



**FIG. 1 - Estratégia de melhoramento genético para pimenta-do-reino visando a obtenção de mutantes em pimenta-do-reino através de irradiação gama na fonte de  $^{60}\text{Co}$ .**

etapas de multiplicação do material proveniente de sementes são realizadas através da cultura de tecidos. As sementes são germinadas *in vitro* e os ápices caulinares usados para a micropropagação. Representantes de cada planta serão mantidos *in vitro* e multiplicados após a seleção.

Esta metodologia foi baseada em ensaios anteriores, iniciados por Ando *et al* (1977) com objetivo de obter mutantes resistentes à fusariose através de irradiação gama. Assim utilizou-se 428 estacas da cultivar Cingapura que foram irradiadas no CENA/USP utilizando as dosagens já descritas acima. Após

**SELEÇÃO DE MATERIAL RESISTENTE DE PIMENTA-DO-REINO ATRAVÉS DE CULTURA DE TECIDOS.** Maria de Lourdes Reis Duarte (Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Eneas Pinheiro, s/n, 66095-000, Belém, Pa. e-mail: mlourdes@cpatu.embrapa.br). *Selection of Piper nigrum resistant material by tissue culture.*

## INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é afetada por várias doenças, mas é a podridão das raízes e secamento dos ramos, também conhecidas como fusariose a mais importante doença da cultura. É causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* (anamórfico: *Fusarium solani* f. sp. *piperis*). Este patógeno é restrito ao Brasil e tem causado severas perdas de produção desde 1957

inoculações artificial e natural (área infestada), três plantas V2 sobreviventes foram obtidas. Estas plantas foram avaliadas durante oito anos e após propagação vegetativa foram submetidas a vários ensaios. Com objetivo de obter mutantes sólidos resistentes à fusariose, com vigor de crescimento e boa produtividade, as seleções foram realizadas nas gerações V3, V4 e V5 no período de 1984 a 1996, sendo selecionadas algumas plantas V5 que foram levadas a campo em área de produtor para caracterização e avaliação. Destas plantas foram selecionados três clones, M-45, M-123 e M-23 que estão sendo submetidos a teste de competição em área de produtor com as cultivares Cingapura, Guajarina, Bragantina, Kottanadan e Uthirankotta para avaliação final de produtividade.

## Considerações finais

- O melhoramento genético de pimenta-do-reino, para as condições de cultivo no Brasil, tem como principal objetivo a obtenção de uma cultivar resistente ou tolerante a fusariose. Embora este objetivo seja logrado através das condições de estreita variabilidade genética e dificuldades na introdução de novos genótipos que possam ser utilizados como fonte de resistência tem-se lançado mão de vários recursos metodológicos convencionais e não convencionais que possam auxiliar na obtenção final dessa cultivar. Aqui também ressaltamos a importância e o valor do recurso genético introduzido e conservado em banco ao longo destes anos, assim como a disponibilidade para o setor produtivo de duas cultivares Guajarina e Bragantina com características de boa produtividade e adaptação às diferentes condições ambientais da Amazônia.
- As perspectivas do melhoramento genético de pimenta-do-reino são de trabalhar no sentido de ampliar a variabilidade genética através de recombinações gênicas dentro da espécie *nigrum*, e através da obtenção de mutantes por irradiação.
- A obtenção de híbridos interespecíficos resistentes a fusariose é uma alternativa que deve ser estudada passo a passo pois desconhece-se o comportamento do produto final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDO, A., ALBUQUERQUE, F.C de, POLTRONIERI, M.C & TULMANN NETO, A. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) através de irradiação gama. In: Anais do Seminário Internacional sobre Pimenta-do-reino e Cupuaçu. Belém: Embrapa Amazônia Oriental/JICA, Documentos, 89. 1997. 440p.
- ALBUQUERQUE, F.C. de & CONDURÚ, J.M.P. Cultura da Pimenta-do-reino na Região Amazônica. Belém: IPEAN, Fitotecnia, v.2, n.3. 1971. 149p.
- ANDO, A., MENTEN, J.O.M., TULMANN NETO, A., ALBUQUERQUE, F.C. & HIRA KATA, K. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.). In: Regional Workshop on nuclear techniques in crop production. Proceeding. São Paulo: OEA/CIEN/CENA, 1984. 3p.

quando foi isolado pela primeira vez de raízes de plantas infectadas (Albuquerque, 1961).

A origem desta forma fisiológica de *N. haematococca* especializada em infectar a pimenta-do-reino e espécies afins não estava bem definida até 1997, quando foram encontradas plantas de *P. aduncum*, uma espécie nativa que vegeta próximo de Igarapés, infectadas pelo patógeno. Neste hospedeiro, *N. haematococca* f. sp. *piperis* causa a morte do ramos infectados, mas a planta emite

novas brotações o que indica que a espécie possui resistência à ação do patógeno. O isolado de *P. aduncum* não tem habilidade de infectar o sistema radicular das diferentes espécies de *Piper* incluindo a pimenta-do-reino (Albuquerque *et al.*, 1999).

Várias medidas de controle tem sido empregadas para controlar a doença, como enxertia em *P. colubrinum* e uso de fungidas eficientes.

Como os mais eficientes fungidas como benomyl, carbendazin e tiabendazol tinham efeito fungistático sobre o patógeno, o governo brasileiro iniciou uma estratégia alternativa de diversificação através de intercâmbio com países estrangeiros principalmente a Índia, o centro de origem da pimenta-do-reino.

A introdução de germoplasma iniciou depois de 1987 de Mayaguez, Porto Rico através do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Mais tarde com a ajuda de consultores indianos as ovas introduções foram feitas. O Brasil possui agora uma coleção de cultivares que contém os seguintes materiais: cultivares de pimenta-do-reino, Balankotta, Belantung, Bragantina (ecotipo de Panniyur-1), Cingapura (ecotipo de Kuching), Cingapura colchicina, Chumala, Dieberg, Djambi, Guajarina (ecotipo de Arkulan Munda), Guajarina INATAM (mutante natural de Guajarina), laçará-1 e laçará-2 (linhagens promissoras oriundas de polinização aberta), Kaluvally-1, Kaluvally-2, Kaluvally Jones, Karimunda, Karinkotta, Kottanadan-1, Kottanadan-2, Kottavally, Kuching, Kudaravally, Kumbhakodi (= Poonjar Munda), Kuthiravally, Panniyur-2, Panniyur-3 (linhagem promissora oriunda Kuthiravally), Perumkodi, Pimenta-da-terra (Espírito Santo), Trang, Uthirankotta (Apra); clones 239 (híbrido natural de Perumkodi), 1558 (híbrido natural de Kaluvally, de alta produção), S-1; espécies nativas, *P. aduncum*, *P. arboreum*, *P. attenuatum*, *P. betle*, *P. carniconnectivum*, *P. colubrinum*, *P. hirsutum*, *P. hispidum*, *P. hispidinervium*, *P. hostmannianum*, *Piper* sp., *P. tuberculatum*; além do cruzamentos CZ 5 x 10 (oriundo de polinização aberta).

Testes de inoculação visando selecionar plantas resistentes ao patógeno não têm tido sucesso. Do mesmo modo, o cultivo de plantas de origem sexuada seguido de seleção após a inoculação artificial consomem tempo e os resultados têm sido negativos. Na falta de um método convencional para uma rápida seleção para resistência, bem como, ausência de resistência nas cultivares introduzidas, uma opção atraente seria utilizar as vantagens da variação somaclonal a fim de ampliar a variabilidade genética nas cultivares existentes.

O crescimento de células de plantas resulta, freqüentemente em uma alta freqüência de variantes estáveis e herdáveis as quais expressam característica úteis. Informações básicas sobre cultivo *in vitro* de pimenta-do-reino foram obtidas por Mathews & Rao (1984) e pesquisas na mesma área vem sendo conduzidas na Índia, Malásia, Indonésia e África do Sul (Fitchet, 1990), entretanto os resultados ainda não se encontram disponíveis.

Desde que todo o germoplasma de pimenta-do-reino no Brasil é susceptível a *N. haematococca* f. sp. *piperis*, um método valioso seria tentar selecionar plantas resistentes a partir de cultura de callus ou suspensão de células usando como agente de seleção os metabólitos tóxicos produzidos pelo fungo durante a patogênese. O envolvimento de toxinas em doenças de plantas foi observado pela primeira vez por Bary (1886) e o rápido progresso nas pesquisas sobre toxinas produzidas por patógenos tem mostrado uma forte evidência de seu papel em uma variedade de doenças de plantas.

#### FITOTOXINAS COMO AGENTES DE SELEÇÃO

Na natureza, os fenômenos envolvidos quando ocorre o contato do hospedeiro com um fungo patogênico apresentam grande variação. Alguns fungos são altamente invasivos enquanto que outros penetram área localizadas ou colonizam um particular tipo de tecido. Sintomas visíveis podem indicar que os tecidos das plantas estão sofrendo os efeitos da doença e, em alguns casos tais trocas

aparecem nas células próximas do local da invasão.

Durante o desenvolvimento nos tecidos do hospedeiro em cultura, os fungos produzem uma ampla gama de compostos com estrutura química e modos de ação variáveis. Estes incluem polipeptídios, glicoproteínas, derivados de aminoácidos poliquetídios, terpenoides, esteróis e quinonas. Tais compostos são chamados fitotoxinas ou simplesmente toxinas.

As fitotoxinas são classificadas como *específicas* ou *seletivas* quando são altamente ativas somente contra o hospedeiro do patógeno que produz a toxina e esta seletividade às vezes se estende entre cultivares de uma única espécie. Esta extrema especificidade sugere um papel importante no incitamento e desenvolvimento da doença (Yoder, 1980). Toxinas *não específicas* ou *não seletivas* produzem alguns sintomas da doença e podem afetar uma ampla gama de hospedeiras da espécie do fungo em questão.

Nem sempre é fácil se estabelecer o papel de uma toxina em uma doença. Uma gama de critérios tem sido usado para avaliar uma substância antes de ser considerada um fator de patogenicidade. É importante que: a) a toxina seja detectada nas plantas infectadas; b) a toxina deve induzir sintomas típicos da doença; c) a produção da toxina deve ser correlacionada com a patogenicidade de vários isolados do patógeno. Nem todas as toxinas satisfazem todos esses critérios.

Muitas toxinas produzidas por fungos são *não específicas* em ação e embora essas toxinas não possam ser consideradas o fator primário determinante da patogenicidade, acredita-se que elas contribuem para aumentar a virulência do patógeno dentro de sua gama de hospedeiros.

Muitas espécies de *Fusarium* produzem, em cultura, compostos que são tóxicos para as plantas. O preciso papel de tais toxinas no desenvolvimento das doenças não tem sido estabelecido mas para a maioria das toxinas é provavelmente um papel na extensão do tamanho das lesões mais do que na determinação da especificidade do hospedeiro (Drysdale, 1984).

*Fusarium solani* f. sp. *pisi* e outras espécies de *Fusarium* pertencentes ao grupo Martiella Wollenweber e a qual *F. solani* f. sp. *piperis* pertence, produz vários pigmentos vermelhos tóxicos com uma estrutura comum de naphthazarin. Seis compostos já foram isolados com grupo funcional e atividade biológicas diferentes. Os compostos isoméricos marticin e isomarticin são principalmente fitotóxicos; norjavanicin a nuvarubin são principalmente para fungos e bactérias e muito menos fitotóxicos; fusarubin e javanicin são ativos contra fungos e apresentam toxidez intermediária a bactérias e plantas superiores.

Tem sido observado que hastes e ramos de pimenta-do-reino quando infectadas por *F. solani* f. sp. *piperis* ficam amarelecidos antes de se tornarem necróticos e que isolados altamente patogênicos produzem pigmentos vermelhos em meio de cultura enquanto isolados menos patogênicos coram o meio de cultura de rosa ou creme (Duarte & Albuquerque, 1984). Estas observações levaram à suposição de esse fungo poderia ser toxigênico e proporcionaram o ponto de partida para os testes de seleção *in vitro*.

A seleção de plantas resistentes tem sido feita através de cultura de tecidos. Esta técnica envolve a seleção de callus aproveitando a grande variação somaclonal que ocorre em cultura de tecidos, entretanto é mais simples melhorar uma cultivar popular do que criar uma nova cultivar.

#### ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS PARA SELEÇÃO *IN VITRO*

Para estabelecer o método para seleção *in vitro* de plantas de pimenta-do-reino a *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* ensaios visando maximizar a produção de toxina e induzir cultura de callus e de suspensão de células foram conduzidos.

## Produção de toxinas

O filtrado tóxico é obtido a partir de culturas tipos de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, com alta habilidade de produzir pigmentos, desenvolvidas em meio líquido de batata e sucrose, durante 20 dias, no escuro e filtrada seqüencialmente em papel de filtro e em filtros de celulose com poros de 0,60 µm, 0,45 µm e 0,2 µm de diâmetro. O filtrado é mantido a 5 °C até o momento do uso.

Para testar a toxidez do filtrado, foram feitos bioensaios com folhas destacadas, punctura e deposição de uma gota do filtrado tóxico no centro de folhas destacadas e infiltração à vácuo do filtrado tóxico em discos de folhas seguida da determinação da quantidade de ions dispersos na solução.

O filtrado tóxico causa descoloração das nervuras secundárias, necrose do tecido foliar em torno da punctura e liberação de ions dentro da solução, medida através de condutividade (Duarte & Archer, 1995).

A purificação parcial em coluna de Saphadex mostra que a toxina possui moléculas pequenas. Estudos conduzidos visando verificar se esses metabólitos tóxicos são resultantes de lise das células do patógeno revelaram que os pigmentos são produzidos durante a fase de crescimento do fungo, indicando que a toxina tem um papel importante na patogênese de *F. solani* f. sp. *piperis* em pimenta-do-reino. Bioensaios com filtrado esterilizado e não esterilizado mostraram que a toxina é termoestável (Duarte & Archer, 1997).

## Culturas de callus e suspensão de células

Culturas de callus e de suspensão de células são obtidas após transferência de explants (discos de folhas, porções de internódios) para placas de Petri (100 mm x 20 mm) contendo o meio de cultura de Gamborg B5 enriquecido com benzylamino purina (BAP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), em diferentes combinações, variando de 0,1 mg a 5 mg/L dos hormônios em MS. Callus duros são induzidos no meio B5 contendo 1 mg/l de BAP e 2,4-D e callus friável, em meio MS contendo 0,5 mg/l a 1 mg/l de 2,4-D (Duarte, 1993).

## SENSIBILIDADE DE CALLUS E DE CÉLULAS À TOXINA

### Efeito do filtrado tóxico no crescimento de callus de *Piper* sp.

Callus de cultivares de pimenta-do-reino e de *Piper betle* obtidos após transferência de discos de folhas para MS e após três subculturas com intervalo de quatro semanas, apresentam redução do crescimento quando cultivado em meio tóxico contendo diferentes concentrações de filtrado tóxico. Quanto maior a concentração de filtrado tóxico menor a taxa de crescimento do callus. Essa redução no crescimento atingiu 78 % em callus de laçarará-1 e 58 % em Kottanadan-1. Pedacos de callus pequenos são mais indicados para cultivo em meio tóxico do que callus maiores, devido ao maior contato com a superfície do meio de cultura. A concentração de 50 % foi considerada letal, sendo mais recomendadas para teste de seleção *in vitro*, as concentrações de 10 % e 20 %.

### Efeito do filtrado tóxico na viabilidade de células de *Piper* spp.

Culturas de células obtidas após cultivos de explantes em meio de cultura Gamborg's B5, enriquecido com 2,4-D (1 mg/l) durante quatro semanas, sofrem queda de viabilidade quando cultivadas em meio MS contendo diferentes concentrações de toxina. A queda da viabilidade é maior com a concentração e o tempo de imersão. Testes mostraram que 120 minutos de exposição na concentração de 10 a 20 % são condições adequadas para selecionar linhagens de células insensíveis à toxina produzida por *F. solani* f. sp. *piperis*.

## SELEÇÃO DE SETORES DO CALLUS RESISTENTES À TOXINA PRODUZIDA POR *F. solani* f. sp. *piperis*

A seleção *in vitro* para resistência a patógenos é amplamente

praticada em uma variedade de combinações planta-patógeno. A natureza da cultura de tecidos usado na seleção é importante pois ela pode determinar a estabilidade do caráter e a capacidade regenerativa da cultura.

Cultura de callus tem sido usada para seleção *in vitro* porque as células selecionadas mesmo quando rodeadas por um grande número de células mortas podem crescer e serem identificáveis. Se o crescimento normal do callus é verde mais, os setores saudáveis podem ser mais facilmente identificados (Jones, 1990). O risco desse tipo de seleção é o aparecimento de quimeras, que pode ser reduzido se pequenas porções de callus são usadas nos testes de seleção (Collin & Dix, 1990).

Na seleção *in vitro* callus de pimenta-do-reino cultivados em meio de Gamborg's B5 contendo três concentrações de filtrado tóxicos são submetidos a dois ciclos de seleção. O método consiste em cultivar os callus em meio tóxico por 20 ou 30 dias, isolar os setores sobreviventes e cultivar no mesmo meio de cultura sem toxinas por 30 dias e, passar novamente por 20 a 30 dias em filtrado tóxico. Os callus sobreviventes são então inoculados com um único macroconídio de *F. solani* f. sp. *piperis* em estágio inicial de germinação.

Setores sobreviventes após cultivo em meio de cultura sem toxina tornam-se friáveis, crescem lentamente e apresentam as camadas mais externas do callus escurecidas. Após o segundo ciclo de seleção, poucos setores são recuperados e muitas vezes para aumentar o volume dos callus é necessário duas subculturas em meio MS e uma vez em Gamborg's B5 antes de submetê-los ao segundo ciclo de seleção.

A colonização dos callus ocorreu tanto em callus selecionados após duas passagens em meio tóxico como nos callus não selecionados das cultivares laçarará-1 e Kottanadan-1. Nos callus selecionados em 10 % de toxina a taxa de redução na colonização foi de 23 % em laçarará-1 e 9,3 % em Kottanadan-1, em relação ao controle, observados seis dias após a inoculação.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidências experimentais têm demonstrado ser possível selecionar callus insensíveis à toxina produzida por isolados altamente patogênicos de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, a partir de germoplasma susceptíveis. O metabólitos secundários produzidos pelo patógeno inibem significativamente, o crescimento de callus de pimenta-do-reino e de espécies nativas.

Esperava-se que callus incubados em meio tóxico durante 30 dias sofressem maior inibição do crescimento do que aqueles incubados por 20 dias. Após a primeira e segunda passagem em meio tóxico a taxa de crescimento de laçarará-1 e *P. betle* foi sempre inferior àquelas observadas após 20 dias com exceção de Kottanadan-1, a qual mostrou uma taxa de crescimento maior após a segunda passagem em meio tóxico. O efeito inibitório dos metabólitos tóxicos do patógeno sobre o crescimento do callus observado em Kottanadan-1 e *P. betle* sugere que os callus dessas plantas tomaram-se menos sensíveis à toxina. Entretanto outras explicações são possíveis, dentre as quais, a relativa insensibilidade de maiores porções de callus devido o pouco contato com o meio. Células do fundo do callus são mais danificadas porque elas estão em contato direto com os metabólitos tóxicos, mas a maior parte do callus permanece intacta.

Soluções de filtrado de cultura diluídas reduziram a viabilidade de suspensão de células de *Piper* spp. O efeito letal é dependente da concentração e aumenta com o tempo de exposição. A perda de viabilidade foi maior na cultivar laçarará-1 do que em Kottanadan-1. Do mesmo modo, suspensões de células são mais sensíveis à toxina do que callus, provavelmente por causa da grande uniformidade do contato com o meio de cultura.

Seleção para resistência *in vitro* usando-se filtrado de cultura do patógeno pode originar plantas resistentes mesmo que não se

conheça exatamente qual e quanta toxina estão presentes no filtrado ou qual o papel que as toxinas desempenham na patogênese (Behnke, 1980; Sacristán, 1985; Binarová *et al.*, 1990). Embora o uso de filtrado de cultura não seja a melhor opção para selecionar plantas resistentes, o filtrado poderá ser usado se a toxina purificada não estiver disponível (Daub, 1986; Jones, 1990).

Diferenças na taxa de crescimento do callus tem sido usadas como um indicador de resistência, mas as diferenças na sensibilidade à toxina entre linhagens resistentes e susceptíveis são muito menores em toxinas não específicas do que nas toxinas específicas, por isso deve-se ter o cuidado de escolher uma concentração apropriada de toxina que permita o isolamento de variantes resistentes (Jones, 1990). Entretanto, todos esses métodos de cultivar callus de pimenta-do-reino em meio de cultura seletivo tornam-se improdutivos porque as plantas não podem ser regeneradas a partir de callus resistentes à toxina. A regeneração de plantas de pimenta-do-reino a partir de callus ainda não foi obtida. Estudos estão sendo conduzidos no Centro de Energia Nuclear para a Agricultura (CENA) visando regenerar plantas de pimenta-do-reino a partir de callus. O sucesso desses estudos complementará os métodos de seleção *in vitro*, tornando possível a obtenção de cultivares resistentes de pimenta-do-reino a *N. haematococca* f. sp. *piperis*, através de cultura de tecidos.

#### REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C. Podridão das raízes e do pé da pimenta-do-reino. Belém: IPEAN, Circular, 5. 1961. 45 p.
- ALBUQUERQUE, F. C., DUARTE, M. L. R., BENCHIMOL, R. L., ENDO, T. Reação de espécies de *Piper* a dois isolados de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado Técnico, 7. 1999, 4 p.
- BARY, A. de Uber einige Sclerotinien und Skletotienkrankheiten. *Botan. Zt.*, 44:376-474, 1886.
- BEHNKE, M. General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theoretical Applied Genetic*, 56: 151-152, 1980.
- BINAROVÁ, P., NEDELNIK, J., FELLNER, M. & NEDBÁLKOVÁ, B. Selection for resistance to filtrate of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22:191-196, 1990.
- COLLIN, H. H. & DIX, P. J. Culture system and selection procedures. In: P. J. DIX (ed.) *Plant Cell Line Selection*. England. Springer-Verlag. 1990. pp 3-18.
- DAUB, M. E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Plant Pathology*, 24:159-186, 1986.
- DRYSDALE, R. B. The production and significance in phytopathology of toxins produced by species of *Fusarium*. In: M. O. MOSS, J. E. SMITH (ed.) *The Applied Mycology of Fusarium*. Symposium No 7. England: Cambridge University Press. 1984. pp. 95-105.
- DUARTE, M. L. R. & ALBUQUERQUE, F. C. Secamento dos ramos da pimenta-do-reino. SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém, PA. Anais...Brasília: Embrapa-DID, 4:383-394. 1986.
- DUARTE, M. L. R. Toxic metabolites of *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* and their role in pathogenesis on black pepper, *Piper nigrum* L. University of London, (Ph. D. thesis), 1993. 213 p.
- DUARTE, M. L. R. & ARCHER, S. A. *In vitro* toxin production by *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. *Fitopatologia Brasileira*, 20:352, 1995. (Suplemento).
- DUARTE, M.L.R. & ARCHER, S.A. Biological and physiological aspects of *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* toxic metabolites. *Fitopatologia Brasileira*, 22:344, 1997. (Suplemento).
- FICHET, M. Successful establishment of *Piper nigrum* in tissue culture. *Citrus and subtropical Fruit Research Institute*, 212: 4-5, 1990.
- JONES, P. W. *In vitro* selection for disease resistance. In: P. J. DIX (ed.) *Plant Cell Line Selection*. England: VCH. 1990. pp.113-143.
- MATHEWS, V.H. & RAO, P.S. *In vitro* responses of black pepper (*Piper nigrum*). *Current Science*, 53:183-186, 1984.
- SACRISTÁN, M. D. Selection for disease resistance in *Brassica* culture. *Hereditas Supplement*, 3: 57-63, 1985.
- YODER, O. C. Toxins in pathogenesis. *Annual Review of Plant Pathology*, 18:103-129, 1980.

## SIMPÓSIO 2 - Aplicação da biologia molecular na fitopatologia / *Application of molecular biology in plant pathology*

**EMPREGO DE PCR NA IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS.** Paulo Sergio Torres Brioso (Laboratório de Virologia Vegetal e Viróides - Departamento de Entomologia e Fitopatologia - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Cx. Postal 74585, Seropédica-RJ, CEP 23851-970; e-mail: paulobri@ufrj.br ou brioso@whouse.com.br). *The use of PCR in plant pathogen identification.*

A técnica de "Polymerase Chain Reaction" (PCR) é um processo cíclico, no qual a enzima DNA polimerase faz cópias de um ácido desoxirribonucleico (DNA), para o qual oligonucleotídeos (iniciadores ou "primers") são fornecidos. A cada ciclo o número de cópias do DNA é duplicado, produzindo um aumento exponencial do mesmo (Saiki *et al.*, 1985).

Como fonte de ácido nucleico para o teste de PCR pode-se utilizar DNA genômico (contendo ou não microsátélites), DNA mitocondrial, DNA ribossomal, DNA de gene para tRNA, extraídos de preparações de fitopatógenos isolados (ou purificados) ou *in vivo*, assim como de DNA clonado (DNA inserido em vetor específico, como plasmídeo) ou de DNA total de plantas infectadas com fitopatógenos.

No caso de se utilizar seqüências de ácido ribonucleico (RNA), torna-se necessário a síntese inicial de DNA complementar (cDNA) a partir das moléculas do RNA, através da enzima

transcriptase reversa. Pode-se utilizar RNA genômico, forma replicativa do RNA de alguns fitopatógenos ou RNA total de plantas infectadas com fitopatógenos, passando a técnica a ser designada de "Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction" (RT - PCR).

Como amostras para a extração de ácido nucleico pode-se utilizar tecido vegetal (oriundo de qualquer parte da planta) infectada, de vetor do fitopatógeno ou o fitopatógeno na forma fresca, desidratada, congelada, liofilizada ou embocada em parafina.

Na confecção dos iniciadores, podem ser usado iniciadores ao acaso ("Random Primers"), iniciadores específicos ou com algumas bases degeneradas, desenhados a partir das seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos disponíveis na literatura utilizando-se, em geral, programas de computador pré-existentes (Dieffenbach & Dveksler, 1995).

Como outros componentes da reação temos o dNTP (quantidades equimolares de dATP, dCTP, dGTP, dTTP - que,