

INTERAÇÕES PATÓGENO/HOSPEDEIRO E O POTENCIAL DAS TÉCNICAS DE SELEÇÃO *IN VITRO* NA OBTENÇÃO DE PLANTAS RESISTENTES A MOLÉSTIAS

ROSA LÍA BARBIERI¹, CRISTINE LUISE HANDEL²

RESUMO- Os patógenos estabelecem com as plantas complexos padrões de interações, os quais podem ser compatíveis ou não. Considerando as diferentes plantas que suprem as necessidades alimentares humanas diariamente, e as moléstias causadas por vírus, bactérias, fungos e nematóides que podem atacá-las, é possível perceber que o número de combinações patógeno/hospedeiro que pode ocorrer é muito grande. Além disso, a troca de alimento entre regiões (introduções) e a monocultura intensiva auxiliaram na disseminação e evolução destas combinações. Com o avanço das técnicas de cultura de tecidos, que permitem controle ambiental e análise de grande quantidade de material genético em pequeno espaço, existe maior facilidade na análise das interações patógeno/hospedeiro, auxiliando programas de melhoramento genético no desenvolvimento de cultivares resistentes a moléstias.

Palavras-chave: fitotoxina, cultura de tecido, resistência a estresses bióticos.

HOST/PATHOGEN INTERACTIONS AND POTENTIAL OF *IN VITRO* SELECTION TECHNIQUES TO OBTAIN DISEASE RESISTANT PLANTS

ABSTRACT- Pathogens establish complex interactions patterns with plants, which can be compatible or not. Considering the different plants which daily supply human needs, and all diseases caused by viruses, bacteria, fungi and nematodes which can cause damage to these plants, the number of host/pathogen combinations is immense. Besides that, the exchange of plants between different regions and the intensive system of agriculture helped the dissemination and evolution of these combinations. Tissue culture techniques, which provide a efficient control of the environment conditions, and turn possible to analyze a wide number of genetic material in restrict space, can help the study of host/pathogen interactions, and breeding programs on the development of disease-resistant plants.

Key words: fitotoxins, tissue culture, biotic stresses resistance.

INTRODUÇÃO

Para tornar mais ágil e eficiente a obtenção de cultivares resistentes a moléstias, em programas de melhoramento a campo, é necessário o conhecimento aprofundado da genética que rege o controle do patógeno. Assim, o melhorista tem condições de manipular constituições genéticas que evidenciem um acentuado controle sobre o desenvolvimento do patógeno. Há casos em que a análise da interação patógeno/hospedeiro é dificultada pela presença de múltiplas variáveis, entre as quais se inclui o ambiente, o patógeno e a própria planta. O uso de técnicas de seleção *in vitro* facilita e agiliza bastante tanto o conhecimento da constituição genética como a seleção de genótipos de plantas resistentes, visto que possibilita um acentuado controle sobre o ambiente e sobre a variabilidade do patógeno.

DESENVOLVIMENTO

1. Interação patógeno/hospedeiro

Segundo o *Committee on Technical Words* (1940) e a *Federation of British Plant Pathologists* (1973), citados por ALEXANDER (1993), o termo resistência pode ser conceituado como "a habilidade que um organismo possui de se defender ou se opor à ação de um fator prejudicial ou patogênico". Esta ampla definição inclui tanto o efeito da planta no atraso do desenvolvimento do patógeno, como a capacidade que a planta tem de funcionar normalmente apesar de altos níveis de moléstia.

De modo geral as populações naturais de plantas são polimórficas para resistência à ação dos diversos patógenos. A efetividade desta resistência é limitada porque os patógenos, por sua vez, também são

1. Biol., M.Sc. - Estudante do Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Faculdade de Agronomia, Departamento de Plantas de Lavoura, Caixa Postal 776, 90001-970 Porto Alegre-RS/BRASIL.
2. Eng. Agr., M.Sc. em Fitotecnia - Bolsista Recém Mestre da FAPERGS.
Recebido para publicação em 29/08/1995.

polimórficos para a virulência, e podem escapar da resistência da planta. Estes polimorfismos parecem ser mantidos por contínuos ciclos de coevolução dentro das populações, combinado com ocasional fluxo de novos genes de resistência e de virulência vindos de populações distantes (FRANK, 1992). Antes da intervenção do homem, as associações parasíticas fungo/planta estavam confinadas a comunidades restritas. Mediadas inadvertidamente pela ação do homem desde tempos pré-históricos, através da agricultura, exploração e introdução de plantas, estas associações mostraram ser capazes de rápida disseminação através dos continentes, com subsequente evolução de comunidades patogênicas (DICK, 1988).

As interações entre as plantas e os patógenos podem ser agrupadas em compatíveis, quando o hospedeiro é suscetível e o patógeno é virulento, ou incompatíveis, quando o hospedeiro é resistente e o patógeno é avirulento (LINDSAY et al., 1993). Apesar de, normalmente, as plantas serem resistentes à maioria dos patógenos, por possuírem um amplo arranjo de componentes constitutivos de defesa e/ou bloquearem fisicamente a entrada de microrganismos, muitas plantas cultivadas são suscetíveis a um determinado número de patógenos capazes de causar enormes perdas na produtividade. Além da constante coevolução patógeno/hospedeiro, particularmente em face da pressão de seleção exercida pela monocultura, existe também a possibilidade de que interações incompatíveis planta/patógeno evoluam para interações compatíveis (CHASAN, 1994). Há exemplos clássicos de devastações em culturas provocadas por patógenos, principalmente por fungos. Um deles é o caso da epidemia que dizimou as plantações de batata na Europa, no século XIX, pelo fungo *Phytophthora infestans*, causando ampla carestia e precipitando ondas de emigração na Irlanda e outros países. Para plantas de reprodução vegetativa, o patógeno passa diretamente de uma geração para outra, causando perda gradual de rendimento e/ou qualidade. Isto pode fazer com que variedades altamente produtivas de batata, ou outras plantas de reprodução vegetativa deixem de ser utilizadas. Atualmente as moléstias causadas por fungos permanecem como um dos principais fatores limitantes para a produtividade das culturas através do mundo (LAMB et al., 1992).

A análise genética das interações incompatíveis patógeno/hospedeiro revelou que elas podem ser colocadas em duas categorias distintas, baseado em suas propriedades genéticas (BRIGGS e JOHAL, 1994). Uma das categorias é a relação gene-a-gene, descrita por FLOR (1946), onde a incompatibilidade acontece quando uma planta possui um gene dominante de resistência que corresponde a um gene de avirulência (*avr*) em um determinado patógeno. A resposta de defesa, que

previne a infecção, se dá a partir do momento em que a planta "reconhece" um particular produto do patógeno controlado pelo gene *avr*. Estes produtos do gene *avr* implicados na percepção do ataque pela planta abrangem um grupo de moléculas coletivamente chamadas de *elicitors*. Após terem detectado a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque através da indução de proteínas de defesa. Estas proteínas inibem o desenvolvimento do patógeno através de alguns mecanismos, como a digestão das paredes celulares do fungo, a fortificação das paredes celulares da planta e/ou a biossíntese de compostos antimicrobianos, as fitoalexinas. Frequentemente a primeira reação de defesa é a resposta hipersensível, que envolve uma necrose localizada devido à morte rápida de poucas células ao redor do local da penetração, as quais liberam compostos antimicrobianos (LINDSAY et al., 1993). Para um patógeno vencer esta resistência, deve perder a função do gene *avr* (CHASAN, 1994). Na segunda categoria de interação incompatível, a planta é capaz de prevenir a atividade dos fatores de compatibilidade, produzidos pelo patógeno, que são necessários para que ele invada o hospedeiro, tais como as toxinas. Neste caso, uma perda da função do gene não poderia tornar o patógeno infeccioso; somente o ganho de um novo fator de compatibilidade poderia fazê-lo (BRIGGS e JOHAL, 1994). O primeiro gene de resistência que foi clonado em plantas, o *Hm1* do milho, participa de uma interação deste tipo (JOHAL e BRIGGS, 1992). O produto deste gene é uma redutase que inativa a toxina HC, um tetrapeptídeo cíclico produzido por raças do fungo *Cochliobolus carbonum* (forma perfeita de *Helminthosporium carbonum*), patogênico no milho que porta o gene *Hm1*, e que é necessária para o sucesso da infecção (CHASAN, 1994).

Fitotoxinas, representando diversas classes de compostos químicos, têm sido isoladas de bactérias e fungos fitopatogênicos, sendo suas estruturas bem caracterizadas (STROBEL, 1974). Muitos fungos necrotróficos secretam toxinas capazes de rápida difusão através dos tecidos do hospedeiro, ativando muitas das respostas de defesa da planta. Tais fitotoxinas podem ser consideradas como *hyperelicitors*, provocando as respostas de resistência no avanço do fungo. Além disso, a ligação de fitotoxinas e *elicitors* às células da planta parece acontecer de forma semelhante (BELL, 1981). Por exemplo, *Helminthosporium sacchari* produz a toxina helminthosporoside, que, parcialmente purificada, se liga mais rapidamente e em maiores quantidades à membrana plasmática de cultivares de cana-de-açúcar suscetíveis do que à membrana de cultivares resistentes. A ligação é intermediária em cultivares com níveis médios de resistência (STROBEL, 1979).

2. Técnicas de seleção *in vitro* aplicadas à interação patógeno/hospedeiro

A cultura de tecidos é uma alternativa que vem sendo muito utilizada no estudo das interações patógeno/hospedeiro e no desenvolvimento de cultivares resistentes a moléstias, bem como em outros trabalhos na área de melhoramento de plantas (produção de plantas haplóides, variedades resistentes a estresses abióticos, plantas transgênicas, plantas livres de vírus por cultivo de meristemas). Uma grande vantagem que esta técnica oferece é a possibilidade de se controlar os efeitos da variável ambiente, visto que em estudos a campo a precisão geralmente é reduzida pela variação entre locais e por flutuações climáticas de ano a ano. Além disto, culturas *in vitro* permitem a utilização de um grande número de genótipos ao longo do ano, e em um espaço relativamente pequeno (WOLF e EARLE, 1990).

Trabalhos envolvendo resistência a moléstias *in vitro* incluem o uso de calos e protoplastos, sendo utilizados diversos tipos de agentes seletivos: toxinas produzidas pelo patógeno, total ou parcialmente purificadas, filtrados de culturas do organismo, e até mesmo o próprio patógeno. As toxinas têm sido bastante utilizadas devido à sua simplicidade - uma simples molécula ao invés de um organismo - e pela possibilidade de conseguir expor todas as células a uma dosagem uniforme, o que é praticamente impossível quando o patógeno é usado como agente seletivo (DAUB, 1984).

A correlação entre a resistência a um patógeno e a resistência à sua toxina é um pré-requisito fundamental para o uso de fitotoxinas (BEHNKE, 1980). A associação da fitotoxina com o processo da moléstia tem sido feito, em vários casos, por isolamento da toxina do tecido infectado, e correlação entre a patogenicidade do organismo e a sua produção de toxina (STROBEL, 1974). LUKE e WHEELER (1955) foram os primeiros a usar fitotoxinas em estudos de resistência, selecionando aveia através do uso da toxina de *Helminthosporium victoriae*. A seleção com esta toxina, denominada victorina, demonstrou que a resistência ao patógeno pode ser selecionada em culturas de tecido de aveia (RINES e LUKE, 1985; HANDEL, 1996).

Diversos trabalhos envolvendo seleção *in vitro* para resistência a moléstias vêm sendo desenvolvidos desde a década de 70. Plantas de alfafa regeneradas a partir de cultura de tecidos foram avaliadas para resistência a filtrados tóxicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* e para resistência ao próprio patógeno, havendo uma alta correlação entre elas (ARCIONI et al., 1987). Plantas de trigo e de cevada regeneradas de calos que sobreviveram ao tratamento com filtrados tóxicos de *Helminthosporium sativum* submetidas a testes *in vivo* com o patógeno apresentaram também uma menor sensibilidade à presença do organismo

(CHAWLA e WENZEL, 1987). O uso de filtrados de *H. sativum* em calos jovens de trigo é uma metodologia adequada para identificar e selecionar genótipos resistentes à moléstia causada pelo fungo, através da avaliação do crescimento dos calos, que permite com precisão distinguir os genótipos em relação à sua reação ao patógeno (CRISTALDO, 1993; BARBIERI, 1995).

Foi obtido sucesso para resistência a moléstias em trabalhos que utilizaram filtrados tóxicos de *Phytophthora infestans* em calos de batata (BEHNKE, 1979; BEHNKE, 1980) e filtrados de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em calos de pêssego (HAMMERSCHLAG, 1988).

Também foi realizada seleção com a toxina de *Drechslera maydis* em calos de milho (BRETTEL et al., 1980), as toxinas de *Pseudomonas syringae* e *Alternaria alternata* em protoplastos de fumo (THANUTONG et al., 1983), a toxina de *Fusarium oxysporum* em calos e protoplastos de tomate (SHAHIN e SPIVEY, 1986), a toxina de *Phoma lingam* em colza (SJODIN e GLIMELIUS, 1989) e a toxina de *H. carbonum* em milho (WOLF e EARLE, 1990).

Utilizando o patógeno *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* em culturas de calos de fumo, DEATON et al. (1982) concluíram que a expressão da moléstia *in vitro* parece estar amplamente correlacionada com sua expressão ao nível global da planta.

Filtrados tóxicos de *Fusarium eumartii* aplicados a plantas adultas e plântulas de batata cultivadas *in vitro* induziram sintomas similares àqueles provocados pelo fungo em si (BOTTA et al., 1994). MENDES et al. (1994) utilizaram filtrados tóxicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* em calos derivados de ápices meristemáticos de bananeira com o objetivo de avaliar a resposta da planta ao fungo. Os autores salientam a possibilidade da utilização de técnicas semelhantes para determinar a patogenicidade de isolados, a resposta bioquímica do hospedeiro às substâncias tóxicas produzidas pelo patógeno, além de selecionar para resistência a moléstias.

CONCLUSÕES

As fitotoxinas, especialmente as que são específicas a determinados hospedeiros, têm provado ser muito úteis na análise das interações patógeno/hospedeiro. As toxinas também parecem ter utilidade em alguns estudos das atividades de plantas sadias, sem mencionar sua grande importância em programas de melhoramento, na realização de *screening* de plantas a serem selecionadas.

As técnicas de seleção *in vitro* apresentam a grande vantagem de possibilitar um controle das variáveis de ambiente, principalmente evitando que outros microrganismos entrem em contato com as plantas tes-

tadas, o que poderia mascarar o efeito do patógeno em questão. Além de proporcionar uma forma eficiente de selecionar genótipos resistentes, o uso de técnicas de seleção *in vitro* é bastante adequado para a realização de análises da interação patógeno/hospedeiro.

Para explorar o potencial atual da técnica e possibilitar sua futura ampliação, é necessário conhecer profundamente o processo de formação de calos da espécie em questão, e a produção de metabólitos pelo patógeno que possam ser utilizados como fator de seleção. Em espécies como o trigo, onde há formação de calos bastante homogêneos e embriogênicos, esta técnica é bastante eficiente, enquanto que em culturas como a aveia, com formação de calos desuniformes, surgem várias limitações na análise dos resultados. É essencial também que a reação apresentada pelo hospedeiro a este metabólito *in vitro* tenha correlação com a reação à moléstia causada pelo patógeno *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALEXANDER, H.M. Evolution of disease resistance in natural plant populations. In: FRITZ, R.S.; SIMMS, E.L. **Plant resistance to herbivores and pathogens**. Chicago: University of Chicago, 1993. p. 326-344.
- ARCIONI, S.; PEZZOTTI, M.; DAMIANI, F. In vitro selection of alfalfa plants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 700-705, 1987.
- BARBIERI, R.L. **Genética da resistência ao *Helminthosporium sativum* em trigo: uso de filtrados tóxicos em cultura de tecidos**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 47p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Departamento de Plantas de Lavoura e Departamento de Genética, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995.
- BEHNKE, M. Selection of potato callus for resistance to culture filtrates of *Pyrenophora infestans* and regeneration of resistant plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 35, p. 69-71, 1979.
- BEHNKE, M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Pyrenophora infestans*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 56, p. 151-152, 1980.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 32, p. 21-81, 1981.
- BOTTA, G.L.; DIMARCO, M.P.; MELEGARI, A.L.; HUARTE, M.A.; BARASSI, C.A. Potencial of a *Fusarium eumartii* culture filtrate on the screening for wilting resistance in potato. **Euphytica**, Wageningen, v. 80, p. 63-69, 1994.
- BRETTEL, R.I. S.; THOMAS, E.; INGRAM, D.S. Reversion of male-sterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 58, p. 55-58, 1980.
- BRIGGS, S.P.; JOHAL, G.S. Genetic patterns of plant host-parasite interactions. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 10, p. 12-16, 1994.
- CHASAN, R. Plant-pathogen encounters Edinburgh: meeting report. **The Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 1332-1341, 1994.
- CHAWLA, H.S.; WENZEL, G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 74, p. 841-845, 1987.
- CRISTALDO, R.M.L.O. Uso de filtrados tóxicos para avaliar a resistência ao fungo *Helminthosporium sativum* em trigos hexaplóides *in vitro*. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 129p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1993.
- DAUB, M.E. A cell culture approach for the development of disease resistance: studies on the phytotoxin cercosporium. **Hortscience**, St. Joseph, v. 19, p. 382-387, 1984.
- DE MAYO, P.; WILLIAMS, R.E.; SEMAL, J. Helminthosporal, the toxin from *Helminthosporium sativum*. 1: isolation and characterization. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 39, p. 1600-1612, 1961.
- DEATON, W.R.; KEYES, G.J.; COLLINS, G.S. Expressed resistance to black shank among tobacco callus cultures. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 63, p. 65-70, 1982.
- DICK, M.W. Coevolution in the heterokont fungi (with emphasis on the downy mildews and their angiosperm hosts). In: PIROZYNSKI, K.A.; HAWKSWORTH, D.L. **Coevolution of fungi with plants and animals**. London: Academic, 1988. p. 31-62.
- FLOR, H. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Journal of Agricultural Research**, Washington D.C., v. 73, p. 335-357, 1946.
- FRANK, S.A. Models of plant-pathogen coevolution. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 8, p. 213-219, 1992.
- HAMMERSCHLAG, F.A. Selection of peach cells for insensitivity to culture filtrates of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and regeneration of resistant plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 76, p. 865-869, 1988.
- HANDEL, C.L. Avaliação *in vitro* da resistência à helmintosporiose em aveia através do uso de filtrados tóxicos do fungo e do inseticida Methomyl. Porto Alegre: UFRGS, 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1996.
- JOHAL, G.S.; BRIGGS, S.P. Reductase activity encoded by the *Hml* disease resistance gene in maize. **Science**, Massachusetts, v. 258, p. 985-987, 1992.
- LAMB, C.J.; RYALS, J.A.; WARD, E.R.; DIXON, A. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 1446-1445, 1992.
- LINDSAY, W.P.; LAMB, C.J.; DIXON, R.A. Microbial recognition and activation of defense systems. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 1, p. 181-186, 1993.
- LUKE, H.H.; WHEELER, H.E. Toxin production by *Helminthosporium victoriae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p. 453-458, 1955.
- MENDES, B.M.J.; RODRIGUES, B.I.P.; TULLMAN NETO, A. Effect of toxic filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp.

- cubense* on the development of banana (*Musa* spp.) shoot tips. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 194-198, 1994.
- RINES, H.W.; LUKE, H.H. Selection and regeneration of toxin-insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 71, p. 16-21, 1985.
- SHAHIN, E.A.; SPIVEY, R. A single dominant gene for *Fusarium* wilt resistance in protoplast-derived tomato plants. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 73, p. 164-169, 1986.
- SJODIN, C.; GLIMELIUS, K. Transfer of resistance against *Phoma lingam* to *Brassica napus* by asymmetric somatic hybridization combined with toxin selection. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 78, p. 513-520, 1989.
- STOESSL, A. Structure and biogenetic relations: fungal nonhost-specific. In: DURBIN, R.D. **Toxins in plant disease**. New York: Academic Press, 1981. p. 110-219.
- STROBEL, G.A. Phytotoxins produced by plants parasites. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.25, p. 541-566, 1974.
- STROBEL, G.A. The relationship between membrane ATPase activity in sugarcane and heat-induced resistance to helminthosporoside. **Biochemical and Biophysical Acta**, Amsterdam, v. 554, p. 460-468, 1979.
- THANUTONG, P.; FURUSAWA, I.; YAMAMOTO, M. Resistant tobacco plants from protoplasts-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 66, p. 209-215, 1983.
- WOLF, S.J.; EARLE, E.D. Inhibition of corn callus growth by *Helminthosporium carbonum* race 1 toxin. **Crop Science**, Madison, v. 30, p. 728-734, 1990.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Professores Fernando Irajá Félix de Carvalho e Luiz Carlos Federizzi pela orientação e estímulo constantes.