

Estratégias biotecnológicas para o combate ao NMP

Marta Vasconcelos

Arganil, 3 de Fevereiro de 2010



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia



O problema:

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



A biotecnologia para combater o NMP

- **BioTecnologia: TECNOLOGIA** baseada na **BIOlogia**
- **Definição das Nações Unidas**
“Qualquer aplicação tecnológica que use um sistema biológico, organismos mortos ou derivados destes, para produzir ou modificar produtos para um uso específico.”



Estratégias

1. Identificação de **genótipos resistentes**
2. Identificação de locus de resistência
3. “Vacinação” de plantas (**Imunização**)
4. Transformação genética de pinheiro com **genes de resistência**
5. Utilização de **micorrizas** para criação de resistência
6. Monitorização de resistências em material diverso



Materiais na UCP-ESB

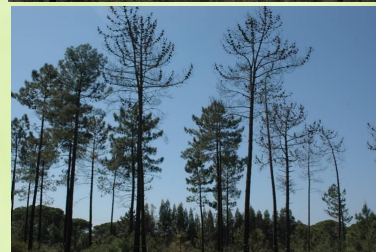
- Várias estirpes de nemátodes virulentos
- 1 estirpe de nemátode não virulento
- Várias espécies de pinheiro (de semente)
- Plântulas de viveiro de *Pinus pinea* e *Pinus Pinaster*
- Plântulas de espécies florestais diversas



1. Identificação de genótipos resistentes

Prospecção de árvores em zonas afectadas

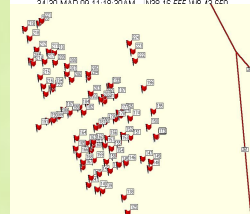
- Local de estudo:
Herdade da Comporta,
concelho de Alcácer do Sal



Georeferenciação de árvores



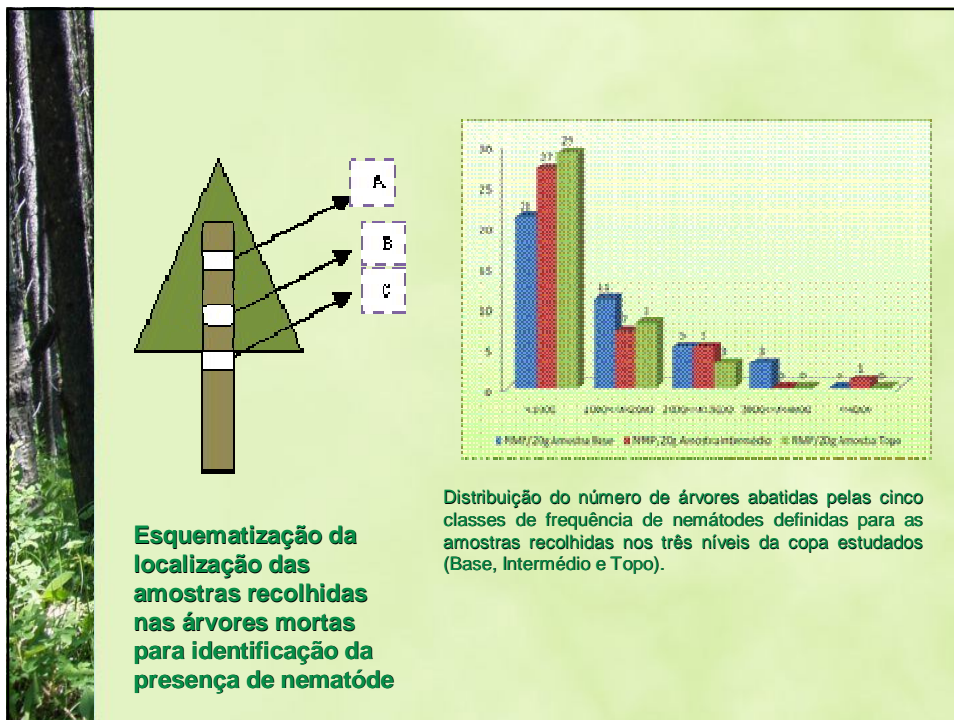
Árv nº	Data Hora	Coordenadas
15	30-MAR-09 9:11:07AM	N88 16.614 W8 43.800
16	30-MAR-09 9:13:41AM	N88 16.609 W8 43.813
17	30-MAR-09 9:17:40AM	N88 16.641 W8 43.787
18	30-MAR-09 9:21:59AM	N88 16.657 W8 43.789
19	30-MAR-09 9:30:52AM	N88 16.674 W8 43.790
20	30-MAR-09 9:35:38AM	N88 16.705 W8 43.835
24	30-MAR-09 9:51:59AM	N88 16.736 W8 43.780
25	30-MAR-09 9:58:50AM	N88 16.758 W8 43.722
26	30-MAR-09 10:07:53AM	N88 16.737 W8 43.673
27	30-MAR-09 10:14:47AM	N88 16.680 W8 43.696
28	30-MAR-09 10:24:46AM	N88 16.685 W8 43.704
29	30-MAR-09 10:27:07AM	N88 16.693 W8 43.740
30	30-MAR-09 10:45:28AM	N88 16.698 W8 43.756
31	30-MAR-09 11:06:14AM	N88 16.644 W8 43.841
32	30-MAR-09 11:06:13AM	N88 16.623 W8 43.849
33	30-MAR-09 11:12:52AM	N88 16.586 W8 43.752
34	30-MAR-09 11:18:29AM	N88 16.622 W8 43.628

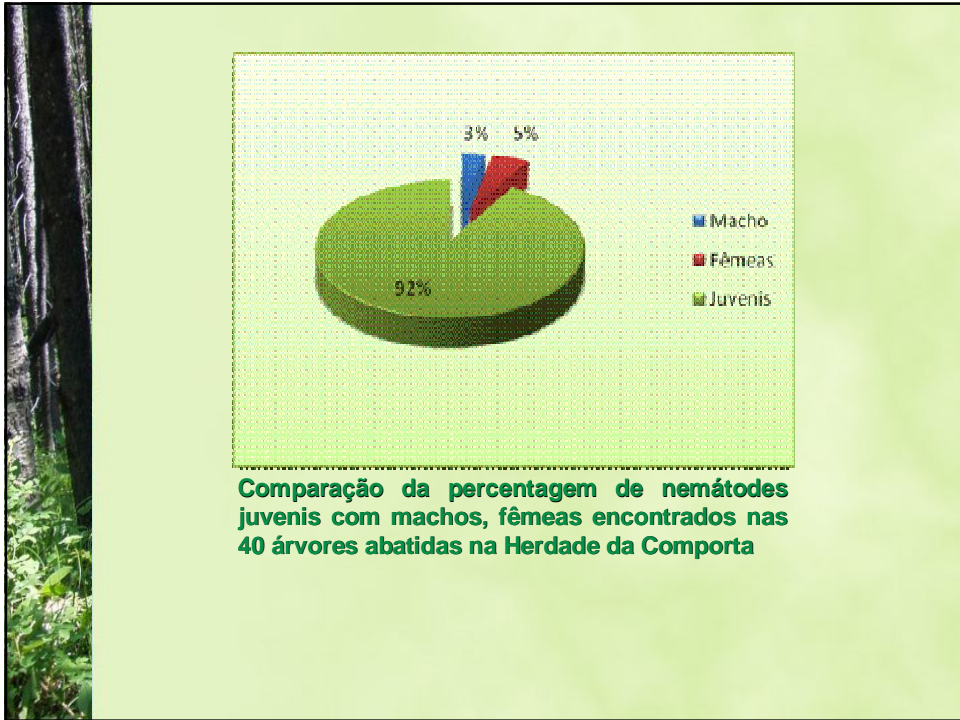






Localização das árvores seleccionadas com indicação dos três níveis observados, relativamente à cor das agulhas, no local Comporta-Oleoduto. Informação recolhida em Novembro de 2009.





Árvore nº 33

30 Março 2009





Foto BR

Localidade: Comporta Sul
Coordenadas:
 38° 16,586 N
 8° 43,752 W
Altitude:

Observações:

- Selecionada 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

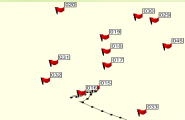
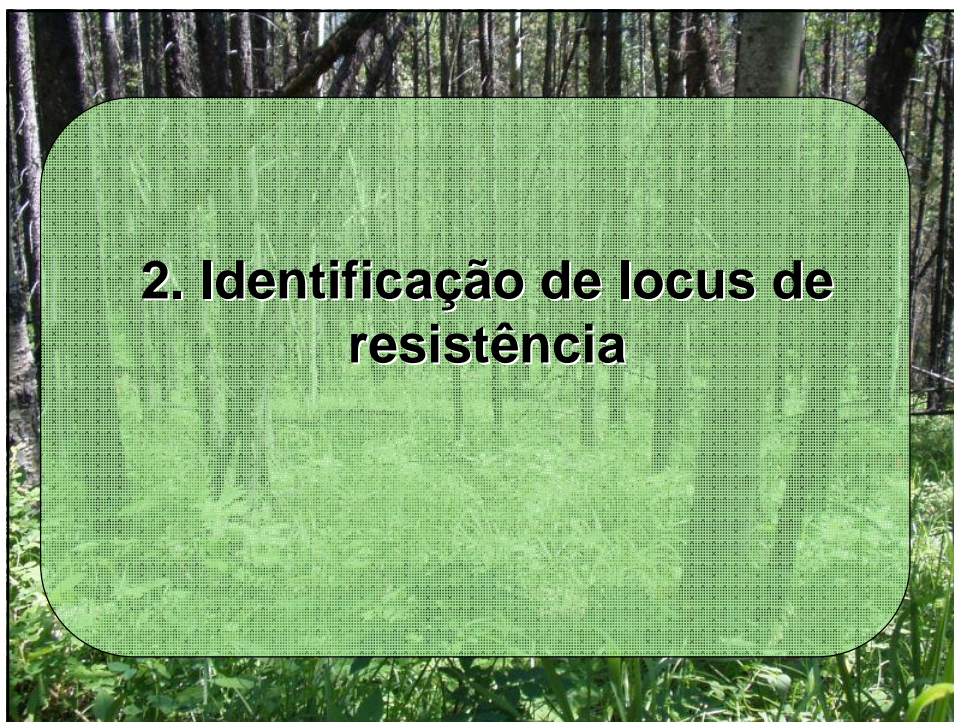


Foto BR

Altura – 17,1 m
DAP – 40,5 cm

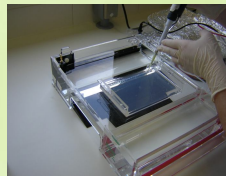
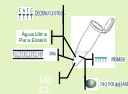


Caracterização genotípica das árvores seleccionadas por Microssatélites e AFLPs

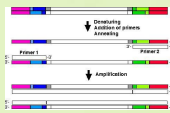


Maceração do material vegetal.

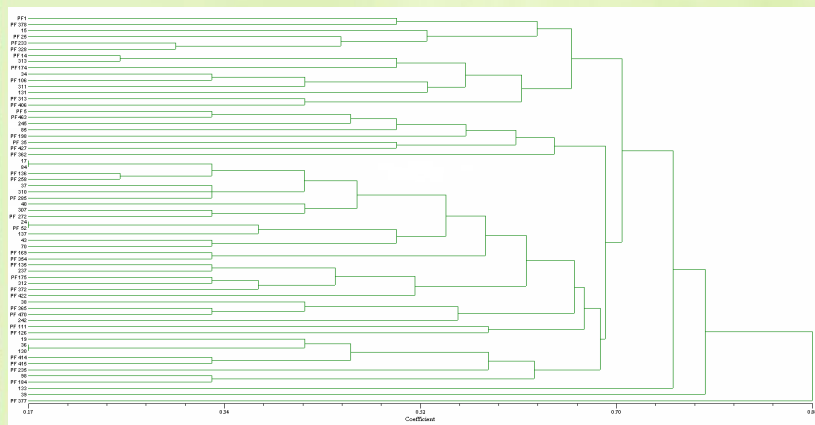
1ª amplificação pré selectiva



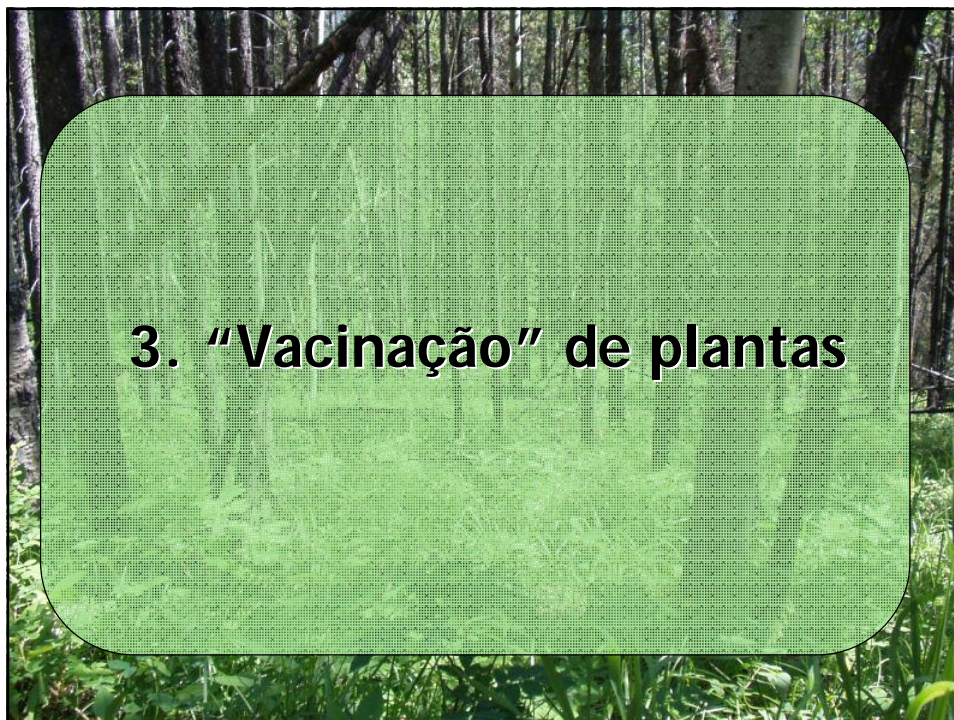
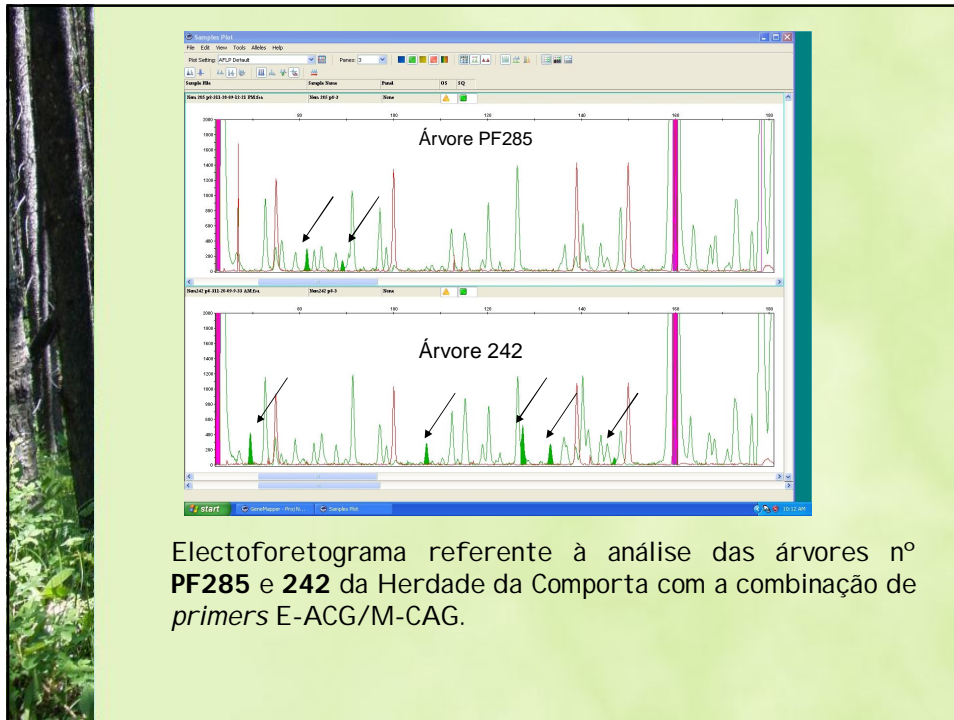
visualização de smears e confirmação da ocorrência das reacções de corte e de pré-amplificação.

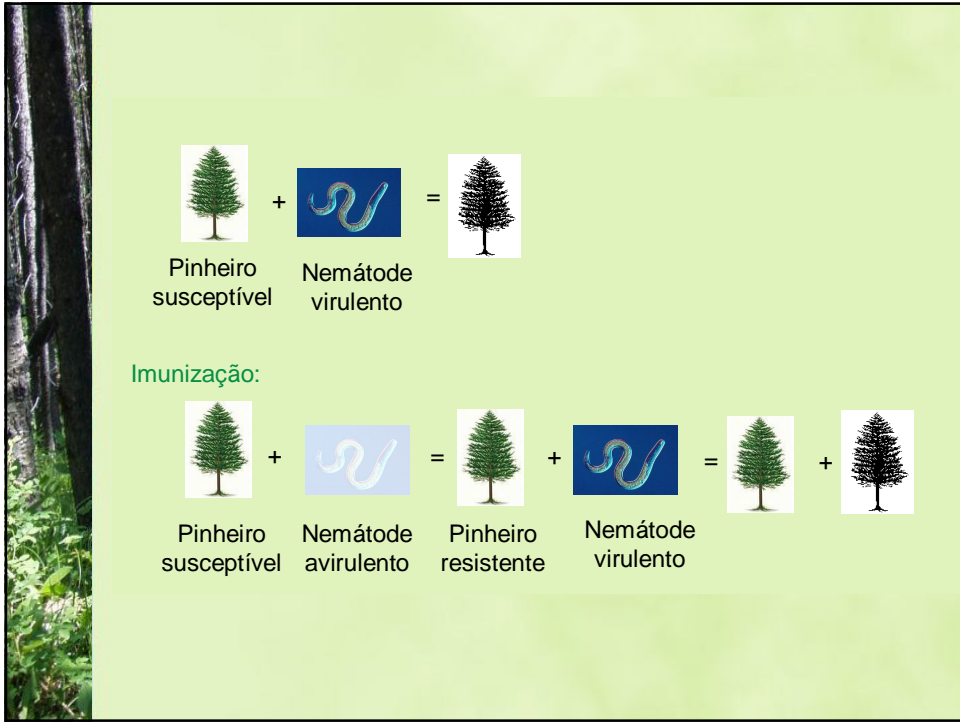


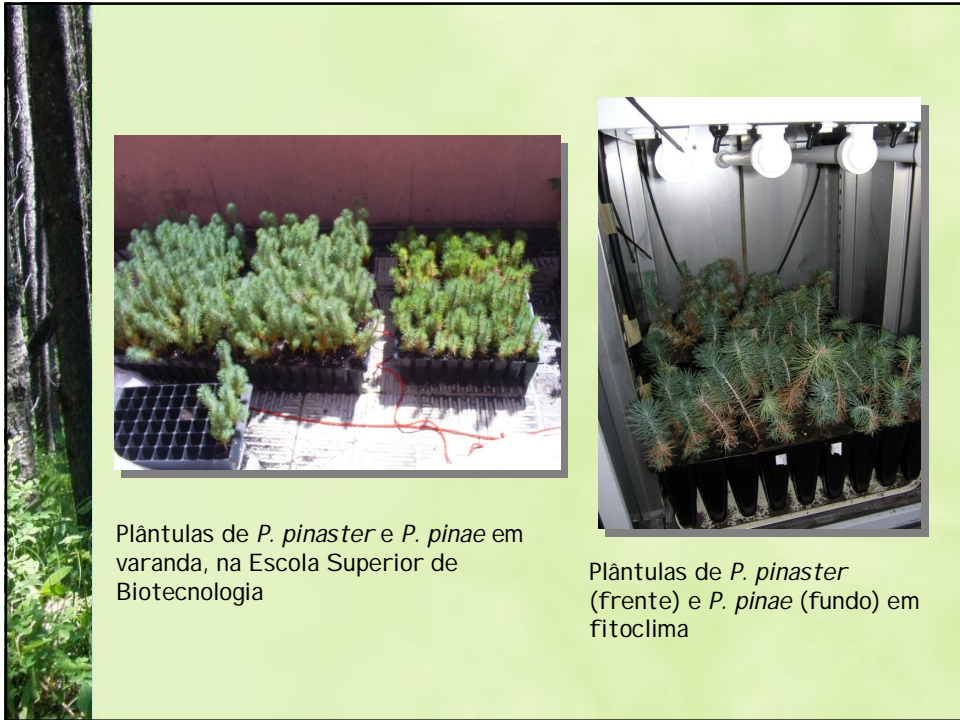
M 1 2 3 4
5 6 7
3000



Dendrograma relativo à análise de 63 árvores de pinheiro-bravo da Herdade da Comporta, obtido a partir da distância genética do inverso dos alelos partilhados e pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, utilizando o *software* NTSYSpc *version* 2.10s (Rohlf, 1989).







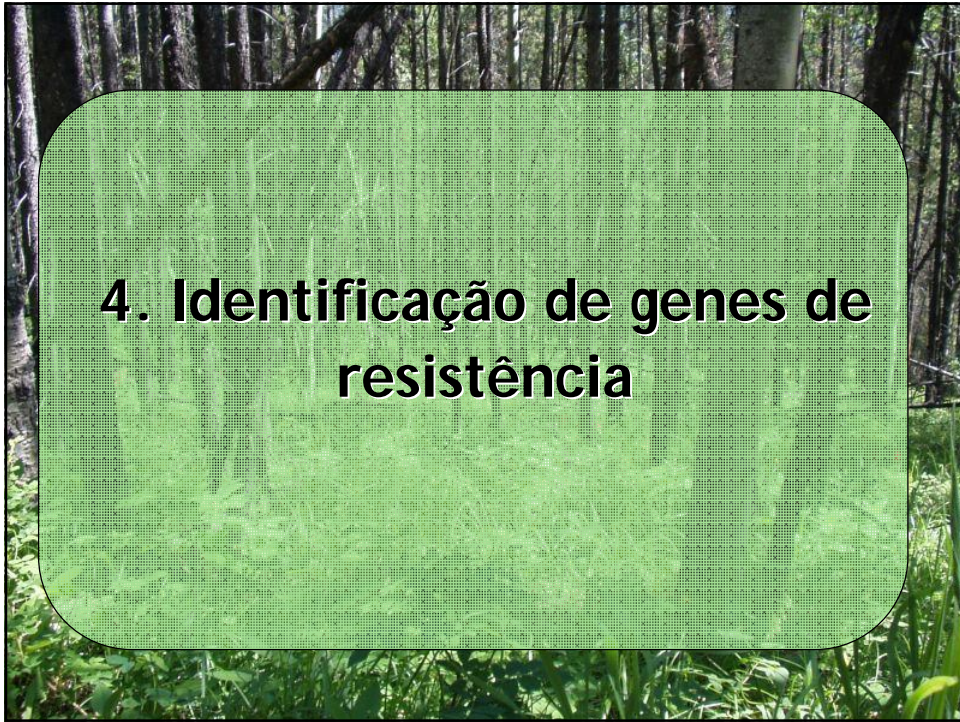
Plântulas de *P. pinaster* e *P. pinae* em varanda, na Escola Superior de Biotecnologia

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

Sintoma I – Plântula saudável;
 Sintoma II – Plântulas com agulhas amarelas ou castanhas em menos do que 1/3;
 Sintoma III – Plântulas com agulhas amarelas ou castanhas entre 1/3 e 2/3;
 Sintoma IV – Plântulas com agulhas amarelas ou castanhas em mais do que 2/3;
 Sintoma V – Plântulas mortas.



4. Identificação de genes de resistência

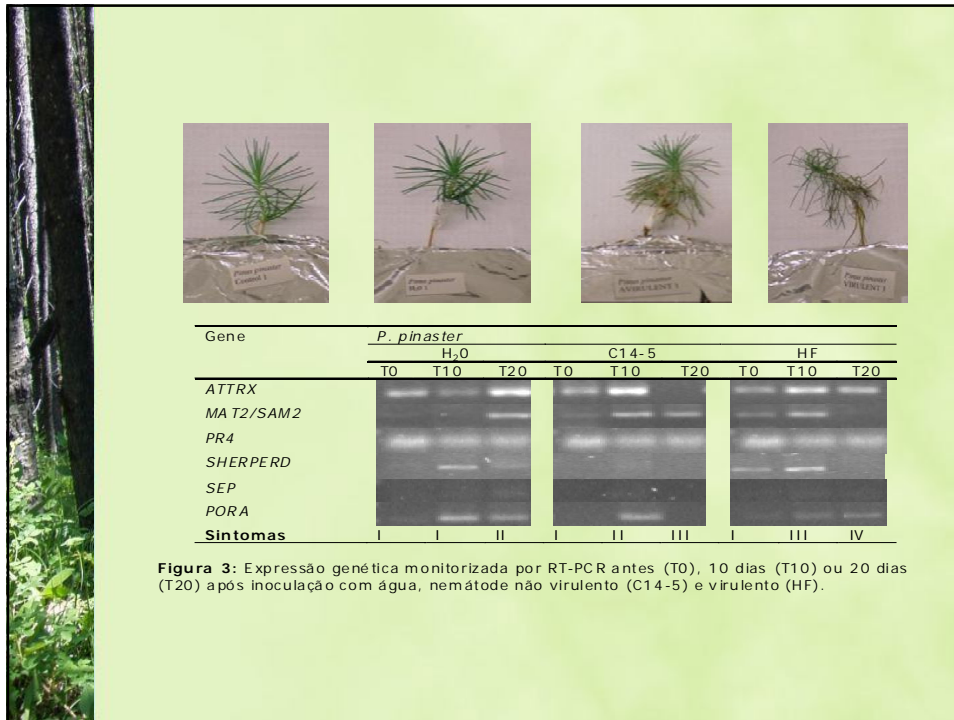


Extracção de RNA de tecidos de *P. pinaster* e *P. pinea*

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

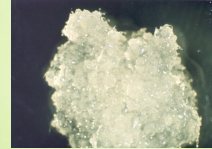
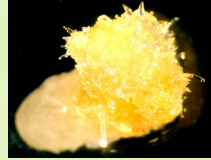


RNA de pinheiro bravo e pinheiro manso (agulhas, ramos, infectados ou não infectados)



5. Transformação com genes de resistência

Transformação genética de pinheiro com genes de resistência

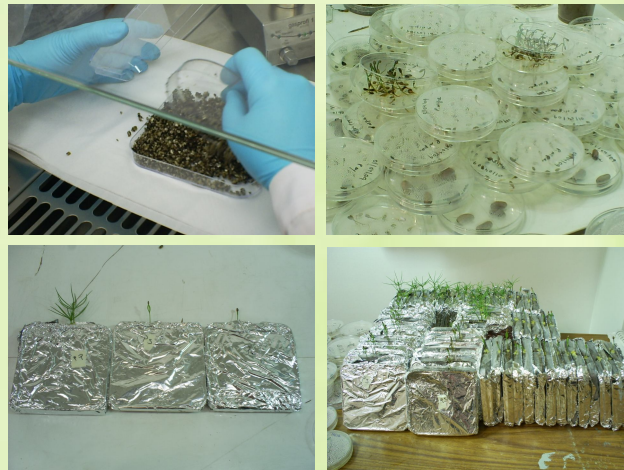


Pretende-se obter plantas jovens de pinheiro bravo com expressão dos genes de resistência ao nemátode identificados previamente

6. Utilização de micorrizas para criação de resistência

- ❑ 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 virulentas de nemátodo

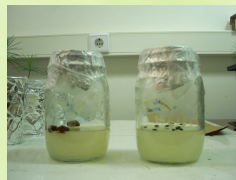
Estabelecimento
de microcosmos



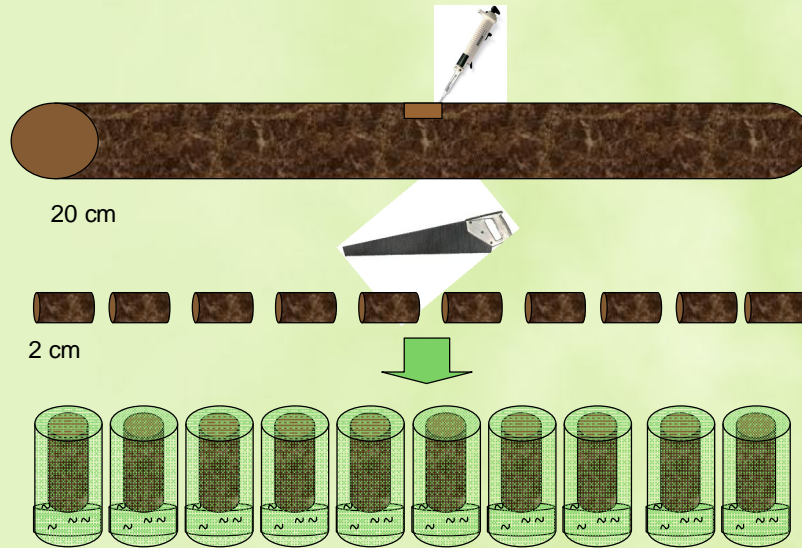
7. Monitorização de resistência ou susceptibilidade

Inoculações controladas

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



Avaliação de resistência através de ramos segmentados



Agradecimentos

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



MUITO OBRIGADA PELA VOSSA
ATENÇÃO

