

Plataforma Experimental URGENTpine:

Estudos de Interação hospedeiro-patógeno na doença do Cancro Resinoso do Pinheiro

Glória Catarina Pinto

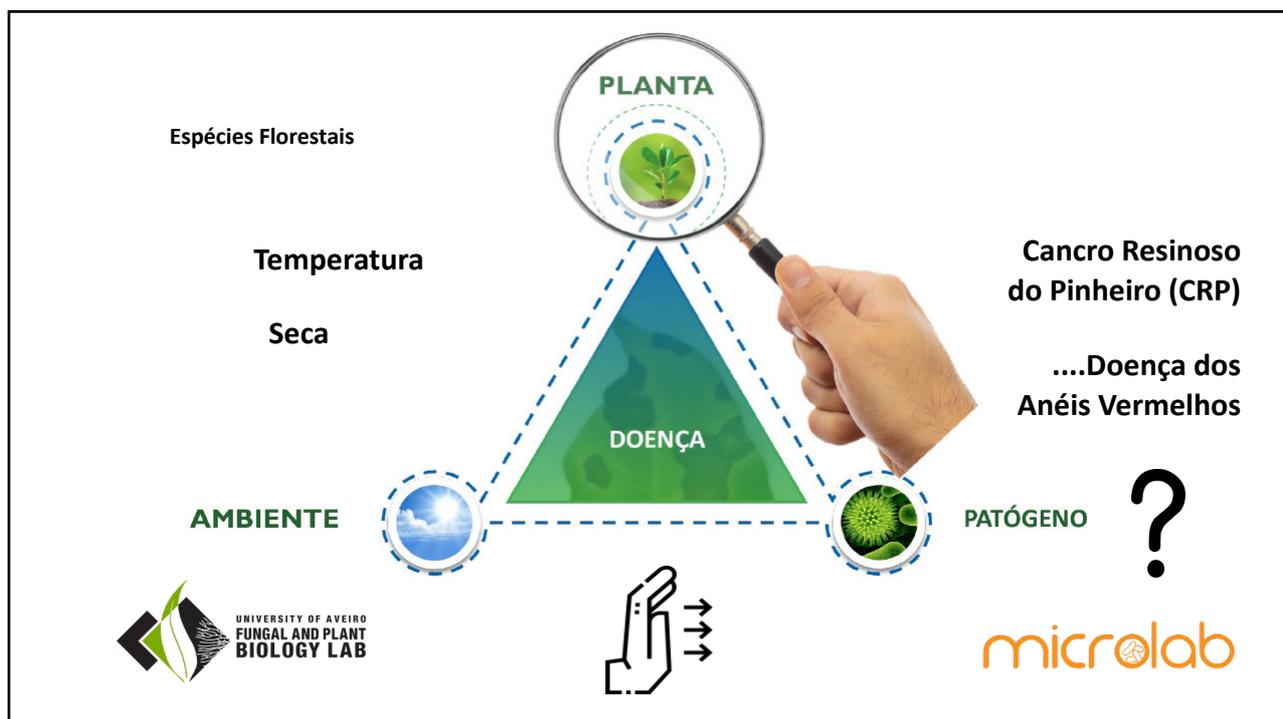
15 dezembro de 2021

1

URGENTpine project
UnRaveling host-pathoGEN iNteracTion in pine pitch canker disease- URGENTpine
 (PTDC/AGR-FOR/2768/2014; POCI-01-FEDER-016785)

Plimpline: Pine protection against Pitch canker through genetic resistance and plant immunization
 (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship H2020-MSCA-IF-2017-797350)

2



3

O problema

Fusarium circinatum

- Fungo altamente virulento para a maioria das espécies de pinheiros;
- Recomendado como agente patogénico de quarentena na Europa (Decisão 2007/433/CE de 18 de Junho de 2007) e parte de um plano de ação nacional;
- Sintomas de infeção por cancro do pinheiro:
 - Em estufa
 - Plantas adultas/plantações



Sociedade,
Ambiente
& Economia



4

2017.....

Ferramentas de deteção

Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry

PHYTOPATHOLOGY Vol. 99, No. 5, 2009

Investigação em CRP

Estratégias de mitigação

Efficacy of hot water treatment to reduce the incidence of *Fusarium circinatum* on *Pinus radiata* seeds

In Vitro and In Vivo Interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*

Evaluating methyl jasmonate for induction of resistance to *Fusarium oxysporum*, *F. circinatum* and *Ophiostoma novo-ulmi*

Caracterização das populações de *F. circinatum*

A genetically homogenous population of *Fusarium circinatum* causes pitch canker of *Pinus radiata* in the Basque Country, Spain

PATHOGENICITY OF *Fusarium circinatum* NIREMBERG & O'DONNELL ON SEEDS AND SEEDLINGS OF RADIATA PINE

Evidence for Multiple Introductions and Clonality in Spanish Populations of *Fusarium circinatum*

Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain

Testes de suscetibilidade hospedeiro

Adaptive Potential of Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Populations to the Emerging Pitch Canker Pathogen, *Fusarium circinatum*

Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain

Screening of Maritime pine (*Pinus pinaster*) for resistance to *Fusarium circinatum*, the causal agent of Pitch Canker disease

Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*

5

Adaptive Potential of Maritime Pine (*Pinus pinaster*) Populations to the Emerging Pitch Canker Pathogen, *Fusarium circinatum*

Alternative species to replace Monterey pine plantations affected by pitch canker caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain

Screening of Maritime pine (*Pinus pinaster*) for resistance to *Fusarium circinatum*, the causal agent of Pitch Canker disease

Resistance levels of Spanish conifers against *Fusarium circinatum* and *Diplodia pinea*

Suscetibilidade do Hospedeiro

P. pinea *P. pinaster* *P. radiata*

Suscetibilidade a *F. circinatum*

social

ambiental

Quais os mecanismos de defesa por detrás destas respostas?
Porque temos espécies Resistentes (R) e Suscetíveis (S)?

6

RESISTÊNCIA

NATURAL/CONSTITUTIVA

Seleção/melhoramento

INDUZIDA (IR)

Agentes Químicos/ Agentes Bióticos

Da ideia à Aplicação!

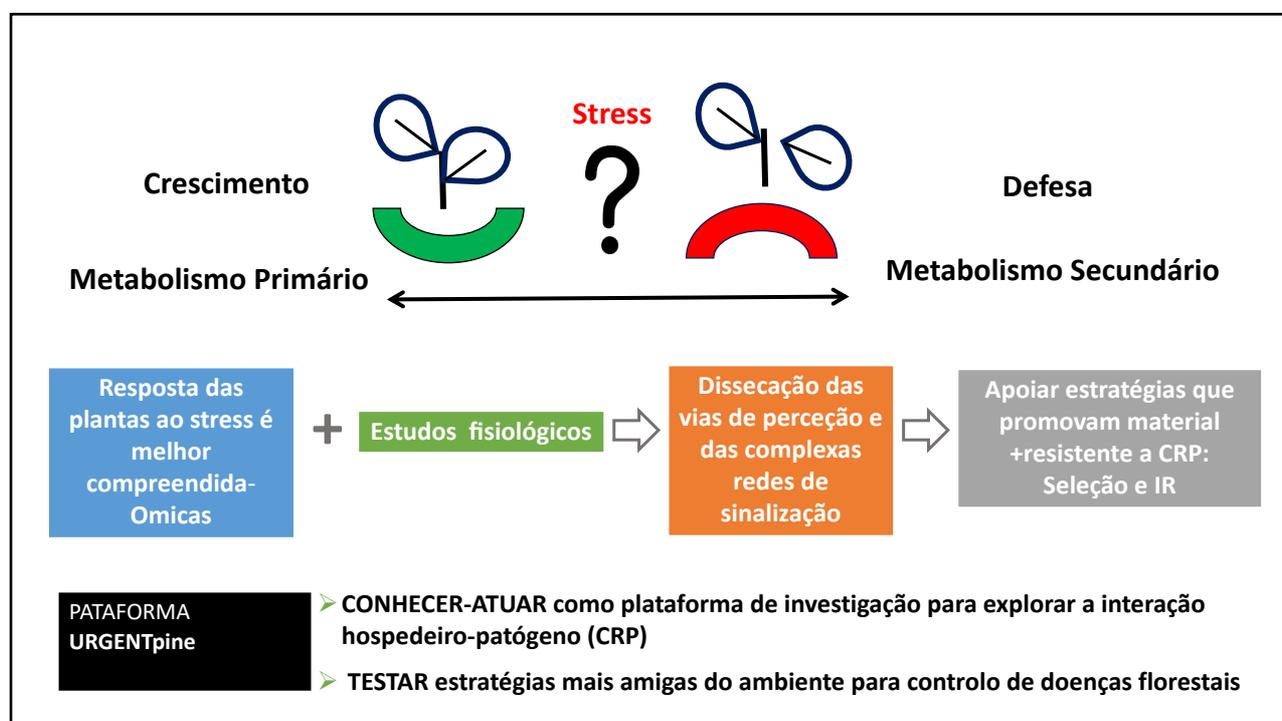
Conhecer as vias de defesa e genes +importantes para produzir plantas florestais mais resilientes a doenças



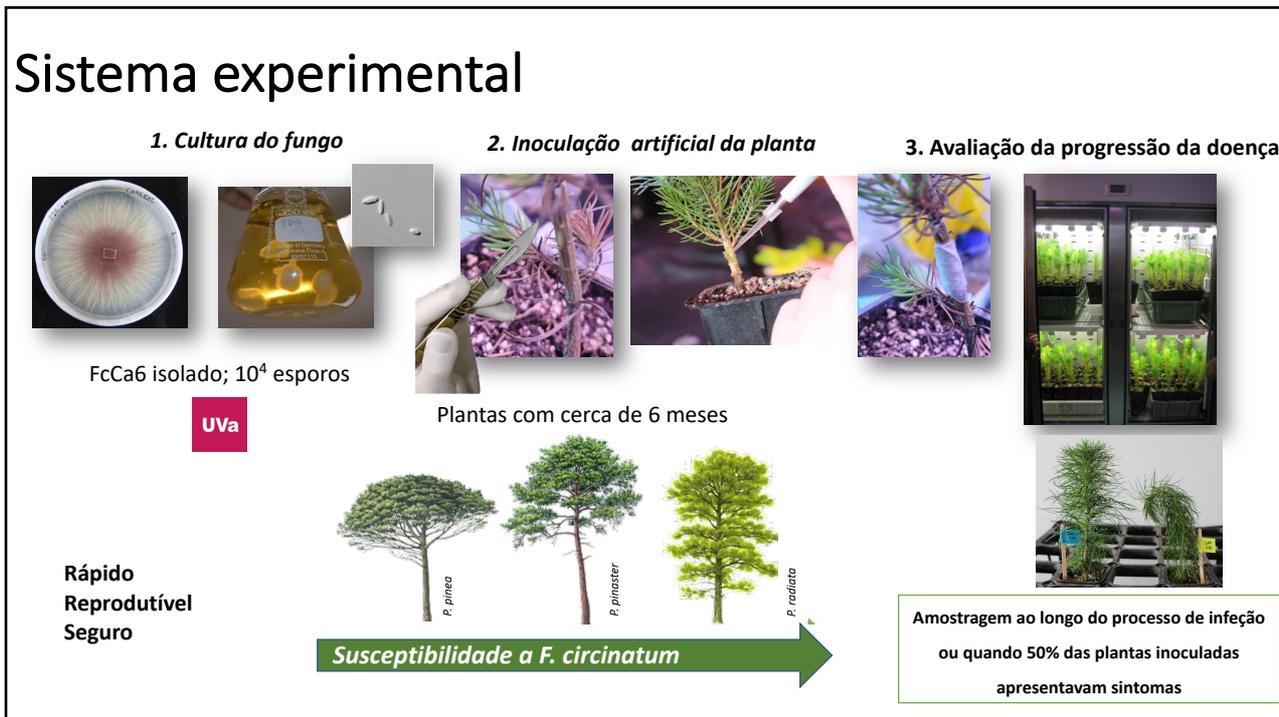
Ex: Seleção molecularmente assistida
Engenharia genética/Edição do genoma
Indutores de resistência



7



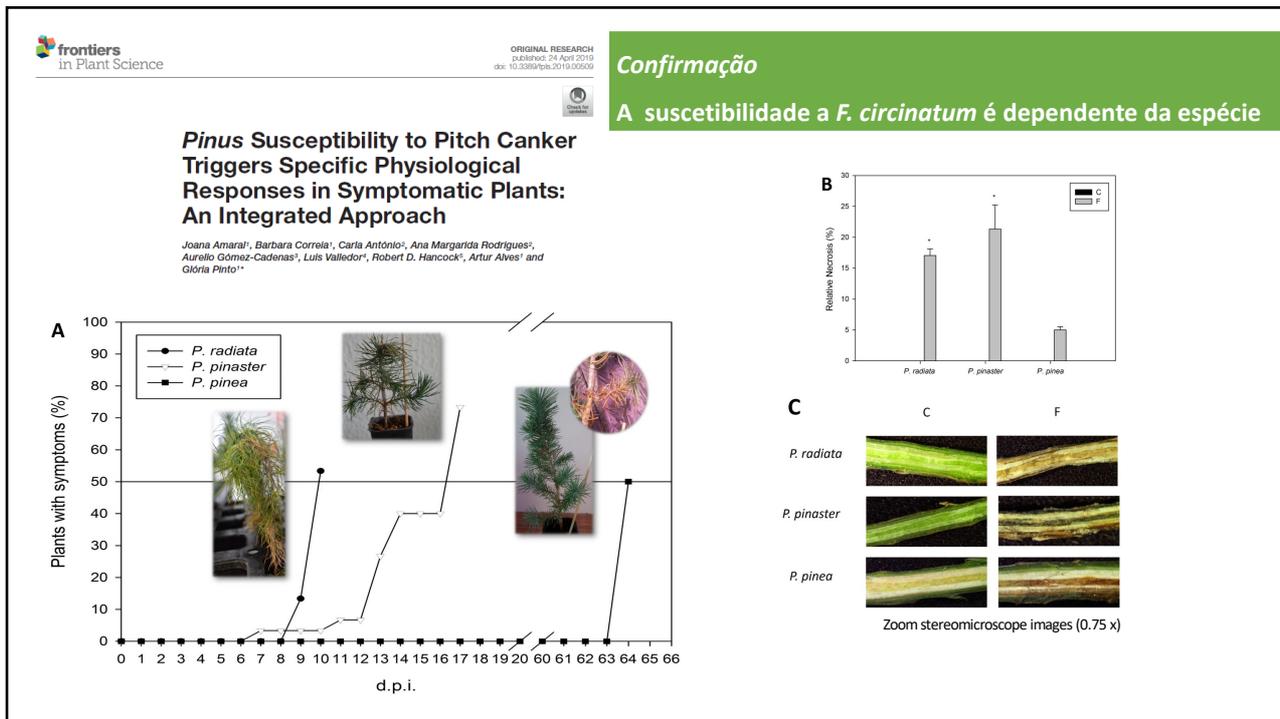
8



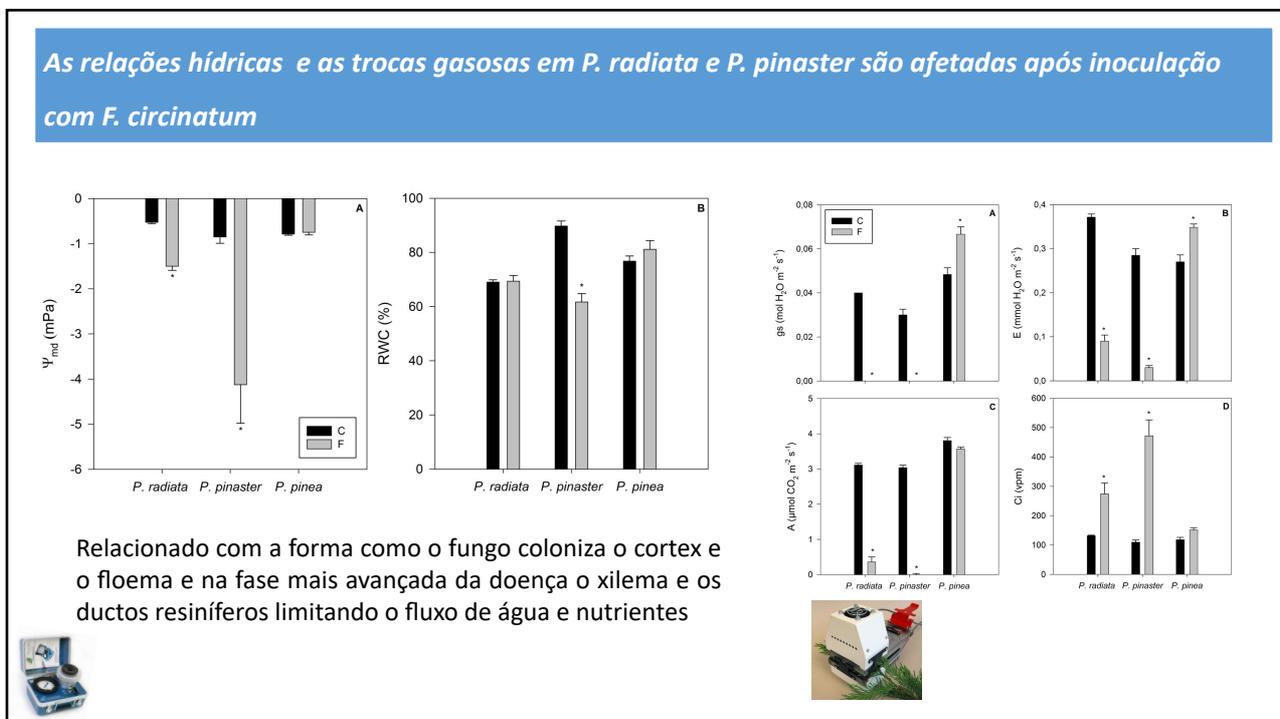
9



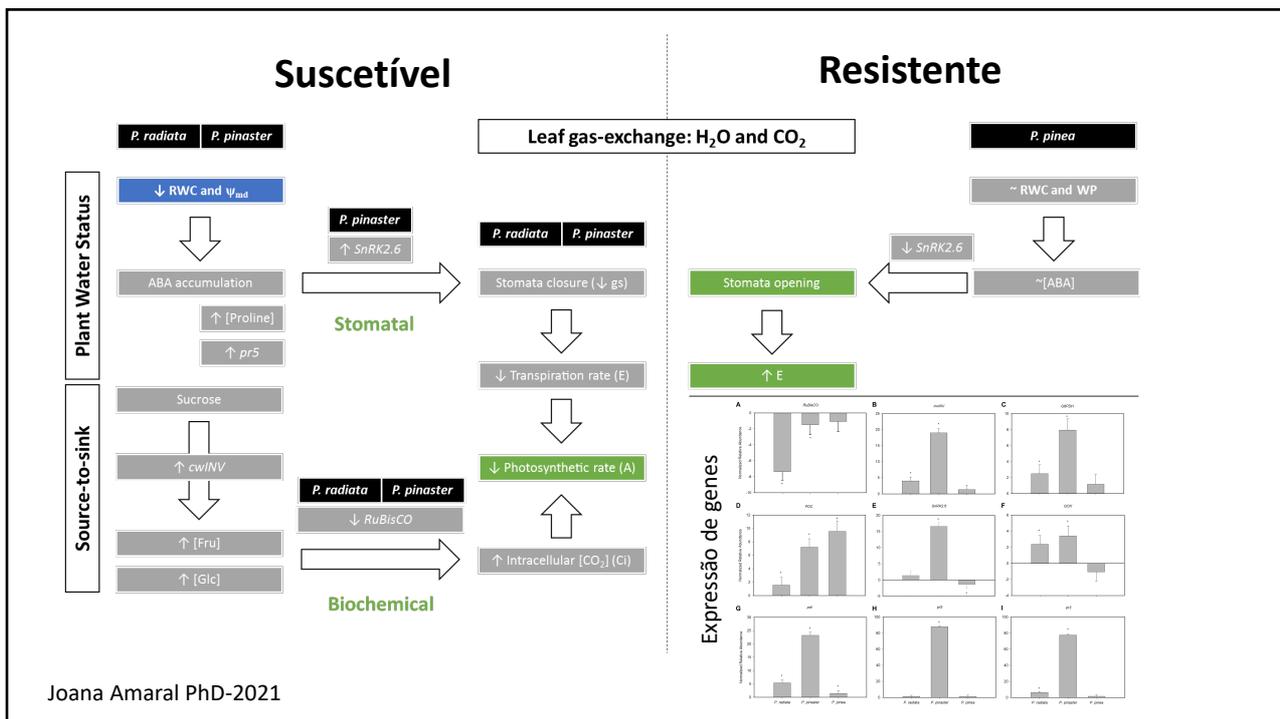
10



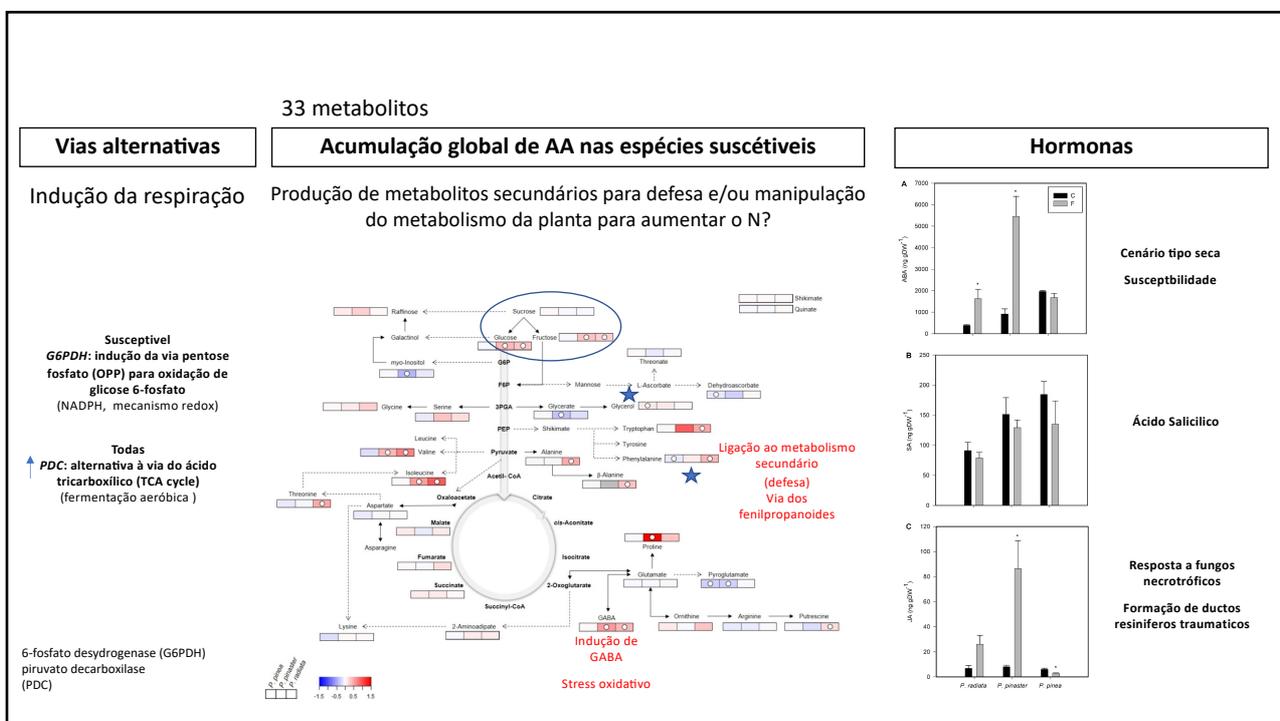
11



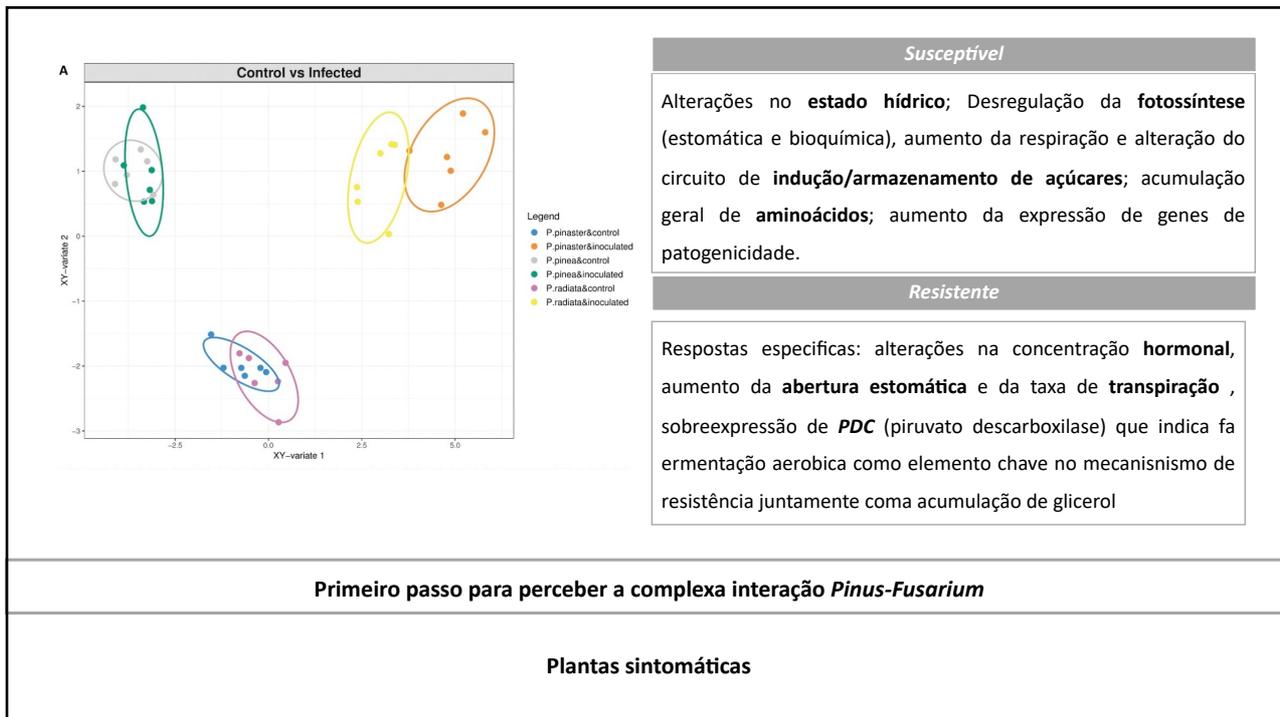
12



13



14



15

Research paper

Temporal physiological response of pine to *Fusarium circinatum* infection is dependent on host susceptibility level: the role of ABA catabolism

Joana Amaral¹, Barbara Correia^{1,6}, Mónica Escandón^{1,7}, Cláudia Jesus¹, João Seródio¹, Luis Valledor², Robert D. Hancock³, Lia-Tânia Dinis⁴, Aurelio Gomez-Cadenas⁵, Artur Alves¹ and Glória Pinto^{1,8}

O que acontece na planta antes do aparecimento dos sintomas?

R

Parameters:

Water status

Gas exchange

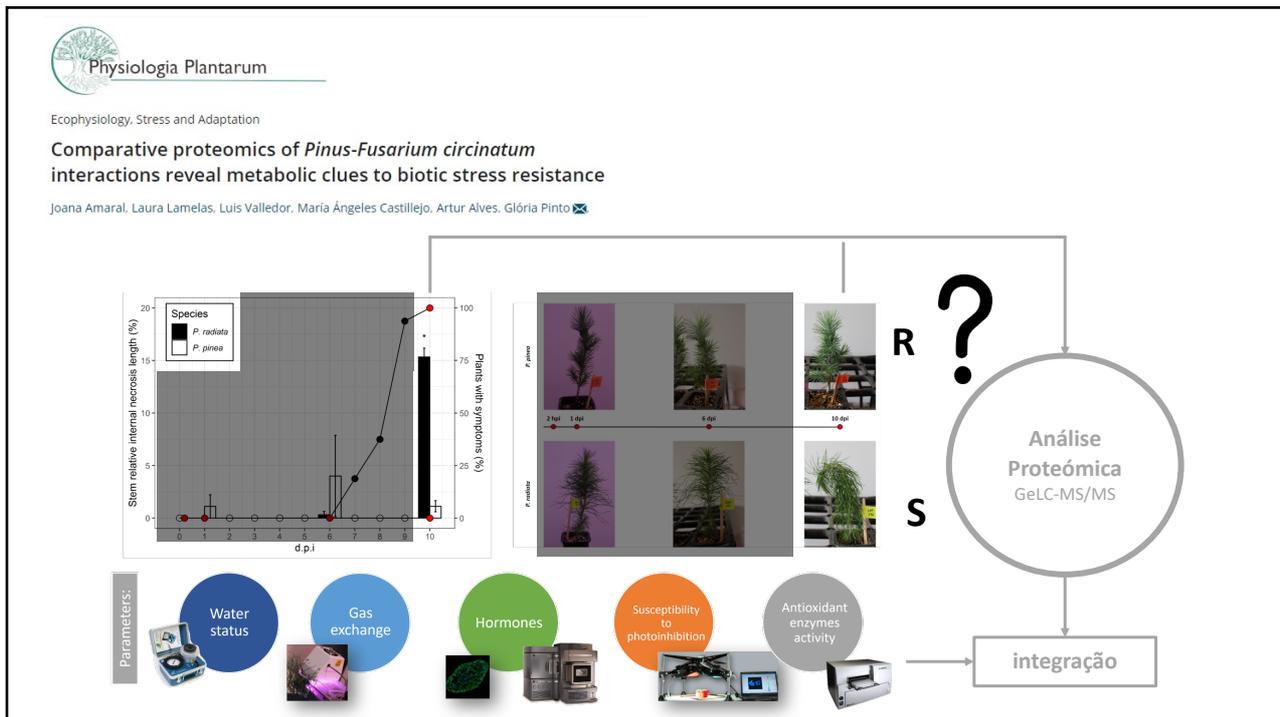
Hormones

Susceptibility to photoinhibition

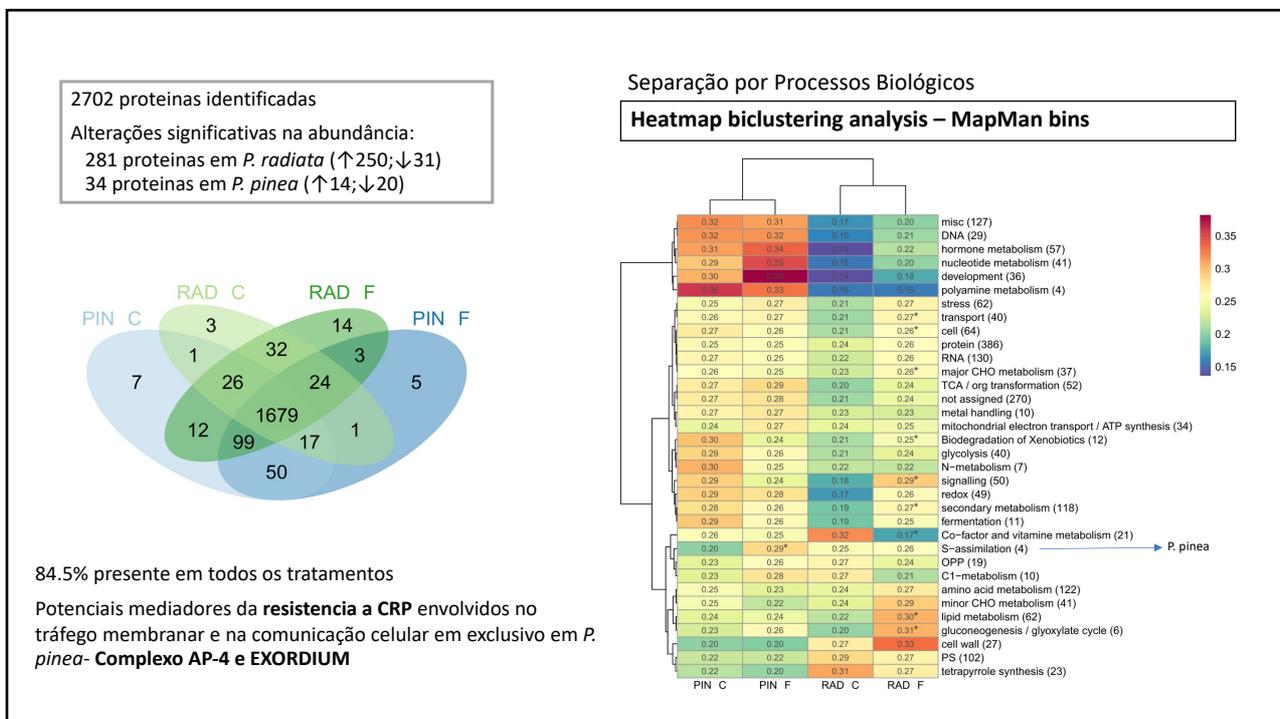
Antioxidant enzymes activity

Ferramentas para a deteção precoce da doença e perceber os mecanismos de defesa iniciais responsáveis pela sobrevivência a CRP em *P. pinea*

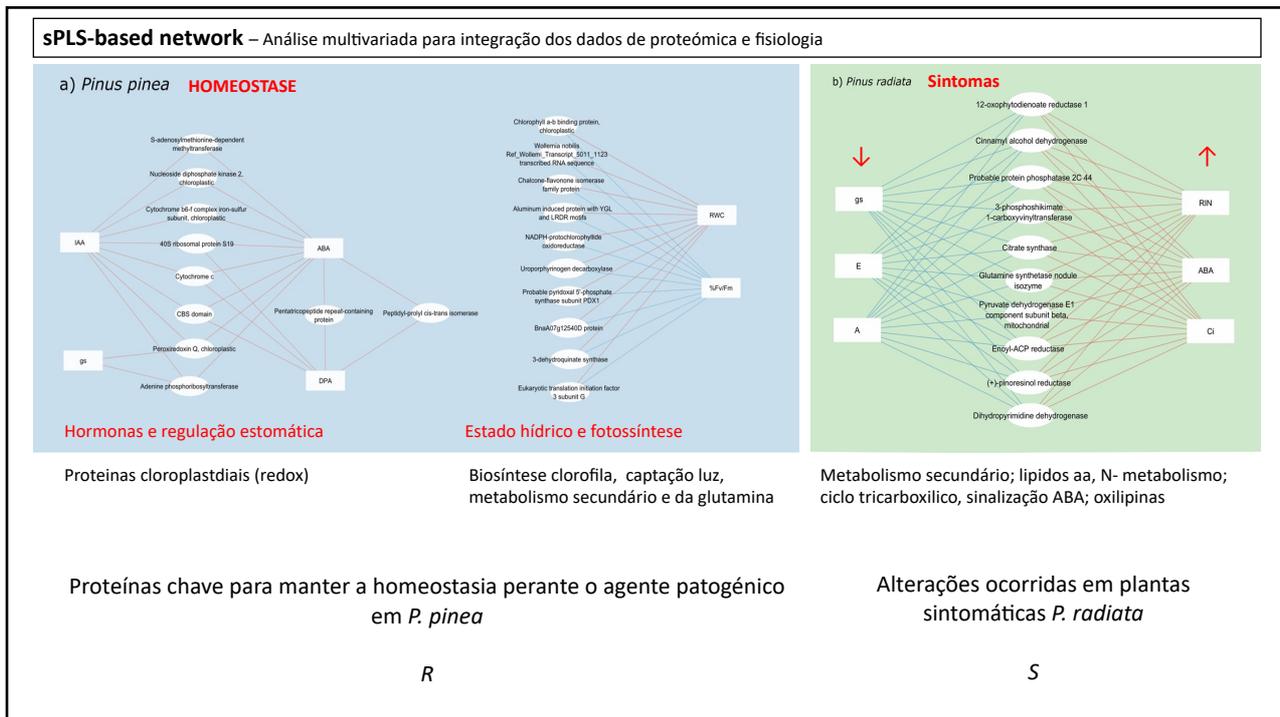
16



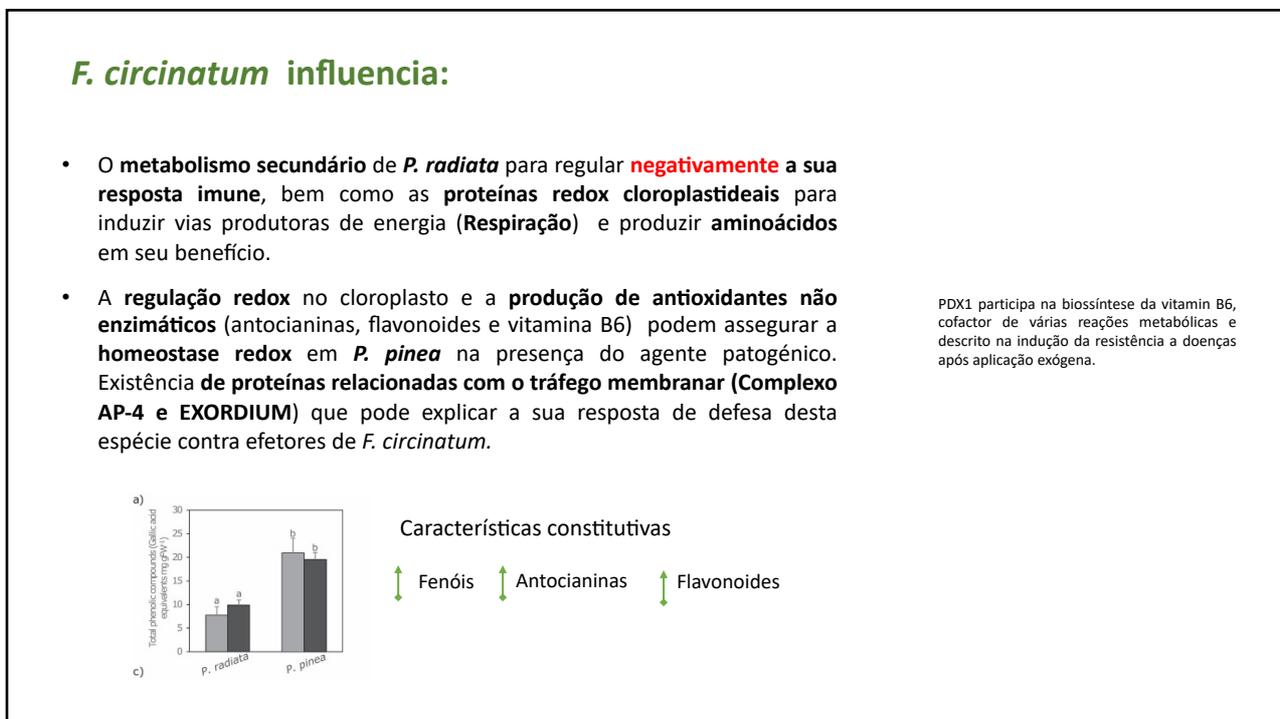
19



20



21



22

Novas descobertas que fornecem uma melhor imagem dos mecanismos envolvidos na resposta ao CRP, destacando o envolvimento de diferentes vias em hospedeiros suscetíveis e resistentes após inoculação com *F. circinatum*.

O PLANO DE TRABALHO ASSENTA NUMA ABORDAGEM INTEGRADA PROPONDO SOLUÇÕES DE BASE CIENTÍFICA

INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA VIA APLICAÇÃO DE AGENTES QUÍMICOS

Catabolitos do ABA

Vitaminas

Fenois/ flavonoides

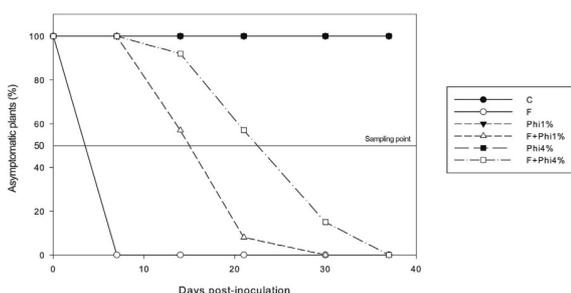


23

FOSFITO- Phi

IR- Agentes químicos

Phi atrasou o desenvolvimento dos sintomas da doença numa forma dependente da dose e de acordo com as observações feitas in vitro:



Trocas gasosas e a fluorescência da clorofila não foram afetados
Prolina, MDA e ABA diminuíram- **DIMINUIÇÃO STRESS**

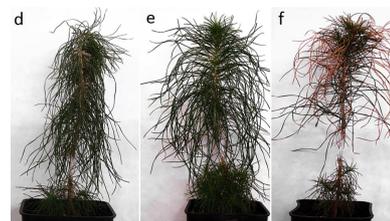
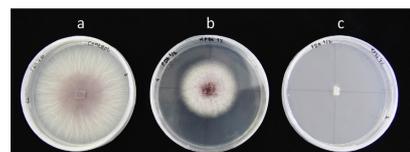
Ação do Phi representa uma potencial estratégia para controlar CRP

Direta: inibição do crescimento do agente patógeno

INDIRETA: indução resistência do hospedeiro action of Phi



Research article
Phosphite shifts physiological and hormonal profile of Monterey pine and delays *Fusarium circinatum* progression
Andria Cerqueira ^a, Artur Alves ^a, Helder Berenguer ^a, Barbara Correia ^a, Aurelio Gómez-Cadenas ^b, Julio Javier Diez ^{c,d}, Pedro Monteiro ^a, Glória Pinto ^{a,*}

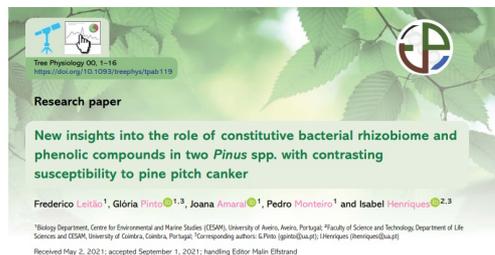


Formulação Fosfito de potássio comercial (Trafos Sinergy)

24

Genótipo e rizobioma?

Qualidade e saúde da planta
 Extensão do genoma- Melhoramento/seleção?
 Indução de resistência

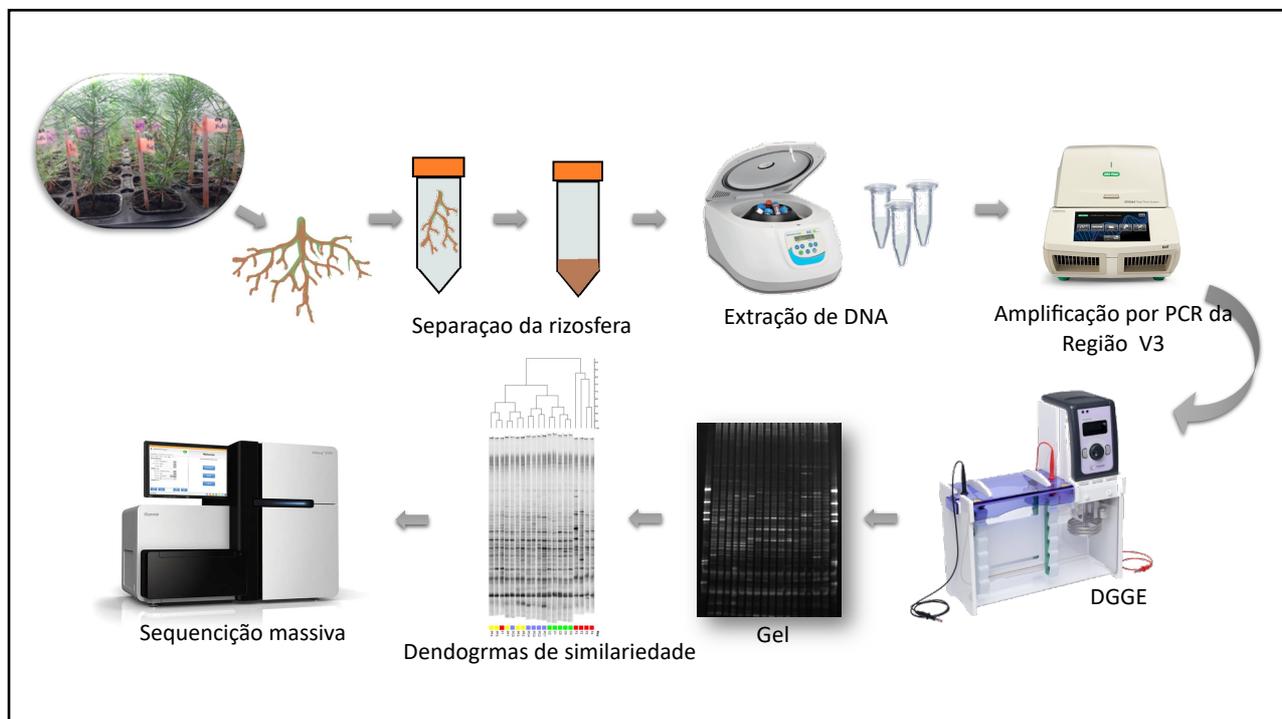


Há diferenças no rizobioma of *P. pinea* (resistente) comparativamente ao *P. radiata* (susceptível)?



IR- Agentes biológicos

25



26

Abundante em *P. pinea*

- *Acidobacteriaceae*;
- *Burkholderiaceae*;
- *Xanthomonadaceae*;
- *Roseiarcaceae*;
- *Mycobacteriaceae*;
- *Nocardioidaceae*;

Abundante em *P. radiata*

- *Micropepsaceae*;
- *Rhizobiaceae*;
- *Gemmatimonadaceae*;

Maior prevalência de famílias bacterianas com características potencialmente antifúngicas observadas no rizobioma de *P. pinea*

Notas experimentais: Cenário de produção: viveiro; substrato comercial; plantas em idade de comercialização

PhD_Frederico Leitão 2021....

27

PGPR Isolation

Testes in vitro com bactérias e *F. circinatum*

Bacterial consortia development

IR

Qualidade da planta
Redução de fertilizantes e agroquímicos

Clonete Relativa	gb	Similarity	Taxon	Tissue	Phyla	Family	Genus	Strain	Phosphate	IAA (µg/ml)	Siderophore	ACC	nH
<i>Moraxella osloensis</i>	955	99.57%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>	R.0301	X	7.15	X	X	X
<i>Moraxella osloensis</i>	1046	99.51%	<i>P. pinaster</i>	Root	Actinobacteria	Micrococcales	<i>Moraxella</i>	R.0302	X	18.79	Positivo	X	X
<i>Moraxella osloensis</i>	1057	100%	<i>P. pinaster</i>	Root	Actinobacteria	Micrococcales	<i>Moraxella</i>	R.0303	X	20.45	Positivo	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1087	99.83%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	R.0304	Positivo	43.11	X	X	X
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1078	99.44%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Enterobacter</i>	R.0305	X	6.89	X	X	X
<i>Penicillium sp.</i>	1133	99.51%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Rhodospirillaceae	<i>Penicillium</i>	R.0307	X	11.02	Positivo	X	X
<i>Bacillus licheniformis</i>	1012	99.94/99.79%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	R.0308	X	6.80	Positivo	X	X
<i>Streptomyces radiolii</i>	1084	98.98%	<i>P. pinaster</i>	Root	Actinobacteria	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	R.0309	Positivo	7.76	X	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1087	99.83%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	R.0303	Positivo	18.96	X	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1059	98.58%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	R.0304	X	5.67	X	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1060	99.54%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	R.0305	X	12.06	X	X	X
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1114	99.01/99.19%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Enterobacter</i>	R.0307	X	7.15	X	X	X
<i>Moraxella osloensis</i>	1021	99.21%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Moraxella</i>	R.0309	X	6.72	X	X	X
<i>Pyrobacillus ischiensis</i>	1003	98.78/79.73%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pyrobacillus</i>	R.0301	X	6.72	X	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1090	97.11%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	R.0306	X	9.28	X	X	X
<i>Penicillium ischiensis</i>	995	98.99/98.19%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Moraxellaceae	<i>Penicillium</i>	R.0308	X	20.09	Reação	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	979	99.89%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Pantoea</i>	R.0303	Positivo	18.28	X	Positivo	X
<i>Burkholderia adambrookii</i>	940	99.89%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	R.0302	Positivo	15.47	X	X	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1101	99.73%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Pantoea</i>	R.0305	Positivo	17.06	Positivo	Positivo	X
<i>Bacillus cereus</i>	1039	100%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	R.0306	X	8.02	Positivo	X	X
<i>Campylobacter jejuni</i>	1007	99.27%	<i>P. pinaster</i>	Root	Proteobacteria	Burkholderiaceae	<i>Campylobacter</i>	R.0307	Positivo	23.12	X	Positivo	X
<i>Pantoea ischiensis</i>	1007	99.60%	<i>P. pinaster</i>	Root	Firmicutes	Faenibacteriaceae	<i>Pantoea</i>	T.0302	X	19.37	Positivo	X	X

28

Controlo Biológico Uma Solução para tudo?

F. circinatum susceptibility

Effect of *Trichoderma viride* pre-inoculation in pine species with different levels of susceptibility to *Fusarium circinatum*: physiological and hormonal responses

J. Amaral^a, G. Pinto^a, J. A. Flores-Pacheco^{bc}, J. J. Díez-Casero^{bc}, A. Cerqueira^a, P. Monteiro^a, A. Gómez-Cadenas^d, A. Alves^a and J. Martín-García^{abc*}

Plant Pathology (2019) Doi: 10.1111/ppa.13080

T. viride inoculação(solo) (C, T)

2 weeks

F. circinatum inoculação (C, T, F, TF)

Monitorização da progressão da doença

Estado hidrico (Ψ_{md} , RWC)

Trocas gasosas (A, E, gs, Ci)

Hormonas (ABA, JA, SA)

Prolina & Pigmentos (Chl, Car, Ant)

+ % EL & necrose interna relativa

T. viride x F. circinatum

Amplifica: ↑ RIN, Ci
↓ Ψ_{md} , A

Novas: ↑ EL, SA
↓ RWC

Trichoderma inicialmente subverte a imunidade do hospedeiro para colonização radicular, levando a maiores danos.

29

Obrigada pela vossa atenção

gpinto@ua.pt

www.cesam.ua.pt/gpinto

UNIVERSITY OF AVEIRO
FUNGAL AND PLANT
BIOLOGY LAB

universidade de aveiro

30