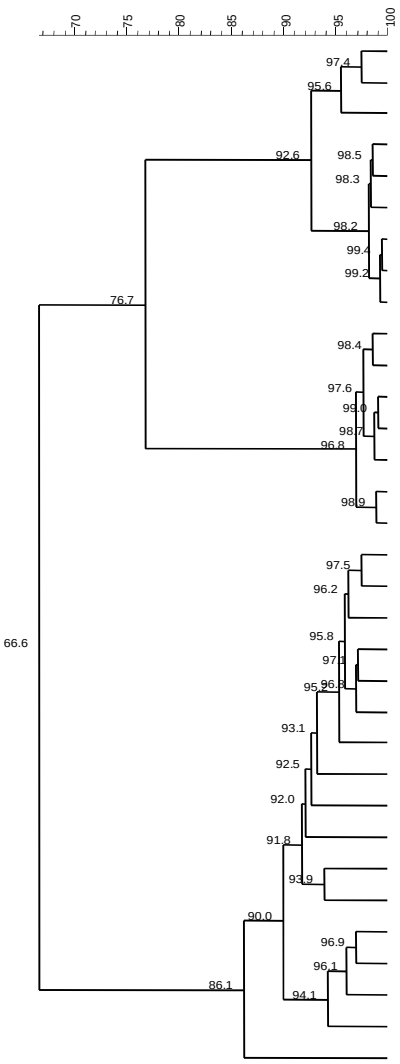
EUPHRESCO Project
Development and validation of innovative diagnostic tools for the detection of fire blight (*Erwinia amylovora*)(ERWINDECT)



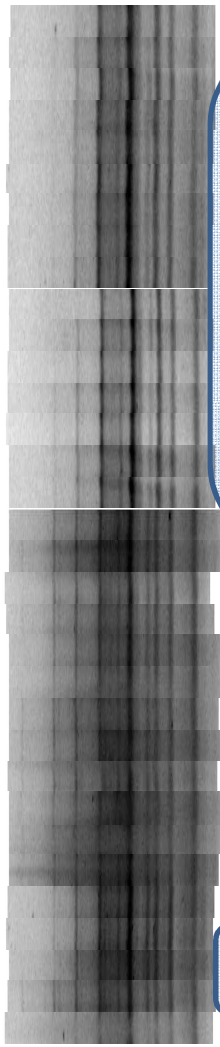
RT-PCR
Detecção de 10 cópias/reacção

Caracterizaçao de Estirpes e Epidemiologia

Ea BOX



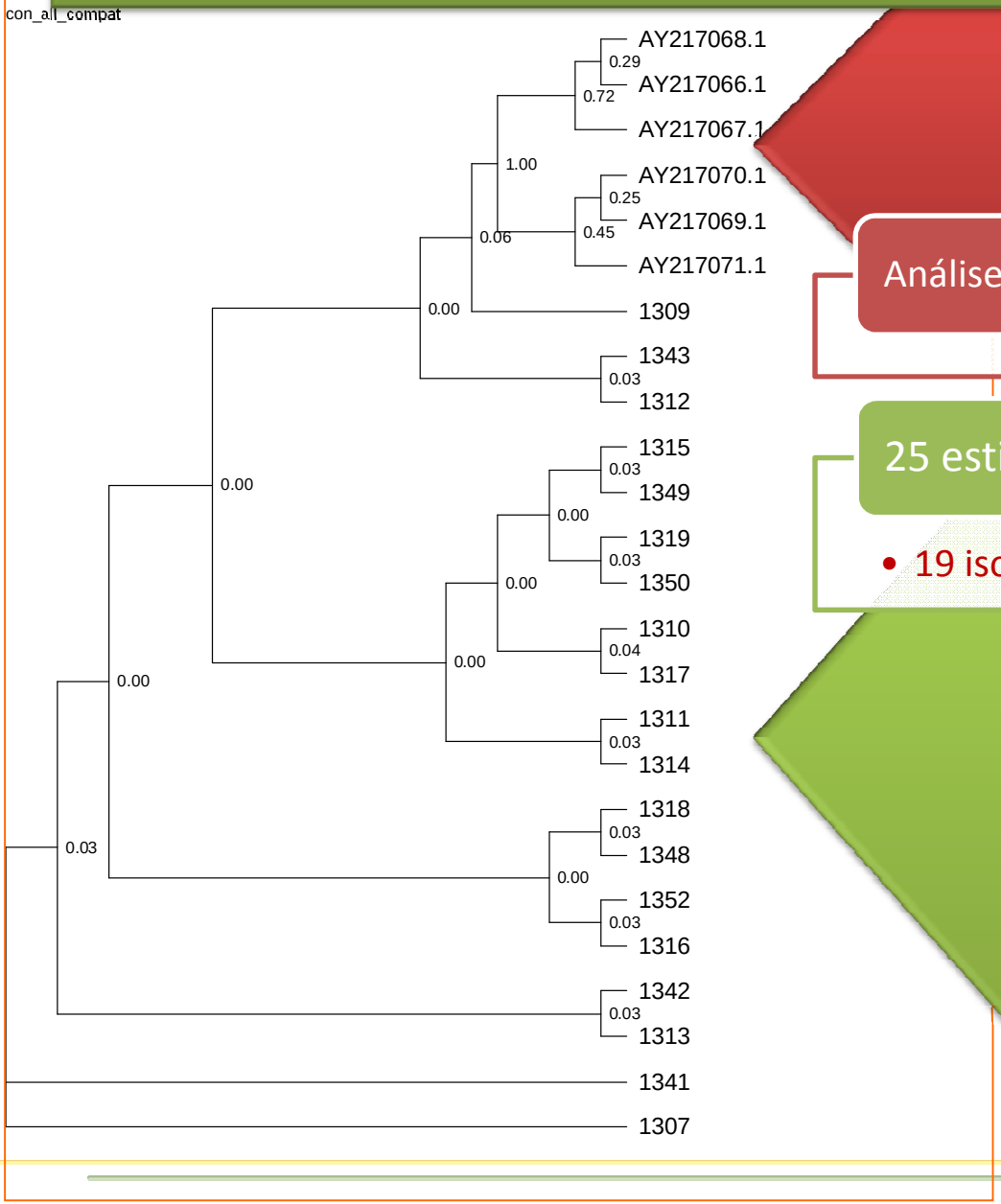
Ea BOX



Nº Colecção	Espécie	Hospedeiro	Origem/Concelho	ano
CPBF 1318	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Bombarral	2010
CPBF 1341	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2011
CPBF 1317	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1342	Erwinia amylovora	Mallus domestica cv. Royal Gala	Portugal/Alandroal	2011
CPBF 1343	Erwinia amylovora	Mallus domestica cv. Granny smith	Portugal/Alandroal	2011
CPBF 1352	Erwinia amylovora	Cydonia oblonga	Portugal/F. Alentejo	2011
CPBF 1348	Erwinia amylovora	Mallus domestica cv. Tromba de Boi	Portugal/Viseu	2011
CPBF 1349	Erwinia amylovora	Mallus domestica cv. Granny smith	Portugal/Guarda	2011
CPBF 1350	Erwinia amylovora	Mallus domestica cv. Ginger Gold	Portugal/F. Alentejo	2011
CPBF 1313	Erwinia amylovora	Mallus domestica	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1314	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1311	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1312	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1310	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1315	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1316	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 411	Erwinia amylovora	Crataegus sp.	Poland	
CPBF 412	Erwinia amylovora	Pyrus malus	Poland	
CPBF 142	Erwinia amylovora	Crataegus sp.	França	
CPBF 361	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. Passe Crass.	Greece	
CPBF 387	Erwinia amylovora	Cotoneaster hybridus pendulus	Ireland	
CPBF 372	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. Passe Crass.	Greece	
CPBF 366	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. Passe Crass.	Greece	
CPBF 393	Erwinia amylovora	Cotoneaster hybridus pendulus	Ireland	
CPBF 365	Erwinia amylovora	Pyrus amigdaliformus	Greece	
CPBF 410	Erwinia amylovora	Crataegus sp.	Poland	
CPBF 373	Erwinia amylovora	Crataegus sp.	Czech Republic .	
CPBF 413	Erwinia amylovora	Pyrus malus	Poland	
CPBF 1307	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1309	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. rocha	Portugal/Alcobaça	2010
CPBF 1351	Erwinia amylovora	Pyrus communis	Portugal/F. Alentejo	2011
CPBF 364	Erwinia amylovora	Pyrus communis	Crete	
CPBF 360	Erwinia amylovora	Pyrus communis cv. Passe Crass.	Cyprus	

ρ =0,85

Caracterizaçao de Estirpes e Epidemiologia



Estirpes estrangeiras

Análise Filogenética Bayseana *rec A*

25 estirpes

- 19 isolados portugueses 2010 e 2011

Estirpes portuguesas

Meios de Protecção

- ✓ Quarentena e politica fitossanitária
- ✓ Monitorização
  - ✓ Monitorização exaustiva dos pomares com sintomas em anos anteriores
  - ✓ Monitorização das condições climáticas regionais (T máx, T min, HR, **outros**…)
  - ✓ A implementação de sistemas de avisos apoiados em modelos de previsão, cujo sucesso pode ser variável, pode contribuir para utilização mais adequada de alguns produtos químicos com eficácia no controlo da doença (Maryblyt)
  - ✓ Avaliação do risco regional
- ✓ Diagnóstico
  - ✓ Detecção precoce de infecções latentes
  - ✓ Detecção de *introduções* via importação
  - ✓ Controlo do material de propagação (porta-enxertos e pés-mãe)
  - ✓ Protecção e Conservação do Património Genético Autóctone

INIAV no Projecto PHYFIRE

- ✓ WP1 – Project Meeting
- ✓ WP2 – Methods training and ring testing
  - ✓ Validation and application of the different methods will utilize collections/isolations from epidemic foci across Europe from sampling/analyses
- ✓ WP5 – Asymptomatic infections and environmental fitness
  - ✓ Optimized protocol for detection in asymptomatic plant material.
  - ✓ Survival ability under adverse conditions.
  - ✓ Genes involved in the response of *E. amylovora* against adverse conditions.
- ✓ WP6 – Source Tracking
  - ✓ Individual genotyping approach methods.
  - ✓ Population structure and epidemiological insights.