

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

Identificação de genótipos resistentes e locus de resistência

- a) Selecção 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

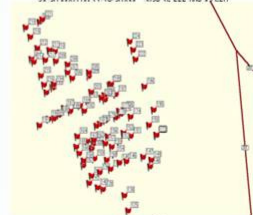
Local de estudo: Herdade da Comporta, concelho de Alcácer do Sal



Georeferenciação de árvores



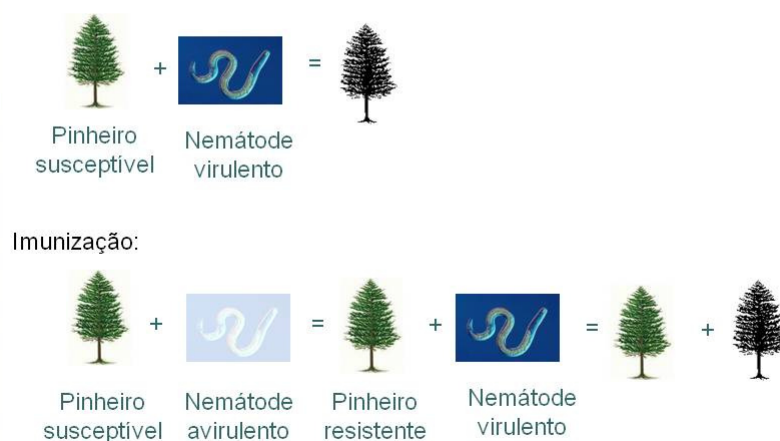
Árv nº	Data Hora	Coordenadas
15	30-MAR-09 9:11:07AM	NDB 16.614 W6 43.800
16	30-MAR-09 9:13:41AM	NDB 16.609 W6 43.813
17	30-MAR-09 9:17:40AM	NDB 16.641 W6 43.787
18	30-MAR-09 9:21:59AM	NDB 16.657 W6 43.789
19	30-MAR-09 9:30:52AM	NDB 16.674 W6 43.790
20	30-MAR-09 9:35:39AM	NDB 16.705 W6 43.835
24	30-MAR-09 9:51:58AM	NDB 16.736 W6 43.780
25	30-MAR-09 9:58:50AM	NDB 16.758 W6 43.722
26	30-MAR-09 10:07:53AM	NDB 16.737 W6 43.873
27	30-MAR-09 10:14:47AM	NDB 16.690 W6 43.696
28	30-MAR-09 10:24:48AM	NDB 16.695 W6 43.704
29	30-MAR-09 10:27:07AM	NDB 16.693 W6 43.740
30	30-MAR-09 10:45:28AM	NDB 16.698 W6 43.756
31	30-MAR-09 11:04:14AM	NDB 16.644 W6 43.841
32	30-MAR-09 11:06:13AM	NDB 16.623 W6 43.849
33	30-MAR-09 11:12:52AM	NDB 16.596 W6 43.752
34	30-MAR-09 11:14:30AM	NDB 16.622 W6 43.752



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)

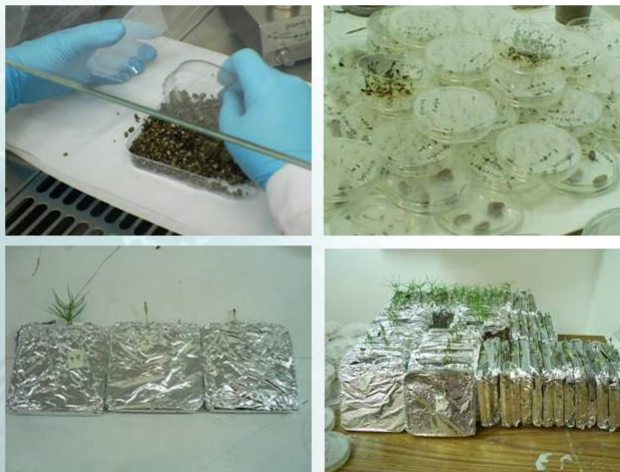


Utilização de micorrizas para criação de resistência

- ☐ 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 estirpes não virulentas de nemátodo e fungo *Botrytis cinerea*.

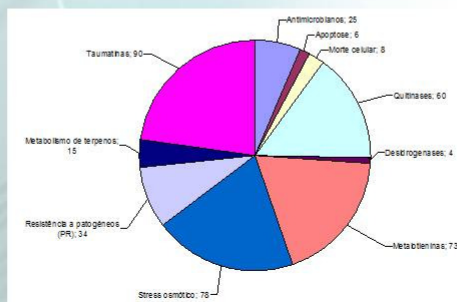
Utilização de micorrizas para criação de resistência

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.

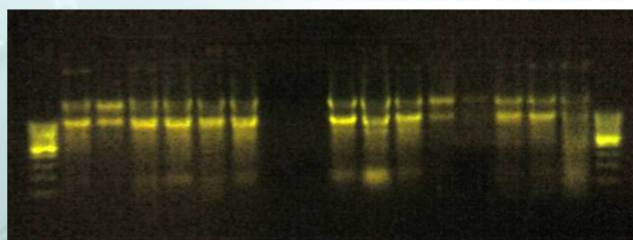


Transformação genética de pinheiro com genes de resistência

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

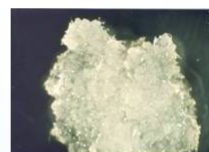
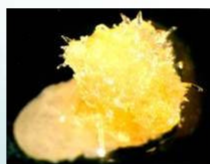


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



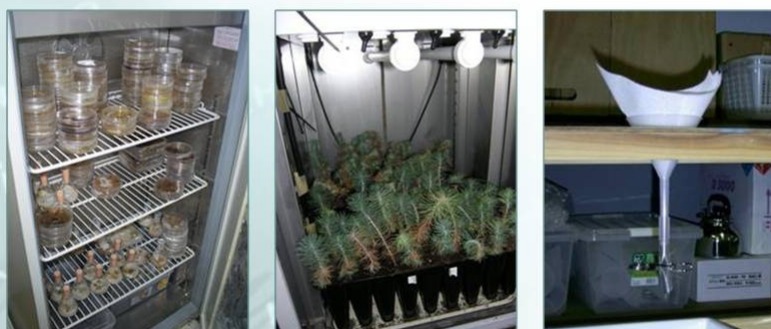
RNA de pinheiro bravo e pinheiro manso (agulhas, ramos, infectados ou não infectados)

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



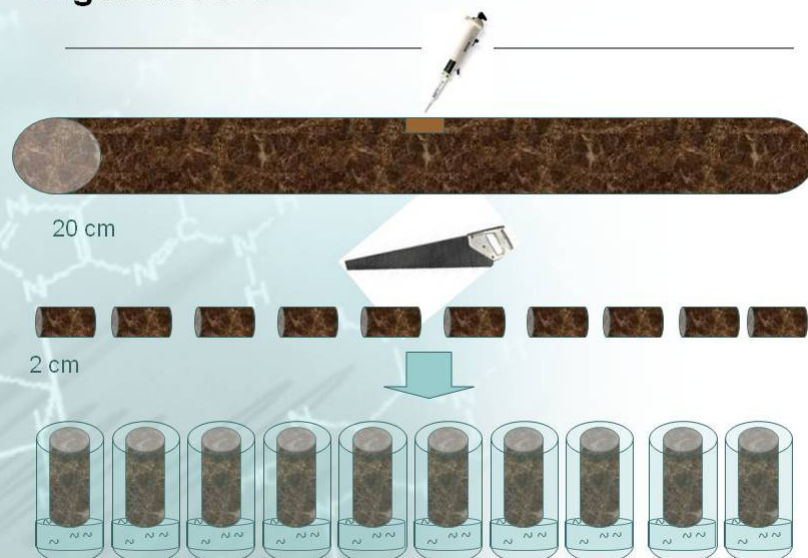
Avaliação de susceptibilidade/resistência de diversos genótipos de pinheiro

- *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

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*

Avaliação de resistência através de ramos segmentados



Colaboração

- Amostras de ramos de diferentes povoamentos/localizações (várias idades) para testar níveis de resistência ao nemátode
- Plantas de pinheiro (bravo, manso) de viveiro ou não, o mais crescidas possíveis

Contactos:

Marta Wilton de Vasconcelos, PhD
 Escola Superior de Biotecnologia
 Universidade Católica Portuguesa
 Rua Dr. António Bernardino de Almeida
 4200-072 Porto
mwasconcelos@esb.ucp.pt
 Tel: +351 22 55 800 11-ext 1440

Agradecimentos

- 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!

