



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Cristiana Raquel Marques dos Santos

DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS  
REGULADAS DE PLANTAS – OTIMIZAÇÃO E  
IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETEÇÃO

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Recursos  
Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade,  
orientado pela Doutora Joana Cardoso da Costa e Mestre Daniela  
Filipa Pereira Nunes Figueira e apresentado à Faculdade de  
Ciências e Tecnologia / Departamento de Ciências da Vida.

Julho de 2023

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra  
Departamento de Ciências da Vida

# DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS REGULADAS DE PLANTAS – OTIMIZAÇÃO E IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODOS DE DETEÇÃO

Cristiana Raquel Marques dos Santos

Relatório de Estágio orientado pela Doutora Joana Cardoso da Costa e  
Mestre Daniela Filipa Pereira Nunes Figueira e apresentado à Faculdade de  
Ciências e Tecnologia / Departamento de Ciências da Vida.

Julho de 2023



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Este relatório foi redigido no âmbito da unidade curricular Estágio do Mestrado em Recursos Biológicos, Valorização do Território e Sustentabilidade, realizado no Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes e incluiu um trabalho realizado no âmbito do projeto XYLOUT - Epidemiologia, Ecogenómica e Modelação das Doenças Reguladas de *Prunus* (PTDC/ASP-PLA/3145/2021), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P.



## Agradecimentos

Este relatório de estágio é o culminar de um ano letivo a estagiar no FITOLAB e o cessar de uma etapa maior na minha vida.

Tive a sorte de durante os últimos anos ter várias “casas” que me formaram a nível pessoal e profissional. Há pessoas e locais às quais devo um sincero agradecimento por todo o suporte e carinho recebido durante esta jornada.

Começo pela família e amigos, aos quais devo um especial agradecimento pela oportunidade que me dão de seguir os meus sonhos e por acreditarem em mim.

Ao Núcleo de Estudantes de Biologia, em especial ao pelouro de Intervenção Cívica que tive o prazer de fundar e coordenar durante 2 anos, e ao Grupo Ecológico da Associação Académica de Coimbra, por me ensinarem o que é a dedicação a uma causa e me ajudarem a desenvolver *skills* essenciais.

A toda a malta do FITOLAB, um obrigada é pouco para agradecer a maneira calorosa com que me receberam e ajudaram durante este ano. Tornaram cada tarefa, mesmo as mais difíceis, em algo agradável de fazer. Obrigada por toda a experiência que partilharam comigo! Tenho de fazer um agradecimento especial às minhas orientadoras. À Joana, tenho a agradecer toda a ajuda, toda a disponibilidade e todo o rigor científico que partilhou comigo que foram essenciais no meu desenvolvimento. À Daniela, obrigada por toda a paciência e dedicação e por me aturares na secretária. Foste essencial para mim e um obrigado será sempre pouco. Sem vocês não teria conseguido chegar até aqui!

Por fim, um agradecimento especial à minha família escutista, o meu agrupamento de escuteiros, 1067 - Pampilhosa, que foi e será casa para todas as situações. Estou perfeitamente ciente e grata pela oportunidade de ter crescido com vocês e de ter aprendido o que é realmente importante nesta vida.

Obrigada a todos!

## Resumo

As plantas são a base para a vida na Terra contribuindo, direta e indiretamente, para o bem-estar humano através de diferentes serviços dos ecossistemas. A saúde vegetal é assim essencial para manter o equilíbrio dos ecossistemas. No entanto, potenciado pelas alterações climáticas e pela atividade humana, a emergência de novas pragas e doenças é uma ameaça permanente para a segurança alimentar e produção agrícola sustentável. Para a maioria dos casos não há tratamentos eficazes disponíveis, pelo que a prevenção e o diagnóstico precoce desempenham um papel crucial. A implementação de métodos de controlo adequados é igualmente essencial para mitigar o impacto destes organismos patogénicos no ambiente e na economia.

Métodos de deteção eficazes para a deteção de pragas e doenças são ferramentas essenciais em qualquer laboratório de fitossanidade. Os métodos moleculares, devido à sua sensibilidade e especificidade, revelaram-se ferramentas fundamentais neste tipo de análises, mas exigem padrões mínimos de qualidade e quantidade de DNA para serem confiáveis. A obtenção de DNA total em quantidade e qualidade é um passo fundamental para o diagnóstico de doenças, porém, os elevados metabolitos secundários na matriz vegetal interferem com algumas reações, como a PCR. Neste contexto, foi desenvolvido um projeto de investigação com o objetivo de determinar o impacto que a matriz vegetal analisada tem na qualidade do DNA total extraído através do método de CTAB, recorrendo a uma análise sistematizada dos registos de ensaio de deteção molecular de *Xylella fastidiosa*, cujos resultados evidenciaram a existência de alguns géneros que dificultam o processo de extração do DNA total, resultando numa proposta de melhoria do protocolo de ensaio no Laboratório de Fitossanidade do Instituto Pedro Nunes.

Neste projeto, foram ainda realizados ensaios de deteção dos organismos regulados *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora* e *Xylella fastidiosa* no âmbito de controlos oficiais e no âmbito do projeto de investigação XylOut. A deteção de *Xylella fastidiosa*, numa amostra de *Prunus avium*, um novo hospedeiro da bactéria em Portugal, reforçou a importância de projetos de investigação e da prospeção para a deteção precoce de focos de infeção, neste caso em pomares de *Prunus*, para um controlo eficaz e/ou erradicação do mesmo e para a compreensão da incidência desta bactéria em *Prunus* no território nacional.

## Palavras-chave

*Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora*, Real time polymerase chain reaction, Diagnóstico.

## Abstract

Plants are the foundation of life on Earth and contribute directly and indirectly to human well-being through various ecosystem services. Plant health is therefore essential to maintaining the balance of ecosystems. However, the emergence of new pests and diseases, exacerbated by climate change and human activities, is a constant threat to food security and sustainable agricultural production. In most cases, there are no effective treatments available, so prevention and early diagnosis play a crucial role. The implementation of appropriate control methods is also essential to mitigate the environmental and economic impact of these pathogens.

Effective detection methods for pests and diseases are essential tools in any phytosanitary laboratory. Molecular methods have proven to be fundamental tools in this type of analysis due to their sensitivity and specificity, but they require minimum standards of DNA quality and quantity to be reliable. Obtaining the quantity and quality of total DNA is a fundamental step in disease diagnosis, but the high levels of secondary metabolites in the plant matrix interfere with some reactions, such as PCR. In this context, a research project was developed with the aim of determining the influence of the analyzed plant matrix on the quality of the total DNA extracted by the CTAB method, using a systematic analysis of *Xylella fastidiosa* molecular detection assay protocols. The results showed the existence of some genera that hindered the total DNA extraction process, leading to a proposal to improve the assay protocol at the Instituto Pedro Nunes Phytosanitary Laboratory.

This project also included testing for the regulated organisms *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora* and *Xylella fastidiosa* as part of official controls and the XylOut research project. The detection of *Xylella fastidiosa* in a sample of *Prunus avium*, a new host for the bacterium in Portugal, confirmed the importance of research projects and surveys for the early detection of infection foci, in this case in *Prunus* orchards, for effective control and/or eradication of the same, and for understanding the incidence of this bacterium in *Prunus* on the national territory.

## Keywords

*Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Erwinia amylovora*, Real time polymerase chain reaction, Diagnosis.