




# Plataforma Experimental URGENTpine:

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

**Glória Catarina Pinto**













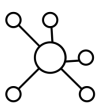
15 dezembro de 2021










1


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

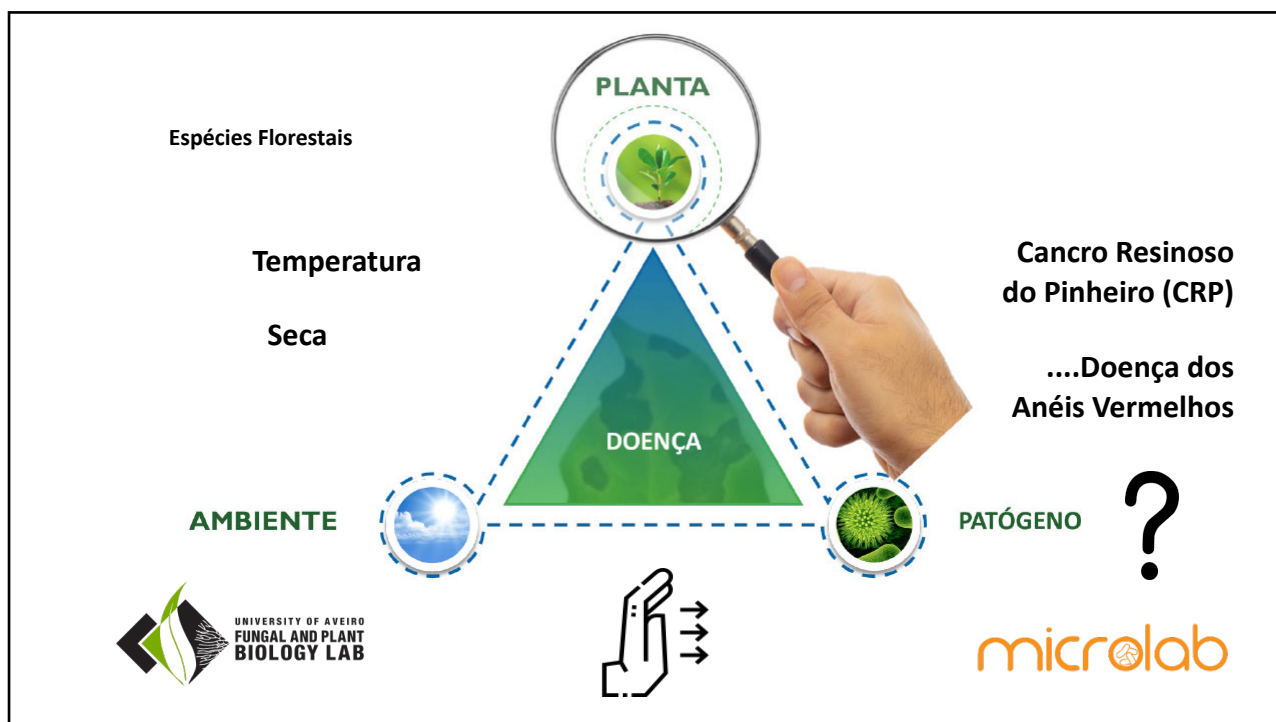


**Plimpline: Pine protection against  
Pitch canker through genetic  
resistance and plant immunization**  
 (Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship  
 H2020-MSCA-IF-2017-797350)



2

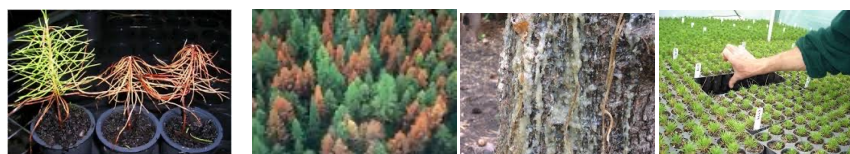


3

## 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

### Ferramentas de deteção

2017.....

PHYTOPATHOLOGY Vol. 99, No. 5, 2009

**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**

Remond Ibanez, Oihane Escarot, Gabriela Etxebarria and Thomas W. Gordon

### Estratégias de mitigação

Forestry 2012; 85: 619-635

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

C. Agustí-Brisach, A. Pérez-Sierra, J. Armengol, J. Garcia-Jiménez and M. Berbegal

Forest Science 2012(20), 20-26

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

Pablo Martínez-Alvarez, Fernando Manuel Alvarado-Santos and Julio Javier Diez

Investigación  
em  
CRP

### Caracterização das populações de *F. circinatum*

Forest Biology 115 (2013) 488-492

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

Eugenia ITURRITXA<sup>a</sup>, Rebecca J. GANLEY<sup>b,c</sup>, Jane WRIGHT<sup>a</sup>, Endika HEPPE<sup>a</sup>, M. Borbegal, A. Pérez-Sierra, J. Armengol, M. L. G. GARCÍA-JIMÉNEZ, J. GARCÍA-SERNA, J. GARCÍA-SERNA, J. GARCÍA-SERNA

SDU Faculty of Forestry Journal Serial: A, Number: Special Issue, Year: 2009, ISSN: 1302-7085, Page: 200-205

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

M. ALVAREZ<sup>a</sup>, Juan BLANCO<sup>c</sup>, Milagros de VALLEJO<sup>c</sup>, Fernando M. Alves-SANTOS<sup>b</sup>, Julio J. DIEZ<sup>a</sup>

PHYTOPATHOLOGY Vol. 103, No. 8, 2013

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

M. Borbegal, A. Pérez-Sierra, J. Armengol, and N. J. Grünwald

MYCOLOGICAL RESEARCH 111 (2007) 833-839

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

Ana PÉREZ-SIERRA<sup>a</sup>, Elena LANDERAS<sup>b</sup>, Maela LEÓN<sup>b</sup>, Mónica BERBEGAL<sup>a</sup>, José GARCÍA-JIMÉNEZ<sup>a</sup>, Josep ARMENGOL<sup>a</sup>

### Testes de suscetibilidade hospedeiro

PLOS ONE December 11, 2014

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

Margarita Elvira-Recuenco<sup>1</sup>, Eugenia Iturriza<sup>2</sup>, Juan Majada<sup>3</sup>, Ricardo Alía<sup>4,5</sup>, Rosa Raposo<sup>6</sup>

Plant Pathology (2014) 63, 1086-1094

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

P. Martínez-Alvarez<sup>a</sup>, V. Pando<sup>b,c</sup> and J. J. Diez<sup>b,d</sup>

Forestry, Vol. 85, No. 2, 2012

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

M. VIVAS<sup>1</sup>, R. ZAS<sup>2</sup> AND A. SOLLÀ<sup>1\*</sup>

For. Path. 43 (2013) 488-495

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

By E. Iturriza<sup>1,5</sup>, R. J. Ganley<sup>2</sup>, R. Raposo<sup>1</sup>, I. García-Serna<sup>1</sup>, N. Mesanza<sup>1</sup>, S. C. Kirkpatrick<sup>3</sup> and T. R. Gordon<sup>4</sup>

5

### I&D CRP

**Suscetibilidade do Hospedeiro**

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

**Suscetibilidade a *F. circinatum***

**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!**

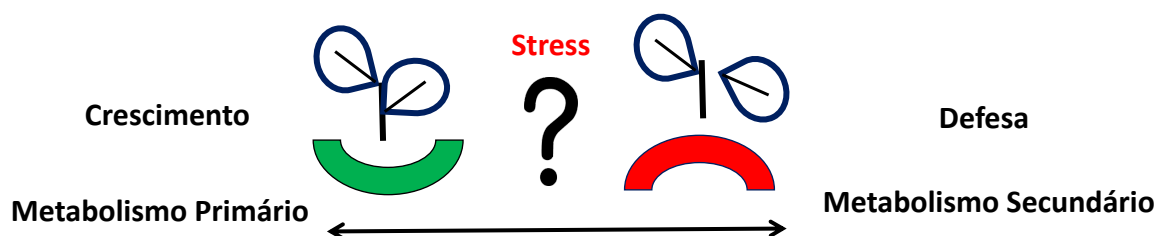
**Conhecer as vias de defesa e genes +importantes para produzir plantas florestais mais resilientes a doenças**



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



7



Resposta das plantas ao stress é melhor compreendida-Omicas

+

Estudos fisiológicos

⇒

Dissecação das vias de percepção e das complexas redes de sinalização

⇒

Apoiar estratégias que promovam material +resistente a CRP: Seleção e IR

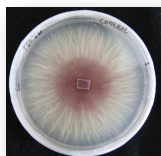
**PATAFORMA URGENTpine**

- CONHECER-ATUAR como plataforma de investigação para explorar a interação hospedeiro-patógeno (CRP)
- TESTAR estratégias mais amigas do ambiente para controlo de doenças florestais

8

# Sistema experimental

## 1. Cultura do fungo



FcCa6 isolado;  $10^4$  esporos

UVa

## 2. Inoculação artificial da planta



Plantas com cerca de 6 meses

## 3. Avaliação da progressão da doença



Amostragem ao longo do processo de infecção ou quando 50% das plantas inoculadas apresentavam sintomas

Rápido  
Reprodutível  
Seguro



Susceptibilidade a *F. circinatum*

9

# INTEGRAÇÃO DADOS

Morfologia e avaliação sintomas

FISIOLOGIA



OMICAS

Estado Hídrico



RWC, Potencial

Performance fotossintética



A, E, gs, Ci, Fv/Fm, NPQ ....

Perfil Hormonal



SA, ABA, IAA, JA, PA e DPA...  
imunolocalização

Perfil Bioquímico



Pigmentos fotossintéticos  
MDA, maquinaria antioxidante (enzimática e não enzimática); açúcares, prolina, fenóis, flavonoides.....

Expressão de genes



Expressão relativa de genes alvo envolvidos no metabolismo primário e secundário  
qPCR Tempo Real

Fotossíntese  
Metabolismo secundário  
Respiração  
Metabolismo açúcares  
Fotorespiração  
Genes patogencidade  
Etc....

Proteômica



Shotgun análise  
LC-MS/MS

Metabolômica

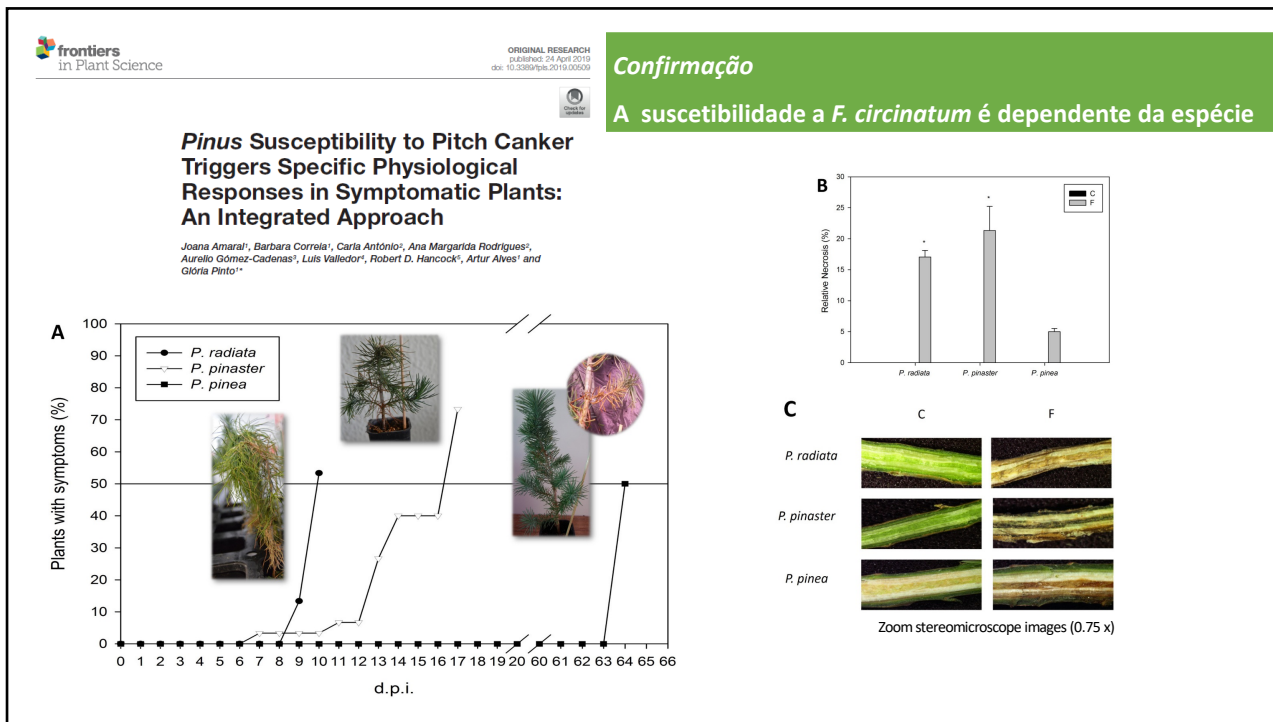
Quantificação relativa de metabolitos primários  
GC-TOF-MS

genótipo

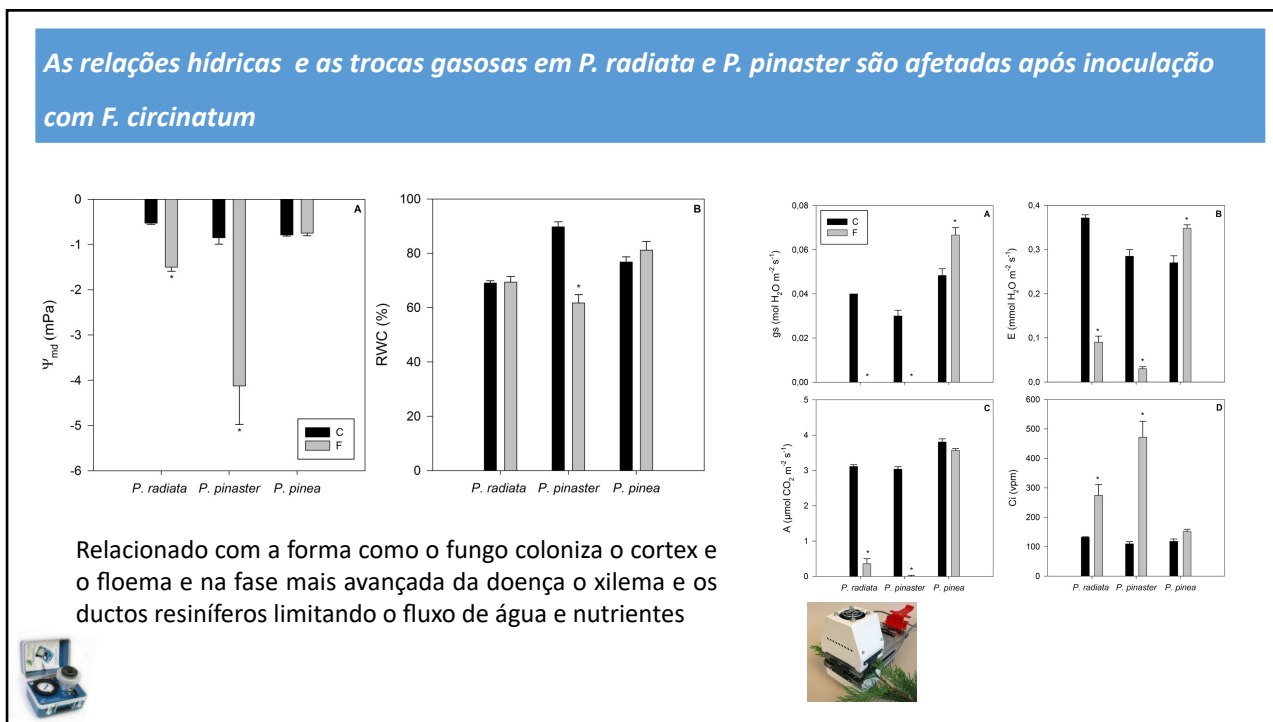


fenótipo

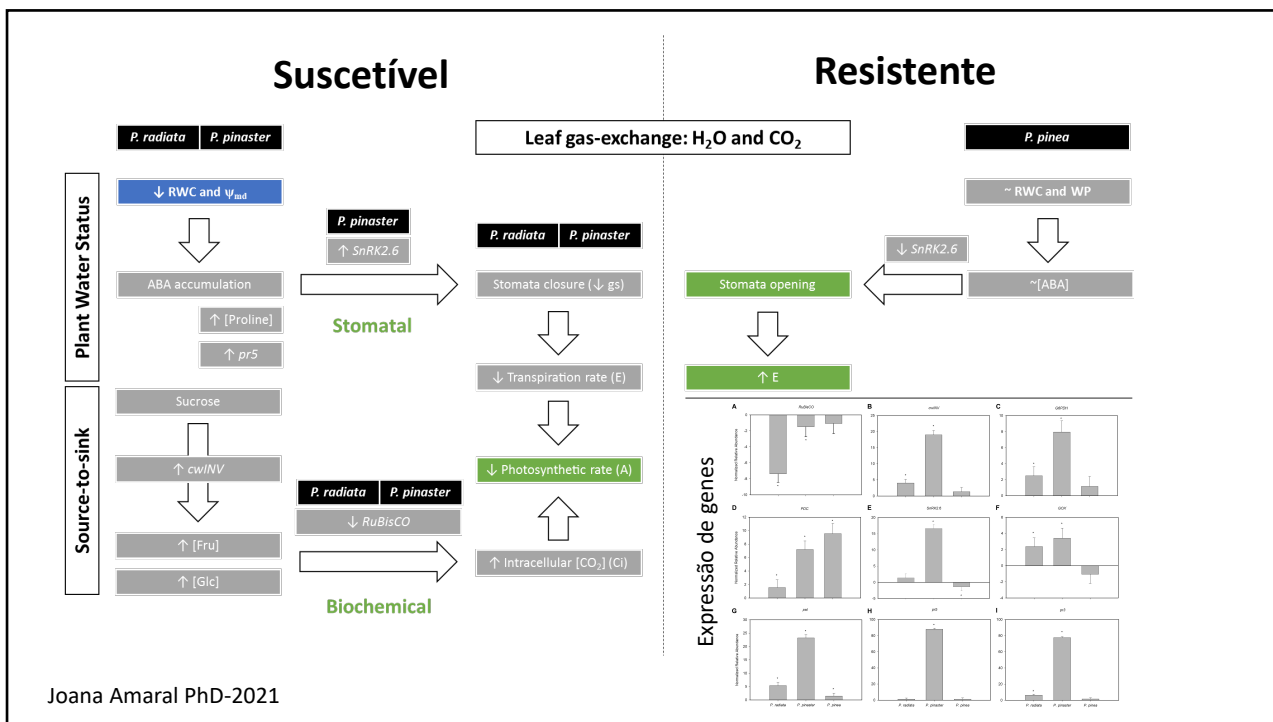
10



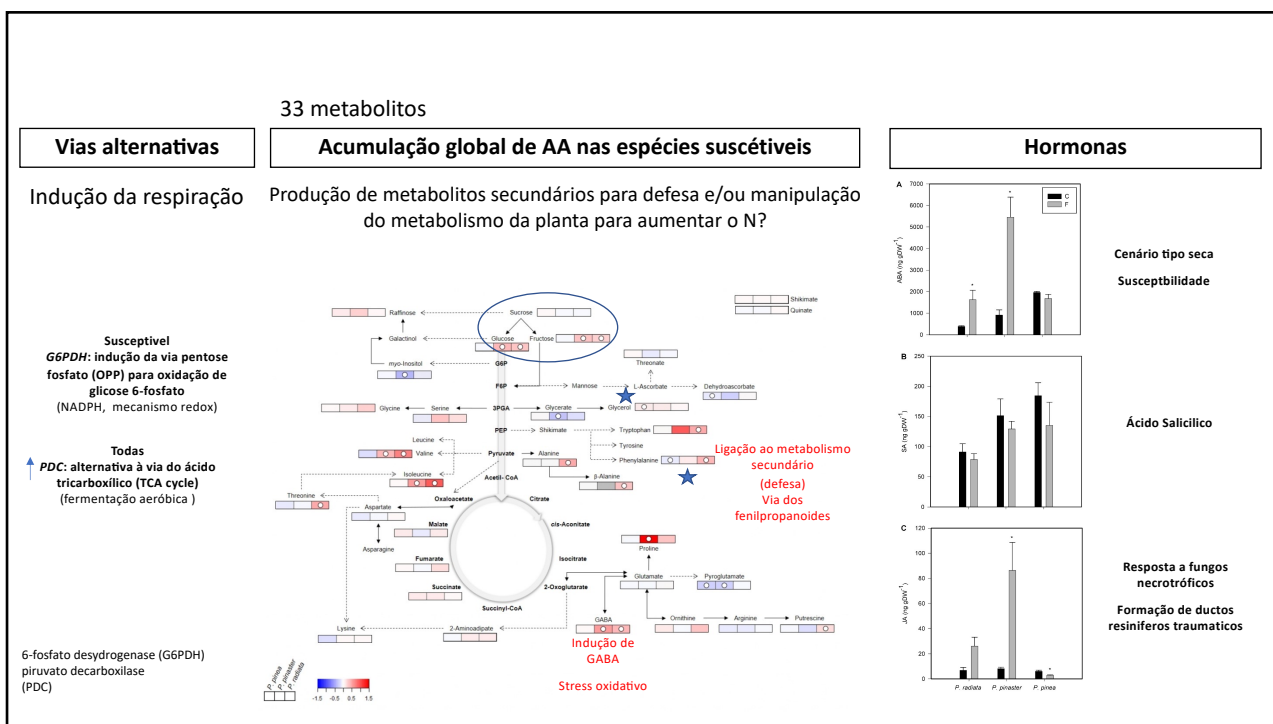
11



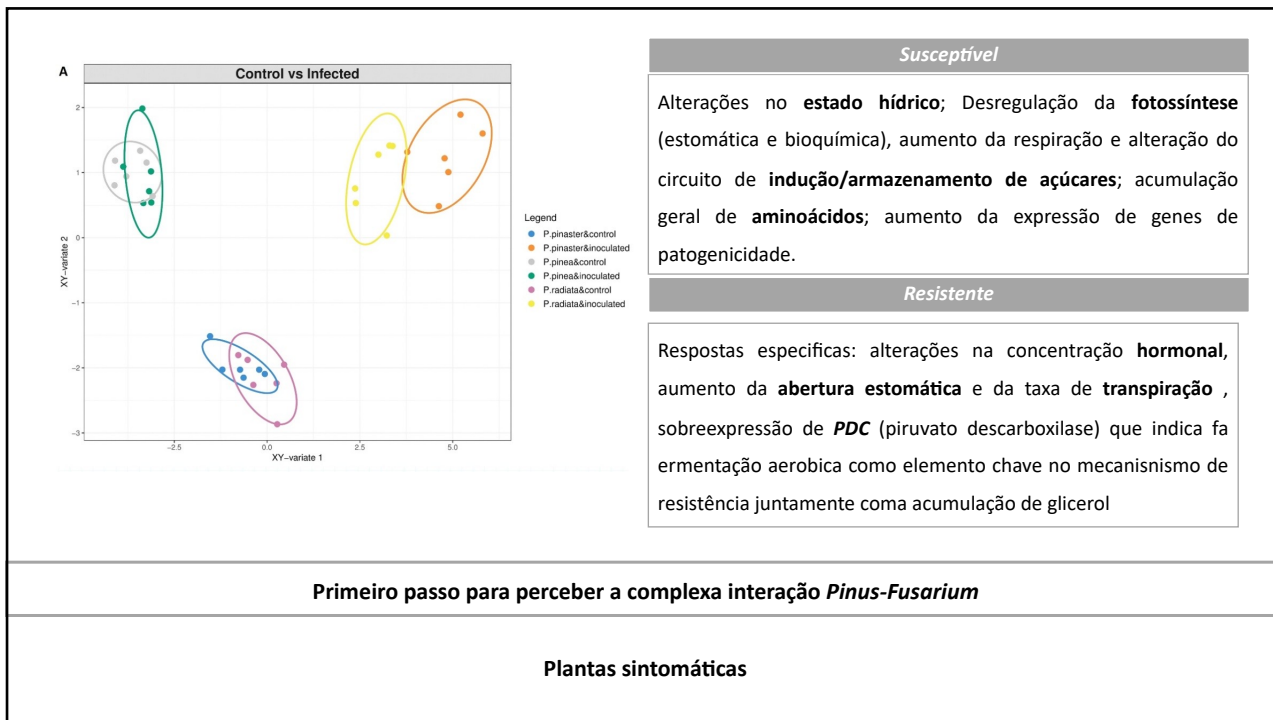
12



13



14



15

Tree Physiology 00, 1–16  
doi:10.1093/treephys/tpaa143

**Research paper**

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

Joana Amaral<sup>1</sup>, Barbara Correia<sup>1,6</sup>, Mónica Escandón<sup>1,7</sup>, Cláudia Jesus<sup>1</sup>, João Seródio<sup>1</sup>, Luis Valledor<sup>2</sup>, Robert D. Hancock<sup>3</sup>, Lia-Tânia Dinis<sup>4</sup>, Aurelio Gomez-Cadenas<sup>5</sup>, Artur Alves<sup>1</sup> and Glória Pinto<sup>1,8</sup>

**O que acontece na planta antes do aparecimento dos sintomas?**

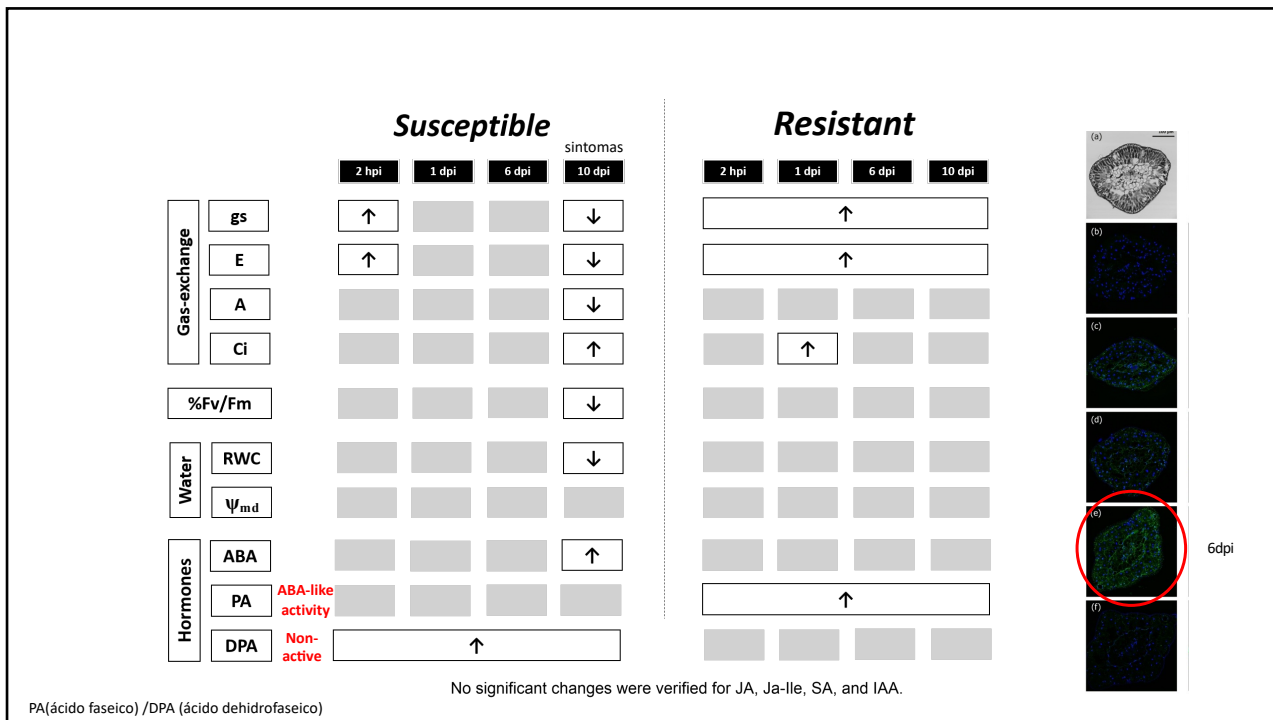
R

Water status
Gas exchange
Hormones
Susceptibility to photoinhibition
Antioxidant enzymes activity

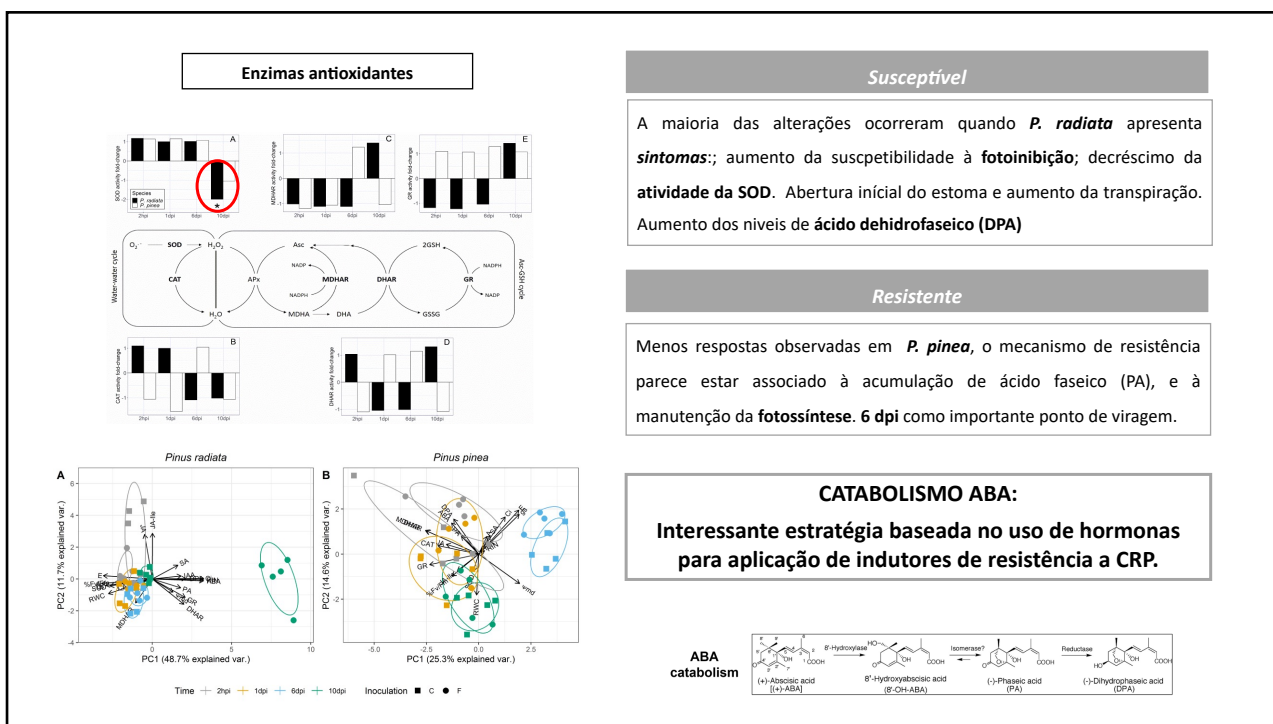
**Ferramentas para a deteção precoce da doença e perceber os mecanismos de defesa iniciais responsáveis pela sobrevivência a CRP em *P. pinea***

16

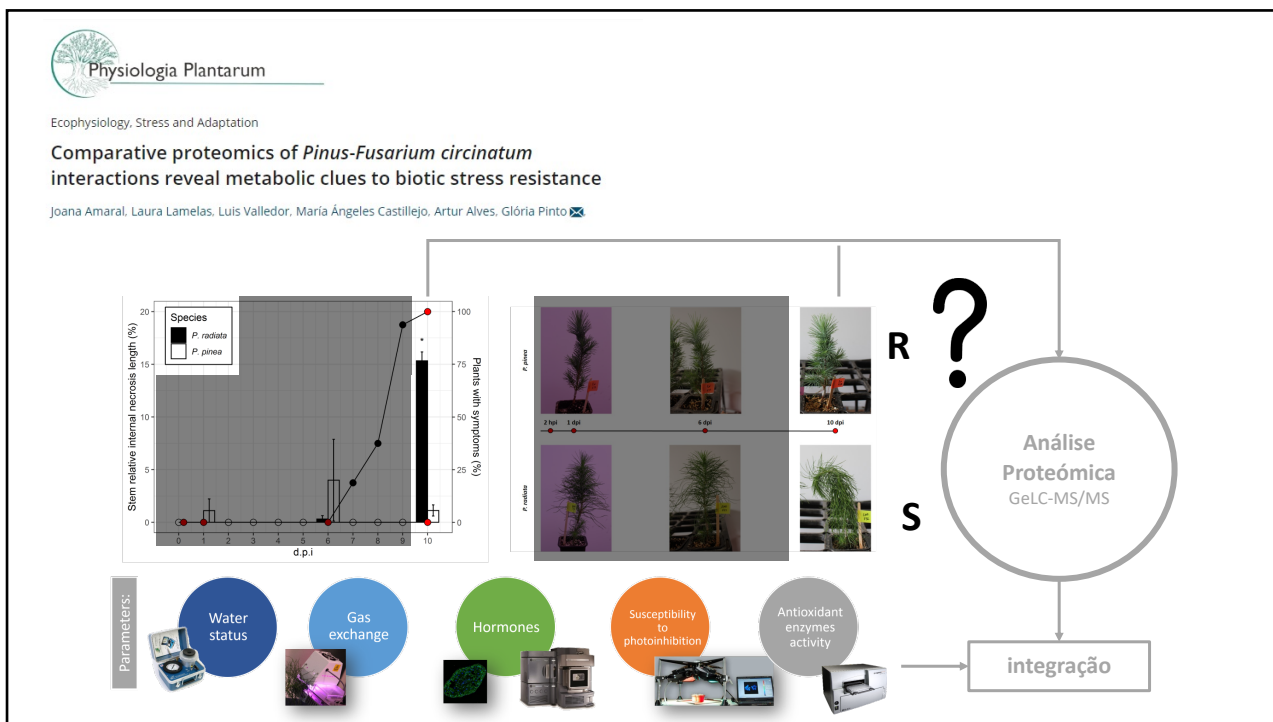




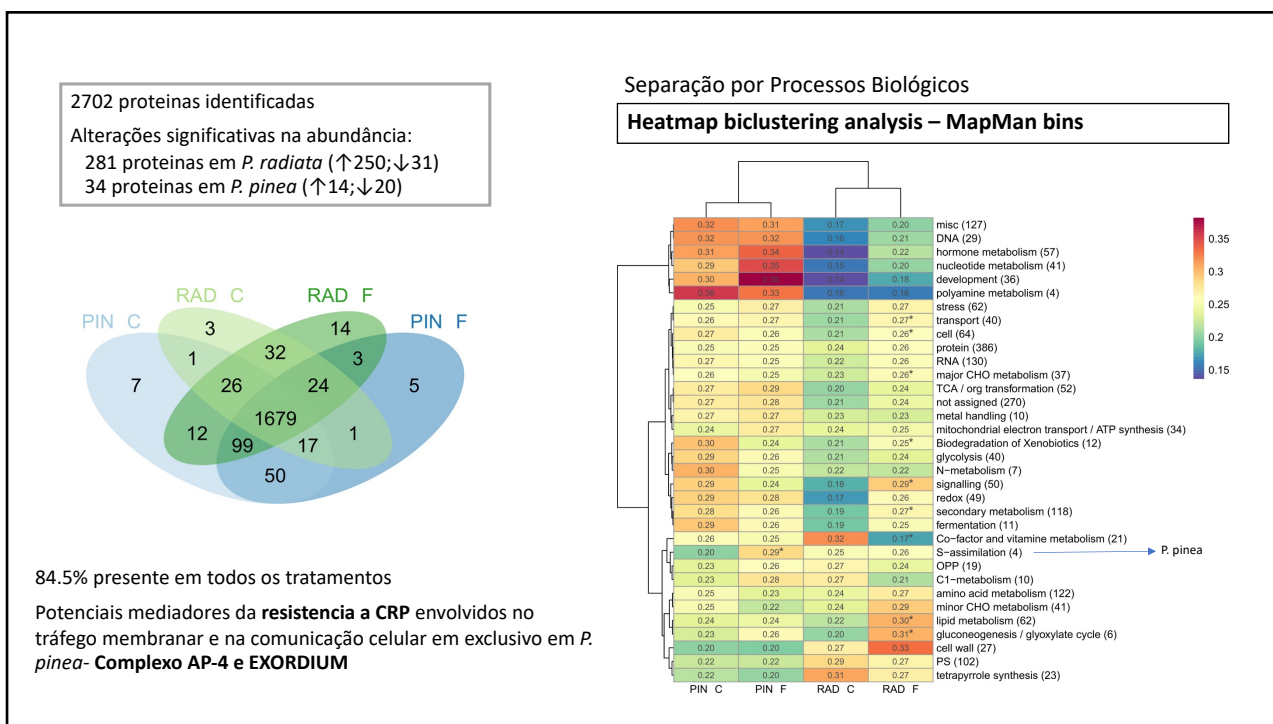
17



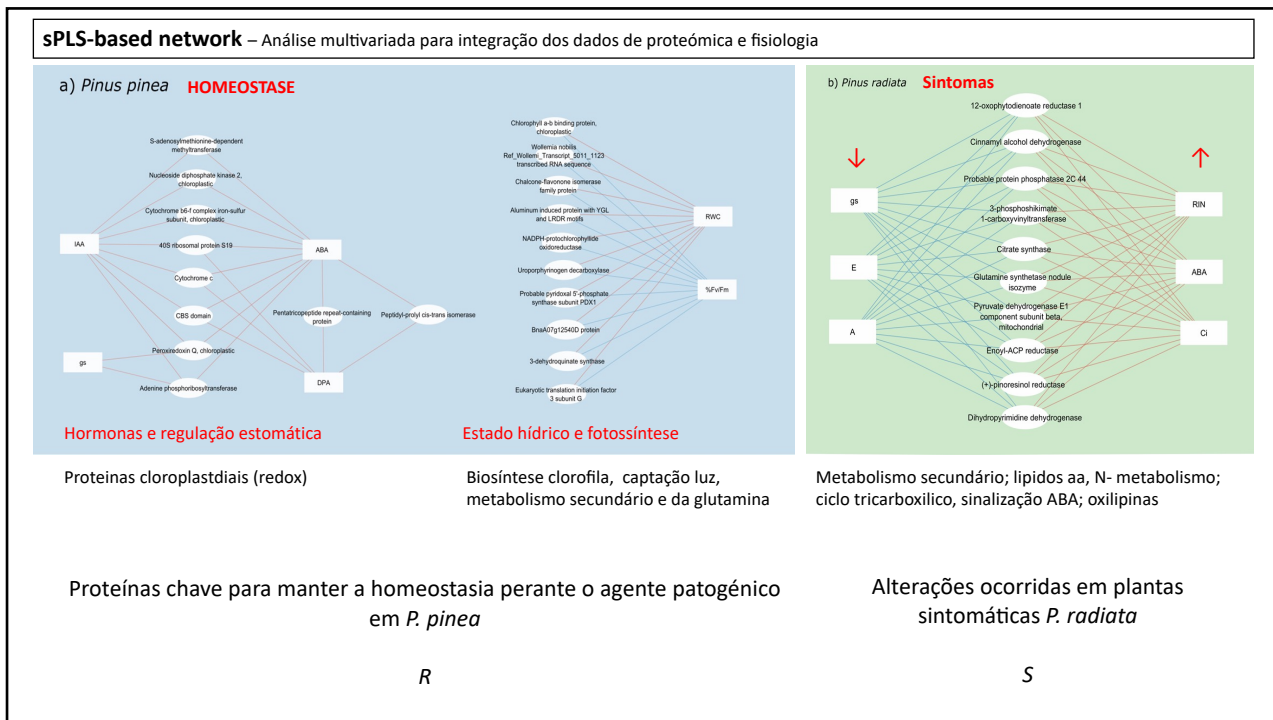
18



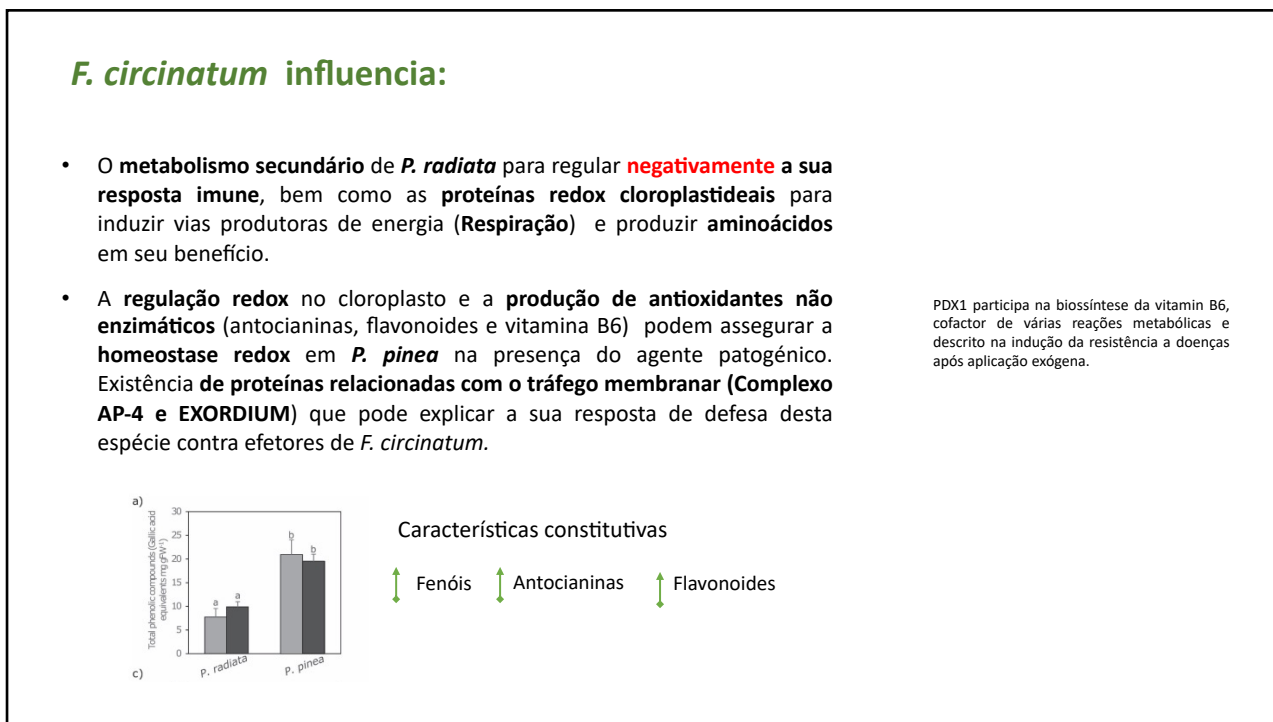
19



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

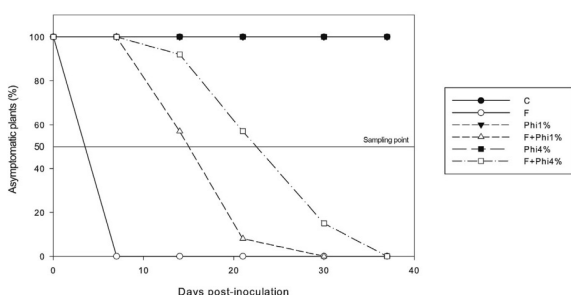


23

## 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**

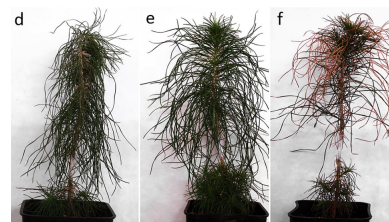
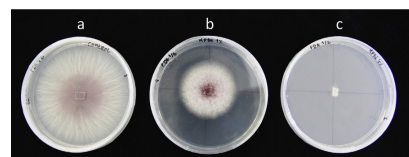
Ação do Phi representa uma potencial estratégia para controlar CRP

**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 <sup>a</sup>, Artur Alves <sup>a</sup>, Helder Berenguer <sup>a</sup>, Barbara Correia <sup>a</sup>, Aurelio Gómez-Cadenas <sup>b</sup>, Julio Javier Diez <sup>c,d</sup>, Pedro Monteiro <sup>a</sup>, Glória Pinto <sup>a,\*</sup>

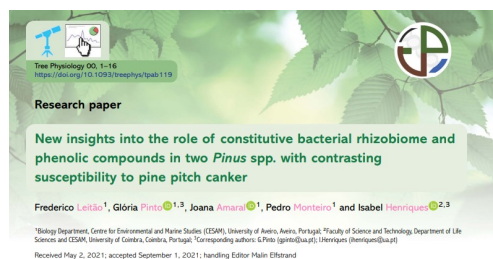


Formulação Fosfito de potássio comercial (Trafos Sinergy)

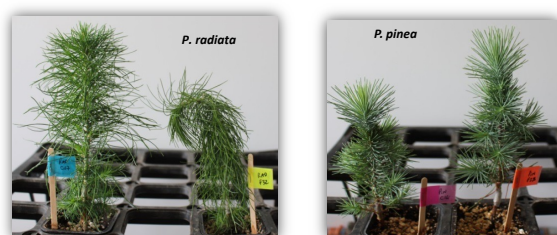
24

# Genótipo e rizobioma?

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

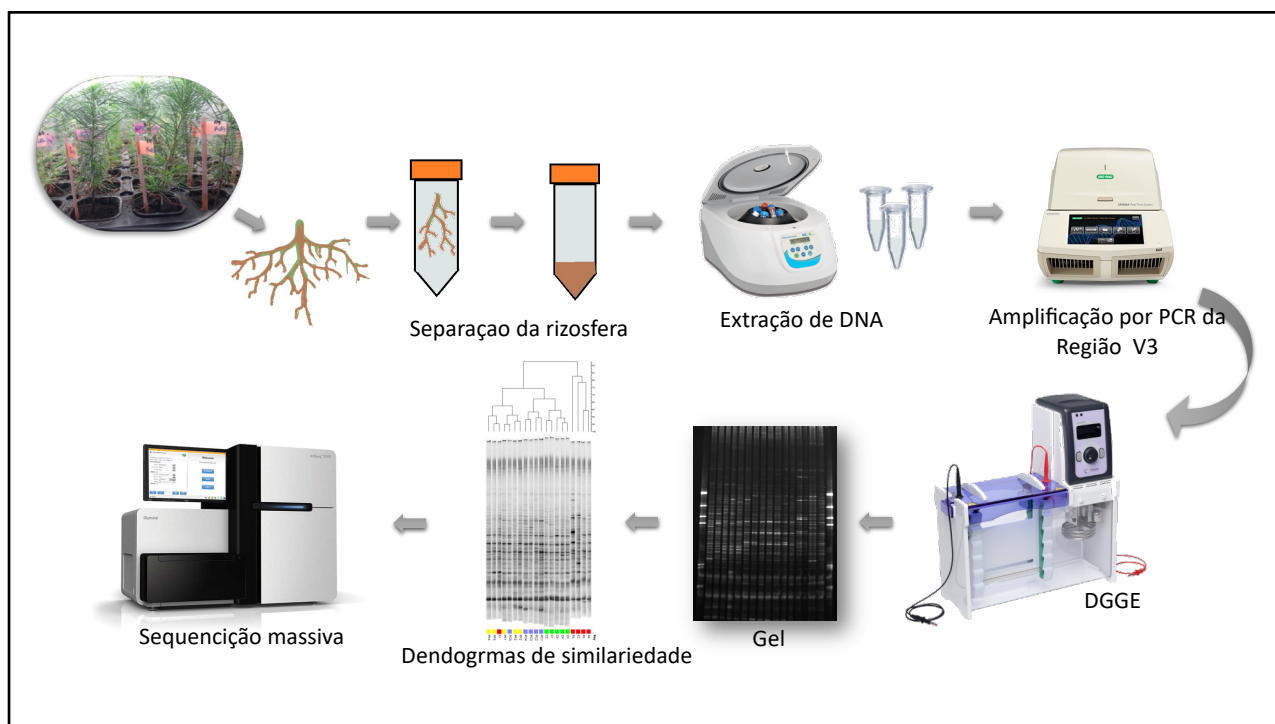


Há diferenças no rizobioma of *P. pinea* (resistente) comparativamente ao *P. radiata* (susceptível)?



IR- Agentes biológicos

25



26

Transform: Log(X+1)  
Resemblance: S17 Bray Curtis similarity

Group  
▲ Fm  
■ Cm  
● Fr  
◆ Cr

Similarity 60

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

*P. radiata*

| Classe          | Ordem            | Família            | Gênero         | Spécies   | Phosphato | IAA (µg/ml) | Sideróforo | ACC      | nH |
|-----------------|------------------|--------------------|----------------|-----------|-----------|-------------|------------|----------|----|
| Moraxellales    | Moraxellales     | Moraxellaceae      | Moraxella      | M. 8.5312 | X         | 7,15        | X          | X        | X  |
| Moraxellales    | Moraxellales     | Moraxellaceae      | Moraxella      | M. 8.5312 | X         | 18,79       | Positivo   | X        | X  |
| Moraxellales    | Moraxellales     | Moraxellaceae      | Moraxella      | M. 8.5312 | X         | 20,45       | Positivo   | X        | X  |
| Proteobacteria  | Proteobacteria   | Proteobacteriaceae | Proteobacter   | M. 8.5314 | Positivo  | 43,11       | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Proteobacteria   | Moraxellaceae      | Entyobacter    | M. 8.5318 | X         | 6,89        | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Rhodospirillales | Rhodospirillaceae  | Rhodospirillum | M. 8.5317 | X         | 11,02       | Positivo   | X        | X  |
| Proteobacteria  | Bacteriales      | Bacteriaceae       | Bacillus       | M. 8.5318 | X         | 6,80        | Positivo   | X        | X  |
| Actinobacteria  | Streptomycetales | Streptomycetaceae  | Streptomyces   | M. 8.5319 | Positivo  | 7,76        | X          | X        | X  |
| Firmicutes      | Firmicutes       | Firmicutes         | Firmicutes     | M. 8.5321 | Positivo  | 18,96       | X          | X        | X  |
| Firmicutes      | Firmicutes       | Firmicutes         | Firmicutes     | M. 8.5324 | X         | 5,67        | X          | X        | X  |
| Firmicutes      | Firmicutes       | Firmicutes         | Firmicutes     | M. 8.5323 | X         | 12,06       | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Proteobacteria   | Moraxellaceae      | Entyobacter    | M. 8.5327 | X         | 7,15        | X          | X        | X  |
| Moraxellales    | Moraxellales     | Moraxellaceae      | Moraxella      | M. 8.5329 | X         | 6,72        | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Proteobacteria   | Proteobacteriaceae | Proteobacter   | M. 8.5319 | X         | 6,72        | X          | X        | X  |
| Firmicutes      | Firmicutes       | Firmicutes         | Firmicutes     | M. 8.5396 | X         | 9,28        | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Moraxellales     | Moraxellaceae      | Entyobacter    | M. 8.5384 | X         | 20,09       | Reação     | X        | X  |
| Proteobacteria  | Burkholderiales  | Burkholderiaceae   | Burkholderia   | M. 8.5381 | Positivo  | 18,28       | X          | Positivo | X  |
| Burkholderiales | Burkholderiales  | Burkholderiaceae   | Burkholderia   | M. 8.5382 | Positivo  | 15,47       | X          | X        | X  |
| Proteobacteria  | Burkholderiales  | Burkholderiaceae   | Burkholderia   | M. 8.5383 | Positivo  | 17,06       | Positivo   | Positivo | X  |
| Bacteriales     | Bacteriales      | Bacteriaceae       | Bacillus       | M. 8.5356 | X         | 8,02        | Positivo   | X        | X  |
| Proteobacteria  | Burkholderiales  | Burkholderiaceae   | Burkholderia   | M. 8.5387 | Positivo  | 23,12       | X          | Positivo | X  |
| Firmicutes      | Firmicutes       | Firmicutes         | Firmicutes     | T. 8.5342 | 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<sup>a</sup>, G. Pinto<sup>a</sup>, J. A. Flores-Pacheco<sup>bc</sup>, J. J. Díez-Casero<sup>bc</sup>, A. Cerqueira<sup>a</sup>, P. Monteiro<sup>a</sup>, A. Gómez-Cadenas<sup>d</sup>, A. Alves<sup>a</sup> and J. Martín-García<sup>abc\*</sup>

*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** ( $\Psi_{md}$ , 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  
↓  $\Psi_{md}$ , 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](mailto:gpinto@ua.pt)

[www.cesam.ua.pt/gpinto](http://www.cesam.ua.pt/gpinto)

UNIVERSITY OF AVEIRO  
FUNGAL AND PLANT  
BIOLOGY LAB

universidade de aveiro

30