

Área Científica **Sistemas Agrários: Produção e Sustentabilidade**

Código PTDC/AGR-PRO/111857/2009 **Início** 2011/03/1 **Termo** 2014/08/31

Título Array de DNA para deteção e genotipagem in planta de bactérias fitopatogénicas de quarentena

Programa

FCT

Medida

Projetos de I&D em todos os Domínios Científicos

Instituição Líder Instituto de Biologia Molecular e Celular

Investigador Responsável INIAV Maria Leonor Pato Cruz

Orçamento Total 152 813,00€

Orçamento INIAV 23 776,00€

Parceria

IBMC	Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto	Nacional
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.	Nacional
FCUP	Faculdade de Ciências da Universidade do Porto	Nacional

Equipa

Maria Leonor Pato Cruz
Camila Borges Fernandes

Resumo

No mercado global, a circulação de cultivares constitui uma ameaça devido à introdução de bactérias fitopatogénicas que poderão causar efeitos devastadores nas culturas e economia locais. Métodos de detecção fiáveis, rápidos e com boa relação custo/benefício são essenciais para assegurar a fitossanidade dos cultivares, e garantir que bactérias fitopatogénicas de quarentena não sejam introduzidas em áreas protegidas. Na União Europeia o regime de fitossanidade pretende prevenir a introdução nos Estados Membros de organismos prejudiciais (Directiva 2000/29/EC e actualizações). A concessão de passaportes fitossanitários baseia-se na identificação de bactérias por meio de métodos de detecção dependentes da cultura de isolados, complementados por testes bioquímicos, serológicos e de patogenicidade. No entanto, é reconhecido que estes métodos, para além de limitações a nível de especificidade e limite de detecção, são excessivamente demorados. Estes métodos são ainda inadequados para a detecção de bactérias viáveis mas não cultiváveis (VBNC), i.e. bactérias num estado de dormência metabólica que mantêm a patogenicidade. Métodos de detecção moleculares podem ultrapassar estas limitações e surgem como alternativas fiáveis para monitorizar a presença de bactérias fitopatogénicas em plantas e amostras ambientais (solo e água). Uma vez que são loci (DNA) e não organismos que são detectados, as técnicas moleculares superam as limitações de culturabilidade. Adicionalmente, os métodos moleculares facilitam a análise de numerosas amostras em simultâneo e permitem uma detecção precoce do patógeno mesmo em plantas assintomáticas, o que se reveste da maior importância em procedimentos de quarentena para evitar epidemias. No entanto, as abordagens moleculares têm de ser extensivamente validadas em ensaios ambientais, já que diversos factores afectam a sua fiabilidade e sensibilidade, nomeadamente a presença de inibidores de PCR ou uma baixa densidade de bactérias alvo na amostra. Assim, é necessário desenvolver protocolos fiáveis para uso em diagnóstico fitossanitário de rotina que possam ser realizados por técnicos sem formação científica específica. O elevado número de sequências de DNA não redundantes presentes nas bases de dados, juntamente com as ferramentas de bioinformática já disponíveis, constituem recursos importantes para a rápida identificação de marcadores moleculares específicos para espécies ou patógenos, como salientado por Albuquerque et al. (2009) [1]. Estratégias que integram o uso de vários marcadores e detecção quantitativa de DNA, como multiplex-PCR, Real-Time PCR e protocolos de arrays de DNA, permitem o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas para a análise simultânea de numerosos marcadores, aumentando a eficiência de detecção da técnica. Actualmente, o desafio em diagnóstico e epidemiologia bacteriana é conciliar, num único procedimento, a especificidade de marcadores genómicos usados em detecção com a resolução clonal da genotipagem. Alcançar este objectivo, um dos propósitos estruturantes deste projecto, é fundamental para a detecção e genotipagem de bactérias nos seus hospedeiros ou em zonas contaminadas, nomeadamente solo e água. Trabalhos anteriores do nosso grupo de investigação, levaram ao desenvolvimento de uma estratégia para a identificação de vários loci taxa-específicos [2]. Várias novas assinaturas de DNA foram já identificadas, seleccionadas e validadas para *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli* [2], para diferentes raças e biovars de *Ralstonia solanacearum* [3] e para diferentes espécies de *Xanthomonas*. Muitos destes marcadores foram já validados usando técnicas de PCR e hibridação (Southern e dot blots), no entanto, apenas um número restrito foi validado usando amostras de plantas infectadas e o seu potencial de genotipagem ainda não foi apurado. A presente proposta tem como objectivos: primeiro, o de completar e alargar a validação dos marcadores usando amostras de plantas infectadas, que levem à optimização de procedimentos para a detecção directa de bactérias em amostras ambientais. Estes ensaios são essenciais para inferir o potencial biotecnológico dos protótipos de diagnóstico molecular, por comparação com os métodos tradicionais e certificados, baseados na cultura de microrganismos e estabelecidos por normas europeias e nacionais. O segundo objectivo, refere-se à caracterização da resolução clonal dos loci taxa-específicos escolhidos, em comparação com análises de genotipagem comuns como o Multi Locus Sequence Typing (MLST) e polimorfismos de um nucleótido (SNP), baseados em sequências de genes "housekeeping". Estes são genes conservados e não possuem o poder discriminatório necessário para detecção. Espera-se que esta proposta ajude a garantir medidas de quarentena e certificação fitossanitária mais eficientes, mas também contribua para desenvolver outras áreas de diagnóstico e epidemiologia microbiana, frequentemente dependentes da obtenção de isolados bacterianos.