



## O USO DA BIOTECNOLOGIA NO ESTUDO DE DOENÇAS DA FLORESTA

A biotecnologia vegetal permite a criação de ferramentas laboratoriais para agilizar a investigação em doenças da floresta. As culturas *in vitro* de rebentos de pinheiro são usadas no estudo bioquímico da doença da murchidão do pinheiro, causada pelo nemátode da madeira do pinheiro.

Jorge M. S. Faria<sup>1,2</sup>, Margarida T. Santos<sup>1</sup>, Filomena Nóbrega<sup>1</sup>, Margarida Espada<sup>3</sup> e Maria Lurdes Inácio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



<sup>2</sup> GREEN-IT Bioresources for Sustainability, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa (ITQB NOVA)



<sup>3</sup> Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento (MED), Universidade de Évora



A massificação e simplificação do transporte intercontinental de mercadorias têm evoluído muito rapidamente, impulsionadas por uma intensa procura e por uma dispersão dos locais de produção, gerando a multiplicação dos percursos de ligação. Verifica-se que estas vias são muitas vezes utilizadas oportunisticamente como rotas de dispersão por agentes parasitas de plantas, levando a um considerável aumento de episódios de novas infestações e infeções. Os sistemas florestais são particularmente afetados, tendo sido alvo de inúmeros ataques por agentes nocivos, como insetos fitófagos, bactérias, fungos ou nemátodes fitoparasitas. Embora a investigação procure acompanhar esta rápida evolução, os avanços científicos e tecnológicos disponíveis para o estudo das doenças da floresta são condicionados pelas limitações inerentes à experimentação em condições naturais com plantas lenhosas. Em muitos casos, os ensaios no campo com parasitas de quarentena estão interditos, enquanto que noutros casos são profundamente influenciados por variações ambientais, como a presença de outros fitoparasitas, alterações ambientais e de condições edáficas (variação no solo) ou outras alterações bióticas ou abióticas de difícil identificação ou controlo. Estas condicionantes podem ser reduzidas ao transitar-se para uma escala mais controlada de estufa, mas, nestes casos, a variabilidade genética no hospedeiro torna difícil isolar a causalidade na resposta às condições impostas, em ensaios com um grande número de indivíduos.

### **A biotecnologia vegetal e o nemátode da madeira do pinheiro**

A aplicação da biotecnologia à investigação de soluções para doenças da floresta permitiu ultrapassar algumas das limitações dos ensaios em estufa e das condições naturais. O desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas impulsionou o estudo mais aprofundado dos mecanismos moleculares de infeção e a análise de novos meios de proteção.

A biotecnologia vegetal fundamenta-se no conceito da totipotência, ou seja, na capacidade de uma célula vegetal se poder diferenciar em qualquer outra

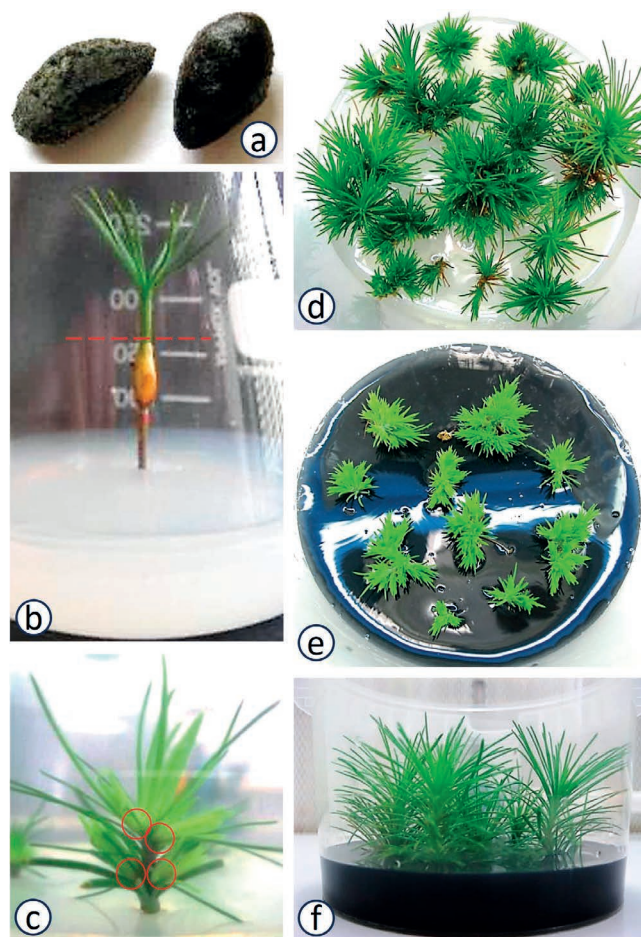
célula da planta e, em última análise, dar origem a uma réplica da planta original. Com a descoberta dos efeitos fitorreguladores de algumas substâncias químicas, foi possível estabelecer-se um conjunto variado de culturas *in vitro* com a potencialidade de poder adaptar-se ao objeto de estudo. Um exemplo da aplicabilidade das culturas *in vitro* a uma doença florestal, causada por um agente patogénico recentemente introduzido no nosso país, foi a criação de coculturas hospedeiro/fitoparasita com o nemátode da madeira do pinheiro (NMP).

O NMP [*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner 1934) Nickle 1981] é um fitoparasita agressivo que infeta espécies suscetíveis de coníferas, principalmente espécies de pinheiro (*Pinus*), e que se acredita ser originário da América do Norte, onde não provoca a doença da murchidão do pinheiro (DMP) por ter coevoluído com as árvores autóctones. No entanto, após a sua introdução nas florestas de pinheiros suscetíveis dos países asiáticos, no início do século XX, o NMP instalou-se e proliferou, dispersando-se largamente pelo Japão, China e Coreia. Volvidos cerca de 100 anos, foi identificado pela primeira vez na Europa, na zona de Setúbal, em Portugal. Desde então, e apesar das pesadas medidas de contenção impostas, o NMP dispersou-se pelo nosso país, tendo inclusivamente sido detetado na ilha da Madeira e em focos isolados em florestas limítrofes espanholas. A sua monitorização e controlo são ainda bastante morosos e mobilizam recursos económicos e humanos consideráveis.

O estabelecimento de culturas *in vitro* de rebentos de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), a espécie maioritariamente afetada no nosso país, permitiu uma mais rápida e fácil caracterização estrutural dos mecanismos de infeção do NMP numa condição laboratorial que simula a doença em condições naturais. A criação das coculturas é iniciada pela germinação de sementes certificadas de *Pinus pinaster* em condições de assepsia (ausência de microrganismos contaminantes) (Figura 1). A parte aérea é depois transferida para meio de cultura rico em nutrientes essenciais à planta, e suplementado com as hormonas vegetais que estimulam a multiplicação celular e originam novos rebentos, clones do

pinheiro original. Desta forma, é possível desenvolver um “pinhal” miniaturizado de plantas clonadas dentro de um contentor plástico reutilizável.

Após a infecção com o NMP, é possível estabelecer uma cocultura, onde se pode recriar *in vitro* a sintomatologia da DMP, nomeadamente o acastanhamento e prostração das agulhas do pinheiro, apesar da condição hídrica não limitante da cultura *in vitro* (Figura 2). Nestas coculturas, após um notório aumento na população de NMP, recorre-se à microscopia para determinar o impacto nos tecidos

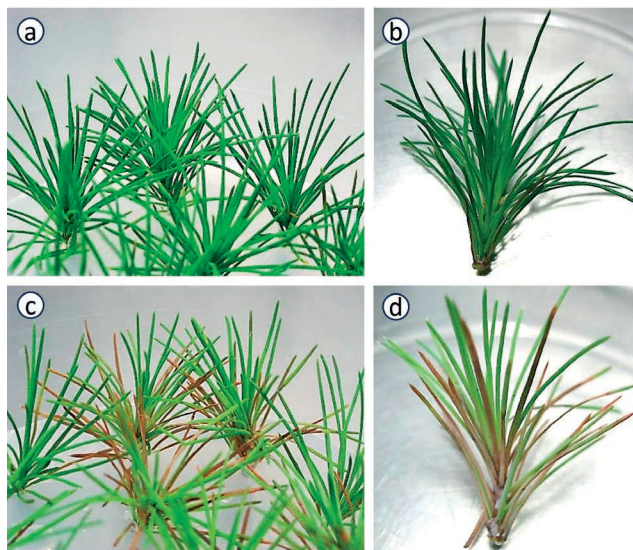


**Figura 1** – Metodologia para a obtenção de culturas *in vitro* de pinheiro. As sementes são esterilizadas (a) e germinadas em assepsia (b), a parte aérea do germinante é depois seccionada e transferida para meio de cultura suplementado com hormonas vegetais, promovendo a multiplicação de rebentos (c). Os rebentos podem ser transferidos para novo meio de multiplicação (d) e/ou então para meio de alongamento, sem hormonas (e), que promove o alongamento do caule (f).

internos dos rebentos de pinheiro *in vitro*. Dentro dos rebentos, os NMP são observados a alimentar-se nos tecidos mais frágeis e nas zonas intersticiais, onde induzem a formação de cavidades.

## A biotecnologia vegetal e a despistagem de bionematodidas

Uma vez estabelecida a cocultura, pode passar-se à despistagem de compostos que apresentem atividade contra o NMP e ausência de toxicidade para o pinheiro hospedeiro. Recorrendo a ensaios prévios de contacto direto, foi possível identificar fitoquímicos com elevada atividade nematodocida e, por conseguinte, com potencial para o desenvolvimento de bionematodidas. Estes fitoquímicos foram testados nas coculturas já estabelecidas, o que permitiu a sua avaliação numa condição de infecção controlada em contexto laboratorial, efetivamente validando o uso destas coculturas como ferramentas biotecnológicas com potencial para a indústria fitofarmacêutica e de desenvolvimento de pesticidas.



**Figura 2** – Estabelecimento de coculturas *in vitro* de rebentos de pinheiro com o nemátode da madeira do pinheiro. Na ausência do fitoparasita, as microagulhas dos rebentos de pinheiro são verdes e eretas (a, b), mas quando os nemátodes são adicionados, algumas agulhas começam a adquirir uma cor amarela-acastanhada e ficam prostradas (c, d), uma condição que, eventualmente, se alastra a todo o rebento, causando a sua morte.

Esta investigação permitiu rapidamente concluir que misturas de fitoquímicos com elevadas proporções de carvacrol, um terpeno volátil, não são adequadas para o desenvolvimento de bionematodidas contra a doença da murchidão do pinheiro, mas misturas ricas em 2-undecanona, um produto natural proveniente do óleo essencial de arruda, permitem controlar as populações do fitoparasita sem prejudicar o pinheiro hospedeiro.

### **A biotecnologia vegetal na validação de novas estratégias de gestão sustentável**

O projeto NemaWAARS, resultante de uma parceria entre a Universidade de Évora (NemaLab) e o INIAV (NemaINIAV), encontra-se em curso, tendo por objetivo compreender os mecanismos de regulação da expressão de genes de parasitismo no NMP e, através da sua disrupção, controlar os mecanismos que levam à sua virulência no pinheiro em condições naturais. O recurso às coculturas *in vitro* vai permitir perceber se a disrupção induzida foi bem-sucedida, imediatamente a jusante do processo, sem se recorrer a extensos ensaios de estufa, que mobilizam consideráveis recursos humanos e económicos. Através do ambiente *in vitro*, este procedimento e a sua validação podem ser realizados no laboratório em tempo real. No contexto deste projeto, foram já estabelecidas culturas *in vitro* de rebentos de várias espécies de pinheiros importantes na Europa e na região mediterrânica, em particular *P. pinaster*, o pinheiro-bravo que pode apresentar variabilidade na suscetibilidade à doença da murchidão do pinheiro, *P. pinea*, o pinheiro manso, com grande importância nacional por produzir o pinhão comercializado, *P. sylvestris*, o pinheiro-de-casquinha, muito comum nas florestas de coníferas na Europa, e *P. brutia*, o pinheiro-da-Calábria.

Todo o trabalho desenvolvido em torno da criação e manutenção destas ferramentas biotecnológicas contribui para a agilização da gestão sustentável da doença da murchidão do pinheiro que tantos danos causa ao pinhal português e à economia do país. ☺

### **Agradecimentos**

Os autores desejam agradecer a João Costa Nunes (INIAV) e Ana Cristina Figueiredo (CESAM/FCUL) pela assistência técnica, ao Centro Nacional de Sementes Florestais (CENASEF) e ao Centro de Estudos da Floresta (CEF) pelo apoio. Esta investigação foi parcialmente financiada pelos projectos NemaACT (2022.00359.CEECIND; DOI 10.54499/2022.00359.CEECIND/CP1737/CT0002), CEECIND/00066/2018 (DOI 10.54499/CEECIND/00066/2018/CP1560/CT0003) e NemaWAARS (PTDC/ASP-PLA/1108/2021; DOI 10.54499/PTDC/ASP-PLA/1108/2021), através de fundos da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

### **Bibliografia**

- Faria, J.M.S.; Rodrigues, A.M.; Sena, I.; Moiteiro, C.; Bennett, R.N.; Mota, M. et al. (2016). Bioactivity of *Ruta graveolens* and *Satureja montana* essential oils on *Solanum tuberosum* hairy roots and *Solanum tuberosum* hairy roots with *Meloidogyne chitwoodi* co-cultures. *J Agric Food Chem.*, **64**:7452–7458.
- Faria, J.M.S.; Sena, I.; Vieira da Silva, I.; Ribeiro, B.; Barbosa, P.; Ascensão, L., et al. (2015). In vitro co-cultures of *Pinus pinaster* with *Bursaphelenchus xylophilus*: a biotechnological approach to study pine wilt disease. *Planta*, **241**:1325–1336.
- Faria, J.M.S.; Barbosa, P.; Bennett, R.N.; Mota, M.; Figueiredo, A.C. (2013). Bioactivity against *Bursaphelenchus xylophilus*: Nematotoxics from essential oils, essential oils fractions and decoction waters. *Phytochemistry*, **94**:220–228.
- Mota, M.; Braasch, H.; Bravo, M.A.; Penas, A.C.; Burgermeister, W.; Metge, K. & Sousa, E. (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology*, **1**:727–734.