1

Ana Cristina Figueiredo

Universidade de Lisboa, Faculdade Ciências de Lisboa, Departamento de Biologia Vegetal

Centro de Biotecnologia Vegetal, CESAM Lisboa

C2, Piso 1, Campo Grande, 1749-016 Lisboa, Portugal

acsf@fc.ul.pt

2

Centro de Biotecnologia Vegetal (CESAM Lisboa)

Linhas de investigação na doença da murchidão do pinheiro

- **Caracterização do perfil volátil do pinheiro-bravo, *versus* outras espécies de pinheiros que ocorrem em Portugal**
- **Avaliação do efeito da inoculação com nematodes no perfil volátil de diferentes espécies de pinheiros**
- **Estudo morfo-anatómico das alterações induzidas pela inoculação com nematodes**
- **Caracterização da atividade nematicida de óleos essenciais, suas frações, e outros extratos**
- **Co-cultura *in vitro* de pinheiro bravo e nematode, e avaliação da ação nematicida e fitotóxica *in vitro***
- **Avaliação da expressão do gene da α-pineno sintetase em culturas *in vitro* de pinheiro, inoculados com nematodes**
- **Determinação das alterações do perfil volátil de pinheiros sujeitos à ação do inseto vetor**
- **Avaliação das diferenças da composição da cutícula de 3 espécies de insetos que co-habitam árvores doentes**

3

Centro de Biotecnologia Vegetal (CESAM Lisboa)

Linhas de investigação na doença da murchidão do pinheiro

- **Caracterização do perfil volátil do pinheiro-bravo, *versus* outras espécies de pinheiros que ocorrem em Portugal**
- **Avaliação do efeito da inoculação com nematodes no perfil volátil de diferentes espécies de pinheiros**
- **Estudo morfo-anatómico das alterações induzidas pela inoculação com nematodes**
- **Caracterização da atividade nematicida de óleos essenciais, suas frações, e outros extratos**
- **Co-cultura *in vitro* de pinheiro bravo e nematode, e avaliação da ação nematicida e fitotóxica *in vitro***
- **Avaliação da expressão do gene da α-pineno sintetase em culturas *in vitro* de pinheiro, inoculados com nematodes**
- **Determinação das alterações do perfil volátil de pinheiros sujeitos à ação do inseto vetor**
- **Avaliação das diferenças da composição da cutícula de 3 tipos de insetos que co-habitam árvores doentes**

4

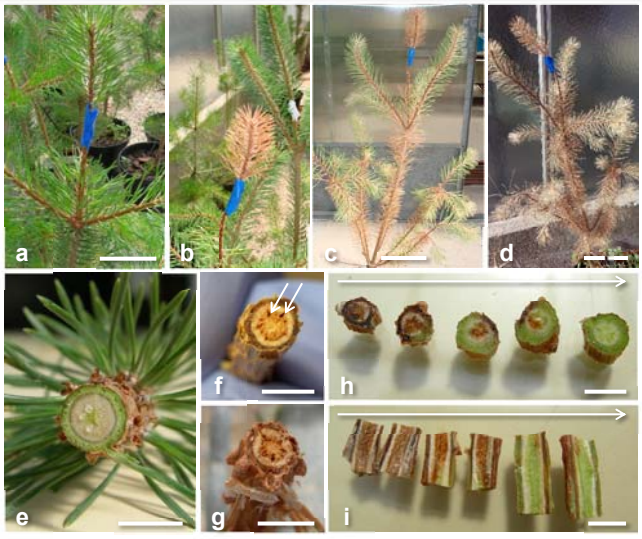
- **Caracterização do perfil volátil do pinheiro-bravo, *versus* outras espécies de pinheiros que ocorrem em Portugal**
- **Avaliação do efeito da inoculação com nematodes no perfil volátil de diferentes espécies de pinheiros**

Rodrigues *et al.* (2017)

2012 a 2015. SisPiNem, PTDC/AGR-CFL/120184/2010, FCT

5

- **Caracterização do perfil volátil do pinheiro-bravo, *versus* outras espécies de pinheiros que ocorrem em Portugal**
- **Avaliação do efeito da inoculação com nematodes no perfil volátil de diferentes espécies de pinheiros**

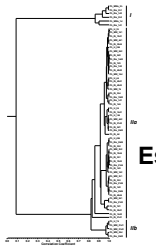


Rodrigues *et al.* (2017)

6

Inoculation of *Pinus halepensis, P. pinaster, P. pinea* and *P. sylvestris* with the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*:

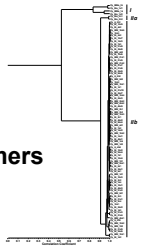
Essential Oils Chemotypes and Monoterpene Enantiomers



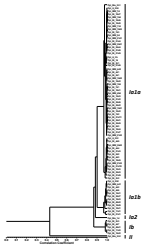
Pinus halepensis

Whole plant

Inoculation area

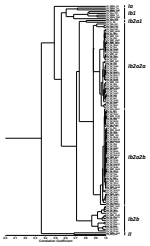


Pinus pinea



Pinus pinaster

Rodrigues *et al.* (2017)



Pinus sylvestris

7

- **Caracterização da atividade nematicida de óleos essenciais, suas frações, e outros extratos**

Óleos essenciais (OEs) de 59 espécies (84 amostras), foram ensaiados contra *Bursaphelenchus xylophilus*, em ensaios de contacto direto

Vinte OEs mostraram mortalidades corrigidas ≥96% a 2 µL/ml. Estes foram seguidamente testados em concentrações inferiores

Os OEs de *Ruta graveolens*, *Satureja montana* and *Thymbra capitata* mostraram concentrações letais (LC_{100}) <0.4 µL/ml

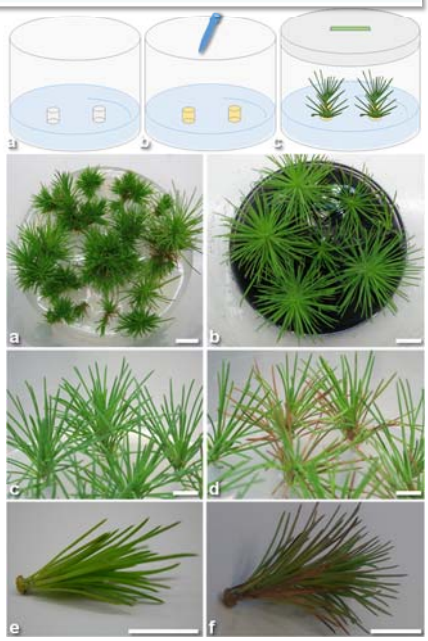
As frações de compostos oxigenados com mortalidade corrigida ≥96% nem sempre mostraram valores de LC_{100} semelhantes aos correspondentes OEs, sugerindo relações aditivas e/ou sinérgicas entre frações **Faria *et al.* (2013)**

2009 a 2015. Tese de Doutoramento, Jorge Faria. SFRH/BD/43738/2008, FCT

2012 a 2015: PlantBioNem, PTDC/AGR-CFL/117026/2010, FCT

8

- **Co-cultura *in vitro* de pinheiro bravo e nematode, e avaliação da ação nematicida e fitotóxica *in vitro***



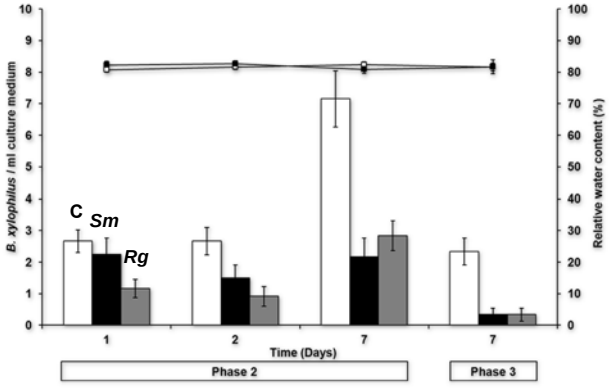
Representação esquemática do estabelecimento das co-culturas *in vitro* de *Pinus pinaster* com *Bursaphelenchus xylophilus*. Em assepsia, realizaram-se pequenos orifícios no meio de cultura (a), que foram inoculados com 100µL de uma suspensão de NMP (250±50 NMP) (b) juntamente com cada rebento de pinehiro (c).

Rebentos de *Pinus pinaster* mantidos em meio de multiplicação SH (SHm) (a) e em meio de alongamento (SHe) (b), com repicagem mensal. c-f. Detalhe dos rebentos de *P. pinaster* (c, e) e da co-cultura de rebentos de *P. pinaster* com *Bursaphelenchus xylophilus* 4 semanas após infeção (d, f). Note-se, em d e f, que as agulhas dos rebentos exibem sintomas típicos de emurchecimento, clorose e procumbência. Barra: 1 cm.

Faria *et al.* (2015)

9

O OE de *Satureja montana* rico em carvacrol mostrou fitotoxicidade nas culturas *in vitro* Ppi e PpiBx, incluindo clorose e procumbência, ao invés do observado com o OE de *Ruta graveolens*



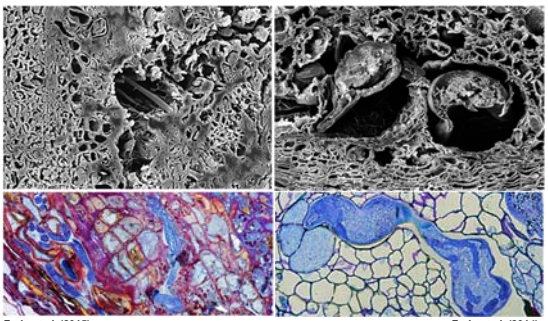
Densidade da população de NMP no meio de cultura das co-culturas de rebentos de *P. pinaster* com NMP (PpiBx), sem- (Controlo, coluna a branco), e com 0.5 µl OE/ml meio de cultura do OE de *S. montana* (coluna a negro) ou de *R. graveolens* (coluna a cinza), e teor médio de água nas culturas *in vitro* de rebentos de *P. pinaster* (quadrado branco) e nas co-culturas PpiBx (quadrado negro), em diferentes dias da Fase 2 e no final da Fase 3 (recuperação)

Faria *et al.* (2015)

10

Nematode parasita de plantas	Dispersão	Espécie hospedeira	Local de infeção
Bursaphelenchus xylophilus (Nemátode da madeira do pinheiro, NMP)	Por espécie vetor. Em Portugal o inseto *Monochamus galloprovincialis*	*Pinus pinaster* Aiton (pinheiro bravo)	NMP entra por feridas de alimentação ou por oviposição
Meloidogyne chitwoodi (Nemátode da galha da raiz, NGR)	Os juvenis dos NGR eclodem e migram pelo solo procurando novo hospedeiro	*Solanum tuberosum* L. (batata)	As células infetadas da raiz do hospedeiro diferenciam-se em 5 a 7 células hipertrofiadas

Bursaphelenchus xylophilus (*Pinewood Nematode*, PWN)



Faria *et al.* (2015)

Faria *et al.* (2014)

Meloidogyne chitwoodi (*Columbia root-knot nematode*, CRKN)

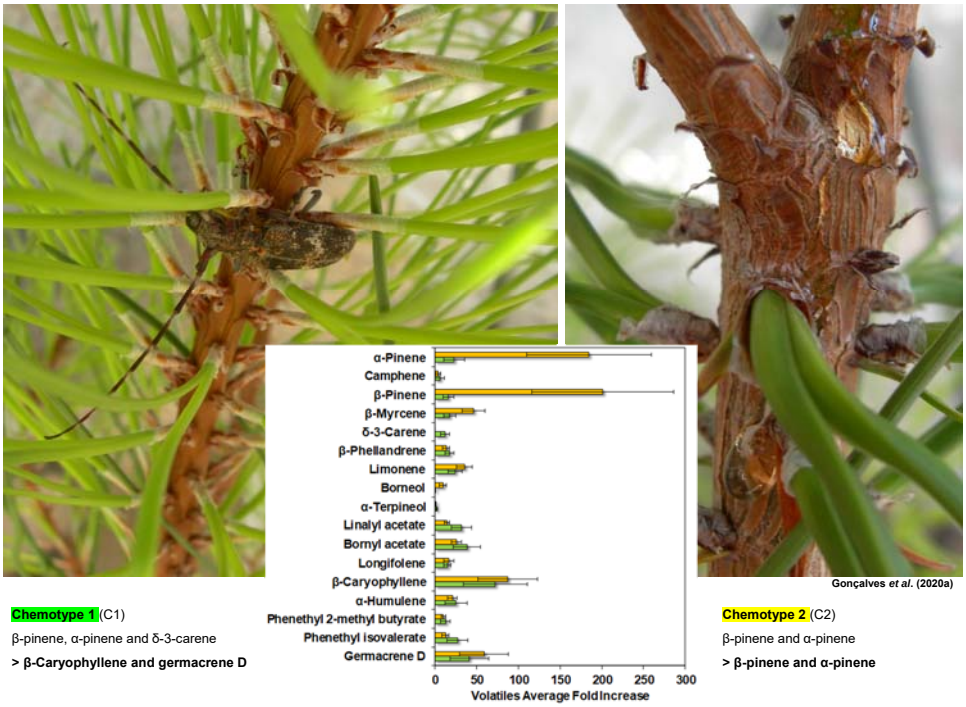
11

- **Determinação das alterações do perfil volátil de pinheiros sujeitos à ação do inseto vetor**

Gonçalves *et al.* (2020a)

2016 a 2019. Nematransfer, PTDC/AGR-FOR/4391/2014, FCT

12



Monochamus galloprovincialis **feeding induced different volatile response on** ***Pinus pinaster*** **of different chemotypes**

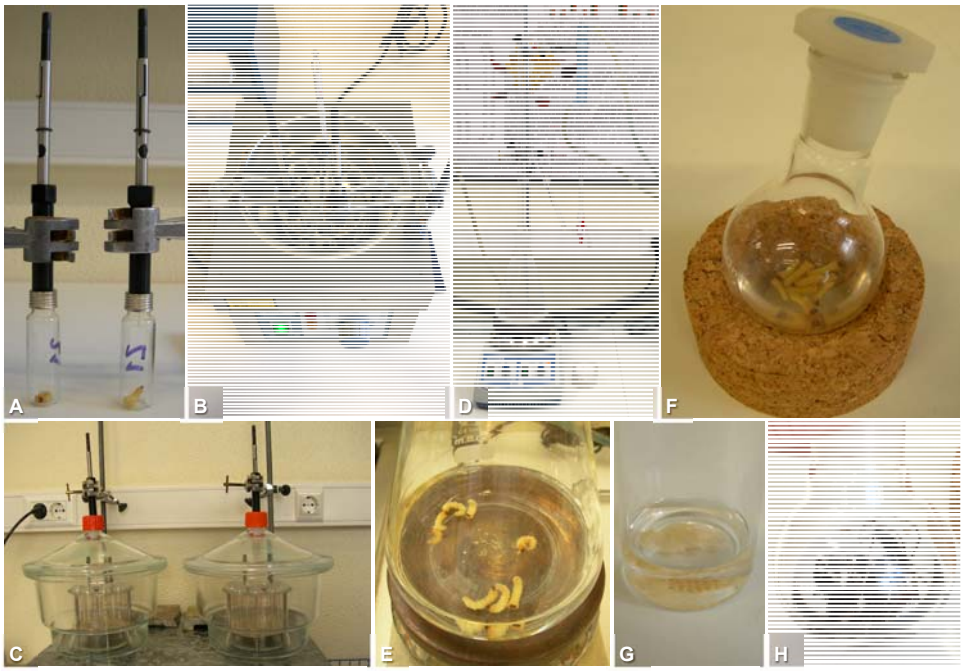
13

- **Avaliação das diferenças da composição da cutícula de 3 espécies de insetos que co-habitam árvores doentes**

Gonçalves et al. (2020b)

2016 a 2019. Nematransfer, PTDC/AGR-FOR/4391/2014, FCT

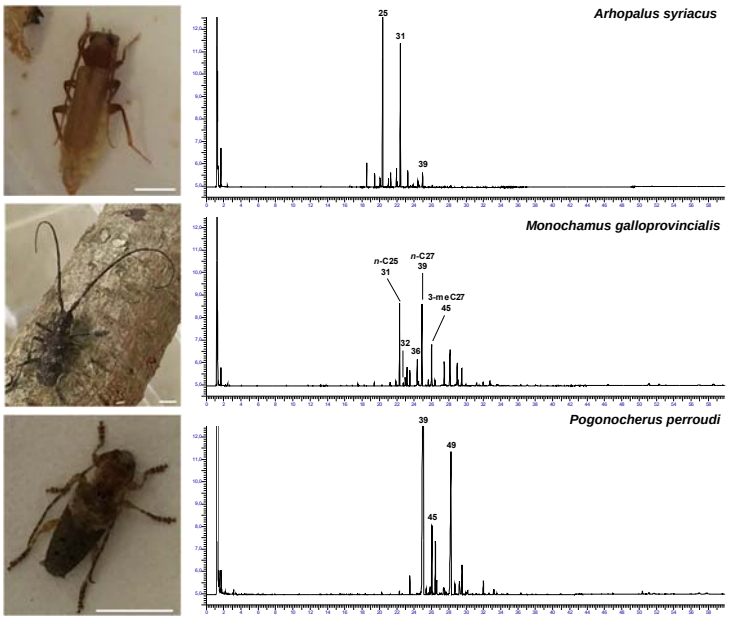
14



Gonçalves *et al.* (2020b)

15

Cuticular compounds (CC) of potential vectors of pine wood nematode



The CC profiles of the different species may play a key role in triggering the movement of PWN from the tree to callow adults of the specific insect vector, among all insects colonizing infested host trees

Gonçalves *et al.* (2020b)

16

Centro de Biotecnologia Vegetal (CESAM Lisboa)
Publicações na doença da murchidão do pinheiro

- Barbosa P., A. S. Lima, P. Vieira, L. S. Dias, M. T. Tinoco, J. G. Barroso, L. G. Pedro, A. C. Figueiredo, M. Mota (2010) Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42: 8-16.
- Barbosa P., J. M. S. Faria, M. D. Mendes, L. S. Dias, M. T. Tinoco, J. G. Barroso, L. G. Pedro, A. C. Figueiredo, M. Mota (2012) Bioassays against pinewood nematode: Assessment of a suitable dilution agent and screening for bioactive essential oils. *Molecules* 17: 12312-12329.
- Faria J. M. S., P. Barbosa, R. N. Bennett, M. Mota, A. C. Figueiredo (2013) Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. *Phytochemistry* 94: 220-228.
- Faria J. M. S., I. Sena, I. Vieira da Silva, B. Ribeiro, P. Barbosa, L. Ascensão, R. N. Bennett, M. Mota, A. C. Figueiredo (2015) *In vitro* co-cultures of *Pinus pinaster* with *Bursaphelenchus xylophilus*: a biotechnological approach to study Pine Wilt Disease. *Planta* 241: 1325–1336.
- Trindade H., I. Sena, A. C. Figueiredo (2016) Characterization of α-pinene synthase gene in *Pinus pinaster* and *P. pinea* in vitro cultures and differential gene expression following *Bursaphelenchus xylophilus* inoculation. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 143.
- Rodrigues A. M., M. D. Mendes, A. S. Lima, P. M. Barbosa, L. Ascensão, J. G. Barroso, L. G. Pedro, M. M. Mota, A. C. Figueiredo (2017) *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster*, *Pinus pinea* and *Pinus sylvestris* essential oils chemotypes and monoterpene hydrocarbon enantiomers, before and after inoculation with the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Chemistry & Biodiversity* 14: e1600153.
- Gonçalves E., A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, J. Henriques, E. Sousa, L. Bonifácio (2020a) Effect of *Monochamus galloprovincialis* feeding on *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*, oleoresin and insect volatiles. *Phytochemistry* 169: 112159.
- Gonçalves E., A. C. Figueiredo, J. G. Barroso, J. Millar, J. Henriques, E. Sousa, L. Bonifácio (2020b) Characterization of cuticular compounds of the cerambycid beetles *Monochamus galloprovincialis*, *Arhopalus syriacus*, and *Pogonocherus perroudi*, potential vectors of pinewood nematode. *Entomologia Experimentalis et Applicata* (no prelo)

17

Centro de Biotecnologia Vegetal (CESAM Lisboa)
Fontes de financiamento na doença da murchidão do pinheiro

- Até 2014: Centro de Biotecnologia Vegetal (CBV) do Instituto de Biotecnologia e Química Fina do Laboratório Associado Instituto para a Biotecnologia e Bioengenharia (IBB)
- 2015 - à data: Centro de Biotecnologia Vegetal (CBV) do Laboratório Associado Centro de Estudos do Ambiente e do Mar Lisboa (CESAM Lisboa)
- 2007 – 2010: Desenvolvimento e avaliação de compostos naturais eficazes no controlo de nemátodes parasitas economicamente importantes, pela utilização de fitoquímicos produzidos a partir de brássicas e espécies produtoras de óleos essenciais, PTDC/AGR-AAM/74579/2006, FCT. Coordenado pelo Prof. Dr Richard Bennett da UTAD
- 2012 – 2015: SisPiNem - Caracterização do sistema nemátode da Madeira do pinheiro / *Pinus*: abordagem fitoquímica e histopatológica, PTDC/AGR-CFL/120184/2010, FCT. Coordenado pelo Prof. Dr Manuel Mota da UÉvora
- 2012 – 2015: PlantBioNem – A biotecnologia vegetal na avaliação de fitonematicidas. PTDC/AGR-CFL/117026/2010, FCT. Coordenado pelo Prof. Dr Ana Cristina Figueiredo da ULisboa
- 2009 – 2015: Óleos essenciais como agentes anti-nemátodes e a sua influência em co-culturas *in vitro* de plantas / nematodes. Tese de Doutoramento em Biologia, especialidade de Biotecnologia (FCUL, UL) do Mestre Jorge Miguel Silva Faria. SFRH/BD/43738/2008, FCT
- 2016 – 2019: Nematransfer - Quebrar o ciclo de declínio da Doença da Murchidão dos Pinheiros, possibilidade ou utopia? Descodificar os mecanismos subjacentes à transferência do nemátode da madeira do pinheiro entre o inseto-vetor e a árvore hospedeira. PTDC/AGR-FOR/4391/2014. Coordenado pelo Dr Luís Bonifácio do INIAV

18

Centro de Biotecnologia Vegetal

.....
e a todos os colegas, colaboradores, bolseiros, alunos de Mestrado, alunos de Doutoramento e post-Docs… Obrigada!

19

Obrigada!

Contactos:
- Centro de Biotecnologia Vegetal (http://cbv.fc.ul.pt/), CESAM Lisboa
- Email (acsf@fc.ul.pt) / Telefone (217500257)

20