

Aspetos celulares/genéticos da doença do declínio do sobreiro

Perguntas e Respostas

Introdução

A Universidade do Algarve dedicou-se ao longo dos anos ao estudo de aspetos relacionados com a doença do declínio do sobreiro dando especial ênfase ao conhecimento dos fatores celulares/genéticos que poderiam estar relacionados com a doença, não descurando a ideia de que numa doença coexistem várias entidades que interagem e que assumem diferentes papéis no perfil de evolução da doença. Em particular, nestes estudos, as entidades mais estudadas foram o hospedeiro, o sobreiro (*Quercus suber*), e o agente infeccioso *Phytophthora cinnamomi*, um oomiceta de desenvolvimento filamentoso que existe no solo associado ao sistema radicular dos hospedeiros.

Ao estruturar um documento que visa dar a conhecer ao público em geral o que a equipa da UAlg tem descoberto em termos celulares/genéticos acerca da interação entre o sobreiro (hospedeiro) e o referido agente infeccioso, entendeu-se que faria sentido apresentar a forma como se processam estes estudos e o que os motiva.

No fundo, os estudos visam dar resposta a questões que são colocadas, e essas questões são motivadas pela observação de fenómenos que sobressaem dos processos naturais e que afetam a relação que o ser humano tem com o ecossistema. O fenómeno da doença do declínio do sobreiro suscita-nos muitas questões acerca da manutenção de sistemas agro-florestais em que predominam indivíduos da espécie *Q. suber* e isso reflete-se no potencial de mais-valias económicas e sociais.

Deste modo, vão-se apresentar ao longo deste documento as questões que motivaram as investigações e vão-se apresentar os resultados que mais se destacaram, ou seja, tentar apresentar as *perguntas* e tentar dar as *respostas*.

Este formato também tem como objetivo saber se as questões que motivam os investigadores fazem sentido para os agricultores, para os produtores e para a comunidade suberícola em geral.

Observações

Começamos então pelas *observações* que motivam as questões, tendo em consideração a Imagem 1.



Imagem 1. Cachopo – Algarve.

Atualmente, num montado ou num sobreiral é muito comum observarmos:

- sobreiros sem folhas, em particular nas extremidades dos ramos, permanecendo os ramos secos ao longo do tempo;
- exsudações no tronco das árvores que apresentam perda de vitalidade;
- apodrecimento e desaparecimento das raízes mais finas responsáveis pela absorção da água, nas árvores com sintomas da doença;
- perda de vitalidade geral da árvore ao longo do tempo, inviabilizando a tiragem da cortiça;
- aumento do número de árvores que apresenta este tipo de sintomas;

-sobreiros que secam repentinamente após o verão, em particular, durante o mês de setembro e outubro, com grande incidência no Sul do país.

Questões

Passemos agora às *questões* motivadas pelas *observações*. Estas observações desencadearam, entre outras, as seguintes questões:

1. Porque observamos padrões distintos de resposta das árvores à doença do declínio? Umhas perdem a vitalidade lentamente e outras morrem subitamente.
2. O que está na causa da perda de vitalidade das árvores?
3. Que agente pode ser responsável pelo desaparecimento/apodrecimento das raízes dos sobreiros?
4. Que fatores celulares/genéticos se podem destacar da resposta do sobreiro à doença?

Estas questões estiveram na origem dos trabalhos que foram sendo publicados por investigadores da Universidade do Algarve ao longo dos anos e que apresentavam resultados relevantes para a temática. São esses trabalhos que irão ser nomeados e comentados de agora em diante.

Contudo, não obstante se apresente a opinião dos investigadores, é importante saber que resposta dão os agricultores e os produtores de cortiça às questões 1, 2, 3 e 4? Qual é a opinião destes profissionais? Por isso, nesta ação de formação, dar-se-á oportunidade aos profissionais da área suberícola de apresentarem as suas ideias, as suas opiniões e as justificações que encontram para a doença do declínio do sobreiro, através da realização de um debate conjunto, desencadeado pelas questões formuladas anteriormente.

Respostas

Variabilidade genética

A diversidade de formas de manifestação da doença (declínio lento e morte súbita), bem como o padrão diversificado de expressão da doença observado nos sobreiros, suscitou questões quanto ao nível de diversidade genética na espécie *Q. suber*. A este respeito foram publicados dois documentos, uma tese de doutoramento (Coelho, A.C., 2004), que seria posteriormente publicada em livro (Coelho, A.C., 2009) e um artigo numa revista internacional (Coelho et al., 2006). Nestes documentos as conclusões refletem que, com base em marcadores genéticos selecionados aleatoriamente no genoma de *Q. suber*, ou seja, com base em pedaços do genoma

escolhidos ao acaso, numa amostra de 313 indivíduos desta espécie, existe um nível muito elevado de variabilidade genética (71%). Também informam que apesar da elevada variabilidade genética, 60% do genoma é partilhado por todos os indivíduos. Ou seja, a elevada variação fenotípica que se observa em *Q. suber* ao nível da qualidade da cortiça produzida e da aparente tolerância à doença do declínio é refletida nos padrões dos marcadores genéticos (Imagem 2).

No que diz respeito às populações, estes estudos demonstram que a diversidade genética é semelhante nas populações estudadas do Algarve, Alentejo e Trás-os-Montes e que a variação genética entre indivíduos, no interior das populações, é muito superior (96%) à variação genética entre populações (3,6%) (Imagem 2). Os autores assumem também que existe muito pouca diferenciação entre as populações ao longo das regiões numa extensão de 700 km.

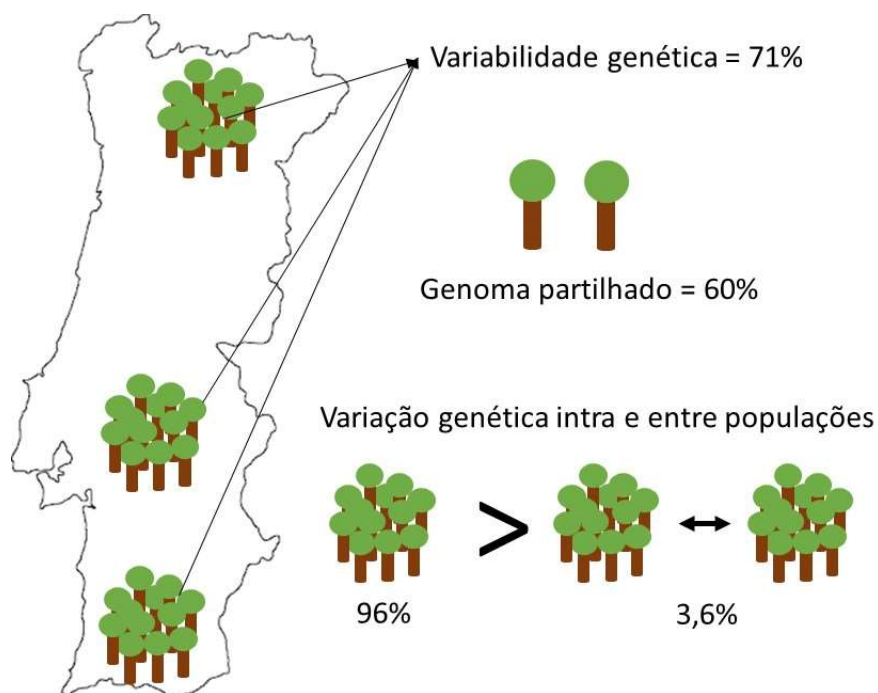


Imagem 2: Diversidade genética das populações de sobreiros em Portugal. (Coelho, A.C., Lima, M.B., Neves, D. and Cravador, A. (2006). Genetic diversity of two evergreen Oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP markers. *Silvae Genetica*, **55** (3): 105-118.)

Num projeto mais recente de sequenciação do transcriptoma do sobreiro, sendo o transcriptoma uma representação do que se expressa do genoma do sobreiro, relata-se a deteção de um elevado número de genes específicos da espécie, ou seja, de genes que não têm correspondência no genoma de outras espécies de plantas e realça-se a importância que a heterogeneidade genética das amostras pode ter tido no resultado (Imagem 3).

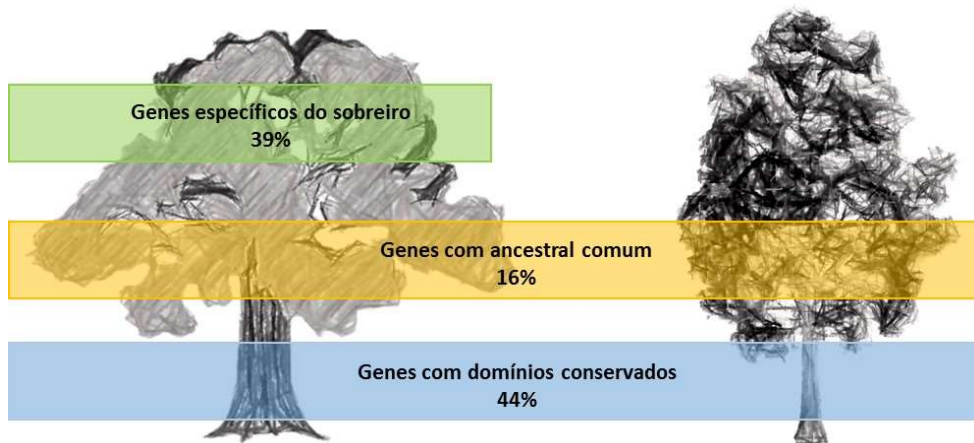
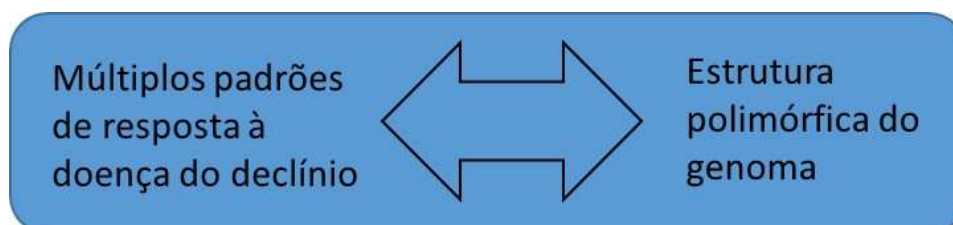


Imagem 3: Distribuição das classes de genes no sobreiro; relação com outras espécies de plantas. (Pereira-Leal, J.B., Abreu, I.A., Alabaça, C.A., Almeida, M.H., Almeida, P., Almeida, T., Amorim, M.I., Araújo, S., Azevedo, H., Badia, A., Batista, D., Bohn, A., Capote, T., Carrasquinho, I., Chaves, I., Coelho, A.C. et al. and Ricardo, C.P.P. (2014). A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. *BMC Genomics*, 15:371. DOI: 10.1186/1471-2164-15-371. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/371>)

Em jeito de conclusão ou de *resposta* pode-se dizer que parece haver uma correspondência entre a diversidade de padrões de resposta dos indivíduos à doença do declínio do sobreiro e a estrutura genética da espécie que se apresenta como muito polimórfica, ou seja, com várias formas do um mesmo gene associadas à expressão de uma determinada característica, que resulta em variabilidade de expressão e variabilidade fenotípica.



Doença do declínio do sobreiro

Proposta de interação entre o sobreiro e o oomiceta Phytophthora cinnamomi

No que diz respeito às causas ou fatores responsáveis pela doença do declínio do sobreiro, cedo no processo investigativo se considerou que poderiam estar envolvidos microorganismos patogénicos. *Phytophthora cinnamomi* foi um oomiceta isolado de forma sistemática dos solos associados a sobreiros com sintomas da doença, levando a crer que este agente biológico seria um dos principais responsáveis pela doença.

Assumindo-se esta premissa como ponto de partida, tentou-se comprovar que o oomiceta era capaz de infetar as raízes dos sobreiros e tentou-se perceber em termos celulares/genéticos quais eram os mecanismos biológicos que eram ativados/desativados durante o processo de interação com o hospedeiro, o sobreiro. Quando se fala em mecanismos de interação, está-se a fazer referência a elementos/estruturas do oomiceta e do hospedeiro que estão envolvidos num processo que decorre em simultâneo para ambas as partes. Interessa saber, portanto, que estratégias de invasão e promoção da doença usa o agente patogénico e que estratégias de defesa usa o hospedeiro.

Por isso, investigaram-se as substâncias produzidas pelo oomiceta, tais como as proteínas elicítinas, e os genes do sobreiro ativados/desativados durante a interação com o agente biótico (Imagem 4).

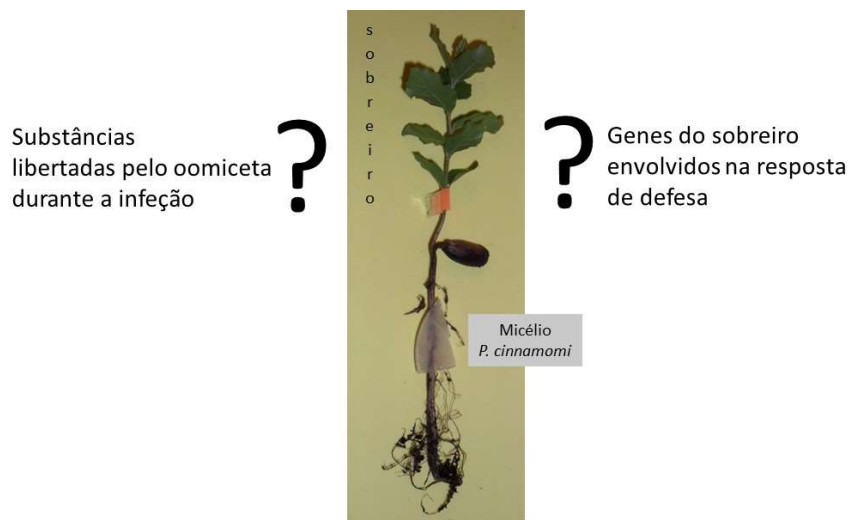


Imagem 4: Representação de uma das formas de infeção por interação direta entre o micélio do oomiceta e a raiz dos sobreiros.

Por vezes, recorre-se em laboratório a modelos de infestação que se aproximam mais do que se prevê que aconteça na natureza - uma infestação promovida por zoósporos de *P. cinnamomi*, estruturas móveis biflageladas que são atraídas para as raízes. Esta mobilidade ocorre na água que existe nos solos e permite a passagem da infeção de uns sobreiros para os outros. A infeção pode progredir através do desenvolvimento de micélio no interior das raízes, em direção ao córtex, provocando um desequilíbrio grave na regulação de água e sais.

Na Imagem 5 podem-se observar os modelos de infestação promovidos por diferentes espécies de *Phytophthora*, considerando-se que, no caso da doença do declínio do sobreiro, se observa o que está traduzido no modelo (a). Neste modelo, *P. cinnamomi* infeta as raízes finas do sobreiro, estando a infeção representada pelas setas vermelhas. As setas azuis mostram o

desenvolvimento secundário na superfície das raízes e no interior. Os modelos (b) e (c) representam infeções por outras espécies de *Phytophthora* promovidas através do tronco ou das folhas.

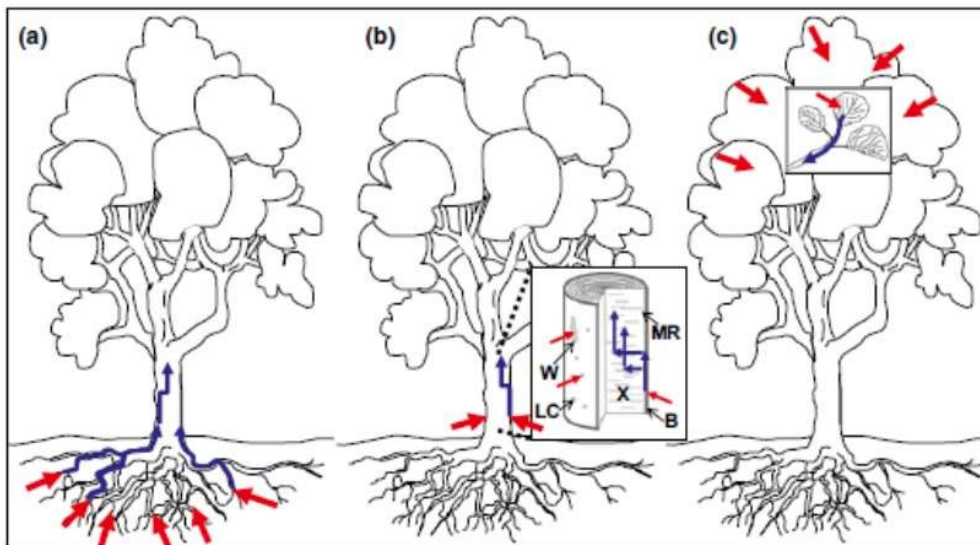


Imagem 5: Modelos de infestação promovidos por diferentes espécies de *Phytophthora* em plantas lenhosas. (Oswald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R.J., Jung, M.H., Pfanzer, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S. and Werres, S. (2014). Strategies of attack and defence in woody plant- *Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* (review article), 44 (3):169-254 DOI: 10.1111/efp.12096.)

Substâncias produzidas por P. cinnamomi durante a interação com o hospedeiro

Durante um processo de infeção, o agente infeccioso tem de ultrapassar barreiras físicas e químicas para se instalar nos tecidos do hospedeiro. Para ter sucesso no processo de invasão terá de produzir e libertar substâncias que vão silenciar ou pelo menos, atenuar, o seu reconhecimento, enquanto agente invasor, por parte do hospedeiro, e a consequente resposta de defesa. Coloca-se então a questão: que substâncias produz o oomiceta durante a infeção?

As proteínas elicinas são as substâncias mais estudadas, sabendo-se que são produzidas por todas as espécies de *Phytophthora* e que estão potencialmente associadas ao processo infeccioso. O que não se sabe ainda é o papel que desempenham neste processo. Ou seja, *P. cinnamomi* aumenta a produção de elicinas quando está em contacto com um hospedeiro mas não se sabe porquê e também não se sabe qual é o alvo destas proteínas no hospedeiro. A ação destas proteínas parece estar associada ao desenvolvimento do micélio, podendo-se observar na Imagem 6, as necroses, assinaladas pelas setas, provocadas pelo micélio numa raiz resultante da germinação de uma lande.



Imagem 6: Necroses produzidas por micélio de *P. cinnamomi*. (Horta, M., Sousa, N., Coelho, A.C., Neves, D. and Cravador, A. (2008). *In vitro* and *in vivo* quantification of elicitin expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73** (1-3): 48-57.) <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.02.003>

Contudo, com o avanço da tecnologia e dos processos de sequenciação, sabe-se, atualmente, que o genoma dos seres vivos das espécies de *Phytophthora* possui centenas de genes, que dão origem a proteínas que estão potencialmente relacionados com o processo infeccioso e com a patogénese. O estudo destas proteínas pode ajudar-nos a compreender como se processa a infeção e pode ajudar na identificação dos alvos destas substâncias nos sobreiros, revelando a função que desempenham durante o processo infeccioso.

E, o que nos dizem os genes que foram identificados no sobreiro e que estão potencialmente relacionados com a produção de substâncias libertadas por *P. cinnamomi* durante a infeção?

Em 2006 publicou-se o resultado de um trabalho que evidenciava que a ação infecciosa do oomiceta podia envolver, para além das proteínas de que falámos anteriormente, substâncias mais simples, que atuariam como toxinas (Coelho et al., 2006). As potenciais toxinas nunca se chegaram a isolar e esta hipótese foi criada devido à identificação de um gene no sobreiro, chamado de QsCAD1, que tinha uma função potencialmente semelhante a um gene identificado numa espécie de feijão, e que conferia resistência a uma toxina produzida por um organismo que provocava o míldio da videira.

Mas, fará sentido pensar na ação de toxinas na doença do declínio do sobreiro?

A morte súbita dos sobreiros é uma forma de manifestação da doença que reflete uma ausência total de resistência por parte da árvore. O colapso integral da árvore sugere que terá sido atingido algum mecanismo essencial à sua sobrevivência, como por exemplo, o processo de respiração celular. Ao ser identificado no sobreiro um gene que terá as mesmas funções de um gene identificado noutra espécie de plantas, diretamente relacionado com a inativação de toxinas, sugere que *P. cinnamomi* possa produzir toxinas, uma vez que a expressão deste gene aumenta durante a infeção com este oomiceta.

As toxinas são normalmente substâncias de pequenas dimensões que podem migrar ao longo da planta e atingir mecanismos essenciais ao seu funcionamento, longe do local onde são produzidas, que, neste caso, seria nas raízes.

A morte súbita aconteceria naqueles sobreiros que possuem este gene não funcional e que seriam incapazes de inativar a toxina.

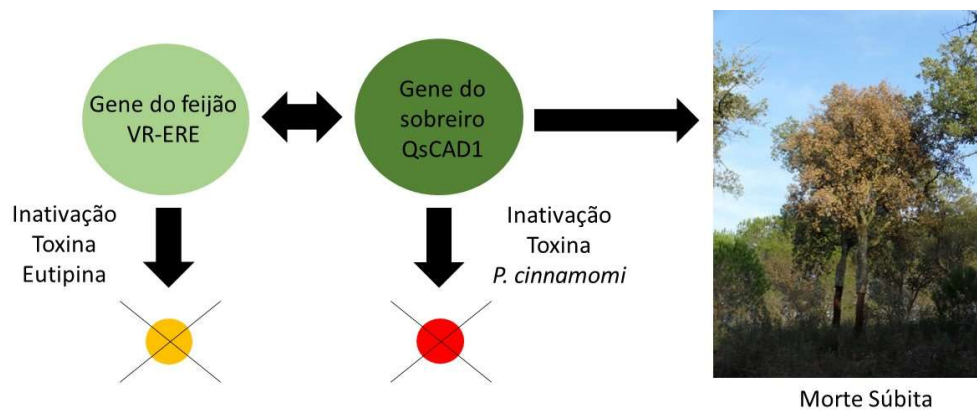


Imagem 7: Esquema da ação do gene QsCAD1 do sobreiro. (Coelho, A.C., Horta, H., Neves, D. and Cravador, A. (2006). Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, July-September, **69** (1-3): 62-72.)

Naturalmente que, neste momento, estes resultados apenas suportam hipóteses que precisam de ser mais estudadas.

Resposta de defesa do hospedeiro, o sobreiro

Nos últimos anos, foram identificados muitos genes potencialmente relacionados com a resposta de defesa do sobreiro à infeção por *P. cinnamomi*. Estão quase todos por caracterizar mas, em relação a alguns genes, tentou-se formular uma história que fizesse sentido com tudo o que sabemos a este respeito. O primeiro modelo que envolvia vários genes do sobreiro relacionados com a resposta de defesa foi formulado em 2004 (Coelho, A.C., 2004), publicado em 2011 (Coelho et al., 2011) e mais recentemente, aproveitado para mostrar a complexidade associada aos mecanismos de defesa que ocorrem nas células das plantas (Osswald et al., 2014).

Não iremos reproduzir este modelo, mas iremos tentar representar a complexidade associada aos mecanismos de defesa de plantas lenhosas. A Imagem 8 apresenta algumas das muitas ações envolvidas no processo de defesa à infeção por *P. cinnamomi*.



Imagem 8: Representação das ações envolvidas na resposta de defesa do sobreiro à infecção por agentes bióticos patogénicos, tais como, *P. cinnamomi*.

E, por muito que gostássemos, não temos ainda soluções para erradicar a doença do declínio do sobreiro, mas temos sugestões de investigações que podem ajudar a esclarecer o fenómeno e que podem ajudar na tomada de decisão quanto às melhores práticas e melhores estratégias de intervenção que visem a manutenção de ecossistemas a cuja beleza já todos nos rendemos e a cuja importância já todos nos curvamos.

Estratégias futuras

Entendemos que atualmente é muito importante encontrar uma estratégia que permita responder à questão:

Que sobreiros devemos escolher para progenitores de sementes que garantam a viabilidade da reflorestação a longo prazo?

Tendo em consideração tudo o que foi dito anteriormente relativamente ao elevado grau de diversidade genética que caracteriza a espécie, à complexidade de fenómenos que estão envolvidos na resposta de defesa, entende-se que uma das vias possíveis passa pela avaliação global do potencial genético de um elevado número de sobreiros.

Mas, em que consiste esta avaliação e o que é que pode produzir em tempo útil?

A Imagem 9 ilustra o que se pretende obter com a avaliação genética de um elevado número de indivíduos. Na realidade, tendo em consideração toda a informação que se possui em termos genéticos do sobreiro, relacionada com a resposta de defesa a doenças, é possível avaliar os padrões destes genes nos indivíduos (sobreiros) e tentar correlacioná-los positivamente com os padrões fenotípicos que observamos e designamos por resistentes ou suscetíveis à doença do

declínio. Procuramos, então, 1, 2, vários padrões genéticos (árvores destacadas na Imagem 9) que estejam correlacionados com um padrão fenotípico e usamos essa informação na seleção dos descendentes para reflorestação. No fundo, procuramos um código de barras genético, associado diretamente à resistência à doença do declínio. Este código de barras pode também representar sobreiros produtores de cortiça de elevada qualidade e de sobreiros bem adaptados ao ambiente em que vegetam.

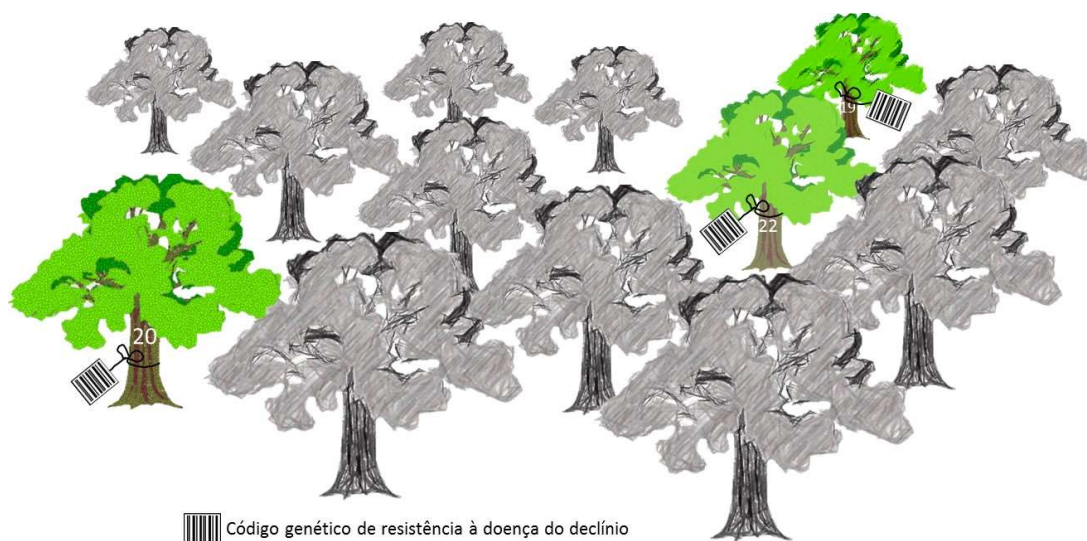


Imagem 9: Representação do resultado da aplicação da estratégia de avaliação genética de um grande número de sobreiros.

Filme de divulgação científica da doença do declínio do sobreiro

Em 2017, a aluna do curso de Imagem Animada da Universidade do Algarve, Gisela Correia, abraçou o projeto de produção de um filme que retratasse a dimensão científica da doença do declínio do sobreiro associada à dimensão ecológica e humana. O seu conteúdo deveria refletir o processo de deterioração do montado e evidenciar as principais causas. Deveria desencadear no observador sentimentos de preocupação, tristeza e melancolia, relacionados com o eventual desaparecimento do montado.

O filme deve servir o propósito de divulgação e sensibilização para o problema da doença do declínio do sobreiro mas ainda não está disponível ao público em geral.

O filme será visualizado em público, pela primeira vez, nesta sessão de formação.

Referências

- Coelho, A.C. (2004; 2009). Estudo da biodiversidade molecular de *Quercus suber* e caracterização de genes envolvidos na resposta de defesa à infecção por *Phytophthora cinnamomi*. Tese de doutoramento, Universidade do Algarve. Editorial Novembro (<http://www.novembro.pt>), coleção Nexus.
- Coelho, A.C., Lima, M.B., Neves, D. and Cravador, A. (2006). Genetic diversity of two evergreen Oaks [*Quercus suber* (L.) and *Quercus ilex* subsp. *Rotundifolia* (Lam.)] in Portugal using AFLP markers. *Silvae Genetica*, **55** (3): 105-118.
- Coelho, A.C., Horta, H., Neves, D. and Cravador, A. (2006). Involvement of a cinnamyl alcohol dehydrogenase of *Quercus suber* in the defence response to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, July-September, **69** (1-3): 62-72.
- Coelho, A.C., Horta, M., Ebadzad, G. and Cravador, A. (2011). *Quercus suber* – *P. cinnamomi* interaction: hypothetical molecular mechanism model. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 41S-S143-S157, indexed to SCOPUS Database (<http://www.scimagojr.com/>).
- Horta, M., Sousa, N., Coelho, A.C., Neves, D. and Cravador, A. (2008). *In vitro* and *in vivo* quantification of elicitin expression in *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **73** (1-3): 48-57.) <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.02.003>
- Pereira-Leal, J.B., Abreu, I.A., Alabaça, C.A., Almeida, M.H., Almeida, P., Almeida, T., Amorim, M.I., Araújo, S., Azevedo, H., Badia, A., Batista, D., Bohn, A., Capote, T., Carrasquinho, I., Chaves, I., Coelho, A.C., Costa, M.M.R., Costa, R.L., Cravador, A., Egas, C., Faro, C., Fortes, A.M., Fortunato, A.S., Gaspar, M.J., Gonçalves, S., Graça, J., Horta, M., Inácio, V., Leitão, J.M., Lino-Neto, T., Marum, L., Matos, J., Mendonça, D., Miguel, A., Miguel, C., Morais-Cecílio, L., Neves, I., Nóbrega, F., Oliveira, M.M., Oliveira, R., Pais, M.S., Paiva, J.A.P., Paulo, O.S., Pinheiro, M., Raimundo, J.A.P., Ramalho, J.C., Ribeiro, A.I., Ribeiro, T., Rocheta, M., Rodrigues, A.I., Rodrigues, J.C., Saibo, N.J.M., Santo, T.E., Santos, A.M., Sá-Pereira, P., Sebastiana, M., Simões, F., Sobral, R.S., Tavares, T.R., Teixeira, R., Varela, M.C., Veloso, M.M. and Ricardo, C.P.P. (2014). A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. *BMC Genomics*, 15:371. DOI: 10.1186/1471-2164-15-371. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/371>
- Oswald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dalio, R.J., Jung, M.H., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S. and Werres, S. (2014). Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* (review article), 44 (3):169-254 DOI: 10.1111/efp.12096.