



Ministério da
Agricultura,
do Desenvolvimento
Rural e das Pescas



IFAP
Instituto de Financiamento
da Agricultura e Pesca, I.P.



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

CBOF

Centro de Biotecnologia
e Química Fina



LINHA DE ACÇÃO 5

Resposta biotecnológica ao problema do NMP

Marta Vasconcelos
2 de Fevereiro 2010



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

OBJECTIVOS GERAIS DO PROJECTO

1. Identificação de genótipos resistentes e locus de resistência
2. Vacinação de plantas (Imunização)
3. Identificação de genes de resistência ao NMP (transcriptómica)
4. Transformação genética de pinheiro com gene de resistência ao NMP
5. Avaliação de resistências



Agradecimientos

- MADRP, IFAP I.P., AFN
- Colaboradores/Consultores: Equipa INRB, IBET, Hajime Kosaka, Dr. Aikawa, Dr. Manuel Mota, Dra. Paula Castro
- **Grupo ESB**



Resultados obtidos no 1º ano de projecto



Identificação de genótipos resistentes e locus de resistência

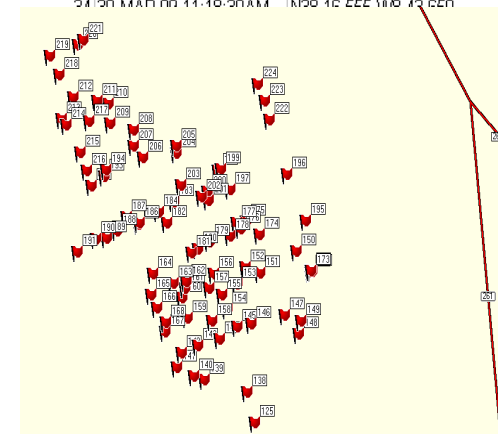
1. Indicação de um conjunto de árvores candidatas e georeferenciadas, seleccionadas pela resistência ao nemátode na área afectada pelo NMP
2. Caracterização genotípica para isolamento de QTLs



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
24	30-MAR-09 11:18:30AM	N38 16.555 W8 43.650



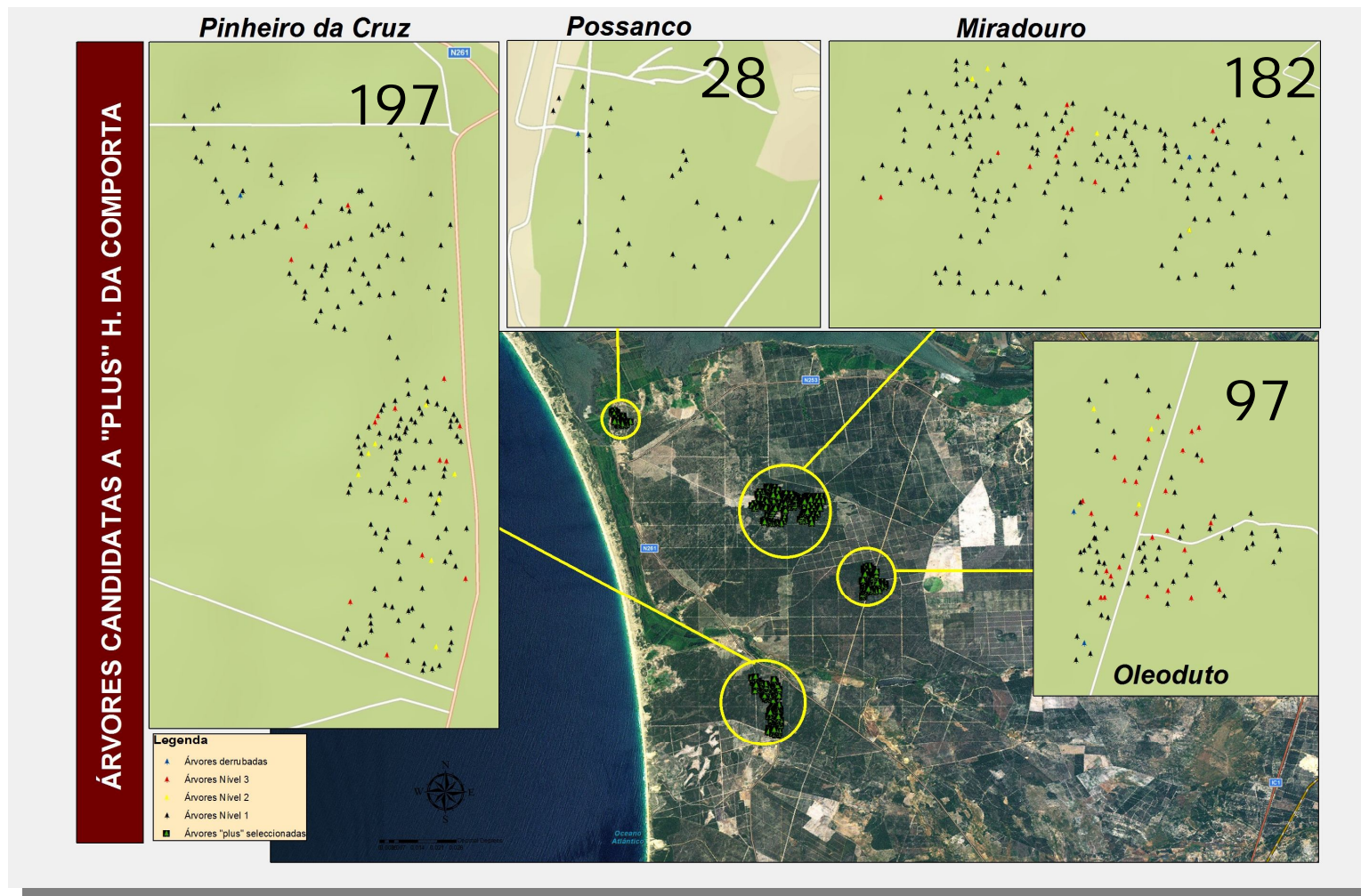


**Colheita de material em
árvores seleccionadas na
Herdade da Comporta**



**Material recolhido em
árvores seleccionadas na
Herdade da Comporta**

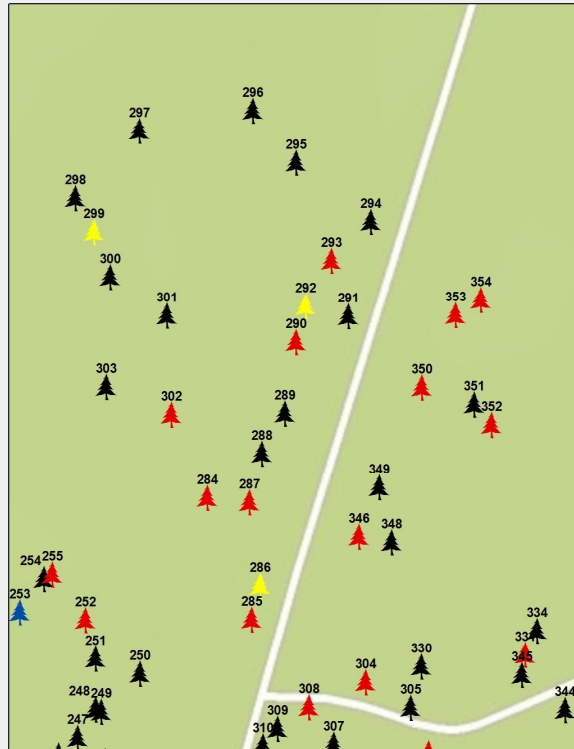




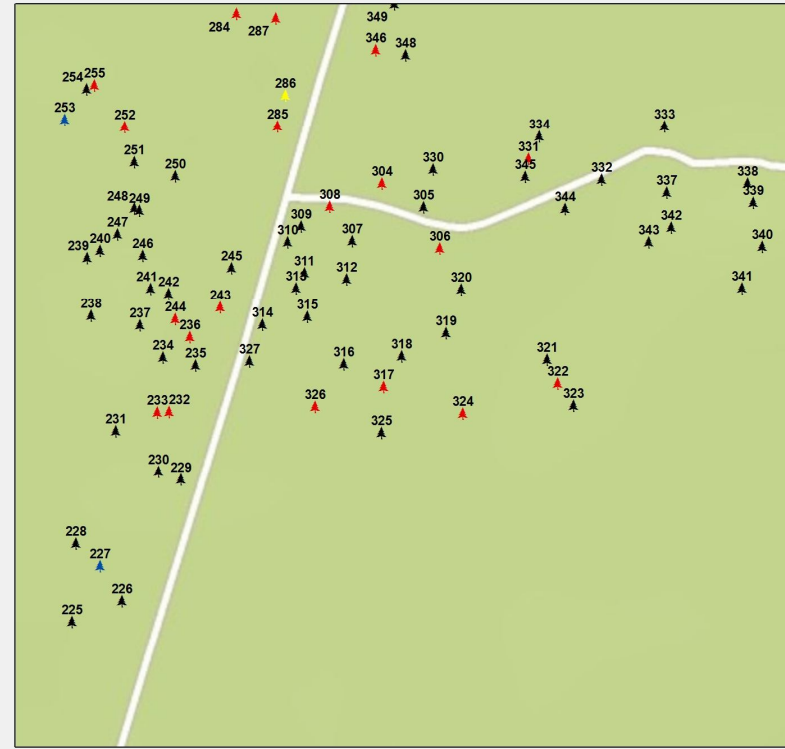
Localização dos quatro núcleos de árvores seleccionadas na Herdade da Comporta: Pinheiro da Cruz, Possanco, Miradouro e Oleoduto



OLEODUTO



Oleoduto Norte



Oleoduto Sul

Legenda	
▲	Árvores derrubadas
▲	Árvores Nível 3
▲	Árvores Nível 2
▲	Árvores Nível 1

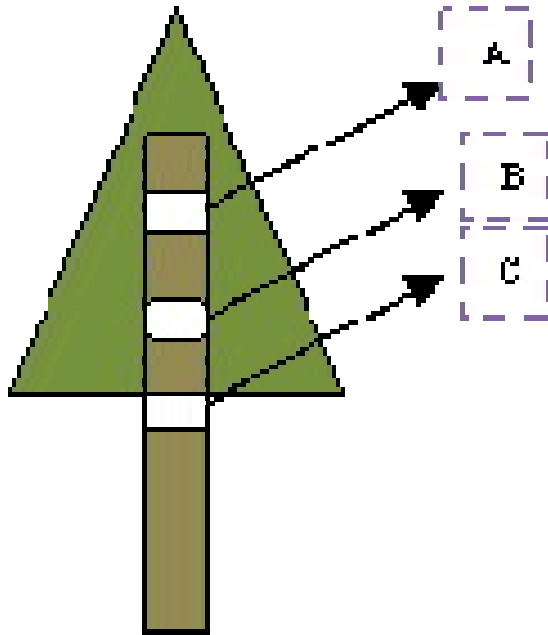
0 0,000375 0,00075 0,0015 0,00225 0,003 Decimal Degrees



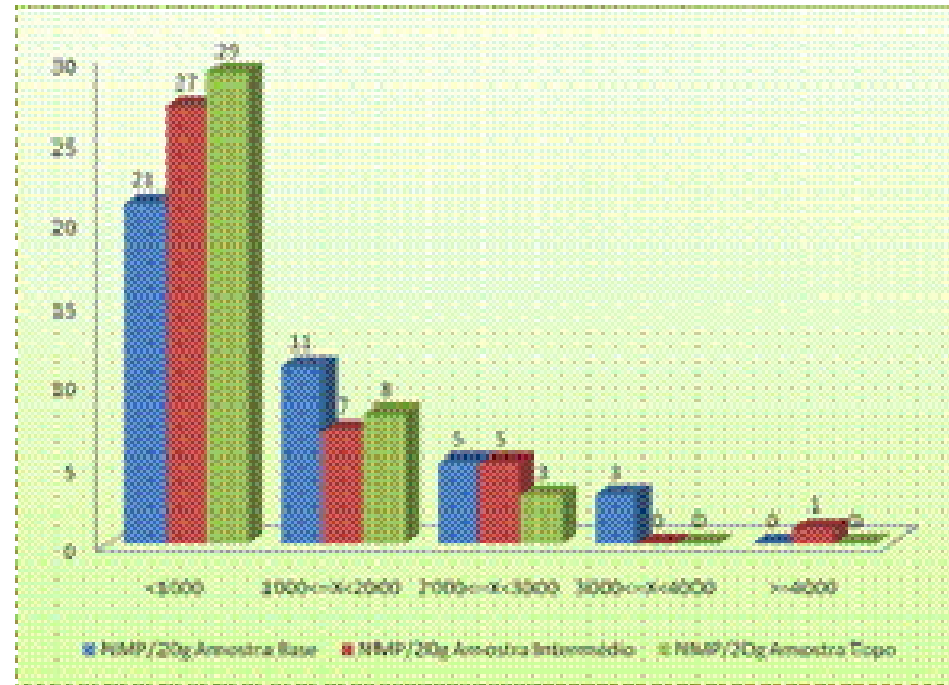
Informação recolhida em Novembro de 2009.

Nível 1 - Árvores com agulhas verdes (saudáveis); **Nível 2** - Árvores com alguns ramos de agulhas amarelecidas (sintomas de doença); **Nível 3** - Árvores com a maioria das agulhas castanhas (árvores mortas ou quase mortas).

504 árvores: 50 mortas, 40 analisadas, 39+

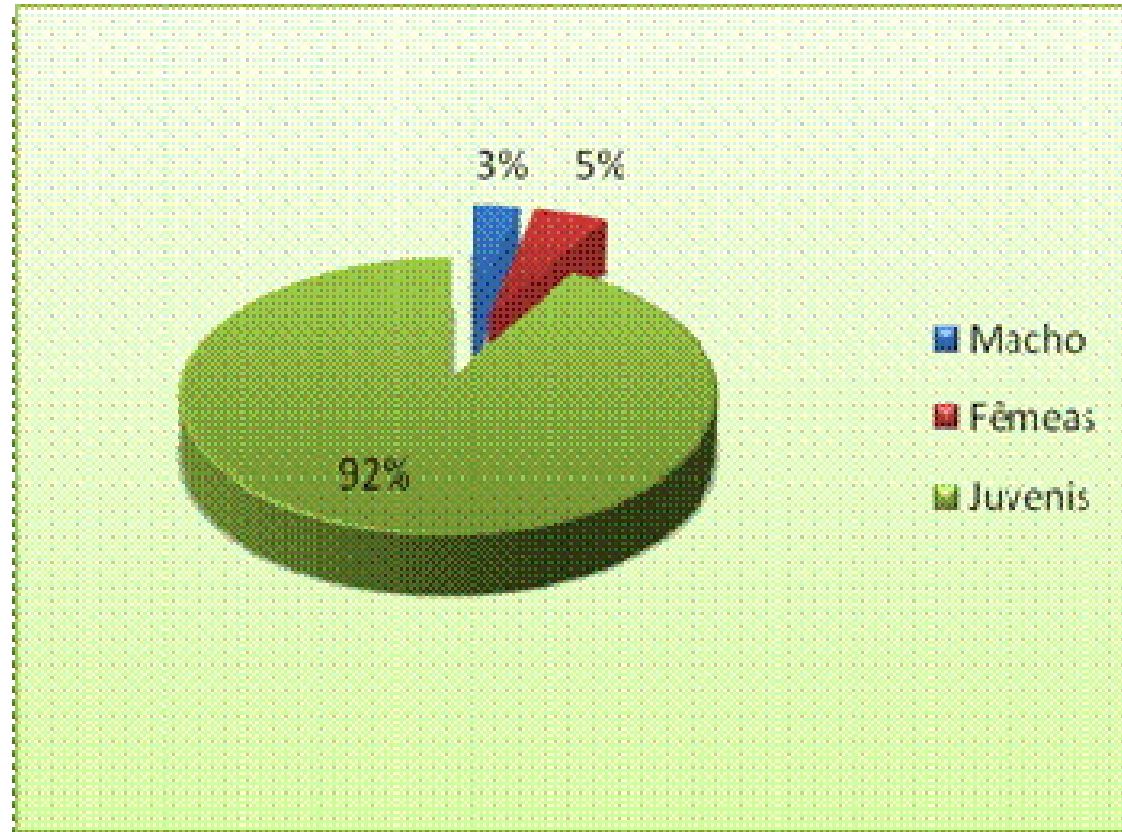


Esquemática da localização das amostras recolhidas nas árvores mortas para identificação da presença de nemátode



Distribuição do número de árvores abatidas pelas cinco classes de frequência de nemátodes definidas para as amostras recolhidas





Comparação da percentagem de nemátodes juvenis com machos, fêmeas encontrados nas 40 árvores abatidas na Herdade da Comporta



Estabelecimento de descendências de geração e meia para avaliação da susceptibilidade ao NMP



Sementeira das descendências dos 16 clones do pomar testado do Escaroupim (final de Outubro) na Mata nacional de Valverde



Árvore nº 33

30 Março 2009

Localidade: Comporta Sul

Coordenadas:

38° 16,586 N

8° 43,752 W

Altitude:

Observações:

- Seleccionada no dia 30-3-09; Foto 09-07-2009; Colheita de pinhas em Abril de 2009;
- Inspeccionada a 09-09-2009; Foto 09-09-2009; a morrer, muito castanha; área muito devastada com muitas cortadas;
- Inspeccionada a 09-10-2009; Foto 09-10-2009; morta;
- Abatida a 28-10-2009 para despiste de causa de doença;



Foto BR

Altura – 17,1 m
DAP – 40,5 cm

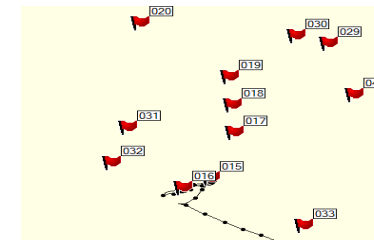


Foto BR



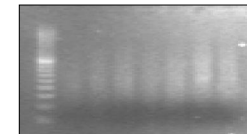
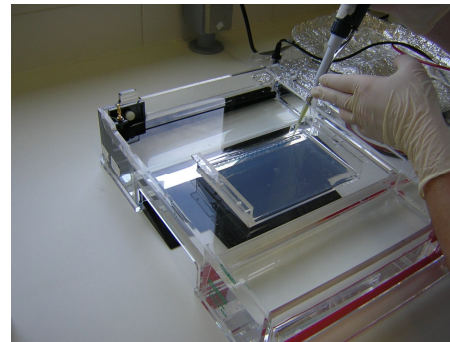
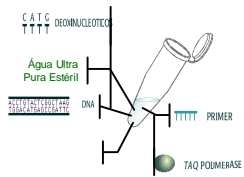
CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

Caracterização genotípica das árvores seleccionadas por Microssatélites e AFLPs

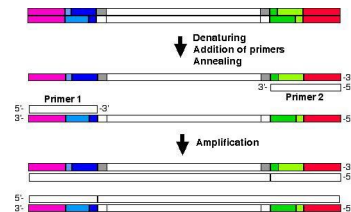


63 árvores genotipadas (27 resistentes?)

1ª amplificação pré selectiva



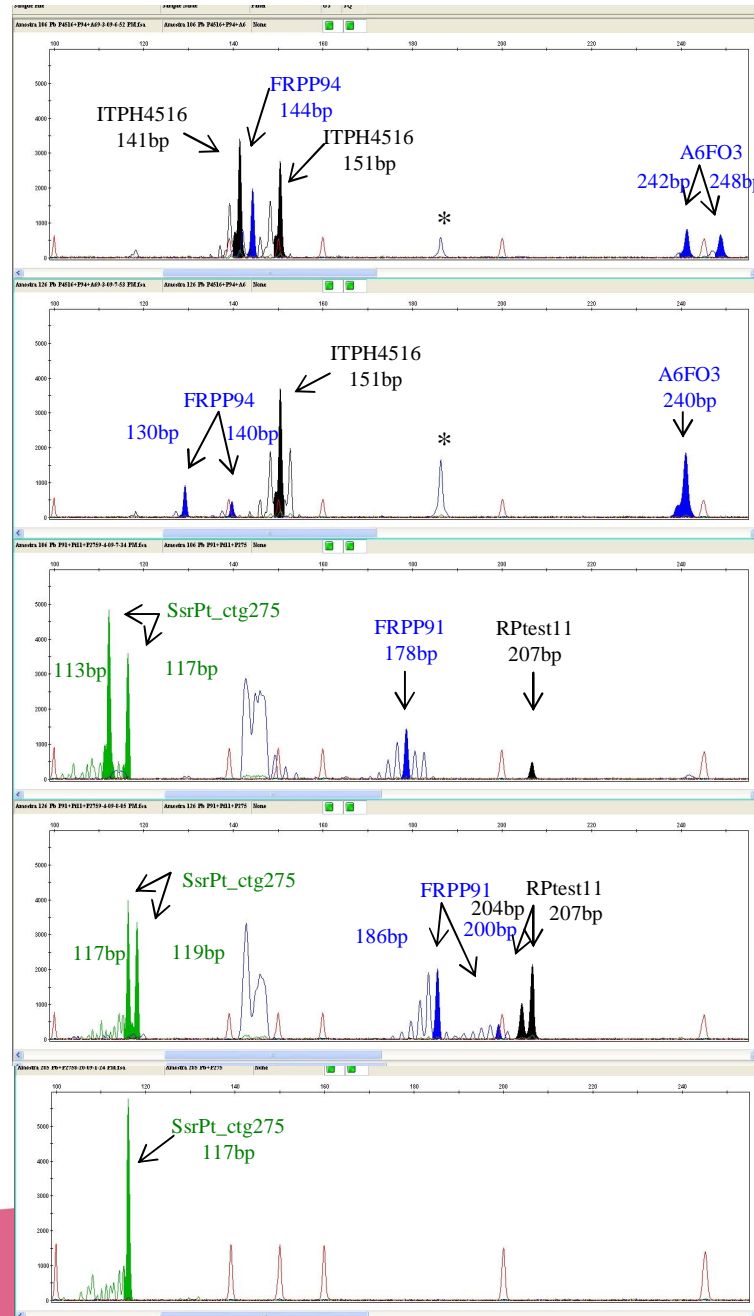
visualização de *smears* e confirmação da ocorrência das reacções de corte e de pré-amplificação.



M 1 2 3 4 5 6
7
3000



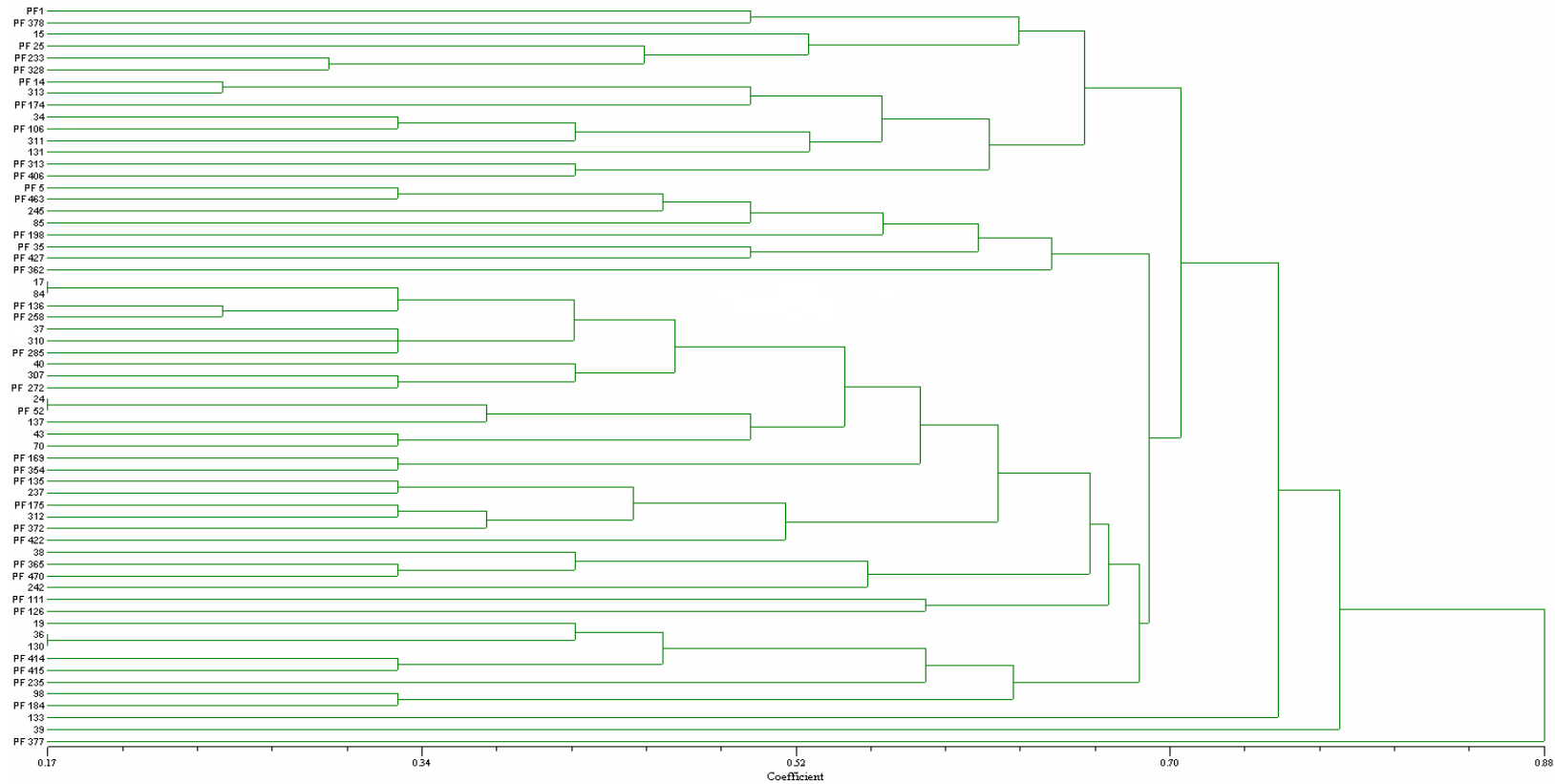
CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia



Perfil genético com 6 marcadores microsatélites



Dendrograma (63 árvores de pinheiro-bravo da Herdade da Comporta)





Electroforetograma (AFLPs) referente à análise das árvores nº **PF285** e **242** da Herdade da Comporta com a combinação de *primers* E-ACG/M-CAG.



2. Introdução de resistência através de "vacinação" das plantas

- Obtenção de cultura estabelecida de estirpe não virulenta de nemátode japonesa em condições laboratoriais nacionais controladas
- Definição dos métodos de cultura para identificação de estirpe *B. xylophilus* nacional não virulenta
- Determinação da não virulência da estirpe japonesa no pinheiro bravo português
- Identificação das condições laboratoriais de inoculação das plantas de campo



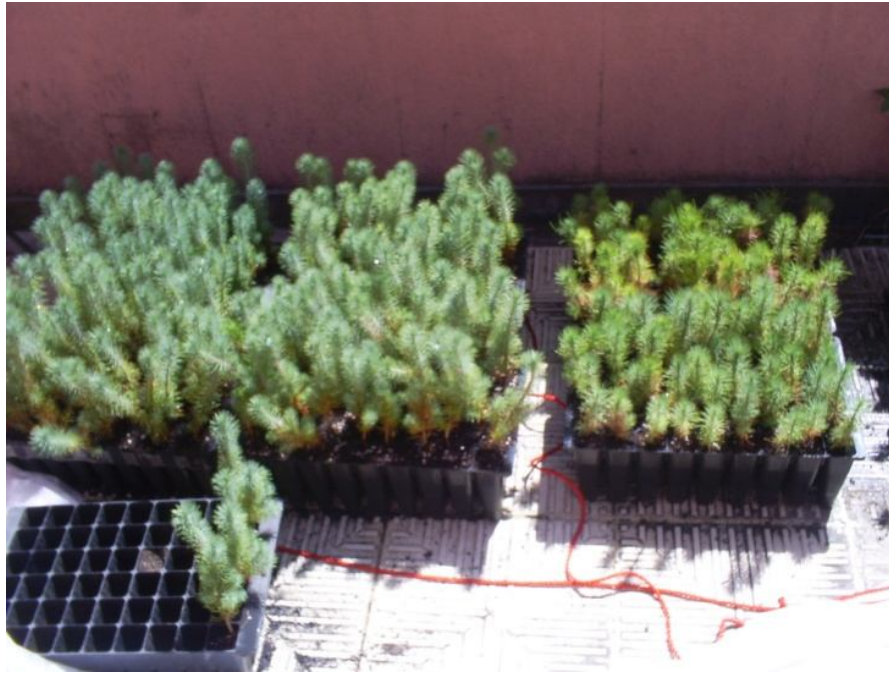


Estufa contendo placas de Petri e Erlenmeyers de 100mL com culturas de fungo e NMP



Erlenmeyer contendo cevada inoculada com *Botrytis cinerea*





Plântulas de *P. pinaster* e *P. pinae* em varanda, na Escola Superior de Biotecnologia



Plântulas de *P. pinaster* (frente) e *P. pinae* (fundo) em fitoclima



Table 1 – Symptom development in *P. pinaster* (PP), *P. pinea* (PPi), *P. nigra* (Pni) e *P. sylvestris* (Psy), before (T0), 10 days (T10) and 20 days (T20) after inoculation with sterile water (H2O), avirulent strain (A) and virulent strain (HF)

Treatment conditions	Incubation time (days)		
	T0	T10	T20
PPH ₂ O	I	I	II
PPA	I	II	II
PPHF	I	III	IV
PPiH ₂ O	I	I	I
PPiA	I	II	II
PPiHF	I	I	II
PniH ₂ O	I	I	I
PniA	I	II	II
PniHF	I	II	II
PsyH ₂ O	I	I	II
PsyA	I	II	II
PsyHF	I	II	III

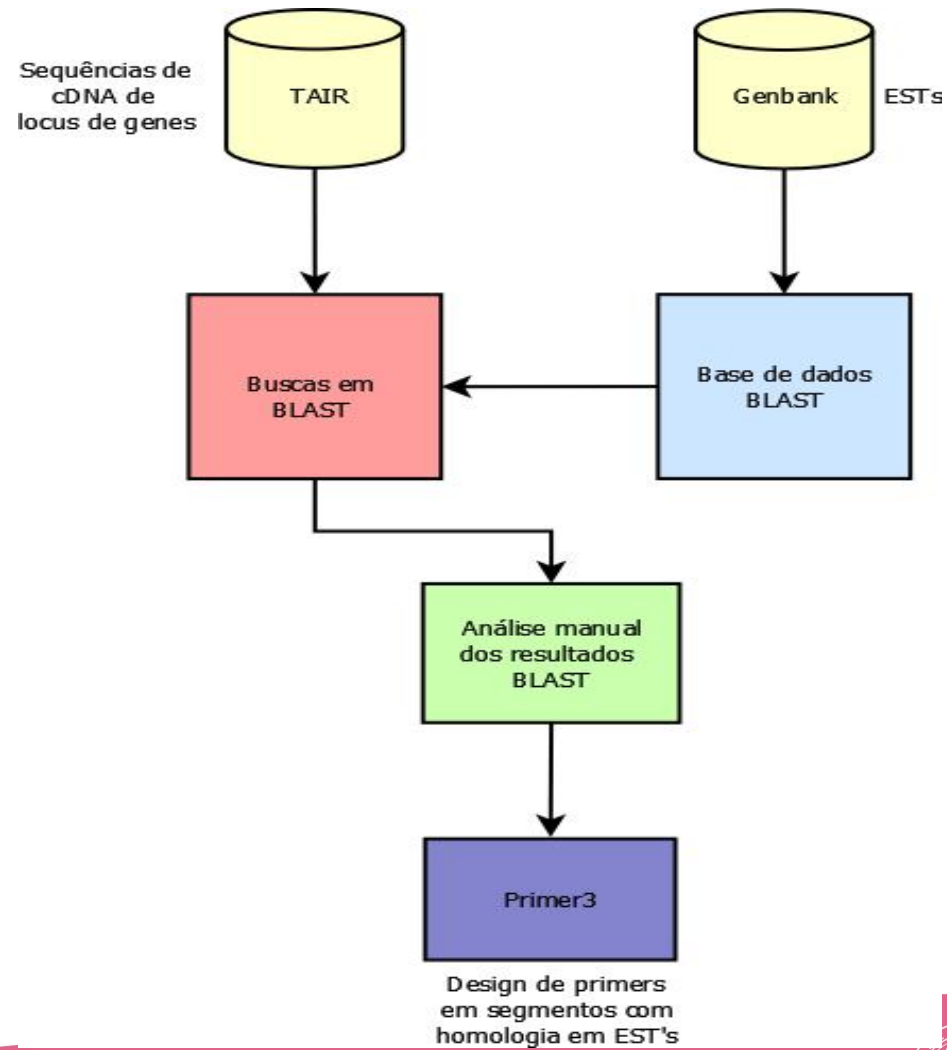


3. Identificação de genes de resistência na planta

- Conhecimento do sistema de cultivo em fitoclima otimizado para plantas de pinheiro bravo e pinheiro manso de diversas populações;
- Obtenção de RNA de alta qualidade de amostras de pinheiro bravo e pinheiro manso afectadas e não afectadas pelo nemátodo
- Obtenção de bibliotecas por nebulização



Desenho de primers



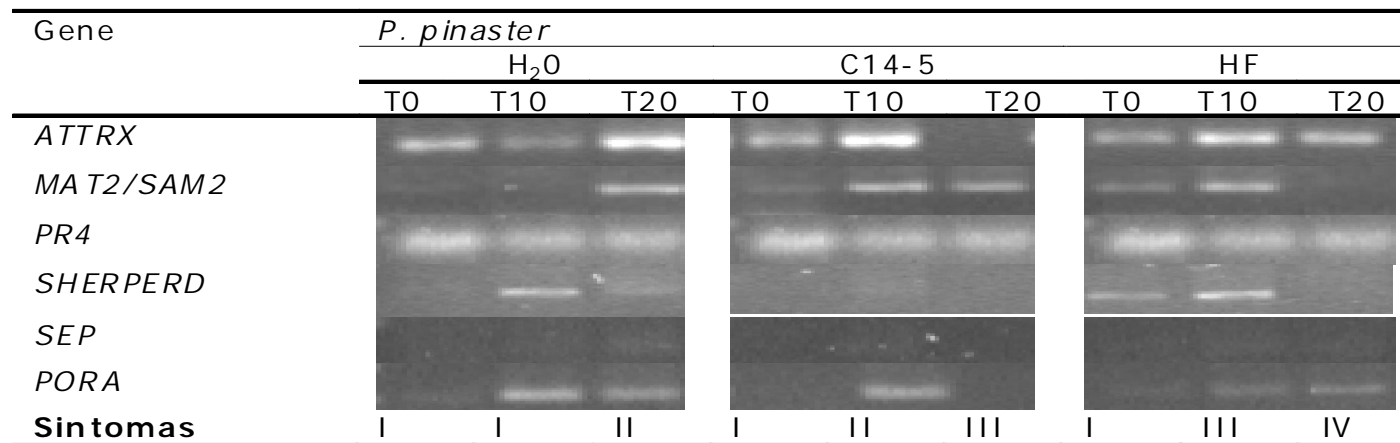
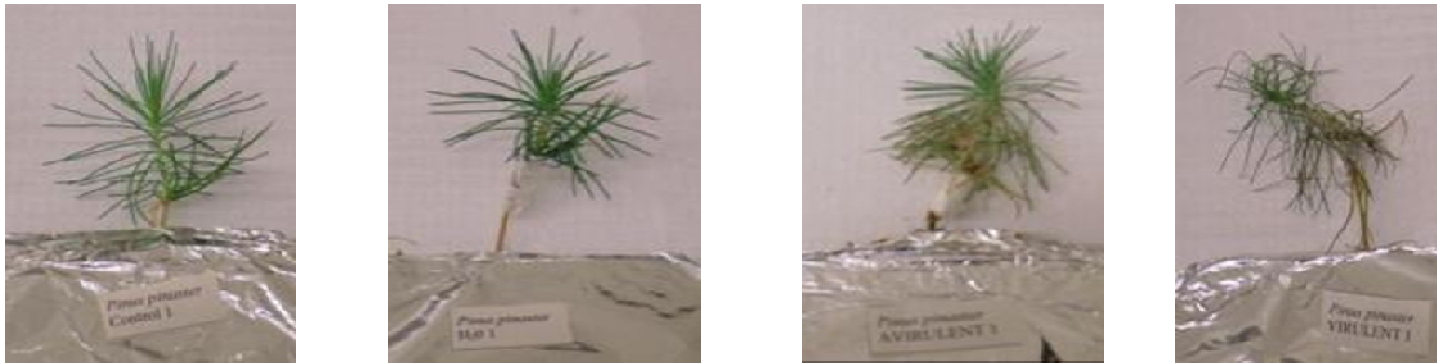


Figura 3: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).





Gene	<i>P. pinea</i>								
	H ₂ O			C14-5			HF		
	T0	T10	T20	T0	T10	T20	T0	T10	T20
<i>ATTRX</i>									
<i>MAT2/SAM2</i>									
<i>PR4</i>									
<i>SHERPERD</i>									
<i>SEP</i>									
<i>PORA</i>									
Sintomas	I	I	II	I	II	II	I	II	II

Figura 4: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).



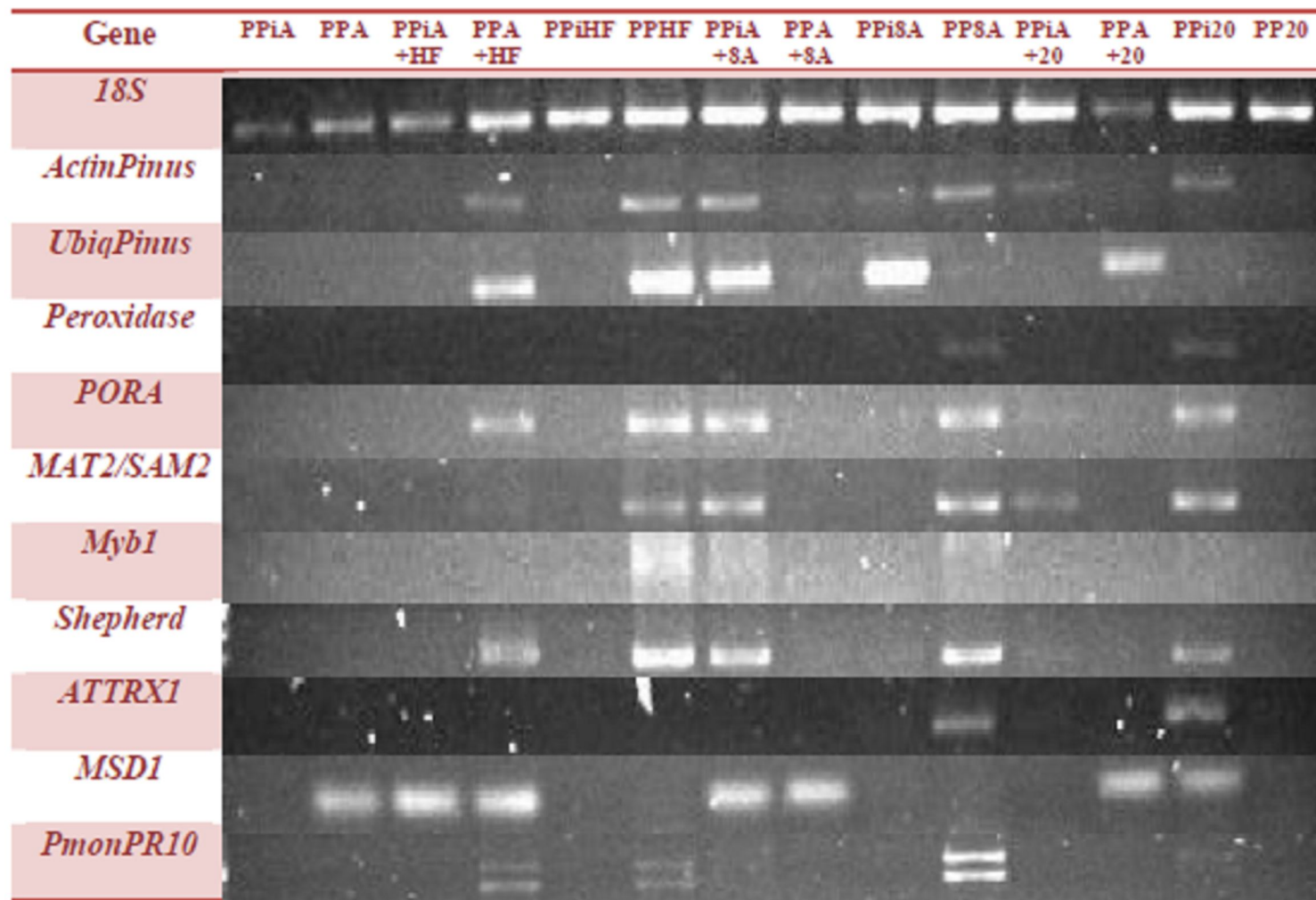


Figura 1: Expressão gênica em *P. pinaster* (PP) e *P. pinea* (PPi) monitorizada por RT-PCR, 6 dias depois da inoculação, com a estirpe não virulenta de nemátode C14-5 (A), com as três estirpes virulentas de nemátode HF, 8A e 20 e com ambas as estirpes, não virulenta e cada uma das virulentas (A+HF, A+8A e A+20).

4: Introdução de genes de resistência

- Obtenção de sementes imaturas de diferentes linhagens de *P. pinaster*
- Obtenção de linhas embriogénicas de *P. pinaster*





Recolha de pinhas imaturas na Mata Nacional do Escaroupim





Pinhas imaturas obtidas nas colheitas

Meio de cultura	Nº total de embriões cultivados		
	Família 49	Família 68	Família 82
CPPU1	70	100	70
CPPU	70	100	70
LVm	70	100	70
IM6P	70	100	70
IM6	70	100	100
BRL	100	100	70



Embrião zigótico de *Pinus pinaster* em estágio precotiledonar de desenvolvimento.



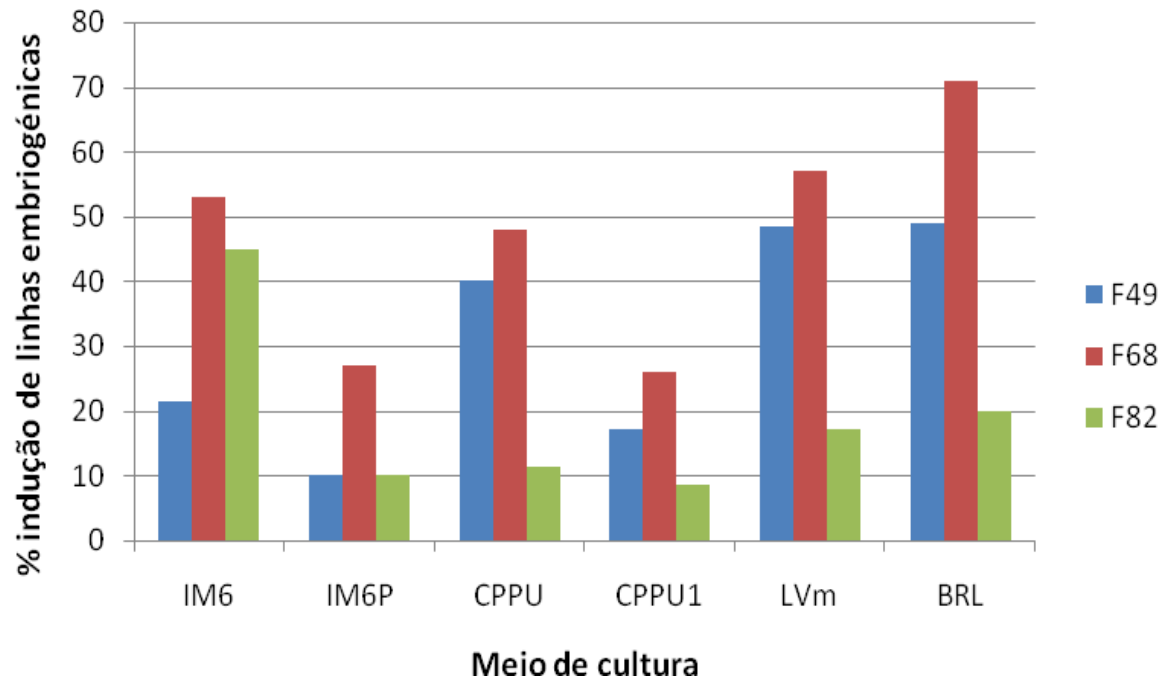


Gráfico 1. Indução de linhas embriogénicas a partir de embriões zigóticos de *Pinus pinaster* das famílias 49, 68 e 82 (F49, F68, F82) nos seis meios de cultura testados (IM6, IM6P, CPPU, CPPU1, LVm e BRL).



Tecidos embriogénicos iniciados a partir de embriões zigóticos de *Pinus pinaster*. (A) Tecido embriogénico após ter sido isolado do embrião zigótico que lhe deu origem; (B) Tecido embriogénico não isolado do embrião que lhe deu origem, sendo ainda visíveis os cotilédones do embrião zigótico.

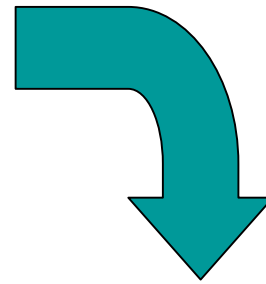
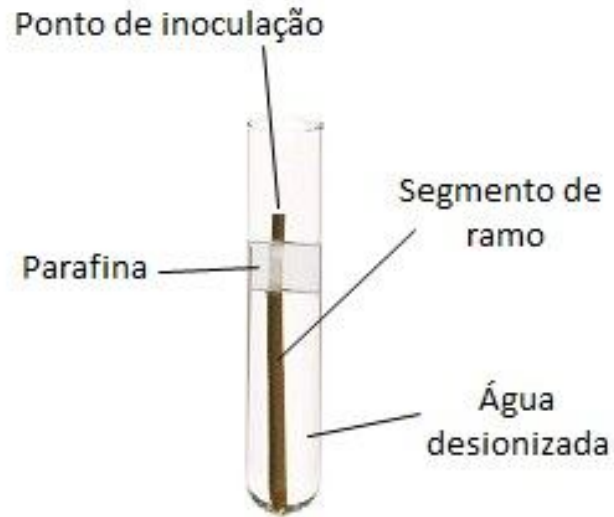


5: Avaliação da resistência ou susceptibilidade dos diferentes germoplasmas ao NMP

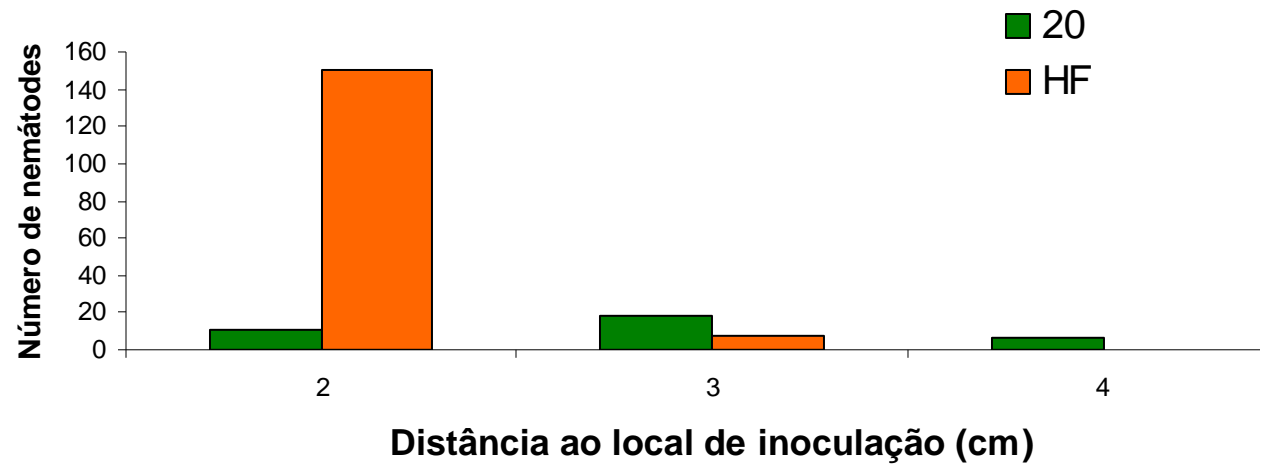
– A começar no terceiro biénio



Avaliação de resistências



Teste dos ramos segmentados



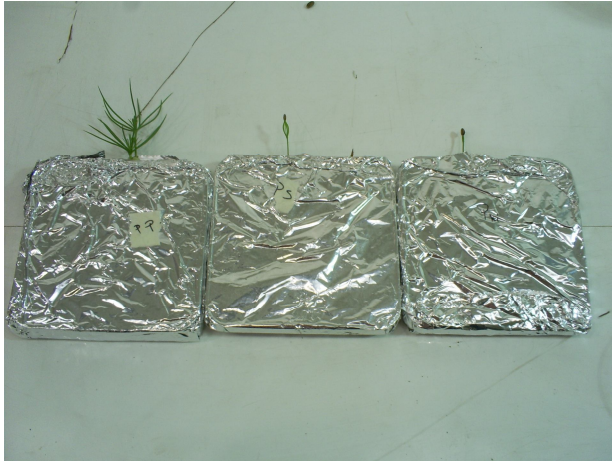
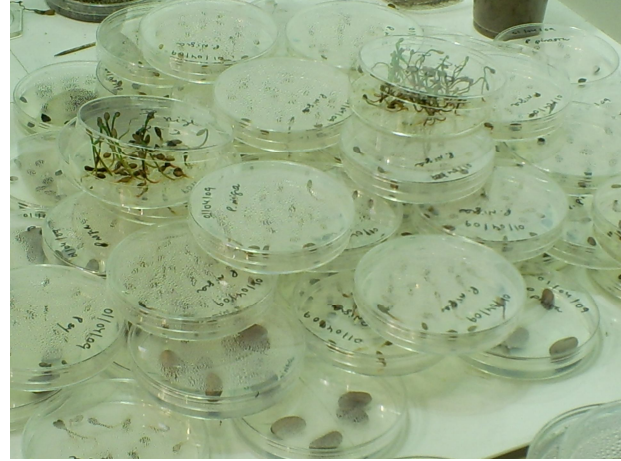
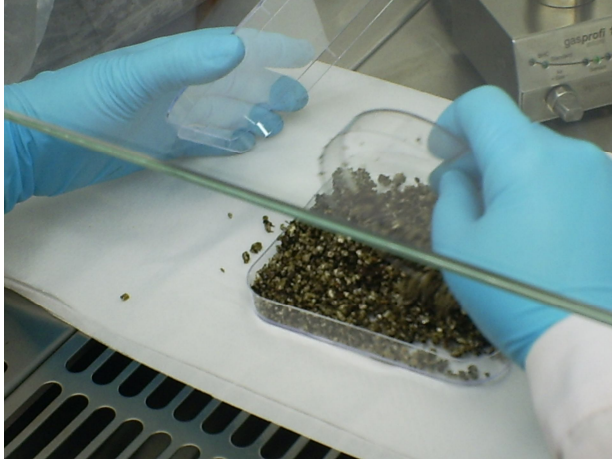
Resultados “extra”



- ❑ Micorrização de *Pinus pinea* e *Pinus pinaster* com fungos ECM (*Suillus* spp., *Rhizopogon* spp., *Pisolithus* 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*.



Estabelecimento de microcosmos



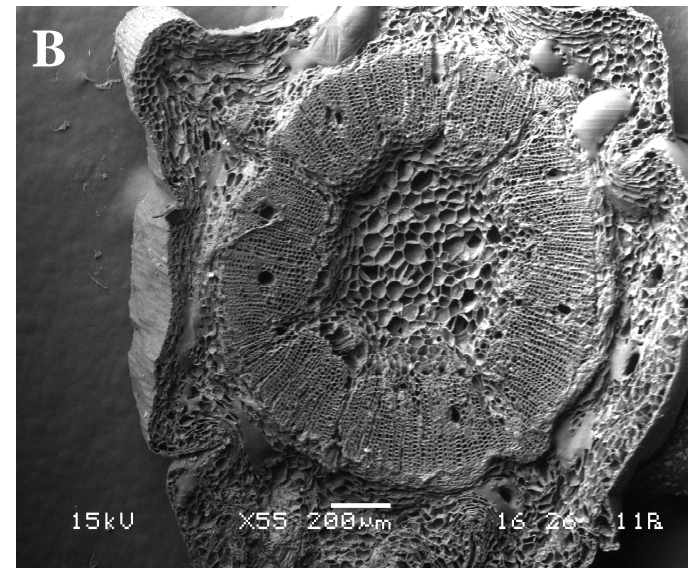
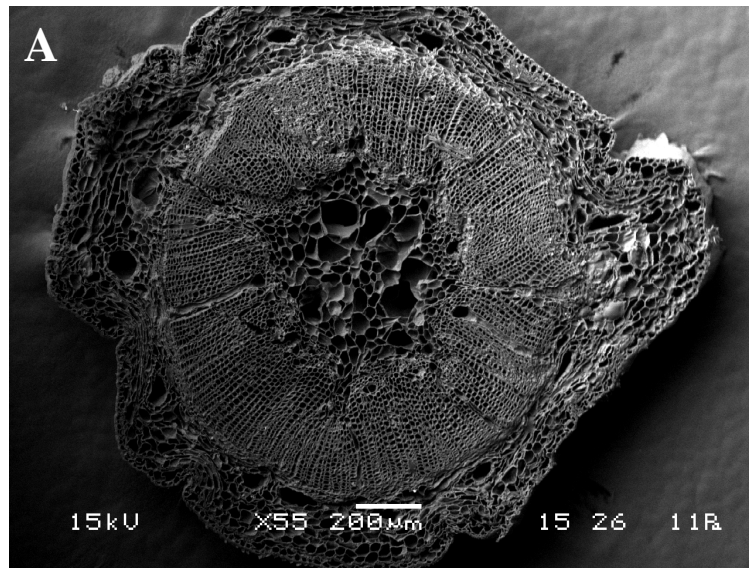
Identificação de bactérias associadas ao nemátode

Estirpe de nemátode	Aspecto das colónias	Morfologia	Coloração de Gram	Teste da catalase	Teste do Citocromo C oxidase	Crescimento a 42°C
HF	Transparentes, brilhantes e pequenas	Bacilos curtos	-	-	+	+
20	Beges, com relevo, brilhantes, opacas e grandes	Bacilos	-	-	+	-
8A	Transparentes, brilhantes e pequenas	Cocos	+	-	+	+
C14-5	Beges, com relevo, brilhantes, opacas e grandes	Bacilos curtos	-	+	+	+

Resultados obtidos nos testes de identificação das bactérias associadas às diferentes estirpes de nemátodes



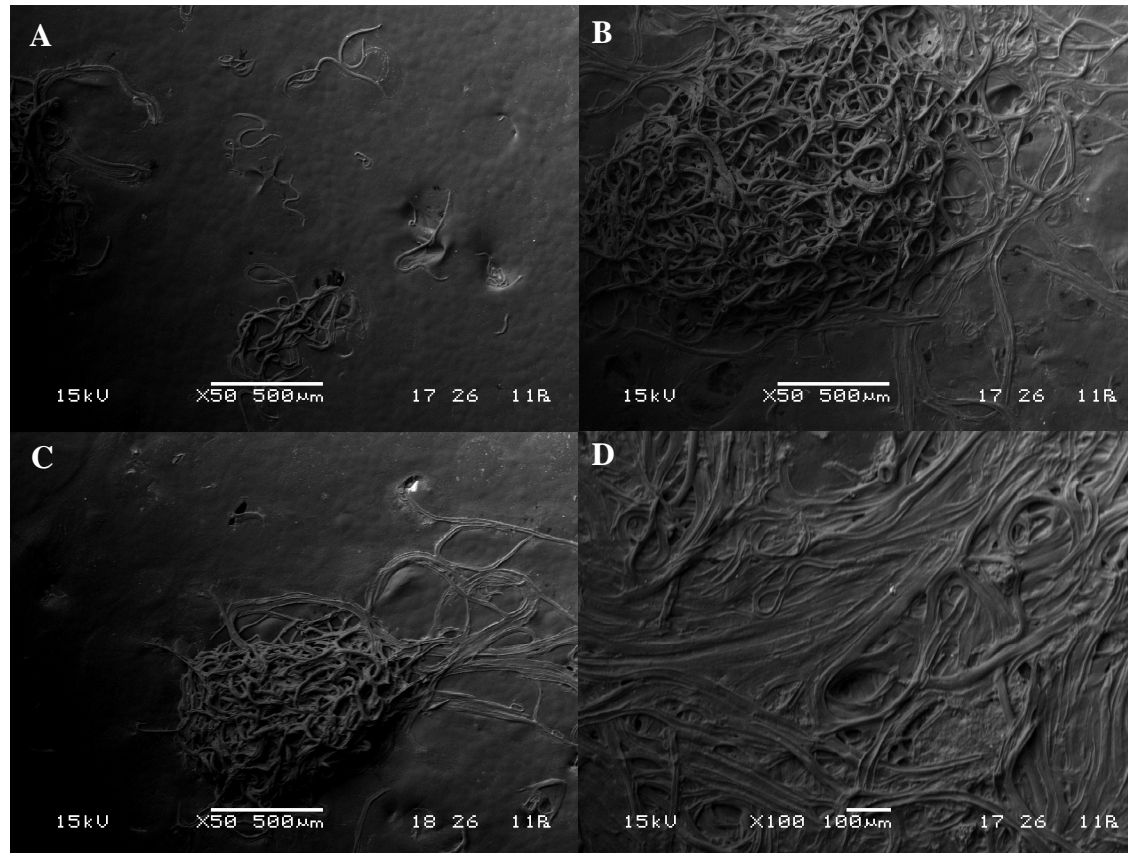
SEM de pinheiro bravo e manso



Imagens de microscopia electrónica de caules de *P. pinaster* (A) e *P. pinea* (B) ampliados 55x



SEM de nemátodes



Imagens de microscopia electrónica de isolados de nemátodes *Bursaphelenchus xylophilus*, 8A (A), 20 (B) e HF (C) ampliados 50X; C14-5 (D) ampliados 100X.



PUBLICAÇÕES COM ORIGEM NO PROJECTO

TRABALHOS ORIGINAIS PUBLICADOS EM REVISTAS CIENTÍFICAS E TRABALHOS DE REVISÃO E/OU PUBLICAÇÃO:

Franco, A., Rodrigues, R., Santos, C., Rortz, M., Rodrigues, A., Vasconcelos, M. (2010) Resistance induction to pine wood nematode in *Pinus* spp. Seedlings by inoculation with an avirulent strain. Submitted to FEBS letters

COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS OU OUTRAS PARTICIPAÇÕES DE ÍNDOLE CIENTÍFICA EM CONGRESSOS NACIONAIS OU INTERNACIONAIS:

Rortz, M., Santos, C., Lima, M., Vasconcelos, M. (2010) Influence of bacteria in *Bursaphelenchus xylophilus* infection mechanisms. Plant and Animal Genome Meeting, San Diego, USA

Santos, C., Rortz, M., Lima, M., Franco, A., Vasconcelos, M. (2010) Study of specific genes of infection by *Bursaphelenchus xylophilus* in Portuguese pine trees. Plant and Animal Genome Meeting, San Diego, USA

Santos, A., Ribeiro, B., Gomes, A.,

Rodrigues, R., Franco, A., Markowski, M., Vasconcelos, M. (2009) Biotechnological strategies for resistance induction to the pinewood nematode (PWN) in *Pinus pinaster*. 8th Plant Genomics European Meeting, Lisbon, Portugal

Franco, A., Rodrigues, R., Rodrigues, A.C., Vasconcelos, M. (2009) Tree vaccination for pine wilt disease: resistance induction in *Pinus* spp. by inoculation with an avirulent nematode strain. Microbiotec09, Vila Moura, Portugal

Franco, A., Rodrigues, R., Rodrigues, A.C., Vasconcelos, M. (2009) Indução de resistência ao nemátode da madeira do pinheiro em plântulas de *Pinus* spp. através da inoculação com uma estirpe não virulenta. 1^o National Congress on Environment and Energy, Estoril, Portugal

Vasconcelos, M, keynote speaker (June 2009) Biotechnological strategies to combat the pinewood nematode. Seminar "Pine, innovation and creation of value added products", Alcobaca, Portugal



Para o ano 2...

- *Objectivo específico 1: Genética do hospedeiro*
- 1- Continuação da selecção de indivíduos candidatos e sua caracterização genotípica molecular
- 2- Avaliação de 2009 (% de árvores sobreviventes ao nemátode após o verão de 2009)
- 4- Indicação da susceptibilidade na população de melhoramento
-
- *Objectivo específico 2: "vacinação" das plantas*
- 5-Plantas inoculadas com nemátode não virulento
- 6-Plantas vacinadas inoculadas com nemátode virulento
- 7-Indicação inicial de nível de resistência induzida



Para o ano 2...

Objectivo específico 3: Genes de resistência

- Confirmação da resistência de pinheiro manso ao nemátode
- Amostras de RNA de pinheiro bravo e manso (infectadas e não infectadas pelo nemátode) sequenciadas por 454
- Anotação bioinformática de 1,000,000 sequências de pinheiro e isolamento de genes de resistência

Objectivo específico 4: Introdução de genes de resistência

- Estabelecimento e proliferação de linhas embriogénicas
- Criopreservação
- Avaliação do potencial regenerativo

