

IV Ciclo de Conferências

Conselho Técnico-Científico



Temas Atuais em Investigação



**Edições
IPCB**

**Escola Superior Agrária
2018**



Instituto Politécnico de Castelo Branco
Escola Superior Agrária

IV Ciclo de Conferências Conselho Técnico-Científico

Temas Atuais em Investigação

Escola Superior Agrária

Ficha Técnica

Edição

Instituto Politécnico de Castelo Branco
Av. Pedro Álvares Cabral, nº 12
6000-084 Castelo Branco. Portugal
www.ipcb.pt

Título

IV Ciclo de Conferências. Conselho Técnico-Científico. Temas Atuais em Investigação

Editor

João Paulo Carneiro

Editores Adjuntos

Ofélia Anjos; Deolinda Alberto

Capa, projecto gráfico e paginação

Rui Tomás Monteiro

Arte Final, impressão e acabamento

Serviços Gráficos do IPCB

Tiragem: 50 exemplares

N.º Depósito Legal: 405259/16

ISBN: 978-989-8196-57-6

©

Conselho Técnico Científico (2016 - 2018)

Prof. Doutor	João Paulo Baptista Carneiro (Presidente)
Prof. Doutor	Ofélia Maria Serralha dos Anjos (Vice Presidente)
Prof. Doutor	Deolinda Maria Fonseca Alberto (Secretário)
Prof. Doutor	António Manuel Moitinho Nogueira Rodrigues
Prof. Doutor	António Maria dos Santos Ramos
Prof. Doutor	Celestino António Morais de Almeida
Prof. Doutor	Cristina Maria Martins Alegria
Prof.	Francisco de Noronha Galvão Franco Frazão
Prof. Doutor	Isabel Cristina Castanheira e Silva
Prof. Doutor	João Pedro Martins da Luz
Prof.	João Pedro Várzea Rodrigues
Prof. Doutor	José Carlos Dias Duarte Gonçalves
Prof. Doutor	Luis Pedro Mota Pinto de Andrade
Prof. Doutor	Manuel Vicente de Freitas Martins
Prof. Doutor	Maria de Fátima Pratas Peres
Prof. Doutor	Maria do Carmo Simões Mendonça Horta Monteiro
Prof. Doutor	Maria Paula Albuquerque Figueiredo Simões
Prof. Doutor	Maria Teresa Pita P. Gonçalves Rodrigues Coelho
Prof. Doutor	Paulo Fernando dos Santos Caldinho Gomes

Índice

Caracterização das curvas de crescimento do ovino Segurenho em sistemas convencionais e biológicos	
<i>Teresa Marta Lupi</i>	3
Micobacterioses em Animais Selvagens	
Aspetos Epidemiológicos e Histopatológicos	
<i>Ana Cristina Matos</i>	13
<i>Xylella fastidiosa</i> , um problema emergente na Europa	
<i>João Pedro Luç</i>	21
Realidade aumentada e modelos de conservação de espécies. Um futuro hoje!	
<i>Luísa Nunes</i>	27
Plant biotechnology research at the Faculty of Agriculture of the University of Szeged, Hungary	
<i>Tamás Monostori</i>	33

O Conselho Técnico-Científico da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco (ESA-IPCB), eleito para o período 2016-2018, tomou posse no dia 15 de abril de 2016. Um dos objetivos previstos no seu Plano de Atividades, consistia na continuidade da promoção de iniciativas visando a divulgação de atividades técnico-científicas, em áreas de intervenção da Escola. Neste sentido, foi organizado o IV Ciclo de Conferências do Conselho Técnico-Científico.

Com esta iniciativa, procurou-se assim continuar com o contributo da Escola para o desenvolvimento tecnológico e da inovação de empresas e produtos, através da divulgação de informação científica, tecnológica e/ou de inovação, obtida em trabalhos de investigação/experimentação realizados com participação da instituição. Para além disso, considerou-se que seria igualmente importante que neste IV Ciclo de Conferências fosse iniciado um alargamento do âmbito das intervenções, possibilitando o acesso a informação de atividades desenvolvidas por outras instituições, nomeadamente internacionais, nas áreas de intervenção da Escola.

Com esta publicação, para além de se procurar promover uma maior divulgação e fácil acesso aos conteúdos das conferências produzidas, pretende-se estimular iniciativas e uma maior cooperação entre agentes, públicos e privados, no sentido de serem desenvolvidas atividades capazes de contribuir para o sucesso e aumento da competitividade de empresas do setor agrícola e agroindustrial.

Castelo Branco, 27 de abril de 2018



Presidente do Conselho Técnico-Científico

Caracterização das curvas de crescimento do ovino Segureño em sistemas convencionais e biológicos

Teresa Marta Lupi

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal
tmlc@ipcb.pt



Abstrat

The sheep breeding program of Segureño breed has reached a great development in recent years, ranking among the most advanced in Spain and EU. For this reason, its responsible technical team has considered the search for new selection criteria which influence the competitiveness of the breed, in which emphasizes the use of the biological meaning of the best fit growth curve, as selection criteria to improve aspects such as age at slaughter, precocity, among others.

Using data between the years 2000-2015 of the historical database of the National Association of Segureño Sheep Breeders (ANCOS), we developed a study in three stages that lead us to offer the aforementioned new criteria to the genetic program. In a first stage, it was analysed nonlinear models describing biological (birth to adulthood) and commercial (birth to

slaughter age) growth curves of Segureña sheep breed. In a second stage a study was conducted to evaluate the effects of non-genetic factors (sex, birth season, herd, birth year and birth type) on the growth behaviour of the animals in order to optimize the genetic analysis models to use of on the curves parameters. Finally, in a third stage it was defined the individual best fit curve and with each animal parameters it was calculated the genetic parameters that illustrated us on genetic variability levels of them in the population, on genetic relationships between parameters and, above all, on their abilities as potential selection criteria. These three stages constitute the specific objectives of this study, and each led to a specific article published in journals of impact.

Resumo

No presente trabalho analisaram-se modelos não lineares para descrever as curvas de crescimento biológico (do nascimento à idade adulta) e comercial (do nascimento ao sacrifício) da raça ovina Segureña, uma das mais importantes de Espanha. Foram avaliados os modelos de Brody, von Bertalanffy, Verhulst, Gompertz e logístico, utilizando dados entre os anos de 2000 a 2015, da base de dados da Asociación Nacional de Criadores de Ovino Segureño (ANCOS). Foi levado a cabo um estudo para avaliar os efeitos não genéticos (sexo, época de nascimento, rebanho, ano de nascimento e tipo de parto) sobre o comportamento do crescimento dos animais. Foi estudada a importância genética dos parâmetros das curvas de crescimento e a sua importância como critério de selecção nos programas de melhoramento dos ovinos Segureños.

Os resultados obtidos estruturaram-se em 3 trabalhos que deram lugar a 3 publicações:

- Na primeira (Characterization of commercial and biological growth curves in the Segureña sheep breed. *Animal* 2015, 9, pp 1341-1348. doi:10.1017/S1751731115000567) foram analisados os modelos não lineares para descrever o crescimento biológico e comercial da ovelha Segureña, uma das mais importantes raças espanholas. Avaliamos os modelos de Brody, von Bertalanffy, Verhulst, Gompertz e logístico a partir de dados históricos da Asociación Nacional de Criadores de Ovino Segureño (ANCOS). Estes registos foram recolhidos entre 2000 e 2013, num total de 129 610 observações de peso que vão desde o nas-

cimento até à idade adulta. O objetivo desta investigação foi estabelecer O comportamento matemático do desenvolvimento corporal durante a vida comercial desta raça (desde o nascimento ao sacrifício) e durante a vida biológica (desde o nascimento à idade adulta); a comparação entre ambas as vertentes dá-nos uma informação importante sobre o melhor momento para o abate, um aconselhamento dietético consoante as necessidades dos animais, permite previsões económicas de produção e, mediante a utilização dos parâmetros da curva como critérios de seleção, permite melhoramentos nas características de crescimento da raça. Os modelos foram ajustados utilizando o procedimento de regressão não linear (NLR) do programa estatístico IBM SPSS version 19. Os parâmetros do modelo foram estimados utilizando o algoritmo Levenberg-Marquardt. Os modelos em estudo foram comparados utilizando o coeficiente determinativo, o erro quadrático médio, o número de interações, o critério de informação de Akaike e a coerência biológica dos parâmetros estimados. Os modelos de von Bertalanffy e logístico foram os que melhor se ajustaram às curvas de crescimento biológico e comercial, respetivamente, em ambos os sexos. O modelo de Brody não é adequado para o estudo da curva de crescimento comercial. As diferenças entre os parâmetros em ambos os sexos indicam um forte impacto do dimorfismo sexual no crescimento. Isto realça do valor da taxa de crescimento mais elevado nas fêmeas o que indica que alcançam mais cedo a maturidade.

- No segundo trabalho (Analysis of the non-genetic factors affecting the growth of Segureño sheep. Italian Journal of Animal Science 2015; 14:3683, pp 124-131. doi: 10.4081/ijas.2015.3683) realizou-se um estudo para avaliar os efeitos dos fatores não genéticos sobre o comportamento do crescimento da raça ovina Segureña. Os dados de crescimento (peso ao desmame precoce, peso ao desmame tardio e peso aos 80 dias de idade) foram recolhidos de 59 704 borregos pertencentes aos dados históricos da Asociación Nacional de Criadores de Ovino Segureño (ANCOS) durante um período de 11 anos. A análise estatística foi realizada utilizando a análise multifatorial da variância do programa estatístico IBM SPSS v. 19. O modelo incluiu os fatores não genéticos - sexo (S) do cordeiro, época de nascimento (N), rebanho (H), ano de nascimento (A) e tipo de parto (P) - como efeitos principais e a idade da ovelha no parto e a idade do cordeiro na recolha de peso como covariáveis, e as interações entre estes fatores. Os resultados mostraram que os pesos em todas as

fases de desenvolvimento foram afetados significativamente ($p < 0,001$) por todos os factores, com excepção do parâmetro A e a covariável idade da ovelha no parto nos cordeiros com 80 dias. As interações duplas $H \times A$, $H \times P$ e $H \times N$ foram significativas ($p < 0,001$) para todas as variáveis, bem como a interação tripla $H \times A \times P$. Os fatores não genéticos têm um papel muito importante no desenvolvimento e crescimento da raça ovina Segureña, nas diferentes idades ou fases de crescimento, pelo que é necessária uma correção para aumentar a precisão directa no peso dos cordeiros no desmame precoce, no desmame tardio e ao sacrifício (80 dias de idade).

- No terceiro trabalho (Genetic parameters of traits associated with the growth curve in Segureña sheep. *Animal*, 2016 May; 10(5), pp 729-35) estudou-se a importância genética dos parâmetros da curva de crescimento e a sua relevância como critério de seleção em programas de melhoramento dos ovinos da raça Segureña. As funções de crescimento logística e de Verhulst foram utilizadas pelo seu melhor ajustamento ao peso corporal/idade nesta raça; o primeiro mostrou o melhor ajuste geral e o segundo o melhor ajuste individual. O peso vivo de 41 330 animais dos arquivos históricos da Asociación Nacional de Criadores de Ovino Segureño (ANCOS) foi utilizado neste estudo. A prole de 1464 carneiros e de 27 048 ovelhas foi utilizada para estudar os parâmetros genéticos e fenotípicos dos parâmetros das curvas de crescimento e as características derivadas de estes. O manejo reprodutivo da população consiste na monta natural controlada dentro de cada rebanho, com um mínimo de 15% das fêmeas fertilizadas por inseminação artificial com sêmen fresco, com o objetivo das conexões genéticas do rebanho, toda a genealogia do rebanho foi rastreada com marcadores de ADN. As estimações dos parâmetros da curva de crescimento desde o nascimento até aos 80 dias foram obtidas para cada indivíduo e para cada modelo, pelo procedimento regressão não linear (NLR) utilizando o software estatístico IBM SPSS (v. 21) com o método de estimação de Levenberg-Marquart. As componentes de covariância e os parâmetros genéticos foram estimados utilizando a metodologia de modelo animal (REML). A herdabilidade do parâmetro A foi estimada em $0,41 \pm 0,042$ e $0,38 \pm 0,021$ com os modelos logístico e de Verhulst, respetivamente, e a herdabilidade dos outros parâmetros variou de 0,41 a 0,62 e 0,37 a 0,61, com os modelos, respetivamente. Foi encontrada uma correlação genética negativa entre o parâmetro A e a taxa de maturidade.

Em síntese, a curva de crescimento que melhor explica o crescimento biológico (do nascimento até à idade adulta) do ovino Segureño é o modelo de von Bertalanffy enquanto que para explicar o crescimento comercial (do nascimento até ao sacrifício) o melhor modelo é o logístico, em ambos os sexos. O modelo de Brody não é adequado para o estudo da curva de crescimento comercial. Os fatores não genéticos, de um modo geral, afetam significativamente o crescimento do cordeiro segurenho. Através do ajuste individual determinaram-se dados com informação necessária para que os produtores possam inferir sobre informação económica relevante em relação ao ponto de inflexão e à maturidade, que não são acessíveis a partir das características de crescimento simples, tais como pesos em diferentes idades chave (nascimento, desmame e sacrifício) ou ganhos de peso diários.

Agradecimentos

Começo por agradecer ao meu orientador, D. Juan Vicente Delgado Bermejo, por todo o seu incentivo, a sua disponibilidade e amizade com que me brindou durante todo o trabalho. Ao D. José Manuel León, por todo o seu apoio e ajuda.

À ANCOS, em especial a José Puntas e a Miguel Serrano, por todo o apoio.

Quero agradecer aos membros do Departamento de Genética (Amparo, Vincenzo), os cafés, os bolinhos e o bem que me acolheram e em especial à Mayra Gomez pela ajuda indispensável na logística.

À Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, pela possibilidade de realizar esta etapa.

Obrigada à minha família, pelo seu apoio e confiança. Em especial aos meus filhos, pelo respeito que demonstraram pelo meu trabalho e a compreensão pela minha falta de tempo, à minha irmã Gaigai pela força e o orgulho que sempre demonstrou e à minha Mãe pelo orgulho que sempre sentiu pelo meu trabalho.

Às minhas amigas, em especial à Teresa, Isabel e Lala pela ajuda que me deram na logística familiar, pela disponibilidade e pela preocupação. Ao Zé Pedro por toda a sua ajuda no trabalho com as publicações.

Aos meus amigos de Córdoba, em especial ao António e à Macarena, pela companhia que me fizeram nas minhas estadias em Córdoba.

E por último, um agradecimento muito especial ao Sérgio, que sem a sua ajuda não sei se teria chegado a este ponto da minha vida. A sua amizade,

conhecimento, disponibilidade, alegria, simpatia e suporte foram o motor do meu trabalho. Muitíssimo obrigada.

Bibliografia

- Abegaz S, Vanwyk JB and Jacobus JJ 2010. Estimation of genetic and phenotypic parameters of growth curve and their relationship with early growth and productivity in Horro sheep. *Archiv Tierzucht* 53, 1, 85-94.
- Akhtar M, Javed K, Abdullah M, Ahmad N and Elzo MA 2012. Environmental factors affecting preweaning growth traits of Buchi sheep in Pakistan. *Journal of Animal and Plant Sciences* 22, 529-536.
- ANCOS 2014. Raza Segureña – Producción de carne.
- Assan N and Makuza SM 2005. The effect of non-genetic factors on birth weight and weaning weight. *Asian - Australasian Journal of Animal Sciences* 18, 151-157.
- Baneh H and Hafezian SH 2009. Effects of environmental factors on growth traits in Ghezel sheep. *African Journal of Biotechnology* 8, 2903-2907.
- Bathaei SS and Leroy PL 1998. Genetic and phenotypic aspects of the growth curve characteristics in Mehraban Iranian fat-tailed sheep. *Small Ruminant Research* 29, 261-269.
- Bela B and Haile A 2009. Factors affecting growth performance of sheep under village management conditions in the south western part of Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development* 21, 189.
- Blasco A 1999. La descripción del crecimiento. Informe técnico ocasional No 6. Departamento de ciencia animal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Boldman KG, Kriese LA, Van Vleck LD, Van Tassell CP and Kachman SD 1993. A Manual for Use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances [DRAFT]. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Clay Center, NE, USA.
- Brody S 1945. *Bioenergetics and Growth*. Reinhold, New York, 1023 pp.
- Brown JE, Brown CJ and Butts WT 1972. A discussion of the genetic aspects of weight, mature weight and rate of maturing in hereford and angus cattle. *Journal of Animal Science* 34, 525-537.
- Brown JE, Fitzhugh HA and Cartwright TC 1976. A comparison of nonlinear models for describing weight-age relationships in cattle. *Journal of Animal Science* 42, 810-818.
- Canaza-Cayo AW, Huanca T, Gutiérrez JP and Beltrán PA 2015. Modelling of growth curves and estimation of genetic parameters for growth curve parameters in Peruvian young llamas (*Lama glama*). *Small Ruminant Research* 130, 81-89.
- Cano T, Peña F, Martos J, Domenech V, Alcade MJ, García A, Herrera M, Rodero E and Acero R 2003. Calidad de la canal y de la carne en corderos ligeros de raza Segureña. *Archivos Zootécnicos* 52, 315-326
- Carneiro PLS, Malhado CHM, Affonso PRAM, Pereira DG, Suzart JCC, Ribeiro Junior M and Rocha JL 2009. Curva de crescimento em caprinos, da raça Mambrina, criados na caatinga. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 10, 536-545.
- Carolino RNP and Gama LT 1993. Análise do crescimento corporal nas espécies pecuárias. *Veterinária Técnica* Ano 3 n° 2, 14-21
- Charles AB 1985. Factors affecting the growth of sheep and goats in Africa. Small ruminants in African agriculture - Les petits ruminants dans l'agriculture africaine. pp 34-44 in Proc. of ILCA Conf., Addis Ababa, Ethiopia.
- Daskiran I, Koncağul S and Bingol M 2010. Growth Characteristics of Indigenous Norduz Female and Male Lambs. *Journal of Agricultural Sciences* 16, 62-69
- Dickson-Urdaneta L, Torres-Hernandez G, Dáubeterre R and García O 2004. Crecimiento en ovinos West African bajo un sistema de pastoreo restringido en Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía* 21, 59-67.

- Dimsoski P, Tosh JJ, Clay JC and Irvin KM 1999. Influence of management system on litter size, lamb growth, and carcass characteristics in sheep. *Journal of Animal Science* 77, 1037-1043.
- Echeverri AML, Bergmann JAG, Toral FLB, Osorio JP, Carmo AS, Mendonça LF, Moustacas VS and Henry M 2013. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzerat bulls raised under grazing conditions. *Theriogenology* 79, 751-759.
- Eltawill EA, Hazel L, Sidwell G and Terril CE 1970. Evaluation of environmental factors affecting birth, weaning and yearling traits in Navajo sheep. *Journal of Animal Science* 31, 823-827.
- Fitzhugh HA 1976. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. *Journal of Animal Science*, Champaign 42, 1036-1051.
- Fitzhugh HA and Taylor SCS 1971. Genetic Analysis of Degree of Maturity. *Journal of Animal Science* 33, 4, 717-725
- Freitas AR 2005. Curvas de Crescimento na Produção Animal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 786-795.
- Gbangboche AB, Adamou-Ndiaye M, Youssao AKI, Farnir F, Detilleux J, Abiola FA, Leroy PL, 2006a. Non-genetic factors affecting the reproduction performance, lamb growth and productivity indices of Djallonke sheep. *Small Ruminant Research* 64, 133-142.
- Gbangboche AB, Alkoiret TI, Salifou S, Farnir F, Leroy PL and Abiola FA 2011. Growth pattern of purebred West African Dwarf sheep and its crosses with the West African Long Legged. *Research Journal of Animal Sciences* 5, 6-13.
- Gbangboche AB, Glele-Kakai R, Salifou S, Albuquerque LG and Leroy PL 2008. Comparison of non-linear growth models to describe the growth curve. *West African Dwarf sheep. Animal* 2, 1003-1012.
- Gbangboche AB, Youssao AKI, Senou M, Adamou-Ndiaye M, Ahissou A, Farnir F, Michaux C, Abiola FA, Leroy PL 2006. Examination of non-genetic factors affecting the growth performance of djallonke sheep in soudanian zone at the Okpara breeding farm of Benin in *Tropical Animal Health and Production* 38, 55-64.
- Gómez DAA, Muñoz MFC and Betancur LFR 2008. Modelación de funciones de crecimiento aplicadas a la producción animal. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 21, 39-58.
- González GR, Torres HG and Castillo AM 2002. Crecimiento de corderos Blackbelly entre el nacimiento y el peso final en el trópico húmedo de México. *Veterinaria México* 33, 443-453.
- Goyache FM 2005. Crecimientos, consumos y medidas corporales. In: Cañeque, V., Sañudo, C. *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. INIA. Madrid. Spain.
- Hamouda MB and Atti N 2011. Comparison of growth curves of lamb fat tail measurements and their relationship with body weight in Babarine sheep. *Small Ruminant Research* 95, 120-127.
- Hernandez JVR 2004. Evaluación fenotípica y genotípica de los caracteres de crecimiento en el esquema de selección del ovino segureño. *Dissertation (Ph.D.)*. University of Córdoba, Córdoba (Spain).
- Hinojosa-Cuéllar JA, Oliva-Hernández J, Torres-Hernández G, Segura-Correa JC, Aranda-Ibáñez EM and González-Camacho JM 2012. Factores que afectan el crecimiento predestete de corderos Pelibuey en el trópico húmedo de México. *Universidad y Ciencia* 28, 163-171.
- Hossein-Zadeh NG 2015. Estimation of genetic relationships between growth curve parameters in Guilan sheep. *Journal of Animal Science and Technology* 12, 57-19.
- Hussain A, Akhtar P, Ali S, Younas M, Yaqoob M, Babar ME, Javed K nad Shakoora A 2013. Factors influencing body weights at different ages in Thalli sheep. *Journal of Animal and Plant Sciences* 23, 1-6.
- Kittelsen E 2008. Geographical and management related factors affecting lambs of outwintered sheep along the west coast of Norway. A baseline study in the research project feral sheep in coastal heaths - developing a sustainable local industry in vulnerable cultural landscapes. *Degree Diss., University of Bergen, Norway*.
- Lambe NR, Navajas EA, Simm G and Bünger L 2006. A genetic investigation of various growth models to describe growth of lambs of two contrasting breeds. *Journal of Animal Science* 84, 2642-2654.

- Lavvaf A and Noshary A 2008. Estimation of genetic parameters and environmental factors on early growth traits for lori breed sheep using single trait animal model. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 74-79.
- León JM, Barba C, Gama LT, Carolino NP, Puntas J, Quiroz J and Delgado JV 2005. Parámetros genéticos de prolificidad de la oveja segureña. Resultados preliminares. *Archivos de Zootecnia* 54, 323-326.
- León JM, Macciotta NPP, Gama LT, Barba C and Delgado JV 2012. Characterization of the lactation curve in Murciano-Granadina dairy goats. *Small Ruminant Research* 107, 76-84.
- León JM, Quiroz J, Martínez M, Camacho ME, Puntas J and Delgado JV 2007. The breeding program of the Segureño meat sheep breed. *Ital. Journal of Animal Science* 6(Suppl.1):149 (abstr.).
- Lewis RM and Brotherstone D 2002. A genetic evaluation of growth in sheep using random regression Techniques. *Animal Science* 74, 63-70.
- Lewis RM, Emmans GC, Dingwall WS and Simm G 2002. A description of the growth of sheep and its genetic analysis. *Journal of Animal Science* 74, 51-62.
- López S, France J, Gerrits WJ, Dhanoa MS, Humphries DJ, Dijkstra J 2000. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *Journal of Animal Science* 78, 1816-1828.
- Lupi TM, Nogales S, León JM, Barba C and Delgado JV 2015. Characterization of commercial and biological growth curves in the Segureña sheep breed. *animal* 9, 1341-1348.
- Macedo R and Arredondo V 2008. Efecto del sexo, tipo de nacimiento y lactancia sobre el crecimiento de ovinos pelibuey en manejo intensivo. *Archivos de Zootecnia* 57, 219-228.
- MAGRAMA 2012. Programa de mejora de la raza ovina segureña. Retrieved on 15 March 2014 from http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/Programa_de_Mejora_Raza_Ovina_Segurena_Definitivo_tcm7-293647.pdf
- MAGRAMA 2013. Caracterización del sector ovino y caprino en España año 2013. Retrieved May 19, 2015, from http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/CARACTERIZACION_DEL_SECTOR_OVINO_Y_CAPRINO_EN_ESPA%C3%91A_2013_tcm7-271704.pdf
- McManus C, Evangelista C, Fernandes LAC, Miranda RM, Moreno-Bernal FE and Santos NR 2003. Curvas de Crescimento de Ovinos Bergamácia Criados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 32, 1207-1212.
- Mekuriaw S and Haile A 2014. Genetic Parameter Estimates for Growth and Reproductive Trait of Sheep for Genetic Improvement and Designing Breeding Program in Ethiopia: A Review. *Open Access Library Journal*, e589. <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1100589>. Accessed on April 2015
- Méndez-Gomez AC, López-Ordaz R, Peralta-Laison M, Ulloa-Arvizu R, Pedraza-Villagómez P, Ruiz-López J, Berruecos-Villalobos JM and Vásquez-Peláez CG 2014. Estimación de heredabilidad de la curva de crecimiento en el borrego de raza Chiapas en México. *Animal Genetic Resources* 54, 85-91.
- Momoh OM, Rotimi EA and Dim NI 2013. Breed effect and non-genetic factors affecting growth performance of sheep in a semi-arid region of Nigeria. *Journal of Applied Biosciences* 67, 5302-5307.
- Noguera RR, Pereira R and Solarte CE 2008. Comparación de modelos no lineales para describir curvas de crecimiento en cuyes (*Cavia porcellus*) desde el nacimiento hasta la edad de sacrificio. *Livestock Research for Rural Development* 20, Article #79.
- Posada SL and Noguera RR 2007. Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 20, 141-148.
- Quesada M, McManus C and Couto FAA 2002. Efeitos genéticos e fenotípicos sobre características de produção e reprodução de ovinos deslanados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31, 342-349.
- Quirino CR, Bergman JAG, Vale Filho VR and Pereira JCC 1999. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nellore bulls. *Theoriogenology* 52, 25-34.

- Ramirez-Tello JA, Torres-Hernández G, Cruz-Colín L, Ochoa-Cordero MA and Suárez-Espinosa J 2013. Evaluación de factores ambientales que influyen en características de crecimiento del nacimiento al destete de corderos Hampshire. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 4, 117-125.
- Ratkowsky DA 1983. *Nonlinear regression modeling*. New York: Marcel Dekker Inc., 297p.
- Robinson JJ, McDonald I, Fraser C and Crafts RMJ 1977. Studies in reproduction in prolific ewes. I. Growth of the products of conception. *Journal of Agricultural Science* 88, 539-552.
- Rodríguez M, Huerta LN, Ventura SM, Rivero LJ and Esparza D 1999. Factores que afectan el comportamiento productivo de corderos mestizos mantenidos bajo condiciones semiintensivas de explotación en el trópico muy seco venezolano. *Revista de la Facultad de Agronomía* 16, 64-78.
- Sarmento JLR, Regazzi AJ, Sousa WH de, Torres RA, Breda FC and Menezes GRO 2006. Estudio da curva de crescimento de ovinos Santa Inês. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35, 435-442.
- Sarti FM, Castelli L, Bogani D and Panella F 2003. The measurement of chest girth as an alternative to weight determination in the performance recording of meat sheep. *Italian Journal of Animal Science* 2, 123-129.
- Sarti FM, Panella F and Bogani D 2001. The most suitable traits in the Appenninica sheep for meat selection. *Zuchthygiene-Reproduction in Domestic Animals* 27:65-73.
- Silva FLR and Araújo AM 2000. Características de reprodução e de crescimento de ovinos mestiços Santa Inês, no Ceará. *Revista Brasileira de Zootecnia* 29, 1712-1720.
- Souza JC and Bianchini Sobrinho E 1994. Estimativa do peso de bovinos de corte, aos 24 meses, da raça Nelore, usando curvas de crescimento. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 23, 85-91.
- Souza LA 2010. Avaliação do crescimento de ovinos da raça Morada Nova sob modelos não lineares convencionais e alternativos. Dissertation (Master), State University of Southwest of Bahia, Itapetinga (Bahia, Brasil).
- Strizke DJ and Whiteman JV 1982. Lamb growth patterns following different seasons of birth. *Journal of Animal Science* 55, 1002-1007.
- Tariq MM, Iqbal F, Eydurán E, Bajwa MA, Huma Z and Waheed A 2013. Comparison of Non-Linear Functions to Describe the Growth in Mengali Sheep Breed of Balochistan. *Pakistan journal of zoology* 45, 3, 661-665.
- Thomas MSC, Annaz D, Ansari D, Serif G, Jarrold C and Karmiloff-Smith A 2009. Using developmental trajectories to understand developmental disorders. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research* 52, 336-358.
- Topal M, Ozdemir M, Aksakal V, Yildiz N and Dogru U 2004. Determination of the best nonlinear function in order to estimate growth in Morkaraman and Awassi lambs. *Small Ruminant Research* 55, 229-232.
- Tron JL, Quintero LAZ, Padilla EG, Pérez JT, Godoy AV, and Peláez CV 2003. Crecimiento predes-tete de corderos en sistemas intensivos de pastoreo y manejo reproductivo en el altiplano central de México. *Veterinaria México* 34, 235-245.
- Ulutaz Z, Sezer M, Aksoy Y, Sirin E, Sen U, Kuran M and Akbas Y 2010. The effect of birth types on growth curve parameters of Karayaka lamb. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 1384-1388.

Micobacterioses em Animais Selvagens

Aspetos Epidemiológicos e Histopatológicos

Ana Cristina Matos

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal
acmatos@ipcb.pt



Abstract

Mycobacterial species are raising serious concerns in livestock and wild animals worldwide. In wildlife, mycobacterial infection has been reported in hundreds of species and likely has the potential to occur in every vertebrate. Since this infection is of a chronic nature the best strategy to control the infection is through early identification of infected animals, and better diagnostic measures are required for effective control programs.

With the development of new molecular methods for detecting and characterizing microorganisms, the ecology of mycobacteria has rapidly advanced in all areas. In human medicine, polymerase chain reaction (PCR) assays are accepted diagnostic standards, replacing or complementing culture isolation and acid-fast staining.

The mycobacterial species that produce tuberculosis in humans and animals are included in the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). My-

cobacteria from the *Mycobacterium avium* complex (MAC) cause a variety of diseases including tuberculosis-like disease in humans and birds, disseminated infections in immunocompromised patients, lymphadenitis in humans and mammals and paratuberculosis in ruminants.

The aim of the present work was to gain a better understanding of the role of free-living mammalian species in the epidemiology of wildlife mycobacteriosis in Portugal.

Resumo

As micobacterioses causam sérias preocupações na produção animal e na vida selvagem, em todo o mundo. As infeções micobacterianas têm sido descritas em centenas de espécies de animais selvagens podendo afetar todos os animais vertebrados. Como estas infeções são de carácter crónico, a melhor estratégia de controlo passa pela identificação precoce dos animais infetados, melhorando a metodologia de diagnóstico e tornando efetivos os programas de controlo.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular aplicadas à microbiologia, o conhecimento da ecologia das micobactérias avançou rapidamente em todas as áreas. Na medicina humana a reação em cadeia de polimerase (PCR) é aceite como técnica de diagnóstico, substituindo ou complementando o isolamento bacteriano e o esfregaço corado pelo método de Ziehl-Neelsen.

Atualmente, estão identificadas 172 espécies e 13 subespécies do género *Mycobacterium* (Euzéby, 2015). Das suas principais características destacam-se o elevado conteúdo de guadina – citosina no seu genoma e a composição única e complexa da sua parede celular que é constituída por ácidos gordos de cadeia longa, os ácidos micólicos, que fazem com que estes organismos sejam de crescimento lento e que sejam impermeáveis aos corantes hidrossolúveis – denominando-se Bacilos-Ácido-Álcool Resistentes (BAAR). São bacilos pleomórficos, retos ou ligeiramente curvos com 0,2-0,6 µm de diâmetro e 1,0-10 µm de comprimento, imóveis, não esporulados, sem cápsula, aeróbios e quimiorganotróficos, com temperaturas de crescimento ideais que variam entre 25-37°C.

A classificação das espécies deste género é feita de acordo com a sua velocidade de crescimento, atividade metabólica, morfologia da colónia, distribuição no ambiente e potencial patogénico.

As micobactérias de crescimento rápido formam colónias em meio só-

lido, num período inferior a 7 dias e são saprófitas em habitats naturais. As micobactérias de crescimento lento formam colónias num período superior a 7 dias e geralmente são patogénicas para o Homem e outros animais.

As micobactérias relevantes em medicina humana e medicina veterinária são agrupadas em complexos, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* e o complexo *Mycobacterium avium*, que incluem espécies que causam síndromes clínicas idênticas e apresentam uma elevada semelhança genética. As restantes micobactérias são referidas como atípicas ou não tuberculosas, mas duas destas são patogénicas responsáveis por duas patologias em humanos, a lepra e a úlcera de Buruli (Falkinham, 1996).

As espécies do género *Mycobacterium* responsáveis pela tuberculose nos humanos e outros animais são incluídas no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC). Este complexo é constituído por 8 espécies de micobactérias de crescimento lento que causam tuberculose nos humanos e outros animais (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. mungi*) (Warren et al., 2006). Os membros deste complexo apresentam, a nível de sequência nucleotídica, uma semelhança superior a 99,9% com sequências de rRNA 16S idênticas, mostrando diferenças fenotípicas e de patogénicidade, estando adaptados a hospedeiros distintos, cada uma das espécies tem preferência por um hospedeiro distinto (Mostowy e Behr, 2005).

O principal agente etiológico da tuberculose em mamíferos selvagens e domésticos é a espécie *Mycobacterium bovis* (de Lisle et al., 2002). A tuberculose bovina é uma doença de distribuição mundial e com um impacto económico significativo e, por vezes, a dificuldade da sua erradicação está relacionada com a existência de reservatórios selvagens (Santos et al., 2009). *M. bovis* é muito semelhante a nível genético com *M. tuberculosis*, sendo o genoma do primeiro ligeiramente mais pequeno (Garnier et al., 2003).

As espécies do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) causam uma variedade de patologias, incluindo lesões típicas de tuberculose em humanos e aves, infeções disseminadas em pacientes imunodeprimidos, linfadenites em humanos e outros mamíferos e paratuberculose em ruminantes. O MAC é constituído por bactérias de crescimento lento e são ubiqüitárias no ambiente.

Originalmente, uma espécie, posteriormente dividida em 2 espécies: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*. Mais tarde com os avanços da taxonomia molecular foram identificadas 7 novas espécies (Turenne et al., 2007).

Muitas subespécies de *M. avium* foram identificadas com base em crité-

rios bioquímicos (HPLC- ácidos micólicos) e moleculares (sequenciação do ITS ribossomal e RFLP de IS1245). Estas subespécies incluem *Mycobacterium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *hominissuis* e *M. avium* subsp. *silvaticum*. Todas as subespécies *M. avium* e *M. intracellulare* são capazes de infetar uma ampla gama de hospedeiros e possuem um alto grau de semelhança genética (Thorel et al., 1990).

Apesar do seu agente etiológico ser conhecido há mais de um século, a tuberculose aviária continua a ser uma doença de difícil diagnóstico *ante mortem*. Ao exame *post mortem* o diagnóstico, por vezes, também se torna difícil devido aos achados de necrópsia não específicos e pela dificuldade na realização de cultura que, apesar de tudo, ainda constitui o método mais comum de diagnóstico de infeções micobacterianas. Ao longo dos últimos anos, a biologia molecular tem sido frequentemente aplicada na identificação e diferenciação destes microrganismos, constituindo uma ferramenta muito útil, pois possibilita a deteção de pequenas quantidades de DNA e de forma mais rápida que a cultura (Tell et al., 2003; Taddei et al., 2004). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) é o agente etiológico de enterite granulomatosa crónica de ruminantes, tendo sido já identificado por técnicas de microbiologia tradicional e por PCR em aves e mamíferos selvagens (Coelho et al., 2008a; Miranda et al., 2009; Matos et al., 2013).

O objetivo do presente trabalho foi compreender melhor o papel dos mamíferos selvagens na epidemiologia das micobacterioses zoonóticas e não zoonóticas na vida selvagem em Portugal, pretendendo fornecer uma visão mais aprofundada das micobacterioses em mamíferos selvagens.

Neste trabalho, foi estudada uma população de 2116 mamíferos selvagens e a prevalência de *Mycobacterium bovis* encontrada por espécie animal foi: 26.9% na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), 20.0% no mangusto (*Herpestes ichneumon*), 21.4% no javali (*Sus scrofa*) e 38.3% no veado europeu (*Cervus elaphus*). Os resultados deste estudo confirmam a presença de *Mycobacterium bovis* em carnívoros selvagens em Portugal demonstrando-se, pela primeira vez, a infeção por *Mycobacterium bovis* em mangustos (*Herpestes ichneumon*), raposas (*Vulpes vulpes*), lontras (*Lutra lutra*), ginetas (*Genetta genetta*) e fuínhas (*Martes foina*). Também foi confirmada a infeção disseminada por *Mycobacterium bovis* em raposas vermelhas em Portugal, demonstrando-se pela primeira vez a ocorrência de infeção natural no cérebro destes animais.

A alta prevalência de tuberculose bovina, na área de estudo, em javalis (21.4%) e veados (38.3%) coincide com a elevada prevalência de tuberculose bovina em bovinos domésticos na região.

Com o objetivo de determinar a prevalência de paratuberculose em vea-

dos e javalis, foram realizadas necropsias a 877 veados e 589 javalis e foram feitas colheitas de vários órgãos para posterior pesquisa de MAP utilizando técnicas de biologia molecular, microbiologia e histopatologia. MAP foi detetado por PCR IS900 em 81.1% das amostras de rim de veado positivas no esfregaço de Ziehl-Neelsen. Em relação aos javalis 45 animais foram classificados como infetados por cultura bacteriológica e/ou PCR e de acordo com os resultados obtidos, 37.9% dos javalis infetados foram aprovados para consumo humano.

A ocorrência de carnívoros selvagens infetados por MAP, neste estudo, numa amostra de 74 animais mortos por atropelamento, foi de 27% (n=20). MAP foi isolado pela primeira vez, em Portugal, na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), na fuínha (*Martes foina*), na lontra europeia (*Lutra lutra*), no mangusto (*Herpestes ichneumon*), e no texugo europeu (*European badger*). A presença de MAP foi confirmada por cultura bacteriológica e detetada por biologia molecular em múltiplos órgãos, das várias espécies animais.

Também, neste trabalho, foi realizada a pesquisa de anti-corpos contra as espécies do complexo *Mycobacterium avium* em mamíferos selvagens mortos por atropelamento, encontrados mortos ou resultantes da atividade cinegética. A seroprevalência resultante foi de 4.7% e os anticorpos contra MAC foram detetados em raposa vermelha, lontra europeia (*Lutra lutra*), texugo europeu (*Meles meles*) e javali (*Sus scrofa*).

Em relação às várias lesões granulomatosas observadas, foi avaliada a resposta inflamatória crónica nos gânglios mesentéricos de javalis com linfadenite granulomatosa. Os parâmetros morfológicos das lesões foram registados e foi avaliada a expressão dos anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 α . Os granulomas observados encontravam-se principalmente no estadio III e IV e as percentagens e padrões de distribuição de anti-CD3 e anti-CD79 α foram semelhantes em lesões onde MAP e MTC estavam presentes.

Resultado da análise dos gânglios linfáticos de veados com lesões granulomatosas foi observada a presença de co-infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, e MAP confirmada por biologia molecular, esta co-infecção foi descrita pela primeira vez, neste trabalho.

Também foi realizada a pesquisa de *Nocardia* spp., utilizando as duas metodologias (PCR e cultura bacteriana) em gânglios linfáticos de javalis com linfadenite granulomatosa, mas com resultados negativos na cultura micobacteriana e PCR, e obtiveram-se duas amostras positivas em PCR. Este é o primeiro caso documentado de nocardiose em javalis e estes resultados realçam a necessidade do diagnóstico diferencial das lesões granulomatosas em animais selvagens.

A informação incluída neste trabalho pode ser utilizada como orientação para novas pesquisas abrangendo vários campos, seja para prosseguir os estudos sobre micobacterioses em mamíferos selvagens como para expandir a pesquisa para outras espécies animais e para outras áreas geográficas.

Os ungulados selvagens apresentam uma grande variabilidade na demografia, gestão, exposição a agentes patogénicos e interação com outros animais selvagens, domésticos e o Homem. Em Portugal, existe a noção que a densidade de animais selvagens como do veado e do javali tem vindo a aumentar nas últimas décadas, mas não existem *census* atualizados destas populações e é necessário saber o tamanho da população, para calcular a amostra necessária ao cálculo da prevalência das micobacterioses.

Também em Portugal, existem poucos dados úteis sobre a prevalência da paratuberculose em rebanhos de ovinos e em bovinos e sobre a tuberculose em rebanhos de caprinos, nem do risco para outras espécies animais.

A adoção de práticas laboratoriais que resultam da combinação dos métodos tradicionais de cultura e métodos moleculares melhoram não só o diagnóstico das micobacterioses nos animais selvagens como a epidemiologia associada. Os métodos moleculares, quando comparados com os métodos tradicionais de cultura melhoram o conhecimento da diversidade e abundância das micobactérias na vida selvagem.

Assim, este trabalho estabeleceu uma base de conhecimento adequado para uma avaliação inicial, mas novas investigações são necessários, a fim de completar o quadro das micobacterioses na vida selvagem e para estabelecer as respetivas medidas de controlo.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo projeto PEst-OE/AGR/UI0772/2014 (financiado pela FCT) e pela bolsa de investigação SFRH/PROTEC/50224/2009 FCT-CECAV (Programa especial de apoio à formação avançada de docentes do ensino superior politécnico).

Agradeço às minhas Orientadoras de Doutoramento Professora Doutora Ana Cláudia Coelho, Professora Doutora Maria de Lurdes Pires e Professora Doutora Manuela Matos.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro e ao Centro de Estudos de Ciências Animais e Veterinárias (CECAV).

Aos Colegas Médicos Veterinários Luis Figueira, Henrique Domingues

e João Cerejo e às Associações de Caça da região.

Aos funcionários da Escola Superior Agrária de Castelo Branco Maria Helena Martins e Paulo Mateus e a todos os Co-autores dos artigos publicados resultantes deste trabalho, pela sua importante contribuição.

Bibliografia

- Coelho, A.C., Pinto, M.L., Coelho, A.M., Rodrigues, J., Juste, R. (2008). Estimation of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by PCR in sheep blood. *Small Ruminant Research* 76: 201-206.
- de Lisle, G.W., Bengis, R.G., Schmitt, S.M., O'Brien, D.J. (2002). Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Revue Scientific et Technique Office International des Epizooties* 21: 317-334.
- Euzéby, J.P. (2015) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
- Falkinham, J.O., 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 177-215.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.-C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 7877-7882.
- Matos, A.C., Figueira, L., Martins, M.H., Matos, M., Andrade, S., Álvares, S., Mendes, A., Sousa, N., Coelho, A., Pinto, M.L. (2013). Granulomatous lesions and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Portuguese wild boars (*Sus scrofa*). *Journal of Comparative Pathology* 148: 85.
- Miranda, A., Pires, M.A., Pinto, M.L., Sousa, L., Sargo, R., Rodrigues, J., Coelho, A.C., Matos, M., Coelho, A.C. (2009). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a diamond sparrow. *Veterinary Record* 165: 184.
- Mostowy, S., Behr, A.M. (2005). The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinics in Chest Medicine* 26: 207-216.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G., Svenson, S.B., Almeida, V., (2009). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases* 45: 1048-1061.
- Tell, L.A., Leutenegger, C.M., Scott Larsen, R., Agnew, D.W., Keener, L., Needham, M.L., Rideout, B.A. (2003). Real-time polymerase chain reaction testing for the detection of *Mycobacterium genavense* and *Mycobacterium avium* complex species in avian samples. *Avian Diseases* 47: 1406-1415.
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., Vincent Lévy-Frébault, V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended and description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 254-260.
- Turenne, C.Y., Wallace, R., Behr, M.A. (2007). *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 205-229.
- Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselink, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G., van Helden, P.D. (2006). Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 10: 818-822.

Xylella fastidiosa, um problema emergente na Europa

João Pedro Luz

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal

j.p.luz@ipcb.pt



Abstract

Xylella fastidiosa is an insect-borne plant pathogenic bacterium associated with serious diseases in a wide range of plants. This bacterium was detected in olive trees in Apulia, southern Italy, in October 2013, and was the first time the bacterium was reported in the European Union. Since then, it has also been found in Corsica and the Provence-Alpes-Côte d'Azur region of southern France and in Spain (Balearic Islands). Several control measures are being adopted to prevent the bacterium from spreading throughout the rest of Europe, particularly in Portugal.

Resumo

A bactéria conhecida, atualmente, como *Xylella fastidiosa* Wells et al. teve várias identidades anteriormente. Na década de 90 do século XIX, foi reconhecido a presença de um microrganismo diminuto nas doenças de Pierce

na vinha e de Phony no pessegueiro. Entre 1936 e 1959, foi provada a transmissão por enxertia de raiz e por insetos, mas o agente causal é considerado um vírus (Hutchins et al., 1953). Em 1971, o mesmo agente é considerado um organismo semelhante a micoplasma (MLO), porque o antibiótico tetraciclina suprime a doença de Pierce. Em 1973, a microscopia eletrônica revela uma bactéria tipo *Rickettsia* nos tecidos do xilema associados às doenças de Pierce e Phony Peach (Hopkins et al., 1973; Nyland et al., 1973;). Em 1978, foram definidos meios de cultura seletivos e uma bactéria foi isolada a partir de tecidos de xilema de videira infetados. Seguidamente, em 1980, uma bactéria no xilema foi associada com a seca/queima de folhas do ulmeiro, mas somente em 1987, um novo gênero e espécie são descritos por Wells et al. com o nome *Xylella fastidiosa*. Em 2004, subespécies de *X. fastidiosa* são descritas com base na patogenicidade, características filogenéticas e relação com o DNA. É uma espécie complexa, atualmente com seis subespécies que variam conforme a distribuição geográfica e os hospedeiros: *fastidiosa*, *multiplex*, *pauca*, *sandyi*, *morus* e *tashke* e com 79 estirpes diferentes, estando a aumentar em áreas geográficas distintas.

As principais características fenotípicas são: bastonetes curtos retos (0,25-0,35 x 0,9-3,5 μm), Gram-negativos, catalase positivos, oxidase negativos, não formadores de esporos, não móveis, aflagelados, aeróbios obrigatórios e com parede celular ondulada (*rickettsialike*). O tempo de geração em cultura é de 0,45 a 1,98 dias e a temperatura ótima de crescimento de 26°C-28°C. A bactéria desenvolve-se estrita e sistemicamente no xilema, cresce muito lentamente nos meios de cultura e é transmitida por insetos vetores.

X. fastidiosa pode infetar mais de 350 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias e 190 gêneros, algumas mais importantes são: citrinos, pessegueiro, videira, amendoeira, mirtilo, cafeeiro, cerejeira, ameixeira, oliveira, sobreiro, azinheira, carvalhos, *Acer* spp., loendro, esteva, ulmeiro, alecrim, rosmaninho e piorno.

As diversas subespécies têm diferentes hospedeiros. Assim, a subsp. *fastidiosa* aparece em videira, luzerna, amendoeira, cerejeira; a subsp. *multiplex* em amendoeira, pessegueiro, carvalhos, azinheira, sobreiro, mirtilo, cerejeira, ameixeira, ulmeiros e oliveira; a subsp. *pauca* em citrinos, cafeeiro e oliveira; a subsp. *sandyi* em loendro e cafeeiro; a subsp. *morus* em amoreira; e a subsp. *tashke* em *Chitalpa tashkentensis* Ellis & Wisura.

X. fastidiosa disseminou-se na Europa, primeiro em outubro de 2013, tendo sido detetada em oliveiras na região da Apúlia, no sul da Itália, e em abril de 2015 afetava toda a província de Lecce e outras zonas da Apúlia.

A doença foi chamada Síndrome do Declínio Rápido da Oliveira (OQDS); em italiano, Complesso del Disseccamento Rapido dell’Olivo (CoDiRO). No início de 2015, tinha infetado até um milhão de árvores na região sul da Apúlia, mas amendoeiras e loendros também testaram positivo para *X. fastidiosa*. Em julho de 2015, *X. fastidiosa* apareceu na Córsega em *Polygala myrtifolia* L. e, em agosto de 2016, foram detetados 279 focos da infeção. Em outubro de 2015, chegou à França continental, perto de Nice, também em *P. myrtifolia*; em agosto de 2016, a bactéria foi detetada na Alemanha em *Nerium oleander* L. (loendro) e em outubro de 2016, foram detetadas em Maiorca, Menorca e Ibiza as subspp. *fastidiosa*, *multiplex* e *pauca* em zambujeiro, cerejeira, ameixeira, oliveira, alecrim e *P. myrtifolia*.

Tendo em conta que a bactéria vive nos vasos xilémicos do hospedeiro, os principais danos causados são a desidratação/seca quando os vasos xilémicos das folhas ficam bloqueados, mas as bactérias formam biofilmes e também se movem contra a corrente do fluxo xilémico. A doença causa a morte dos gomos e rebentos, distribuídos aleatoriamente no início, mas que se expande para o resto da copa, resultando no colapso e morte das árvores. Nos pomares/zonas afetados, quase todas as plantas hospedeiras apresentam sintomas.

As principais doenças causadas por *X. fastidiosa* são: doença de Pierce na videira, clorose variegada dos citrinos, phony peach, bacterial leaf scorch (*Quercus* spp.), doenças de leaf scorch (queimaduras foliares) em loendro, cerejeira, amendoeira, ameixeira, cafeeiro e plantas ornamentais e o Síndrome do Declínio Rápido da Oliveira (OQDS ou CoDiRO).

X. fastidiosa é transmitida, de modo persistente, sem período de incubação, por insetos vetores que se alimentam do fluido xilémico através da armadura bucal picadora-sugadora, no processo de ingestão-egestão. No sul da Itália, *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophoridae), altamente polífago e amplamente difundido, é a única espécie atualmente identificada na Europa como vetor de *X. fastidiosa*. Outros vetores, que existem também em Portugal, poderão ser *Cicadella viridis* L. (Hemiptera: Cicadellidae) e *Aphrophoraalni* Fällén e *A. salicina* Goeze (Hemiptera: Aphrophoridae).

Para realizar o diagnóstico poderão usar-se várias técnicas, tais como: observação microscópica do fluido xilémico; cultura em meios seletivos; técnicas serológicas – ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), IF (imunofluorescência), DTBIA (imunoensaio por transferência de direta); e técnicas moleculares – PCR (reação em cadeia da polimerase) e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). A observação microscópica é possível porque as populações aumentam sensivelmente no fluido xilémico com

o desenvolvimento dos sintomas. A cultura em meio seletivos, como sejam PWG, BCYE e PD2, é uma técnica muito sensível, mas o crescimento é muito lento (2 a 4 semanas) e é facilmente contaminável. O PCR é o teste padrão para diagnóstico, mas normalmente requer tecidos sintomáticos. Numa breve avaliação dos diferentes métodos de diagnóstico podemos referir que a técnica de cultura é muito sensível (pode detetar números muito baixos de células bacterianas), o ELISA é o melhor processo para tecido sintomático, o PCR convencional é sensível, mas é mais demorado e o qRT-PCR (tempo real) é tão sensível quanto PCR convencional, mas mais rápido e sem géis, o que o torna o principal método usado em tecidos assintomáticos.

Os principais meios de luta concentram-se na luta legislativa, cultural e química. A deteção precoce é muito importante para um plano de erradicação eficaz. Em Portugal, temos vários fatores facilitadores da entrada de *X. fastidiosa*, como sejam: invernos pouco rigorosos; presença de insetos-vetores, como *Philaenus spumarius* e *Cicadella viridis* e outros; e presença de hospedeiros preferenciais como oliveira, vinha, amendoeira, loendros, *Quercus* spp., que são culturas de grande importância económica.

Na Europa, a luta legislativa baseia-se na Decisão da Comissão n.º 2015/789 – Medidas para impedir a introdução e propagação na União Europeia de *Xylella fastidiosa*, alterada pelas decisões n.º 2015/2417 e n.º 2016/764 e, em Portugal, no Decreto-Lei n.º 154/2005 – Diretiva n.º 2000/29/CE – Medidas de proteção fitossanitária destinadas a evitar a introdução e dispersão no território nacional e comunitário, de organismos prejudiciais aos vegetais. Em junho de 2016, a DGAV elaborou o Plano de contingência para *Xylella fastidiosa* e seus vetores. As medidas de erradicação baseiam-se no estabelecimento de duas zonas demarcadas, a zona infetada e a zona tampão. Na zona infetada, num raio de 100 m das plantas infetadas, deverão ser eliminadas todas as plantas sintomáticas e as possíveis plantas hospedeiras. Na zona tampão, num raio de 10 Km à volta da zona infetada, deverão ser monitorizadas plantas assintomáticas, através de um plano de amostragens. Em ambas as zonas, deverá ser restringido o movimento de vegetais, proibir a replantação com plantas hospedeiras e eliminar os insetos vetores antes da eliminação das plantas atacadas.

Na luta cultural deverá se:

- reduzir o stresse no hospedeiro e manter o vigor das plantas;
- remover plantas infetadas e hospedeiros alternativos;
- não plantar hospedeiros;
- usar cultivares mais resistentes.

A luta química assentará:

- na erradicação de vetores, embora com resultados inconclusivos; poderá ser útil para reduzir a taxa de propagação para plantações adjacentes;
- no uso do antibiótico oxitetraciclina, mas as injeções de tronco só proporcionam alívio temporário dos sintomas e não funcionam bem em plantas com doença avançada, devendo ser repetidas anualmente;
- na interrupção do biofilmes.

Bibliografia

- Anderson, P.C.; French, W.J. (1987) – Biophysical characteristics of peach trees infected with phony peach disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 31: 25-40.
- Bradbury, J.F. (1991) – CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 1049. CAB International, Wallingford, UK.
- Cambra, M. (2017) – La detección de la bacteria *Xylella fastidiosa* en Mallorca pone en grave peligro a la agricultura española si no se actúa adecuadamente (I). *Phytoma España*, 286: 14-15.
- Chang, C.J.; Walker, J.T. (1988) – Bacterial leaf scorch of northern red oak: isolation, cultivation, and pathogenicity of a xylem-limited bacterium. *Plant Disease*, 72: 730-733.
- Davis, M.J.; Raju, B.C.; Brlansky, R.H.; Lee, R. F.; Timmer, I. W.; Norris, R.C.; McCoy, R.E. (1983) – Periwinkle wilt bacterium: axenic culture, pathogenicity, and relationships to other gram-negative, xylem-inhabiting bacteria. *Phytopathology*, 73: 1510-1515.
- Freitag, J. H. (1951) – Host range of the Pierce's disease virus of grapes as determined by insect transmission. *Phytopathology*, 41: 920-934.
- French, W.J.; Christie, R.G.; Stassi, D.L. (1977) – Recovery of rickettsia-like bacteria by vacuum infiltration of peach tissues affected with phony diseases. *Phytopathology*, 67: 945-948.
- Goheen, A.C.; Nyland, G.; Lowe, S.K. (1973) – Association of rickettsia-like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. *Phytopathology*, 63: 341-345.
- Hopkins, D.L. (1988) – *Xylella fastidiosa*: a xylem-limited bacterial pathogen of plants. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 271-290.
- Hopkins, D.L.; Mollenhauer, H.H.; French, W.J. (1973) – Occurrence of a rickettsia-like bacterium in the xylem of peach trees with phony disease. *Phytopathology*, 63: 1422-1423.
- Hutchins, L.M.; Cochran, W.F.; Turner, W.F.; Weinberger, J.H. (1953) – Transmission of phony disease virus from tops of certain affected peach and plum trees. *Phytopathology*, 43: 691-696.
- Kostka, S.J.; Tattar, T.A.; Sherald, J.L.; Hurtt, S.S. (1986) – Mulberry leaf scorch, new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. *Plant Disease*, 70: 690-693.
- Leu, L.S.; Su, C.C. (1993) – Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease*, 77: 642-646.
- Minsavage, G.V.; Thompson, C.M.; Hopkins, D.L.; Leite, R.M.V.B.C.; Stall, R.E. (1994) – Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84: 456-461.
- Nyland, G.A.; Goheen, A.C.; Lowe, S.K.; Kirkpatrick, H.C. (1973) – The ultrastructure of a rickettsialike organism from a peach-tree affected with phony disease. *Phytopathology*, 63: 1275-1278.
- OEPP (1989) – Data sheets on quarantine organisms No. 166, *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bulletin*, 19: 677-682.
- EPPO (1990) – Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008.

- Purcell, A.H.; Frazier, N.W. (1985) – Habitats and dispersal of the principal leafhopper vectors of Pierce's disease bacterium in the San Joaquin Valley. *Hilgardia*, 53: 1-32.
- Raju, B.C.; Goheen, A.C.; Frazier, N.W. (1983) – Occurrence of Pierce's disease bacteria in plants and vectors in California. *Phytopathology*, 73, 1309-1313.
- Raju, B.C.; Wells, J.M. (1986) – Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. *Plant Disease*, 70: 182-186.
- Severin, H. H. P. (1949) – Transmission of the virus of Pierce's disease by leafhoppers. *Hilgardia*, 19: 190-202.
- Sherald, J.L.; Lei, J.D. (1991) – Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscaping trees. *Plant Disease*, 75: 200-203.
- Sherald, J.L.; Wells, J.M.; Hurtt, S.S.; Kostka, S.J. (1987) – Association of fastidious xylem-limited bacteria with leaf scorch in red maple. *Plant Disease*, 71: 930-933.
- Wells, J.M.; Raju, B.C.; Hung, H.Y.; Weisburg, W.G.; Mandelco-Paul, L.; Brenner, D.J. (1987) – *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov.: gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37: 136-143.
- Wells, J.M.; Raju, B.C.; Nyland, G. (1983) – Isolation, culture and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. *Phytopathology*, 73: 859-862.
- Yonce, C.E.; Chang, C.J. (1987) – Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA techniques. *Environmental Entomology*, 16: 68-71.

Realidade aumentada e modelos de conservação de espécies. Um futuro hoje!

Lúcia Nunes

Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Castelo Branco, Portugal
lfunes@ipcb.pt



Abstract

Augmented reality represents the future technology for autonomous or guided global knowledge about any subject is also used for environmental modelling obtaining immediate results after variable manipulation. Through augmented reality numerous applications for higher education are developed in the present study, dedicated to species of flora and fauna tagging identification as well as management of natural and artificial ecosystems.

Aria-Nature research project is developed with Aromi Lab. / Universidade Nova de Lisboa.

Resumo

A realidade aumentada constitui a ferramenta de futuro para o conhecimento global autónomo ou guiado de qualquer temática, para a modelação ambiental com manipulação de variáveis e resultados imediatos e para

inúmeras aplicações, neste presente estudo, dedicadas às espécies de flora e fauna e gestão de ecossistemas naturais ou artificiais.

O projecto Aria-Nature é desenvolvido em conjunto/integrado nos estudos de investigação do laboratório Aromi/Universidade Nova de Lisboa.

1- Introdução

Existem muitas maneiras diferentes de obter conhecimento sobre assuntos específicos. Esses métodos incluem palestras em sala de aula com livros didáticos, computadores, dispositivos portáteis e outros aparelhos electrónicos. A escolha da inovação na aprendizagem depende do acesso de um indivíduo a várias tecnologias e ao ambiente de infra-estruturas em torno do mesmo. Numa sociedade em rápida mudança, onde existe uma grande quantidade de informações e conhecimentos disponíveis, a adopção e aplicação de informações no momento certo e lugar certo é necessária para a maior eficiência na obtenção do conhecimento. A Realidade Aumentada (RA) é uma tecnologia de excelência na educação superior com aplicações ilimitadas em todas as áreas de estudo/experimentação a serem desenvolvidas no projecto Aria-Nature.

2. O que é a realidade aumentada

- Realidade aumentada (RA) ou (AR em inglês) consiste na integração de informações virtuais em visualizações do mundo real.
- Realidade Aumentada é uma tecnologia que permite que o mundo virtual seja misturado com o real, possibilitando maior interacção e abrindo uma nova dimensão na maneira como executamos tarefas.

Teve sua origem em algo muito simples as etiquetas informativas. Assim, foram criados os códigos 2D (duas dimensões) que permitiam o armazenamento de muito mais informação do que os códigos de barras. Os códigos bidimensionais são responsáveis pela possibilidade de projectar objectos virtuais numa filmagem do mundo real.

Para que a realidade aumentada funcione é necessário uma webcam ou outro dispositivo que permita a interpretação e criação de um objecto virtual.

Por meio da câmara, será transmitida a imagem que vai ser combinada com a animação. A partir daí entra em acção o software ou aplicativo capaz

de interpretar o sinal transmitido pela câmara. A imagem capturada será projectada com uma imagem em 3D previamente incluída no aplicativo responsável pela renderização das ilustrações.

Devido ao fato da câmara capturar as imagens em tempo real e misturá-las com animações, esta junção causa o efeito de realidade aumentada. A RA é utilizada combinando-se um código de duas dimensões com um programa de computador.

2.2. Os dispositivos para uso da realidade aumentada

A tecnologia utilizada para exibir o conteúdo aumentado como uma camada sobreposta ao ambiente real pode ser dividida em três categorias, (1) dispositivos móveis, como smartphone e tablet, (2) estacionários e (3) óculos. Os óculos de RA raramente são usados na educação superior, já que a tecnologia ainda é dispendiosa. Em contraste, os Smartphones de hoje, além da câmara e microfone, têm acesso a muitos outros sensores, como GPS, bússola e giroscópio, ou seja, ferramentas para criar AR bastante sofisticadas.

Essas divisões são agora úteis ao projectar e desenvolver recursos AR. No entanto, como tecnologia evolui rapidamente, os dispositivos futuros terão um número maior de sensores mais sofisticados para perceber o mundo real onde o conteúdo sobreposto deve ser apresentado, causando o número de categorias cada vez maiores e mais detalhadas.

2.3. A utilização de realidade aumentada na educação superior

A razão mais comum para RA permanecer nas periferias do ensino superior não é falta de interesse ou necessidade, mas sim uma falta geral de conhecimento sobre como trabalhar e aplicar a tecnologia.

O objectivo deste projecto é que a tecnologia seja capaz de se integrar perfeitamente com o ambiente de aprendizagem existente, em vez dos usuários terem que passar tempo a adaptarem-se a novas formas de aprender.

Como uma tecnologia emergente, é uma aposta segura que a RA começar a desempenhar um papel fundamental no local de trabalho, de modo que os estudantes envolvidos com este tipo de tecnologia irão configurar a tecnologia nas especialidades que pretendem desenvolver.

3. A Realidade aumentada nos modelos ambientais

A tecnologia RA permite um enorme avanço na gestão de ecossistemas e avaliação de variáveis assim como na análise do impacto da alteração dessas variáveis, especialmente quando o sistema pode ser usado através de serviços de internet.

O exemplo de visualização de um marteloscópio que se baseia em fotografias de planos com 360 ° (semelhante ao Google Streetview) é usado como plataforma de treino e comunicação para estudantes e profissionais. A tecnologia RA é sobreposta às imagens reais e serve para estudar os impactos na gestão florestal de plantações (Fig. 1). As áreas são mapeadas e inventariadas, e estudantes e profissionais podem marcar árvores para remoção com base em objetivos específicos de gestão florestal. O software calcula o resultado da intervenção e, assim, permite que os participantes avaliem diretamente as consequências da sua ação em poucos minutos.



Fig. 1 - Gestão florestal ao minuto com modelos de realidade aumentada

1. A realidade aumentada na gestão de espécies ameaçadas e habitats

O projecto Aria-Nature, tem como objetivo proporcionar conhecimento global das espécies de fauna e flora usando aplicações detalhadas de RA que permitem ao usuário identificar no campo diferentes tipos de aves que são categorizadas de forma muito detalhada. O acesso a estas aplicações permitem identificação completamente autónoma, sendo que podem mesmo funcionar sem acesso a internet (Fig 2).

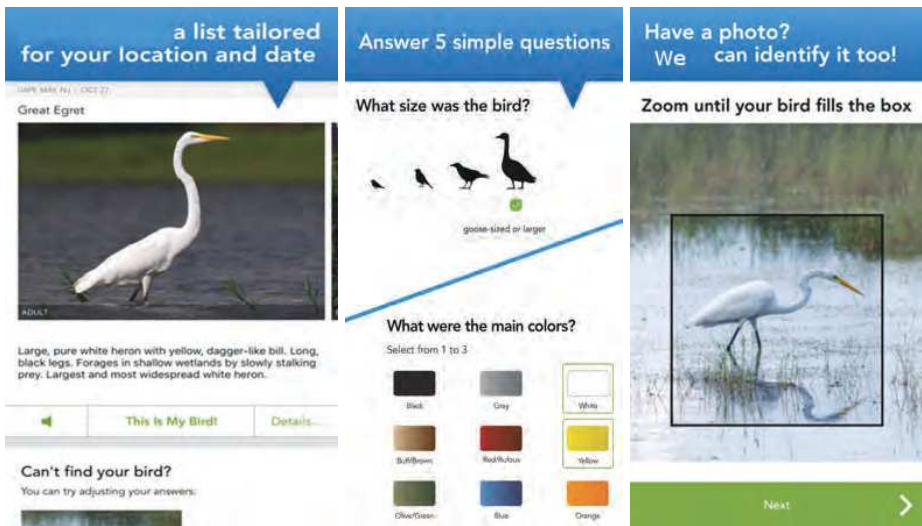


Fig. 2 - Aplicações RA para o conhecimento global das aves e seus habitats

O desenvolvimento de outras ferramentas de gestão ambiental, ao nível da conservação de espécies ameaçadas e ecossistemas artificializados (agricultura e plantações florestais, como referido no capítulo anterior) serão também contemplados:

1. Percursos em meio natural aprimorados com aplicativos de viagem (óculos RA) com a capacidade de fornecer informações relevantes no contexto e integradas na percepção do mundo físico.
2. Sistemas de recuperação de imagem móvel para identificar espécies, para que os usuários observem e identifiquem a fauna ou a flora ao ar livre na ausência de especialistas.
3. Aplicações de gestão ambiental onde um estudante de qualquer nível podem explorar como a instrução dos ecossistemas pode ser mais envolvente e eficaz combinando informações de RA e ecossistemas reais combinados com recursos/informações virtuais.
4. Um aplicativo de rastreamento móvel que integra informações geográficas e realidade aumentada móvel para rastrear a composição das espécies de árvores feito com câmaras em smartphones. A informação sobre a composição/variáveis manipuláveis virtualmente sobre um povoamento florestal ou uma cultura agrícola é sobreposta à imagem real. Esta é uma aplicação alternativa aos métodos clássicos para rastreio de variáveis ambientais.

4. Perspetivas no futuro da RA no ensino global

Para destacar os recursos e vantagens da RA, é necessário identificar características curriculares que podem ser oferecidas por esta tecnologia e que não são possíveis com outros meios de aprendizagem e ainda conceitos para revelar valores educacionais únicos para ambientes de aprendizagem RA. O trabalho de investigação que inclui análises aprofundadas de como os ambientes RA ajudam a aprender e ensinam a criar oportunidades importantes na educação, como sejam a contextualização da informação, são uma ajuda única apenas viável por esta tecnologia.

Bibliografia

- Azuma, R., Baillot, Y., Behringer, R., Feiner, S., Julier, S., & MacIntyre, B. (2001). Recent advances in augmented reality. *IEEE Computer Graphics and Applications*, 21(6), 34–47.
- Facer, K., Joiner, R., Stanton, D., Reid, J., Hull, R., & Kirk, D. (2004). Savannah: mobile gaming and learning? *Journal of Computer Assisted Learning*, 20, 399–409.
- Dunleavy, M., Dede, C., & Mitchell, R. (2009). Affordances and limitations of immersive participatory augmented reality simulations for teaching and learning. *Journal of Science Education and Technology*, 18(1), 7–22. <http://dx.doi.org/10.1007/s10956-008-9119-1>.
- El Sayed, N. A. M., Zayed, H. H., & Sharawy, M. I. (2011). ARSC: augmented reality student card – an augmented reality solution for the education field. *Computers & Education*, 56(4), 1045–1061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compedu.2010.10.019>.
- Klopfer, E. (2008). *Augmented learning: Research and design of mobile educational games*. Cambridge, MA: MIT Press.

Plant biotechnology research at the Faculty of Agriculture of the University of Szeged, Hungary

Tamás Monostori

University of Szeged Faculty of Agriculture. Hódmezővásárhely, Hungary

Abstract

Various techniques of plant biotechnology have been being applied in the last two decades in the plant cell and tissue culture lab of the Faculty of Agriculture of the University of Szeged. Students are regularly involved in the experimental work that is performed in close collaboration with the plant biotechnology lab of the Cereal Research Non-profit Ltd., Szeged. Some parts of the presented work were prepared at the IPB, Halle, Germany and at the TU Braunschweig, Germany.

The experimental fields are: isolated microspore cultures of small-grain cereals; *in vitro* micropropagation of horticultural crops; genetic transformation of small-grain cereals.

Isolated microspore culture of triticale and barley

Androgenesis-based production of doubled haploid (DH) varieties is commonly used to accelerate the breeding process of various crop species. In addition to the widely-used anther culture, isolated microspore cultures have several advantages such as offering a unicellular system of synchronized haploid cells being excellent targets for transformation as well as for studies on the biochemical and molecular background of embryogenesis.

Microspores of the late-uninucleate to early-binucleate stages were isolated from cold pre-treated spikes of five triticale genotypes by microblending. By the application of induction media of various hormone-composition (hormone-free; 2,4-D + kinetin; PAA) as well as a hormone-free regeneration medium, plants were regenerated and transferred into soil. Hormone-free induction medium had a positive impact on embryoid production, while its effect on green and albino plant regeneration was not sig-

nificant. The proportion of haploid regenerants was 90% here in contrast with microspore cultures of other cereals, where usually spontaneous dihaploid plants can be regenerated at high percentage. Fully or partially fertile triticale plants received after colchicine-treatment offer a proper material to be introduced into the traditional breeding process.

In microspore cultures of barley, androgenesis could be induced in media both with and without exogenous hormone-supplement. In contrast to triticale, however, the regeneration capacity of embryoids was significantly lower in hormone-free media.

These data suggest that androgenesis and plant regeneration are independent events with respect to hormone-requirement as well. Cold pre-treatment of spikes provides the signal which initiates and promotes embryogenesis in isolated microspores of both triticale and barley. The regeneration of plants, however, exhibits differences between genotypes and/or species regarding exogenous hormone-requirement.

Studies on in vitro propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*

In vitro propagation methods are frequently used for the conservation of rare cacti and to produce plants for commercial purposes. Micropropagation by axillary shoot proliferation was successfully applied in cactus species *Melocactus salvadorensis*, *Lobivia tegeleriana* and *Cereus jamacaru*. Addition of naphthaleneacetic acid (NAA) to the MS induction media supplemented with benzylaminopurine (BAP) had positive effect on shoot induction. A 50% reduction of basal salt, vitamin and sugar concentration of hormone-free MS medium helped vitrified or abnormal shoots of *C. jamacaru* to recover and significantly improved rooting rate. Hyperhydricity was frequently observed among adventitious shoots induced on secondary explants of *L. tegeleriana*, while it did not occur in *M. salvadorensis*.

Somatic callus cultures of *L. tegeleriana* have been generated to develop a plant – cell – plant system. This makes the manipulations on cell level and the production of somaclonal variants being interesting for cactus enthusiasts possible. Calli of granular structure were produced on MS medium containing 2,4-D and kinetin. Vigorously growing plantlets of normal morphology have been regenerated from primary calli if transferred to MS medium containing 2,4-D and kinetin, while plantlets regenerated on hormone-free MS medium grew slower and exhibited abnormal characteristics.

In vitro micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas*)

Methods of in vitro micropropagation based on the induction of axillary buds are continuously adapted for sweet potato genotypes of European importance. The established methods as well as the clones of in vitro origin give the basis to produce virus-free propagation material for commercial purposes, as well as for the foundation of an in vitro gene bank.

Genetic transformation studies in barley to introduce barley AOS1 and JIP23 cDNAs in sense and antisense direction via bombardment with a particle inflow gun

The comprehensive goal of the research program was to apply a transgenic approach for the studies on the role of jasmonates in the development of barley.

Novel plasmid vectors carrying the cDNAs coding for AOS1 or JIP23 from barley, either in sense or in antisense orientation under the control of the Ubi-1 promoter were prepared. AOS has a regulatory role in JA-biosynthesis, thus a modulation of endogenous jasmonate levels could be expected in AOS-transgenics. JIP23-transgenics could better elucidate the function of this jasmonate-induced protein being the most abundant in barley. Novel vector constructs were developed and shown to be functionally active based on the transient expression experiments, however, stable transgenic plants have not been produced until now.

Genetic transformation of wheat with barley AOS1 cDNA via particle bombardment with PDS-1000/He

Based on the homology of over 90% between the AOS sequences in the two species, barley AOS1 under the control of the 35S promoter was introduced into wheat by biolistic transformation of immature embryos. In the research, still in progress, the presence of the AOS cDNA as well as that of the bar selection marker gene was revealed in several lines of putative transgenic plants.

Genetic transformation of barley with LOX2:Hv:1 cDNA via particle bombardment with PDS-1000/He

Lipoxygenases (LOXs) catalyse the first step in the synthesis of fatty acid metabolism in plants. Metabolites of the LOX-pathway have been identified as compounds with antimicrobial activity, growth regulators, flavours and odours as well as signal molecules. The primary aim of the research was to study the lipoxygenase-dependent signal transduction pathway in a homologous system.

Immature scutella of barley were transformed with cDNA coding for a 13-lipoxygenase of barley (LOX-100) via particle bombardment. All transgenic plants were phenotypically indistinguishable from wild type plants and set seeds. Immunocytochemical assay showed the expression of the LOX cDNA either in the chloroplasts or in the cytosol, depending on the presence of the chloroplast signal peptide sequences in the vector construct. Analyses of oxylipin profiles showed higher levels of jasmonic acid for the lines displaying elevated levels of LOX-100.

References

- Monostori, T., Lantos, Cs., Mihály, R., Pauk, J., 2003. Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. *Cereal Research Communications* 31: 297-300.
- Monostori, T., Schulze, J., Sharma, V.K., Maucher, H., Wasternack, C., Hause, B., 2003. Novel plasmid vectors for homologous transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) with JIP23 cDNA in sense and antisense orientation. *Cereal Research Communications* 31: 17-24.
- Monostori, T., Tanács, L., Mile, L., 2012. Studies on in vitro propagation methods in cactus species of the genera *Melocactus*, *Cereus* and *Lobivia*. *Acta Horticulturae* 937: 255-261.
- Pauk, J., Mihály, R., Monostori, T., Puolimatka, M., 2003. Protocol of triticale (X *Triticosecale* Wittmack) microspore culture. In: K., Kasha, M., Maluszynski (eds): *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 129-134.
- Pauk, J., Puolimatka, M., Lökös Tóth, K., Monostori, T., 2000. In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 221-229.
- Sharma, V.K., Monostori, T., Göbel, C., Hänsch, R., Bittner, F., Wasternack, C., Feussner, I., Mendel, R.R., Hause, B., Schulze, J., 2006. Transgenic barley plants overexpressing a 13-lipoxygenase to modify oxylipin signature. *Phytochemistry* 67: 264-276.

