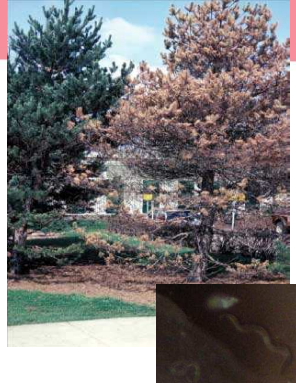


Indução de resistência ao nemátode da madeira do pinheiro em plântulas de *Pinus* spp. através da inoculação com uma estirpe não virulenta

Albina R. Franco, Rui Rodrigues, Ana C. Rodrigues, Marta W. Vasconcelos*,
 Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa,
 Rua Dr. António Bernardino de Almeida, Porto, Portugal
 *mwvasconcelos@esb.ucp.pt



INTRODUÇÃO: A doença da madeira do pinheiro, causada pelo *Bursaphelenchus xylophilus*, está a afectar a área florestal portuguesa. É possível induzir a defesas da planta ao ataque do nemátode, inoculando árvores com estirpe não virulenta do nemátode, criando assim uma resistência a infecções subsequentes com estirpe virulenta^{1,2};

o Objectivo deste estudo centra-se em avaliar a indução de resistência de estirpes de nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF), em plântulas de *P. pinaster*, *P. pinea*, *P. nigra*, e *P. sylvestris*. Os mecanismos de resistência foram avaliados, seguindo a expressão de genes potencialmente envolvidos na resposta à doença.

MATERIAL E MÉTODOS

- Germinação e crescimento de plantas em microcosmos
- Testes de indução de resistência em pinheiro

■ Plântulas com 4 meses foram inoculadas com 500 nemátode/20 µL de C14-5, HF, ou água estéril³.

■ Sintomas de infecção foram classificados COMO: (I) planta saudável; (II) descoloração parcial das agulhas; (III) descoloração parcial das agulhas, necrose, e redução na produção de resina; (IV) descoloração total, necrose e morte da plântula.



Figura 1: Crescimento de pinheiro em microcosmos.

- Desenho de primers
- Extracção de ARN total e expressão genética

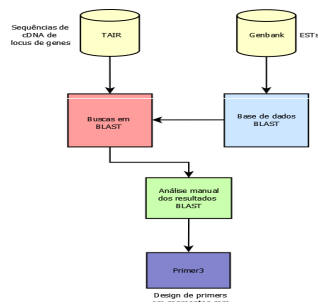


Figura 2: Design de primers para RT-PCR

Extracção de ARN nos tempos T0 (0h), T10 (10d) e T20 (20d)

Purificação de ARN e síntese de cDNA

RT-PCR para estudo de expressão dos genes *MAT2/SAM2*, *PR4*, *SEPI*, *ATTRX1*, *SHERPERD1*, *PORA*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

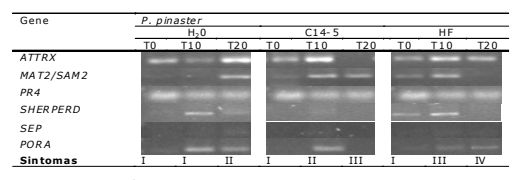
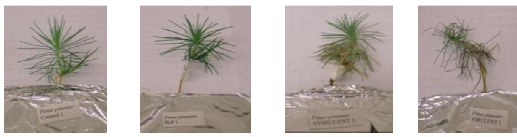


Figura 3: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).

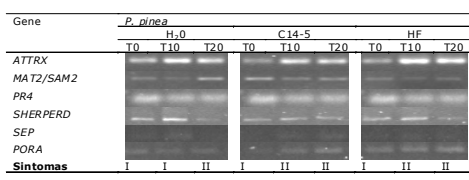


Figura 4: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).

- ✓ Observaram-se sintomas de descoloração parcial das agulhas nos tratamentos com C14-5 e HF. Este fenómeno pode dever-se ao bloqueio do sistema vascular. A estratégia de defesa contra ataques também pode ser responsável por estes sintomas.
- ✓ Genes associados com respostas de stress foram detectados, o que sugere que uma resposta sistémica generalizada foi accionada. PR4 foi expresso em todos os tratamentos, sugerindo que as defesas do hospedeiro foram activadas;
- ✓ A produção de etileno (*MAT2/SAM2*) e desidratação (*SHERPERD1*) foram detectados ao fim de 20 dias de incubação;

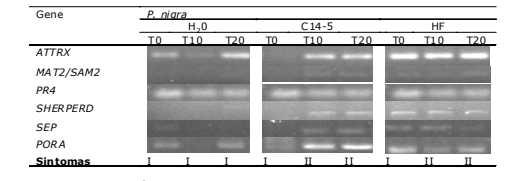
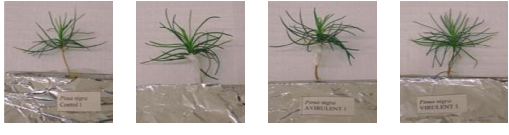


Figura 5: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).

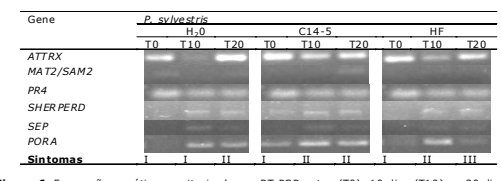
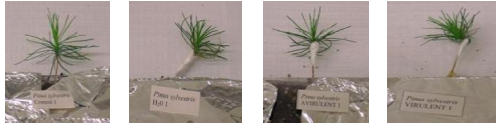


Figura 6: Expressão genética monitorizada por RT-PCR antes (T0), 10 dias (T10) ou 20 dias (T20) após inoculação com água, nemátode não virulento (C14-5) e virulento (HF).

- ✓ A expressão dos genes *SEPI* e *PORA* indicam que os processos de fotossíntese continuaram activos após a infecção;
- ✓ A resposta em *P. pinaster* foi diferenciada e faseada, podendo estar relacionada com factores inibitórios da estirpe virulenta, condicionando uma resposta eficaz por parte da planta;
- ✓ Embora os mecanismos de indução de resistência ao nemátode não tenham sido completamente elucidados, o presente estudo permite inferir que a presença de nemátode virulento desencadeia uma resposta sistémica faseada e diferente do não virulento. Outros factores relacionados com a indução e resistência a ataques patogénicos serão alvo de estudos futuros.

Bibliografia:

1. Takehushi, Y., Kanzaki, N., Futai, K. (2006) Nematology 8: 435-442
2. Takehushi, Y. e Futai, K. (2007) For. Path. 37: 289-291
3. Asai, E., Futai, K. (2002), J. For. Res 7: 113-116