

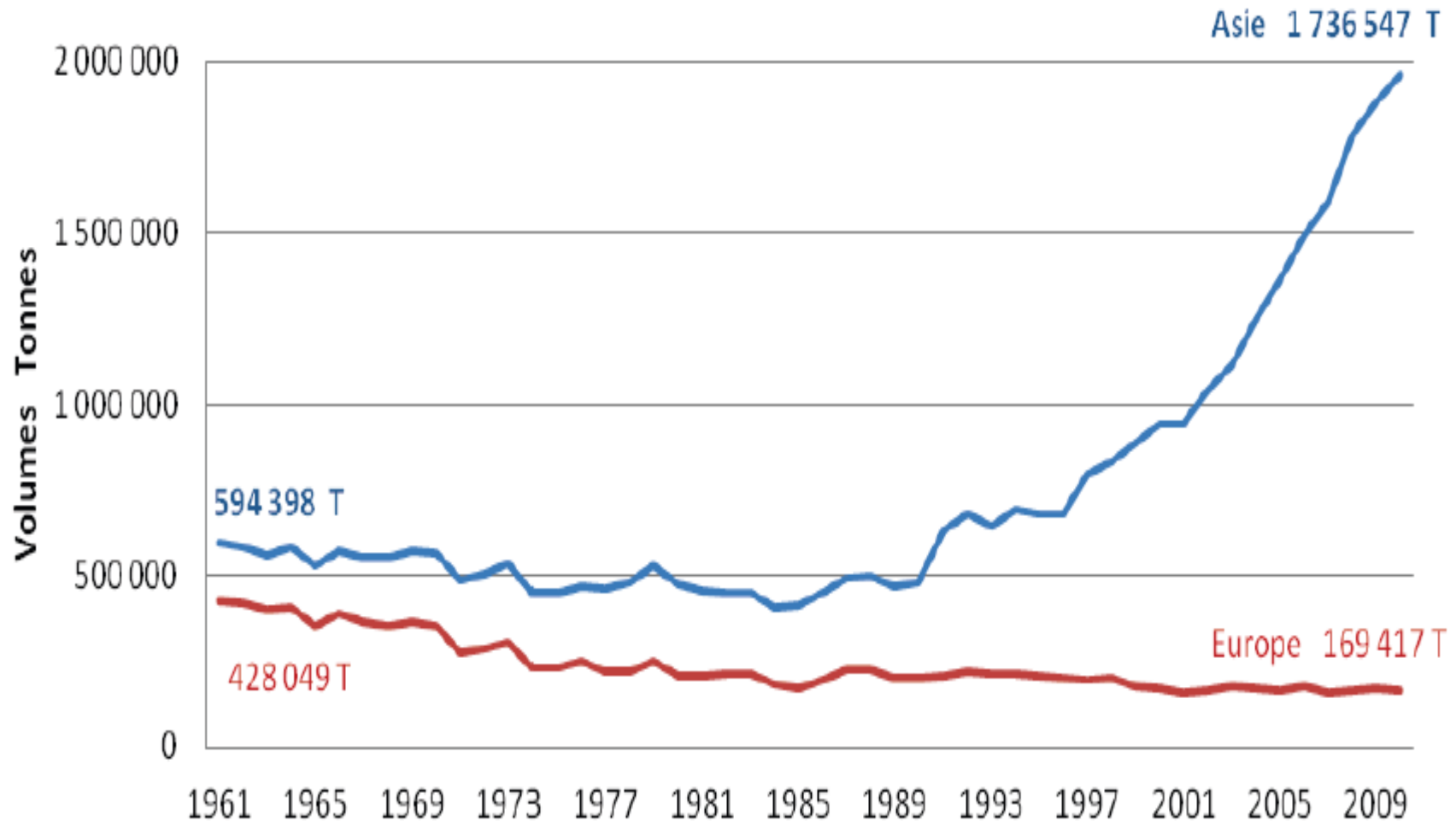
Melhoramento genético de castanheiro para a resistência à doença da tinta



Rita Costa, Carmen Santos, Patrícia Fernandes, Sara Tedesco, Helena Machado, Susana Serrazina, Isabel Correia, José Gomes-Laranjo, Helena Machado, Filomena Gomes Tatyana Zhebentyayeva, Christopher Sasaki, Chuck Burdine and C. Dana Nelson



Evolução da produção de castanha



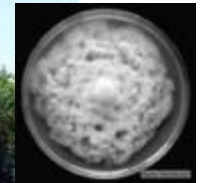
As principais ameaças para *Castanea sativa* na Europa

Doenças: (doença da tinta– *P. cinnamomi*, *P. cambivora* e cancro– *C. parasitica*)

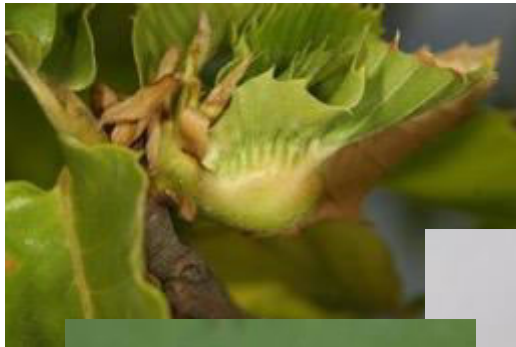
cancro



tinta



Vespa das galhas do castanheiro



hipovirulência

Pragas: bichado da castanha (*Cydia splendana*) e a vespa das galhas (*Dryocosmus kuriphilus*) – introduzida em 2002 em Itália em Piemonte – redução de 80% da produção. Recente introdução em Portugal



bichado da castanha

***Phytophthora cinnamomi* Rands**

(The “ biological bulldozer”)



- Classe: Oomicetas (núcleos com 2n cromossomas e parede celular com celulose em vez de quitina);**
- Patogénio muito agressivo com mais de 1000 hospedeiros; posicionado no Top 10 dos oomicetas patogénicos (Kamoun et al., 2014);**
- Possui um enorme impacto económico em diferentes espécies vegetais, desde florestais a agrícolas, em condições de campo e nos viveiros, na Europa, Estados Unidos, África, Nova Zelândia e Austrália; (grande impacto nas culturas de abacate p ex.)**
- As espécies de *Phytophthora* desenvolvem mecanismos sofisticados de manipulação das células vegetais para causar infecções (alternam fases necrófitas com biotróficas);**
- Consegue sobreviver em condições extremamente desfavoráveis do meio ambiente (Jung et al., 2013).**

Objectivos do Programa de Melhoramento Genético para a resistência à doença da tinta

Cruzamentos controlados entre
C. sativa x *C. crenata* e *C. sativa* x *C. mollissima*
Produção de populações F1 e F2 segregantes
para a característica resistência a *P.cinnamomi*



Vertente investigação aplicada - Seleção de porta-enxertos com resistência melhorada a *P. cinnamomi*, adaptados a diferentes situações de solo e clima

Vertente investigação fundamental - Identificação de genes de Resistência e marcadores moleculares para selecção genómica de material vegetal melhorado

Susceptibilidade das diferentes espécies de Castanea

Castanheiro Europeu- *C. sativa*



Susceptíveis

Castanheiro Americano- *C. dentata*



The American Chestnut Foundation

Castanheiro Japonês- *C. crenata*

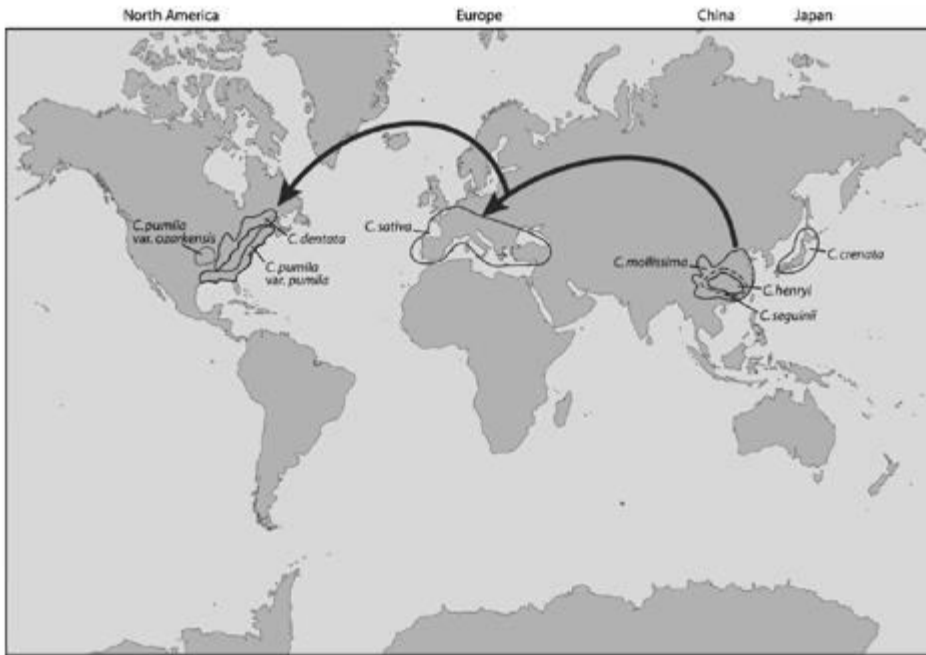


RESISTENTES

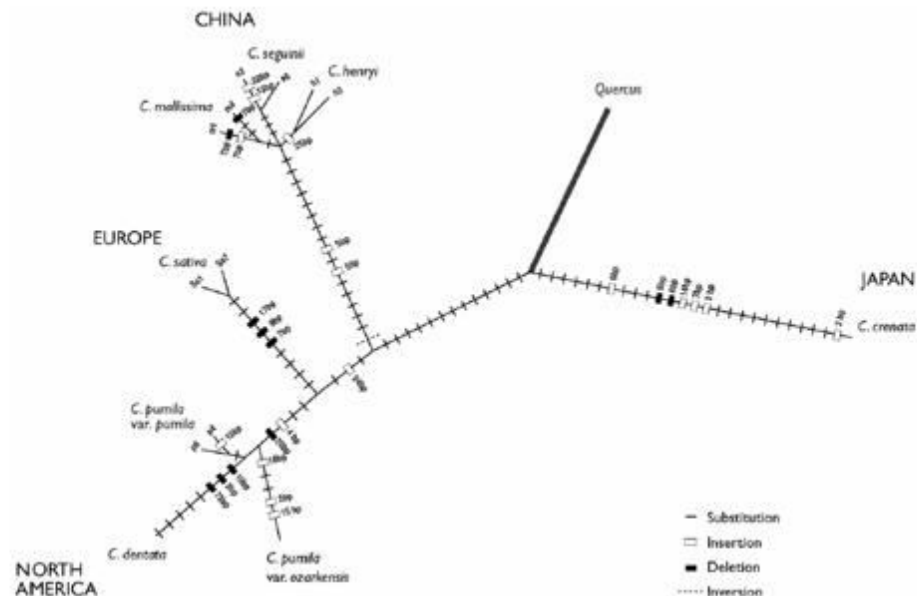
Castanheiro Chinês- *C. mollissima*



Evidência molecular da origem Asiática do género *Castanea* e da migração da Ásia para a Europa e América do Norte - coevolução



The phylogeny of *Castanea* was estimated using DNA sequence data from different regions of the chloroplast genome. Sequencing results support the genus *Castanea* as a monophyletic group with *Castanea crenata* as basal.



Cruzamentos controlados – *C.sativa* x *C.crenata* e *C.sativa* x *C.mollissima*

Progenitor masculino *C. crenata*



X

Cross SC

Progenitor feminino *C. sativa*



X

Cross SM



C. mollissima



Duas descendências F1
(SC+SM)



Uma descendência F2 – Obtida de polinização aberta entre indivíduos da geração F1 de 2006

Descendência F1 dos cruzamentos de 2006 – Junho de 2016



Fenotipagem – Quantificação do grau de resistência das descendências dos cruzamentos a *P. cinnamomi*

Dois testes de inoculação:

Inoculação de raiz



Cópias de cada genótipo obtidas por micropropagação

Inoculação de estaca



Estacas das descendências

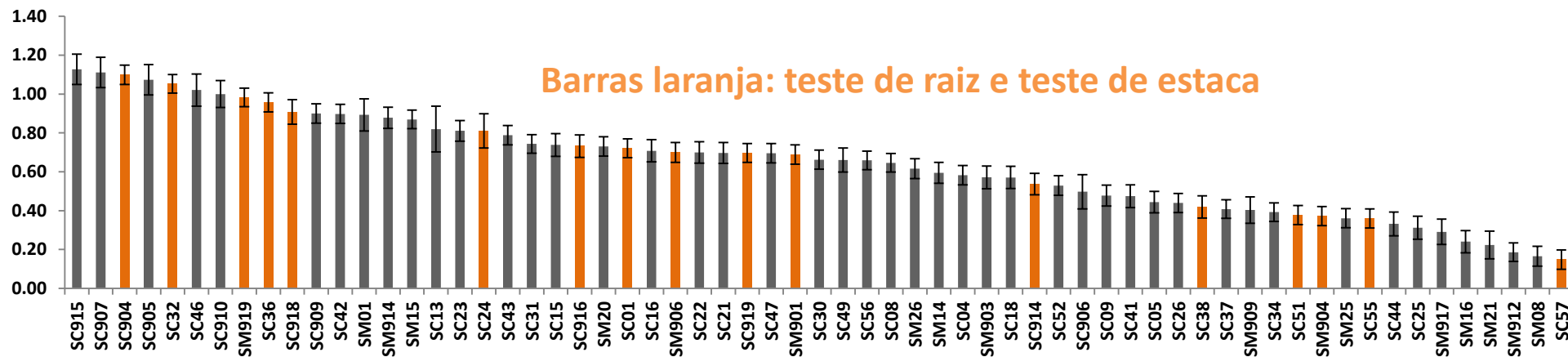
Fenotipagem- Correlação entre o teste raiz e teste estaca



Progressão da lesão (cm/dia)



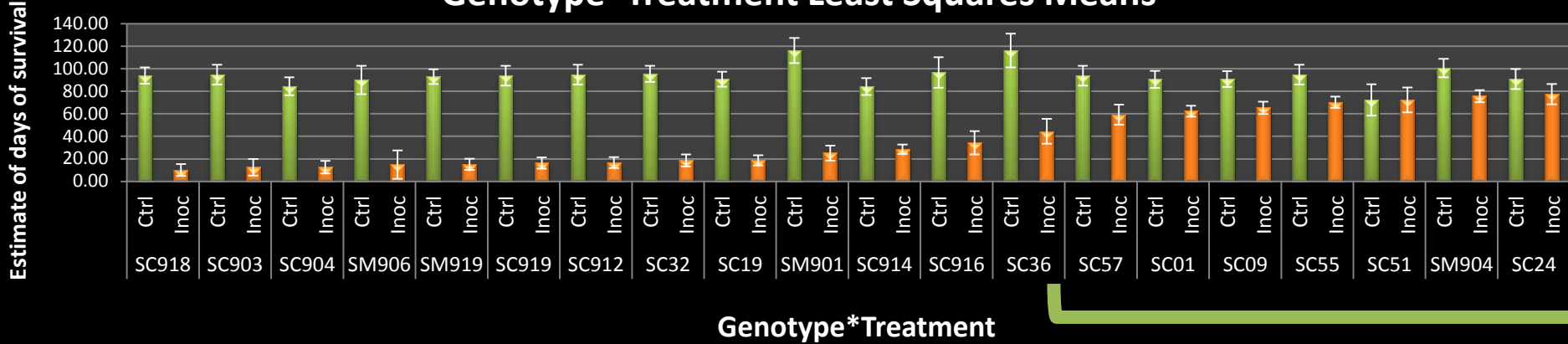
Ranking da susceptibilidade a *P.cinnamomi*



Elevada correlação obtida entre os dois testes (89%)

Seleção de genótipos com resistência melhorada a *P.cinnamomi*, micropropagação e teste de compatibilidade de enxertia com diferentes variedades de castanha

Genotype*Treatment Least Squares Means



Compatibilidade de enxertia



Seleção dos 6 clones mais resistentes

Micropropagação

Enraizamento e aclimatização



Micropopagação de genótipos selecionados



1 - Estabelecimento in vitro

Cópias de cada pé-mãe



2 - Multiplicação

1€/planta



3 - Enraizamento



4 - Aclimação

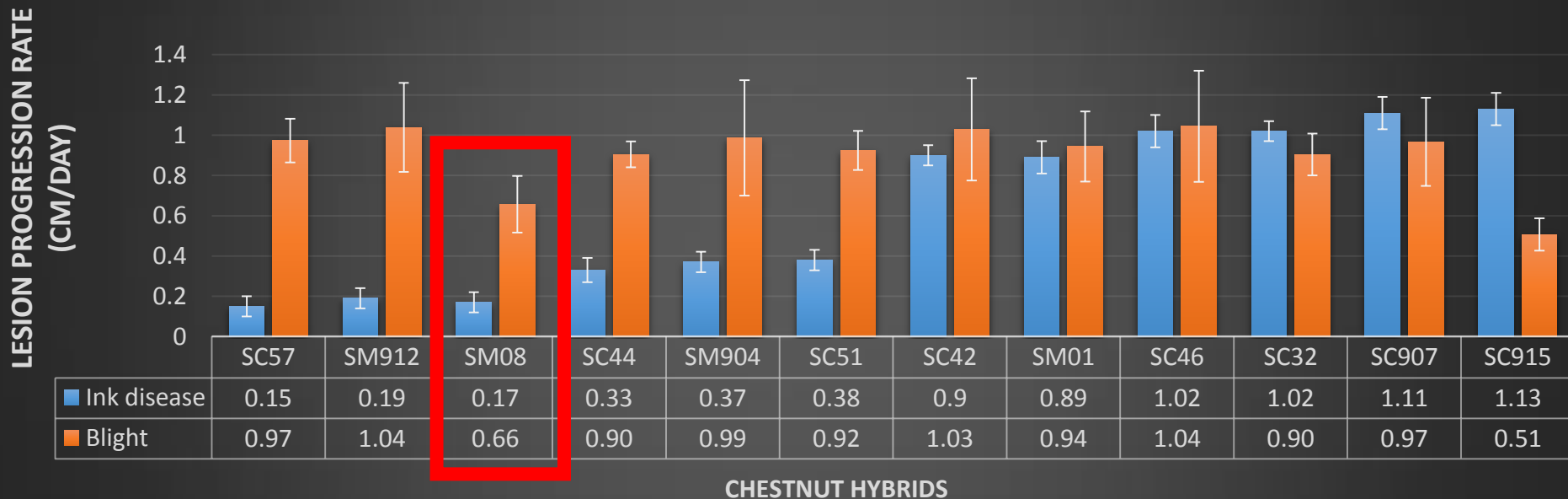
Fenotipagem- Resistência ao cancro (*C. parasitica*)

- 12 genótipos (6 resistentes 6 susceptíveis)
- Cálculo da progressão da lesão (cm/dia).

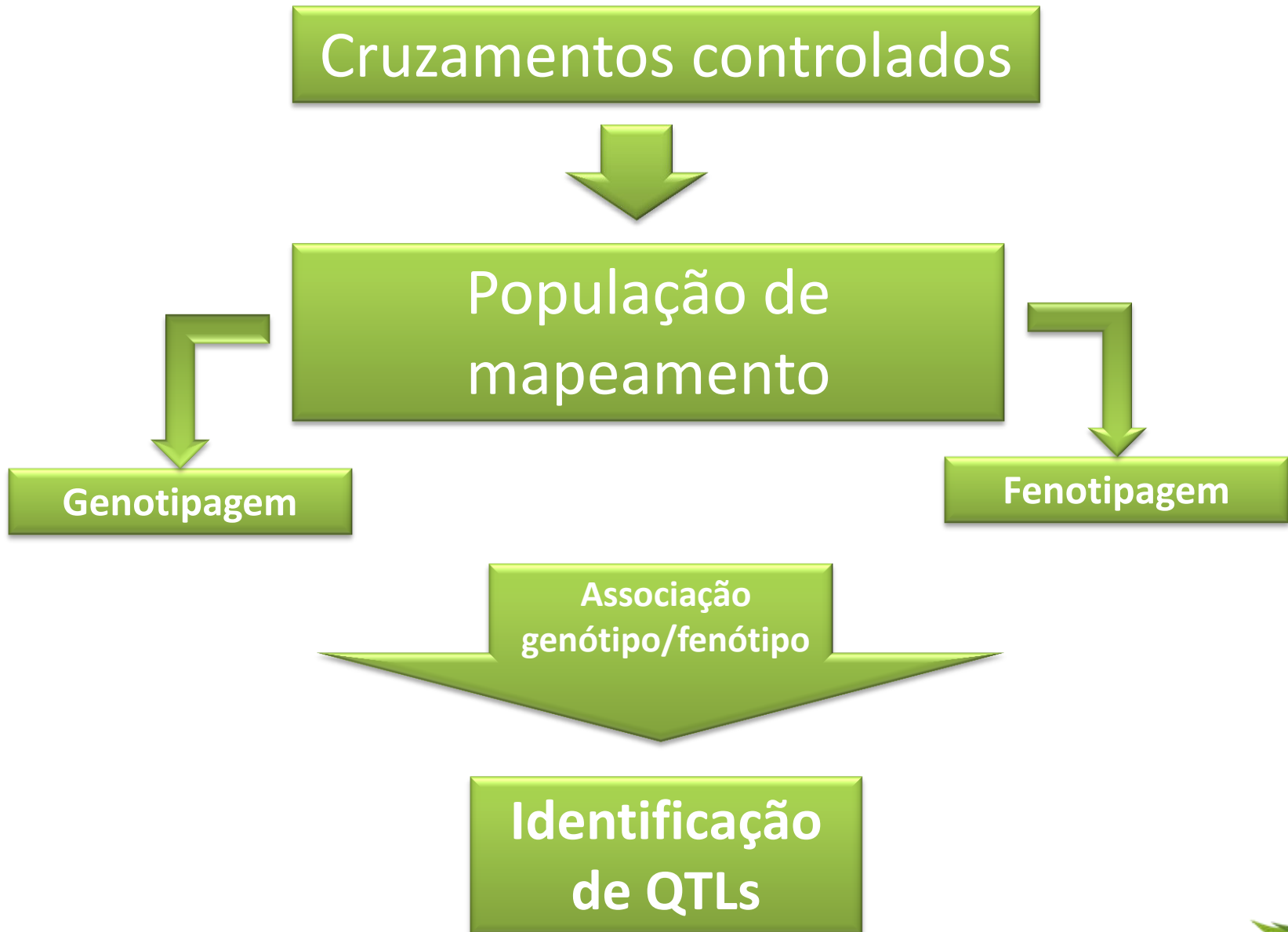
Inoculation

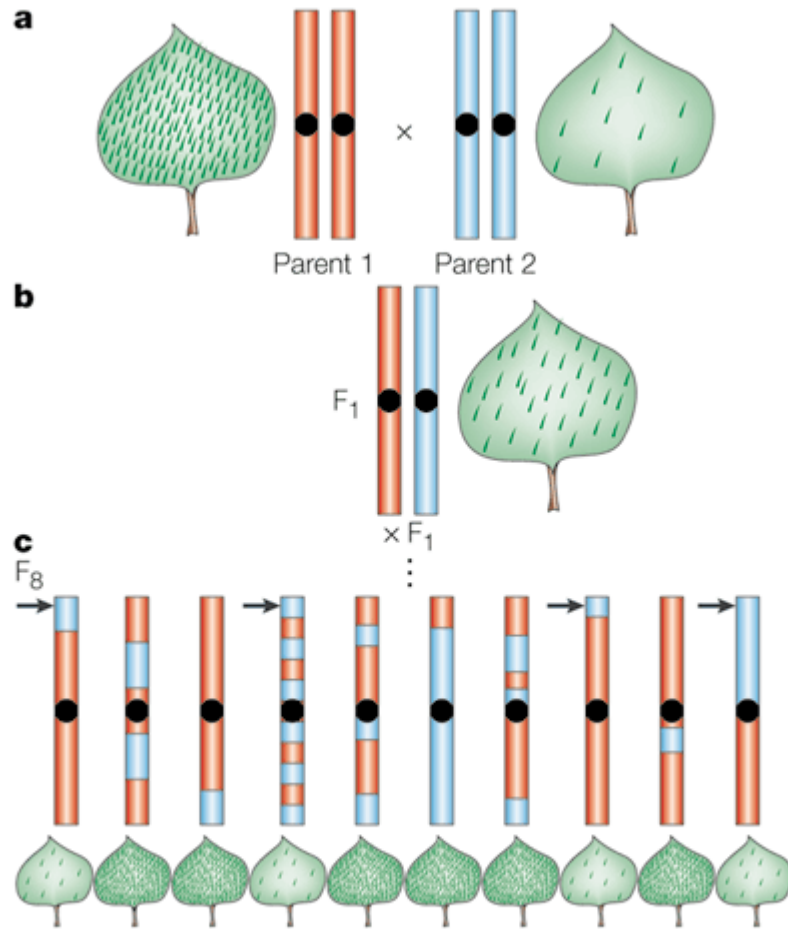


Lesion Length



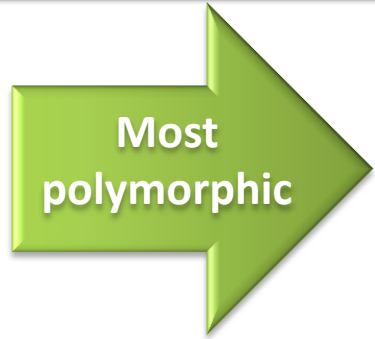
Identificação de genes e loci envolvidos na resistência





Genotyping SSRs and SNPs

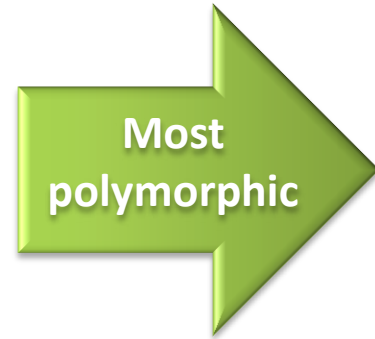
378 SSRs (*Castanea mollissima*
– SIFG – US)



144 SSRs



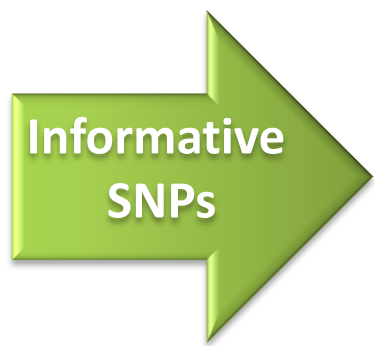
43 SSRs (*C. sativa* and *C. crenata*
P. cinnamomi candidate genes)



21 SSRs



2553 SNPs (*C. mollissima*
and *C. dentata*– Fagacea Project – US)



278 SNPs

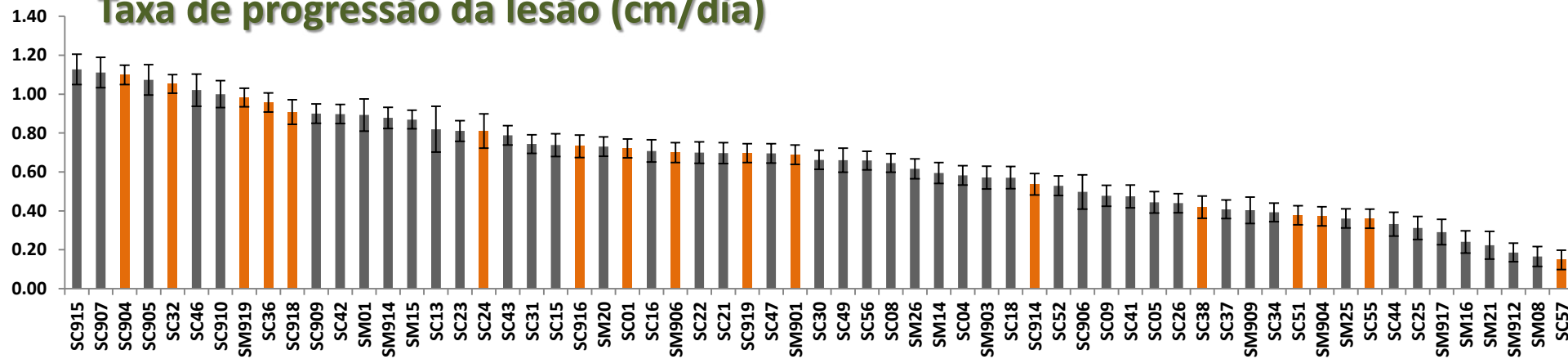


Fenotipagem – Progressão da lesão em estaca

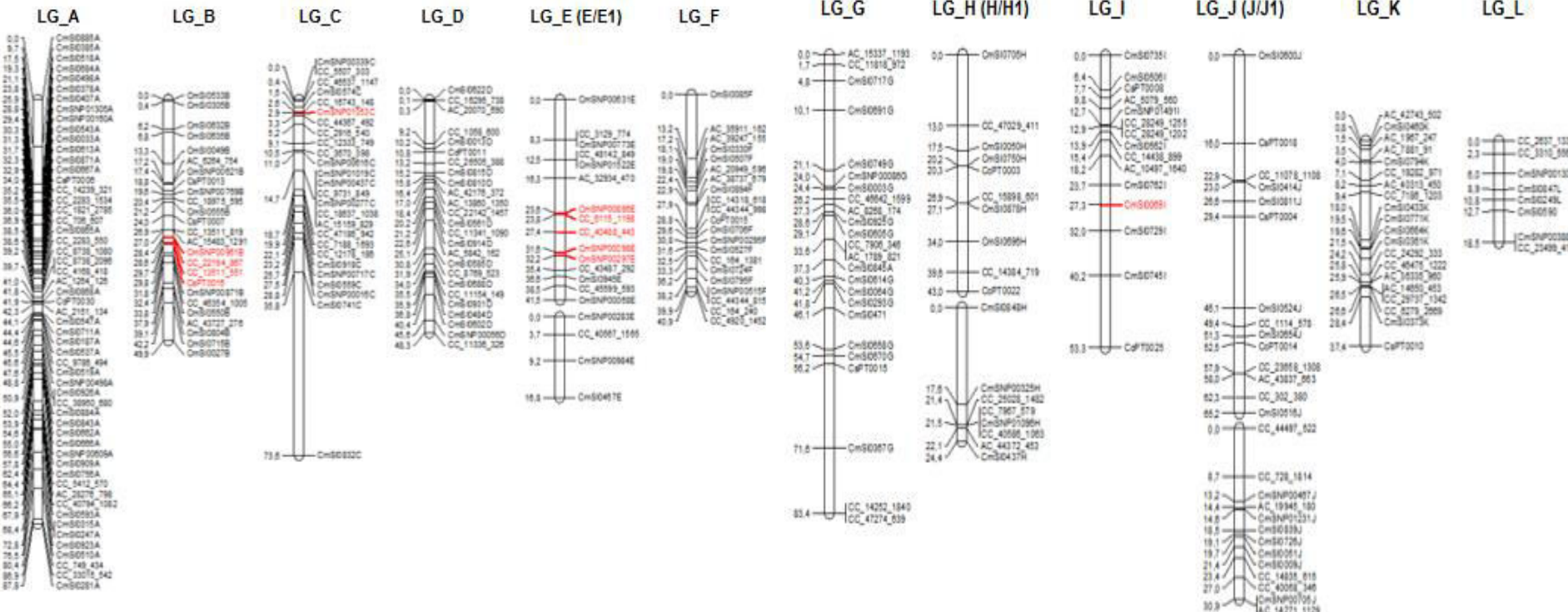
Comprimento da lesão



Taxa de progressão da lesão (cm/dia)



Mapa genético e QTLs para a resistência a *P. cinnamomi*



- 283 marcadores moleculares mapeados (SSRs e SNPs)
- 155 indivíduos (*C. sativa* x *C. crenata*)
- 15 Grupos de ligação (LG)
- Distância total: 714,2 cM; 1 marcador/2,5 cM
- 11 **QTLs** distribuídos em 4 grupos de ligação
- LOD=4

Identificação de genes candidatos de resistência em transcriptomas de *Castanea*

Clones de *C. sativa* e *C. crenata* com 5 anos



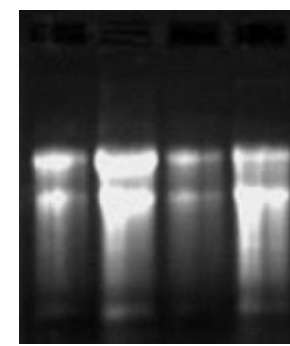
Inoculação com *P. cinnamomi*



Colheita de raízes às 48, 96h e 7 dias após inoculação



extração de RNA



Identificação de genes candidatos de Resistência a *P. cinnamomi*

Validação por PCR digital:

- *C. sativa* and *C. crenata*
- SC Hybrids

Desenvolvimento de novos marcadores



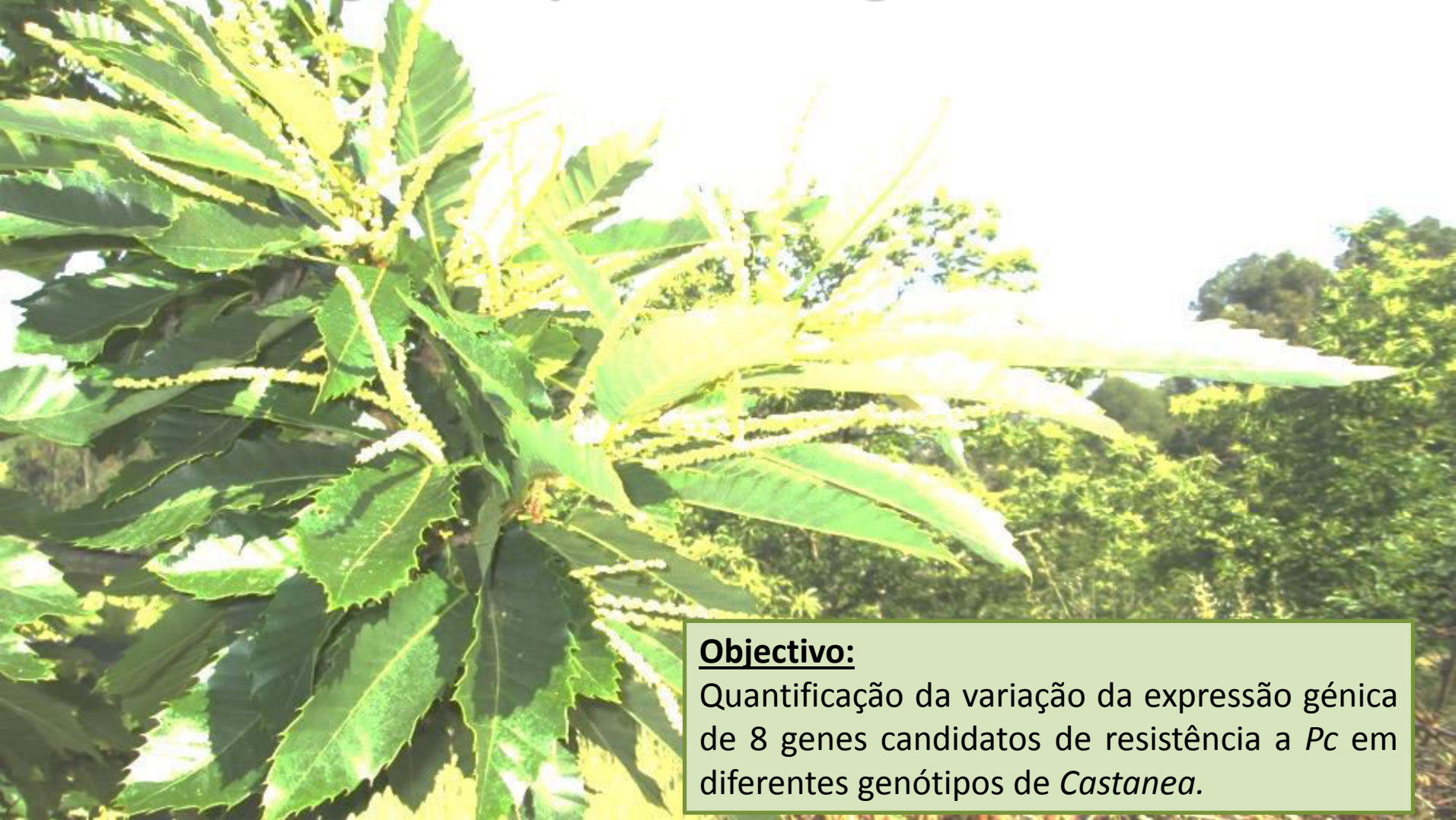
454 Sequencing

4 RNA pools
(3 time points x 3 réplicas)

- Cs_inoculado
- Cs_não-inoculado
- Cc_inoculado
- Cc_não-inoculado

43 novos marcadores desenvolvidos em genes candidatos

Expressão génica por PCR digital



Objectivo:

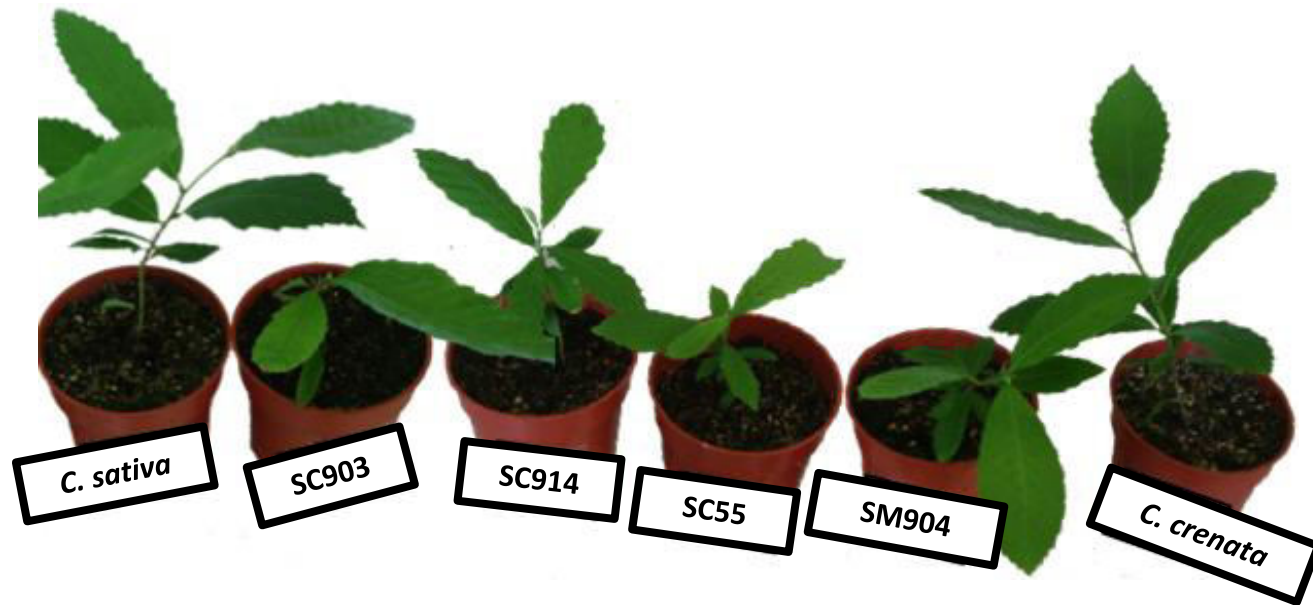
Quantificação da variação da expressão génica de 8 genes candidatos de resistência a *Pc* em diferentes genótipos de *Castanea*.

Objetivo e Material Vegetal

Objetivo:

Quantificação da variação da expressão de 8 genes candidatos à resistência da doença da tinta, usando plantas com diferentes fenótipos (de resistente a sensível).

- **Material vegetal:** 6 genótipos, em triplicados biológicos, exibindo diferentes níveis de susceptibilidade à infecção com *P. cinnamomi*;
- **Inoculação:** Raízes inoculadas com *P. cinnamomi* e colhidas em três tempos após inoculação: 0h (não inoculado), 24h e 48h.



RESISTÊNCIA

Seleção de genes

8 genes candidatos à resistência a *P. cinnamomi* foram seleccionados, a partir dos genes diferencialmente expressos identificados pela sequenciação do transcriptoma de *C. crenata* inoculado e não inoculado.

| Nome do gene | Potencial função |
|-----------------------|---|
| <i>Cast_Gnk2-like</i> | Proteína anti-fúngica secretada pelas raízes |
| <i>Cast_PE-2</i> | Reforço da parede celular |
| <i>Cast_C2CD</i> | Reconhecimento do patógeno |
| <i>Cast_LRR-RLK</i> | |
| <i>Cast_ABR1</i> | Regulação da transcrição (Factor de Transcrição); Produção de lenhina |
| <i>Cast_Myb4</i> | |
| <i>Cast_WRKY 31</i> | |
| <i>Cast_RNF5</i> | Degradação de proteínas |



Quantificação da expressão destes genes nas raízes inoculadas e não inoculadas através de métodos moleculares

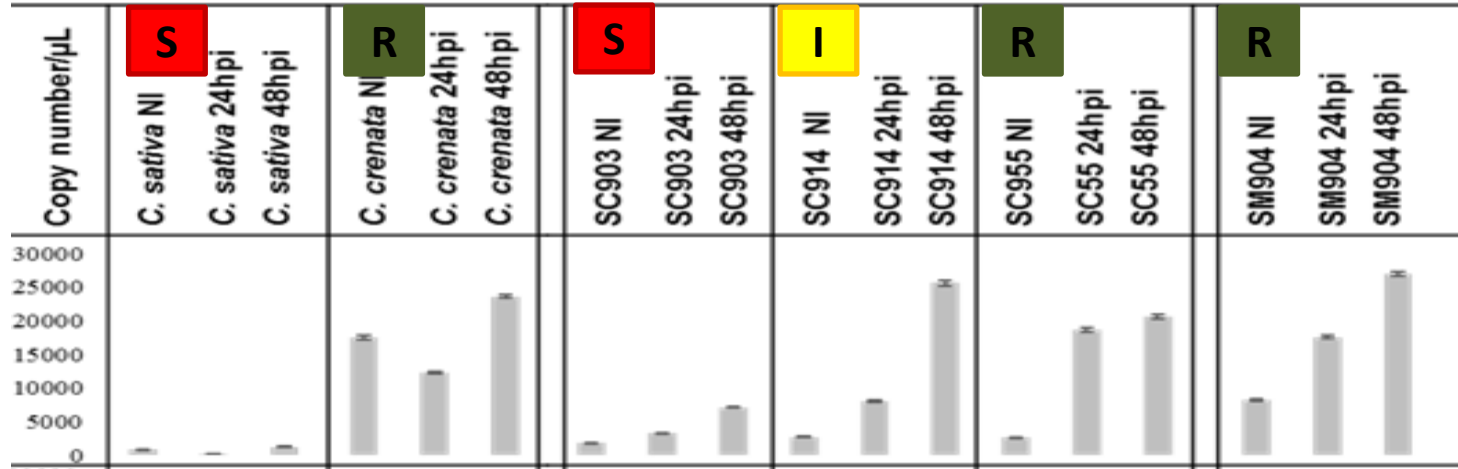
Exemplo da quantificação de um gene de resistência

Proteína anti-fúngica

R Resistente

I Intermédio

S Susceptível



- Genótipos resistentes exibem mais cópias do gene do que os genótipos susceptíveis;

- Há uma tendência de acumulação de cópias do gene depois da inoculação;

- *C. crenata* apresenta uma grande quantidade de cópias do gene de resistência mesmo antes da inoculação

→

- O gene candidato à resistência é validado para este conjunto de fenótipos

→

- Genótipos resistentes parecem estar mais preparados e protegidos contra uma possível infecção

Nos genótipos resistentes, a proteína anti-fúngica é secretada para o meio devendo inibir a penetração e/ou crescimento de *P. cinnamomi*.

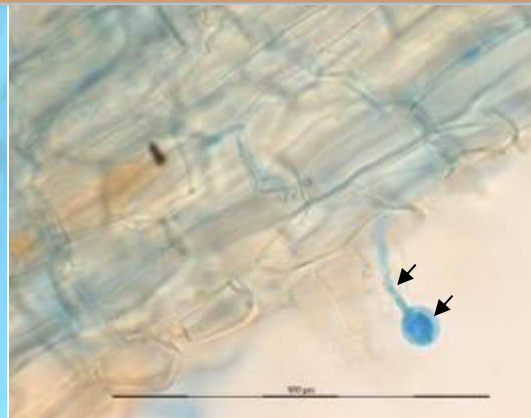
Objectivo



- Avaliar a progressão do patógeno *Phytophthora cinnamomi* no sistema radicular de castanheira
- Raízes de plantas com cerca de 6 meses de idade dos genótipos **susceptível** (*C. sativa*) e **resistente** (*C. crenata*).
- Inoculação com uma solução de **zoósporos** de *P. cinnamomi*
- Observação da progressão de *Pc* 3h30, 24h, 48h e 72h após inoculação

Primeiros Resultados

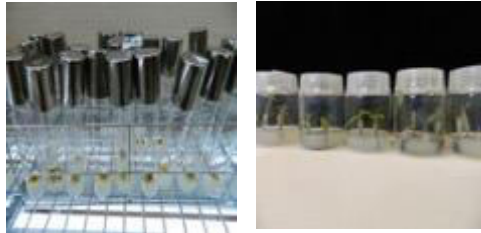
3h30 – Enquistamento e germinação de zoósporos



- Não se detectaram diferenças significativas entre genótipos no início da infecção
- Observações indicam que zoósporos de *P. cinnamomi* libertam o seu conteúdo celular aquando da germinação
- Hifas desenvolvidas após 3h30
↳ rápida infecção do patógeno

Compatibilidade de enxertia

Focus on the early cellular events of graft formation to detect precursory signs of incompatibility



Graft establishment: in vitro callus unions and micrografts



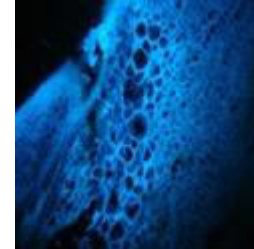
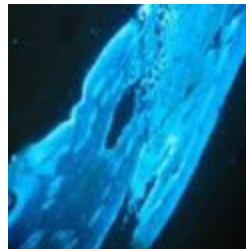
Samples collection (10 & 21DAG) and processing for histology



Histochemical stains and microscopy observations

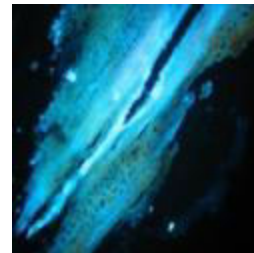
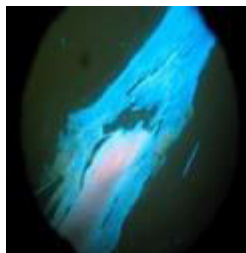
Preliminary Results: Micrografts (10 DAG)

CAST/CAST
homograft



The homograft form a well developed union with visible *callus* bridge formation

CAST/CC14
heterograft



Unsucessful heterograft, very poor adhesion and callus formation.

Preliminary Results: *callus* unions (10DAG)

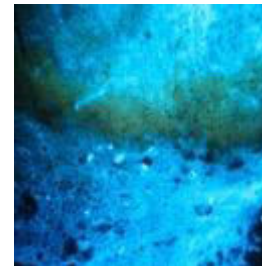
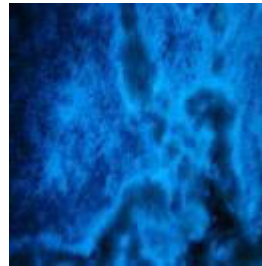
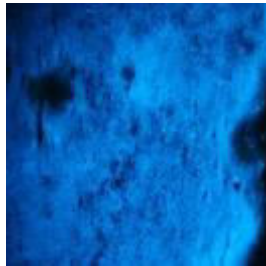
Histochemic
al stains

Homograft
CC14/CC14

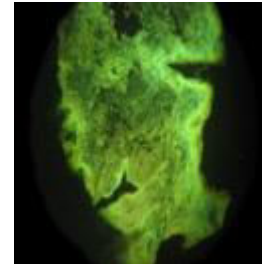
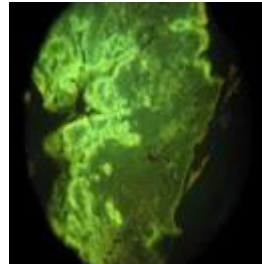
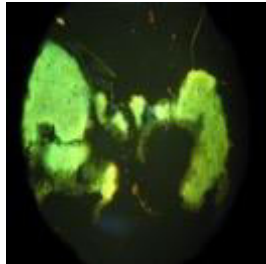
Heterograft
CAST/CC14

Heterograft
JU/CC14

Calcofluor for
cellulose



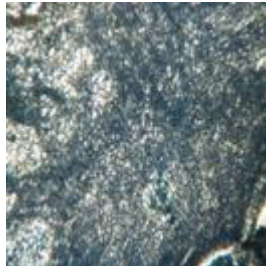
Acridine Orange
e for metabolic
activity



**Ruthenium
Red**
for pectins



Toluidine blue
for phenols



Produção de clones com resistência melhorada a *P. cinnamomi* para ensaios de campo a instalar em Janeiro de 2017



Obrigada

rita.lcosta@iniav.pt

