

Estratégias biotecnológicas para o combate do NMP

Marta Vasconcelos

Escola Superior de Biotecnologia

Universidade Católica do Porto

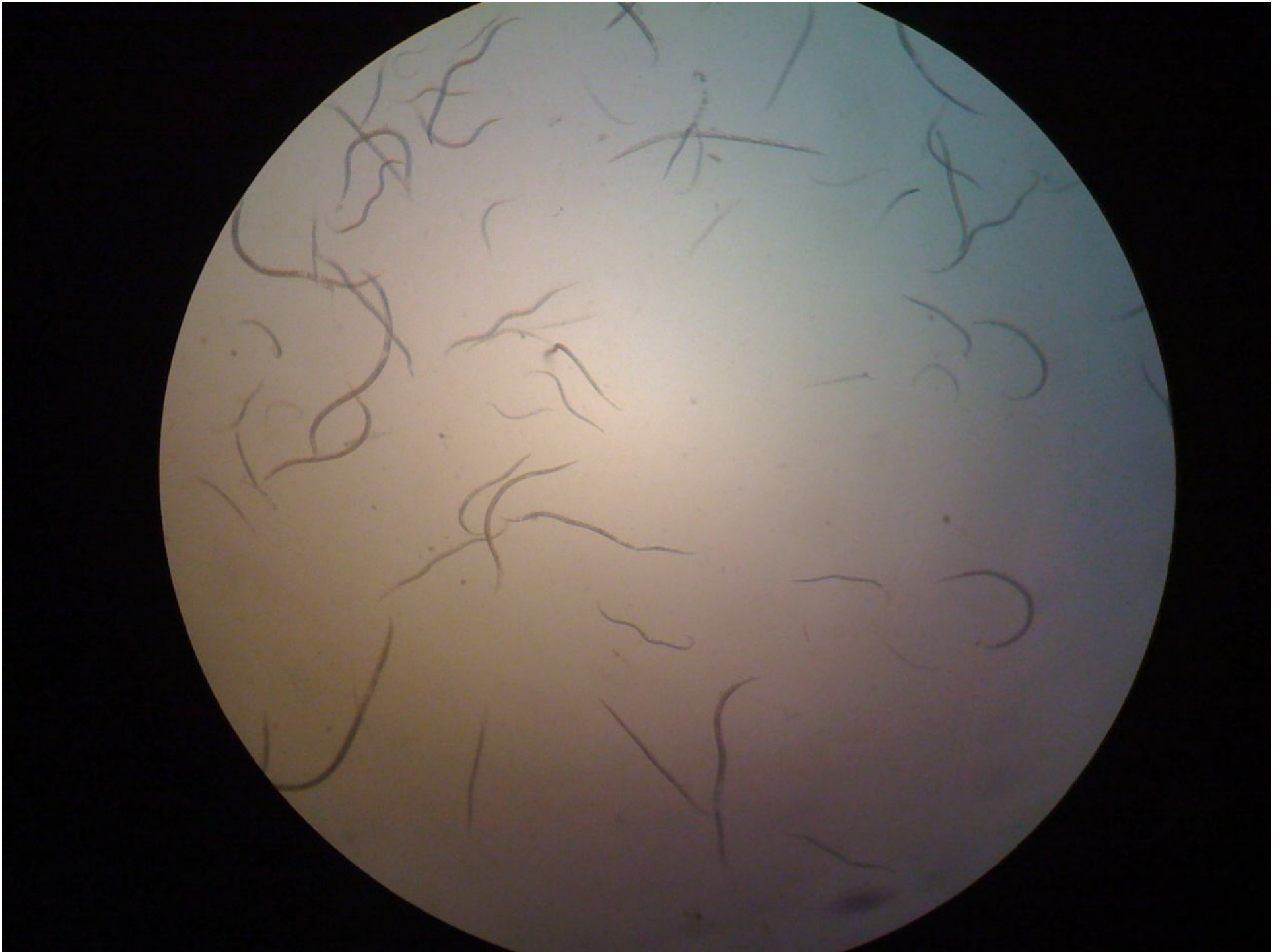
19 de Junho de 2009



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

CBQF

Centro de Biotecnologia
e Química Fina



O problema:

- ❖ O nemátode da madeira do pinheiro (NMP) é considerado uma das mais graves e letais pragas a nível mundial
- ❖ O NMP está a devastar os pinhais portugueses
- ❖ Detectado pela primeira vez no nosso país em 1999, encontra-se presente em diversos distritos a centro/sul do país tendo, e no distrito de Coimbra
- ❖ Declaração da totalidade do território nacional (continente) como zona afectada (Portaria 553-B/ 2008, de 27 de Junho de 2008).



Poderemos utilizar a biotecnologia para combater o NMP?

O que é a biotecnologia?

- **Tecnologia** baseada na **biologia**

Definição das Nações Unidas (convenção da diversidade biológica):

“Qualquer aplicação tecnológica que use um sistema biológico, organismos mortos ou derivados destes, para produzir ou modificar produtos para um uso específico.”

Objectivos do Projecto

1. Identificação de genótipos resistentes e locus de resistência
2. Vacinação de plantas (Imunização)
3. Utilização de micorrizas para criação de resistência
4. Transformação genética de pinheiro com genes de resistência

Material

- 3 estirpes de nemátodes virulentos
- 1 estirpe de nemátode não virulento
- Sementes de 5 espécies de pinheiro para screening de resistências (CENACEF)
- Plântulas de 10 meses de *Pinus pinea* e *Pinus Pinaster*

Identificação de genótipos resistentes e locus de resistência

- a) Seleção de árvores com graus de resistência;
- b) Avaliação da susceptibilidade/resistência
- c) Caracterização genotípica de árvores
- d) Estudos de associação genótipo/fenótipo.
- e) Avaliação da apetência do insecto vector

Prospecção de árvores em zonas afectadas

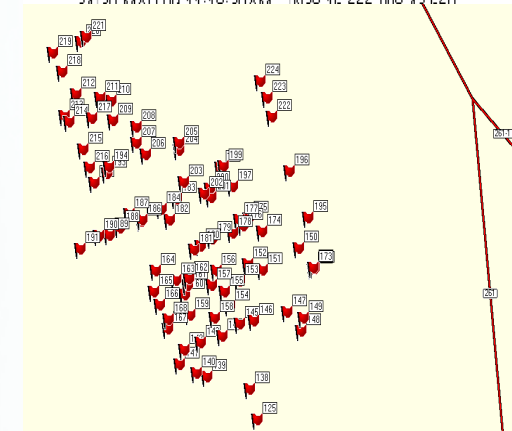
Local de estudo: Herdade da Comporta, concelho de Alcácer do Sal

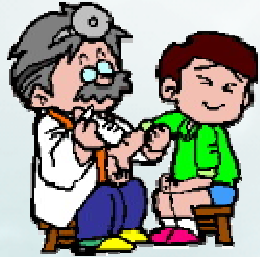


Georeferenciação de árvores



Árv n°	Data Hora	Coordenadas
15	30-MAR-09 9:11:07AM	N38 16.614 W8 43.800
16	30-MAR-09 9:13:41AM	N38 16.609 W8 43.813
17	30-MAR-09 9:17:40AM	N38 16.641 W8 43.787
18	30-MAR-09 9:21:59AM	N38 16.657 W8 43.789
19	30-MAR-09 9:30:52AM	N38 16.674 W8 43.790
20	30-MAR-09 9:35:39AM	N38 16.705 W8 43.835
24	30-MAR-09 9:51:59AM	N38 16.736 W8 43.780
25	30-MAR-09 9:58:50AM	N38 16.758 W8 43.722
26	30-MAR-09 10:07:53AM	N38 16.737 W8 43.673
27	30-MAR-09 10:14:47AM	N38 16.690 W8 43.696
28	30-MAR-09 10:24:48AM	N38 16.685 W8 43.704
29	30-MAR-09 10:27:07AM	N38 16.693 W8 43.740
30	30-MAR-09 10:45:28AM	N38 16.698 W8 43.756
31	30-MAR-09 11:04:14AM	N38 16.644 W8 43.841
32	30-MAR-09 11:06:13AM	N38 16.623 W8 43.849
33	30-MAR-09 11:12:52AM	N38 16.586 W8 43.752
34	30-MAR-09 11:19:30AM	N38 16.555 W8 43.650





Vacinação de plantas (Imunização)

1. Importação de *B. xylophilus* não virulento e estabelecimento das culturas;
2. Recolha de plântulas de diversos genótipos e estabelecimento de cultura em fitotrão;
3. Pré-Inoculação de plântulas com estirpes não virulentas de *B. xylophilus* e controlo;
4. Estimativa de resistência induzida pelas pré-inoculações;
5. Análise estatística dos resultados obtidos.

Vacinação de plantas (Imunização)



Imunização:

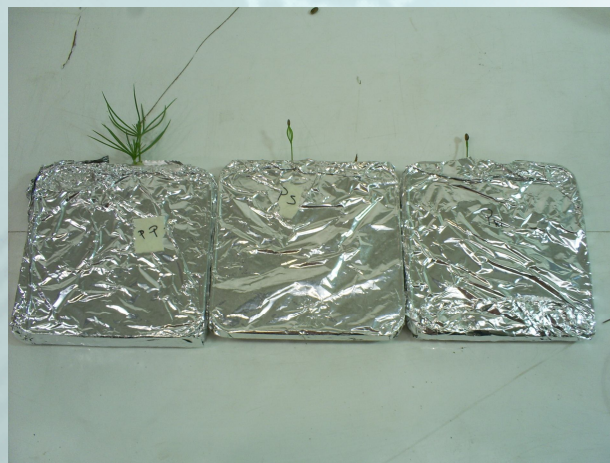
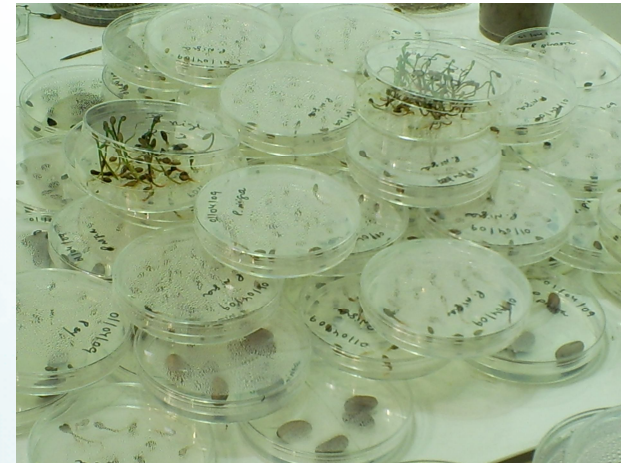
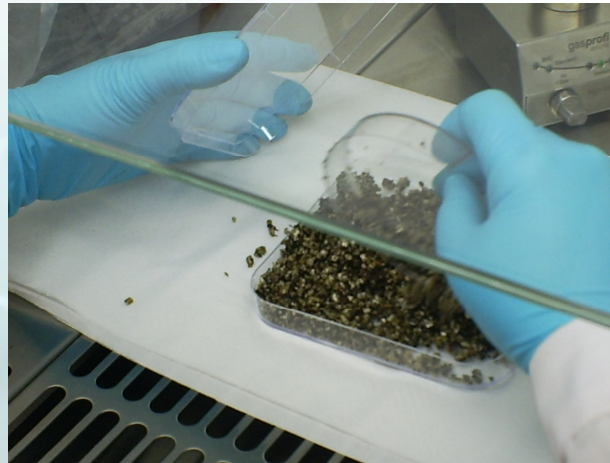


Utilização de micorrizas para criação de resistência

- Micorrização de *Pinus pinea* e *Pinus pinaster* com fungos ECM (*Suillus* spp., *Rhizopogon* spp., *Pisolitus* spp., *Paxillus* spp., *Laccaria* spp., *Lactarius* spp., *Hebeloma* spp.) para ensaios laboratoriais de inoculação
- Inoculação de plântulas previamente micorrizadas e não micorrizadas, com estripes não virulentas de nemátodo e fungo *Botrytis cinerea*.

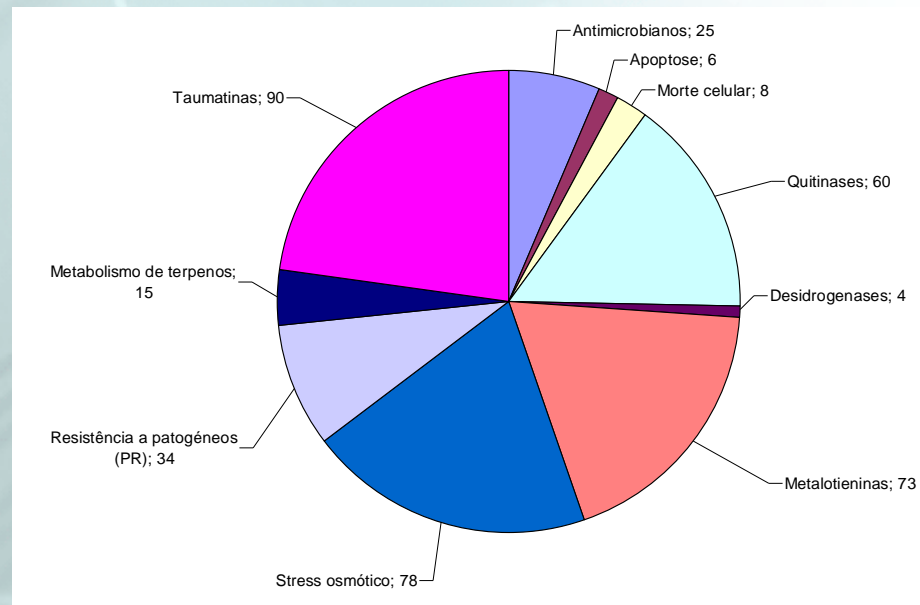
Utilização de micorrizas para criação de resistência

Estabelecimento
de microcosmos



Transformação genética de pinheiro com genes de resistência

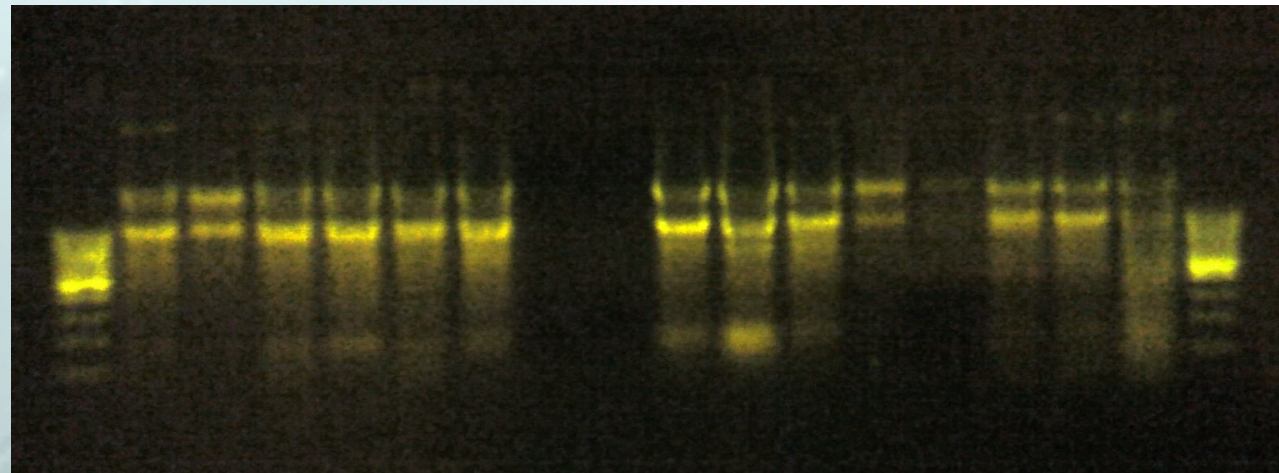
1. Identificação de genes na planta que confirmam resistência ao nemátode
2. Transformar pinheiro bravo com gene de resistência
3. Transferência das plântulas para condições *ex vitro* e crescimento inicial em estufa.



Transformação genética de pinheiro com genes de resistência

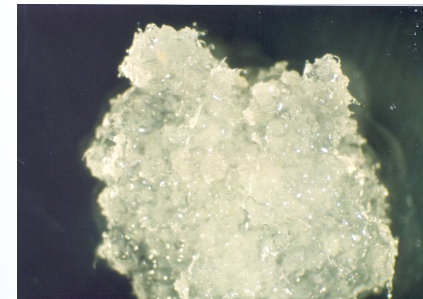
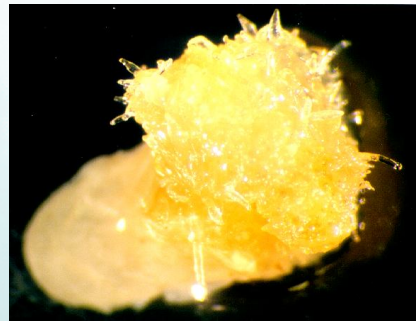
Extracção de RNA de tecidos de *P. pinaster* e *P. pinea*

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



RNA de pinheiro bravo e pinheiro manso (agulhas, ramos, infectados ou não infectados)

Transformação genética de pinheiro com genes de resistência



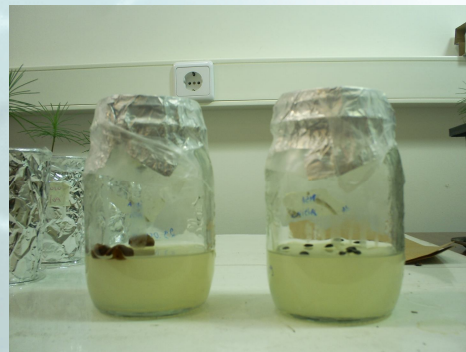
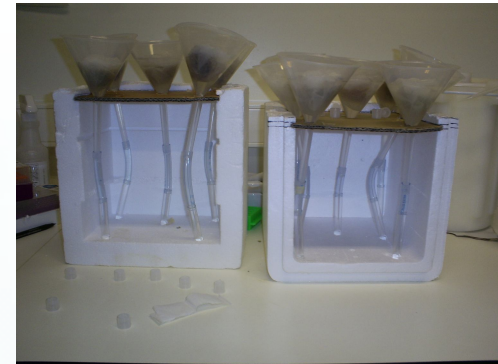
Pretende-se obter plantas jovens de pinheiro bravo com expressão dos genes de resistência ao nemátode identificados previamente

Crescimento e extracção de nemátodes



Inoculações controladas

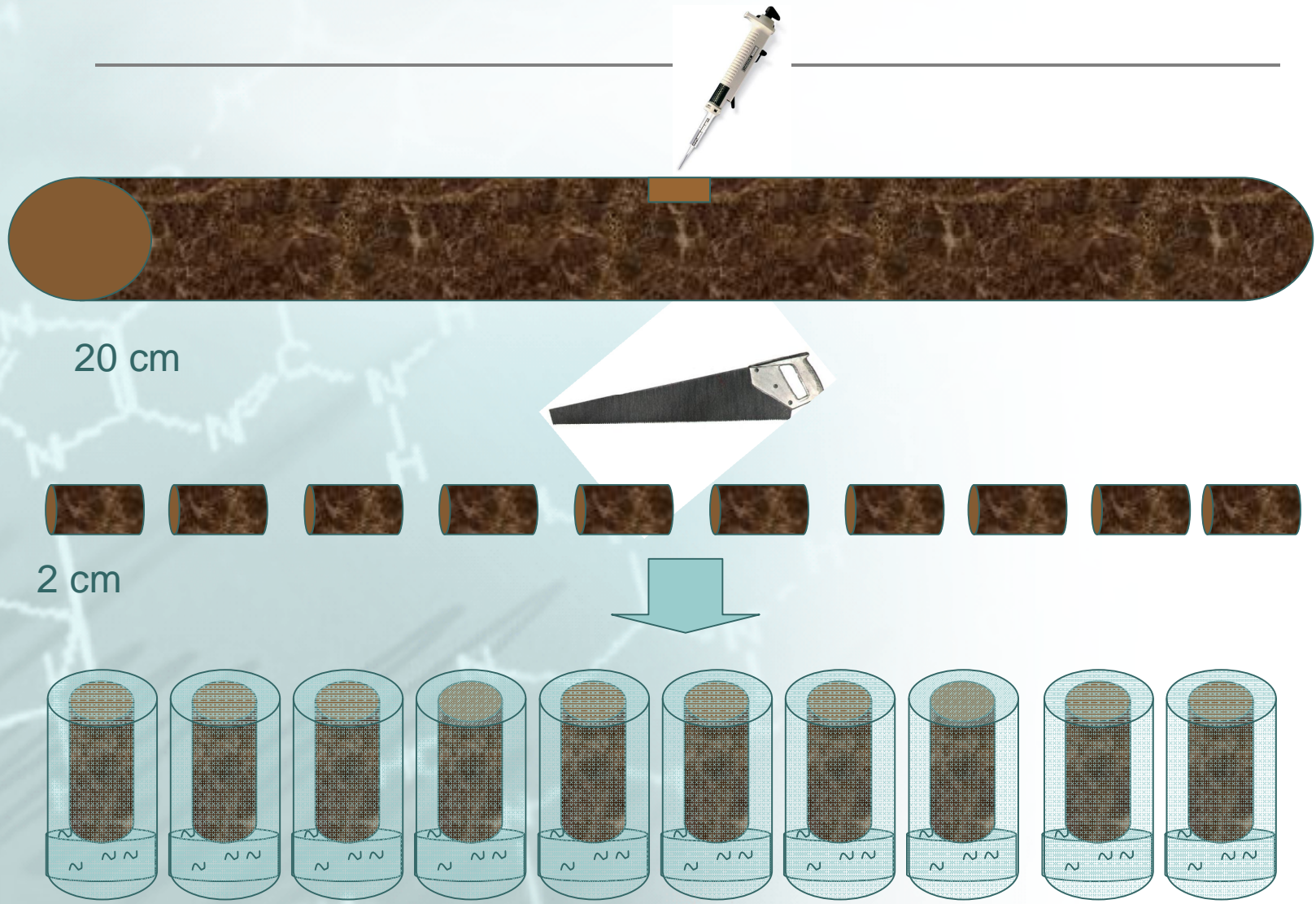
- Inoculações de Pinheiro bravo e manso por diversos métodos:
 - Papel de filtro
 - Callus
 - Raspagem



Avaliação de susceptibilidade/resistência de diversos genótipos de pinheiro

- *P. pinaster* (4 locais), *P. pinea* (1 local), *P. sylvestris* (1 local), *P. nigra* (1 local) e *P. radiata* (1 local), para inoculações controladas em 2010
- Avaliação através inoculações e através da técnica de ramos segmentados

Avaliação de resistência através de ramos segmentados



Agradecimientos

- AFN
- Colaboradores/Consultores: Equipa INRB, IBET, Rui Oliveira, Hajime Kosaka, Dr. Aikawa, Dr. Manuel Mota, Paula Castro
- Grupo ESB: Ana Cristina Rodrigues, Albina Franco, Rui Rodrigues, Maciej Markowski, Carla Santos, Mariana Roriz

O Grupo na ESB



Obrigada pela vossa atenção!

