

AGROS

www.isa.utl.pt

Ano MMVIII N°2 Preço 3€

**“UMA APROXIMAÇÃO
À INVESTIGAÇÃO”**



Associação dos Estudantes do
Instituto Superior de Agronomia

Fungos Patogénicos das Plantas. A Batalha Química para a Patogénese

Ricardo Boavida Ferreira

INTRODUÇÃO

Os fungos, constituindo um reino relacionado, do ponto de vista evolutivo, com os animais, é um grupo extraordinariamente diversificado de organismos, com cerca de 250.000 espécies amplamente distribuídas por quase todos os ecossistemas. Os Oomicetas, durante muito tempo considerados como uma classe do reino Fungi, são hoje classificados no reino Chromista. Juntamente com os fungos, constituem os dois grupos mais importantes de agentes eucariotas patogénicos que atacam as plantas, tratando-se de um exemplo biológico de evolução convergente, na medida em que apresentam muitas semelhanças no que diz respeito aos seus modos de vida. Assim, por exemplo, ambos apresentam crescimento filamentoso durante o período de crescimento vegetativo, produzem micélio e formam esporos para reprodução sexuada e assexuada. Também não é possível distinguir a resposta das plantas ao seu ataque. Fungos e Oomicetas incluem espécies biotróficas (que crescem e reproduzem nos tecidos vivos das plantas; ex. géneros *Erysiphe* e *Plasmopara*, respectivamente), necrotróficas (que se alimentam de células vegetais mortas; ex. géneros *Botrytis* e *Pythium*) e hemibiotróficas (que estabelecem inicialmente uma relação biotrófica com o seu hospedeiro, continuando a infecção após a morte das células deste; ex. géneros *Colletotrichum* e *Phytophthora*).

As plantas constituem um excelente ecossistema para os microrganismos por oferecerem uma gama

ampla de habitats, incluindo a filosfera (a parte aérea da planta), a rizosfera (a zona de influência do sistema radicular) e a endosfera (o sistema de transporte interno). Ao contrário dos animais, em que as micoses são relativamente pouco numerosas, uma proporção considerável das doenças das plantas são causadas por fungos: 120 géneros de fungos, 30 tipos de vírus e oito géneros de bactérias são responsáveis pelas cerca de 11.000 doenças que foram descritas nas plantas. Deste modo, os



orgãos aéreos e subterrâneos das plantas estão contínua e permanentemente expostos a uma vasta gama de potenciais agentes patogénicos. Contudo, sabendo que o estado normal de uma planta é o saudável, o desenvolvimento de uma doença requer a ocorrência simultânea de um estado susceptível do hospedeiro, um estado virulento do agente patogénico e um meio ambiente favorável. Por outras palavras, nem todos os agentes patogénicos podem atacar todas as plantas, nem uma só planta é susceptível à panóplia total de agentes fitopatogénicos. Na realidade,

apenas uma fracção diminuta destes agentes é capaz de invadir, com sucesso, e provocar doença, em cada hospedeiro. Se, por um lado, a virulência dos agentes patogénicos e a susceptibilidade dos hospedeiros variam ao longo dos seus ciclos de vida, por outro, o desenvolvimento de uma doença depende fortemente das condições ambientais, como a disponibilidade em água, a temperatura e a molhabilidade da superfície vegetal. Por todos estes motivos, o estabelecimento de uma doença é normalmente menos frequente do que o que seria de esperar.

COMO EVOLUIRAM OS MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS

A presença de agentes patogénicos ao longo de centenas de milhões de anos permitiu às plantas o desenvolvimento de uma ampla gama de ferramentas de defesa, intrincadas e elaboradas. Este padrão surgiu a partir do que se pode considerar um processo de co-evolução do tipo ping-pong, em que planta e agente patogénico foram sucessivamente adicionando armas químicas ao longo de uma guerra perpétua. Sempre que uma inovação defensiva era estabelecida no hospedeiro, novas maneiras de a ultrapassar eram desenvolvidas pelo agente patogénico. Este processo co-evolutivo complexo explica, provavelmente, não só casos de extrema especificidade, que se estabeleceram entre muitos agentes patogénicos e os seus hospedeiros, como a ineficácia e/ou redundância de alguns genes defensivos, que frequentemente codificam enzimas com actividades sobrepostas.

A existência de mecanismos de defesa redundantes e/ou ineficazes contra o

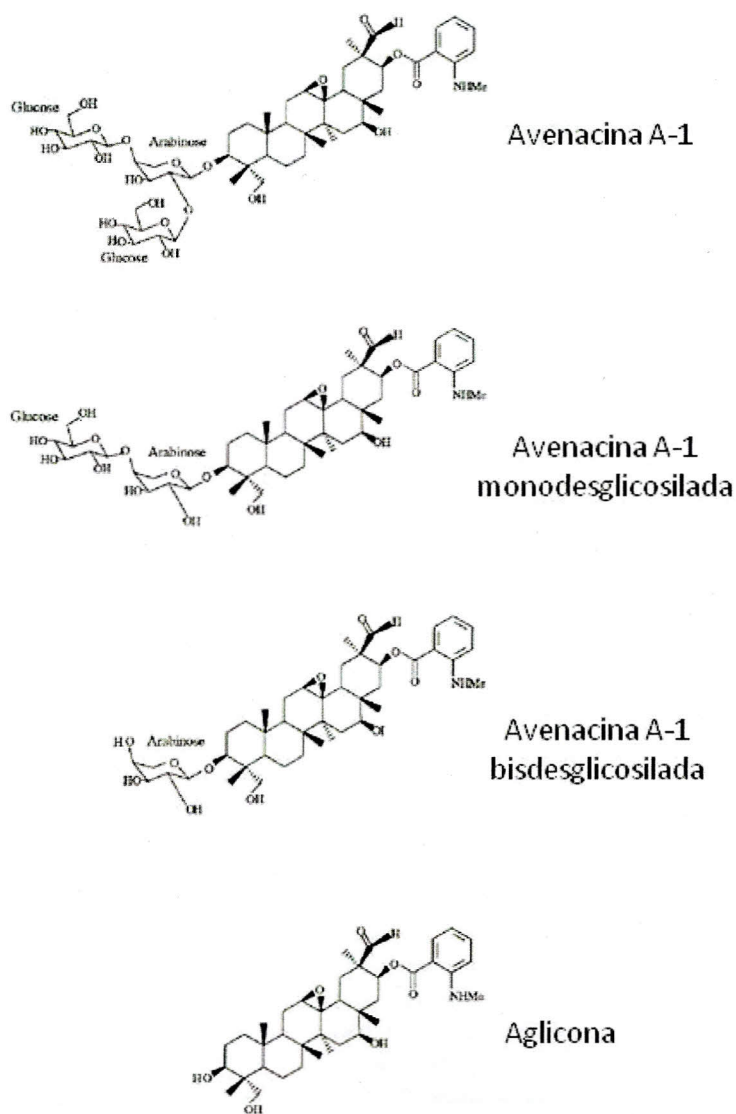


Figura 1. Estrutura da avenacina A-1 e dos seus derivados desglicosilados.

mesmo com um mecanismo de defesa redundante e/ou inútil. Será, então, de esperar que, ao longo de muitos milhões de anos, uma planta vulgar tenha adquirido e/ou perdido um número de mecanismos de defesa redundantes/inoperativos. É importante notar que não se pode concluir que uma dada proteína é inútil apenas porque não se lhe conhece uma função óbvia. Esta proteína poderá não ter valor hoje, mas ter desempenhado um papel de defesa importante contra agentes patogénicos que existiram há muito tempo.

EXEMPLOS DE INTERACÇÕES PLANTA/AGENTE DE ESPECIFICIDADE ELEVADA PATOGENICO

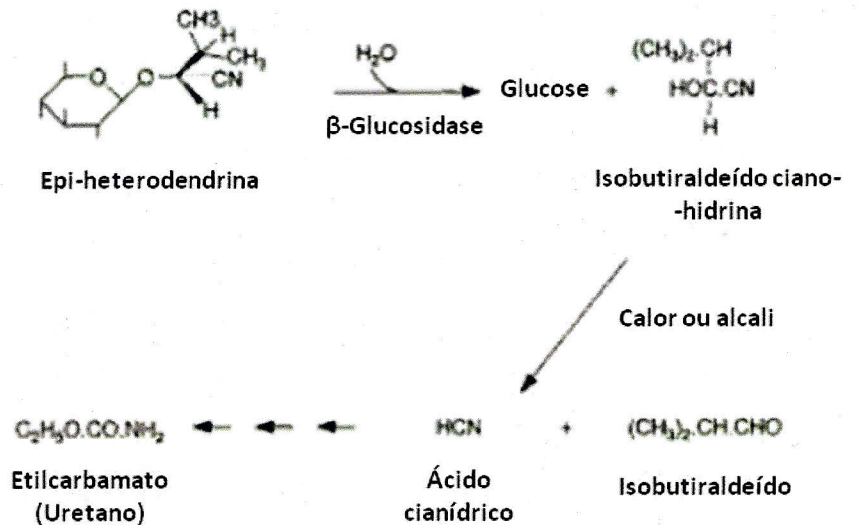
ataque de agentes patogénicos levanta, desde logo, a questão do papel que desempenham nas plantas. Supostamente, estes mecanismos terão aparecido casualmente ao longo da evolução, o que significa que a sua presença pode ser benéfica, indiferente ou prejudicial à planta hospedeira. Consideremos, por exemplo, uma mutação casual que induza acumulação, na planta, de uma proteína anti-fúngica em resposta ao ataque de um fungo. Se a via biossintética dessa proteína consumir uma proporção significativa do potencial metabólico da planta, dois resultados possíveis são de esperar: (i) a mutação não adiciona valor à planta hospedeira, a qual não poderá, por isso, competir de um modo tão eficiente como

a sua forma selvagem para os recursos disponíveis. Nestas condições, a pressão selectiva eliminará, presumivelmente, a forma modificada da planta e a sua proteína anti-fúngica inútil. (ii) A nova proteína anti-fúngica fornece à planta uma vantagem selectiva relativamente à sua forma selvagem, permitindo-lhe ter mais sucesso num habitat competitivo. Nestas condições, a planta modificada pode mesmo tornar-se a forma dominante nesse habitat.

Se, no exemplo anterior, o novo mecanismo de defesa da planta não consumir uma fracção considerável do seu potencial assimilatório, a planta modificada poderá subsistir durante um longo período de tempo,

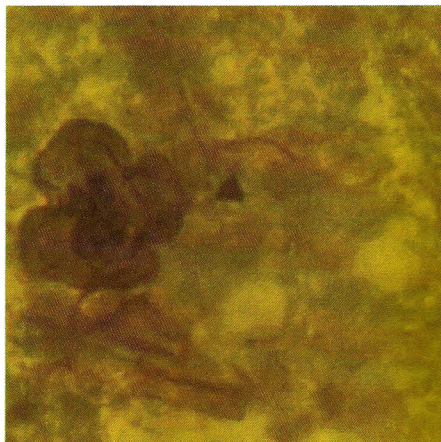
Um exemplo de um elevado grau de especificidade estabelecido entre uma planta e um agente patogénico é fornecido por alguns fungos causadores de oídio. Estes fungos exibem, normalmente, uma especificidade muito grande para o hospedeiro, sendo capazes de infectar apenas um único hospedeiro, um grupo de hospedeiros próximos do ponto de vista evolutivo ou uma família particular de plantas, e incapazes de sobreviver da ausência dos tecidos vivos do seu hospedeiro. Quando um fungo responsável pelo oídio infecta um conjunto de espécies relacionadas filogeneticamente, ele apresenta, frequentemente, raças com especialização fisiológica para hospedeiros únicos, não sendo

Figura 2. Formação do ácido cianídrico e do etilcarbamato a partir da epi-heterodendrina.



possível a ocorrência de infecções cruzadas. Quando identificadas, estas linhas podem ser distinguidas como forma *specialis* (f.sp.) e designadas em conformidade. Por exemplo, *Sphaerotheca pannosa* f.sp. *rosae* é o nome atribuído à raça fisiológica do fungo que causa o oídio da roseira (*Rosa* spp.) e do loureiro (*Laurus nobilis*), embora a espécie em si (isto é, outras f.sp.) ataquem, também, o pessegueiro (*Prunus persica*), a amendoeira (*Prunus dulcis*) e o damasqueiro (*Prunus armeniaca*).

A saponina avenacina A-1, um glicósido sintetizado constitutivamente, constitui outro exemplo de um grau muito elevado de especialização entre planta e agente patogénico (Fig. 1). O crescimento do fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, patogénico para as raízes do trigo, é inibido pela avenacina A-1. Por este motivo, plantas de aveia (*Avena sativa*), que sintetizam avenacina A-1, exibem resistência ao ataque do fungo. No entanto, o fungo relacionado *G. graminis* var. *avenae*, patogénico para as raízes da aveia, produz uma glicosidase que hidrolisa a saponina, separando o resíduo hidrato de carbono da aglicona (Fig. 1) e eliminando, assim, a toxicidade da avenacina A-1. Esta raça do fungo não é, por isso, inibida pela avenacina A-1, o que



se traduz na susceptibilidade das plantas de aveia ao seu ataque. Como seria de esperar, uma mutação no gene que codifica a glicosidase torna *G. graminis* var. *avenae* sensível à avenacina A-1 e, por isso, incapaz de infectar a aveia. Por outro lado, plantas transgênicas de aveia que não formam avenacina A-1 ficam susceptíveis ao ataque de *G. graminis* var. *tritici*. Estas observações indicam que *G. graminis* var. *tritici* não é um agente patogénico para a aveia porque não tem a capacidade de metabolizar a avenacina A-1, considerada como um factor de resistência a menos que o fungo a consiga desintoxicar.

Admite-se que os taninos desempenham um papel semelhante nas folhas da videira (*Vitis vinifera*). Experiências realizadas recentemente nos nossos laboratórios mostraram que *Erysiphe necator* e *Plasmopara viticola*, os agentes patogénicos biotróficos responsáveis pelo oídio e míldio da videira, respectivamente, segregam uma enzima nos tecidos do hospedeiro que bloqueia a actividade anti-microbiana dos taninos.

Observa-se que, ocasionalmente, algumas interações planta-agente patogénico evoluíram para mecanismos fortemente complexos, intrincados e mesmo inesperados. Um exemplo marcante é fornecido pelo estudo da

reconstituição da cianogénese em cevada (*Hordeum vulgare*). A formação do apressório e do gancho do apressório em *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, o agente causador do oídio da cevada, são estimulados, in vitro, pela epi-heterodendrina (Fig. 2), um β -D-glicósido cianogénico derivado da leucina, que se acumula especificamente na epiderme das folhas da cevada. A enzima (1,4)- β -D-glucanase exo-hidrolase, localizada no endosperma amiláceo dos grãos de cevada, hidrolisa in vitro a epi-heterodendrina, com libertação de ácido cianídrico (HCN). Contudo, as folhas de cevada não são cianogénicas, isto é, não possuem a capacidade de libertar cianeto por não conterem a β -D-glucosidase apropriada. No entanto, a cianogénese pode ser reconstituída nas células da epiderme das folhas da cevada, por expressão de um cDNA codificante de uma β -D-glucosidase cianogénica do sorgo (*Sorghum bicolor*), o que se traduz numa redução de 35 a 60% da taxa de colonização por *B. graminis* f.sp. *hordei*. Estas observações sugerem que, ao longo da evolução, a perda da cianogénese nas folhas da cevada permitiu ao fungo utilizar a presença da epi-heterodendrina para facilitar o reconhecimento do hospedeiro e para estabelecer a infecção.

PRINCIPAIS ARMAS UTILIZADAS PELAS PLANTAS NUMA CONFRONTAÇÃO COM UM AGENTE PATOGENICO

Uma interacção entre uma planta e um agente patogénico pode ser comparada a uma guerra, composta por várias batalhas, cujas armas principais são as proteínas sintetizadas por ambos os organismos.

As proteínas podem ter uma acção directa sobre o outro organismo (por exemplo, as plantas sintetizam numerosas proteínas PR, proteínas anti-fúngicas¹ e péptidos anti-fúngicos). Assim, por exemplo, as quitinasas são proteínas PR com reconhecida função anti-fúngica, protegendo as plantas do ataque de

fungos. Isto acontece porque um dos principais constituintes da parede celular dos fungos é o polissacárido quitina (Fig. 3), um polímero de N-acetil-D-glucosamina, com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). As quitinasas do apoplasto, ao cortarem a quitina da parede celular dos fungos, danificam a sua estrutura e, ao mesmo tempo, libertam oligómeros de quitina, os quais funcionam como eliciadores, permitindo às plantas armar as suas defesas. Os quitina-oligossacáridos assim libertados estão envolvidos no oxidativo burst, na fosforilação de proteínas, na biossíntese de fitoalexinas, na activação da transcrição de genes de defesa e no estímulo da divisão celular. Os receptores específicos pela percepção dos quitina-oligossacáridos estão localizados na membrana plasmática das células vegetais e apresentam uma afinidade de ligação que aumenta com o grau de polimerização dos oligómeros: a quitotetraose é o comprimento mínimo de

oligómero que produz resposta, ao passo que o 8-mero induz uma resposta intensa.

As proteínas podem, também, desempenhar um papel importante ao catalisarem (como é o caso, por exemplo, de numerosas enzimas) ou participarem (como é o caso, por exemplo, das proteínas dirigentes, que "dirigem" a estereoquímica de determinadas reacções catalisadas por enzimas) na síntese de moléculas pequenas com um papel directo na interacção planta/agente patogénico. Estão nesta situação as fitoalexinas, consideradas

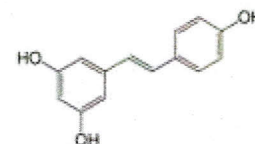


Figura 4. Estrutura do trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno).

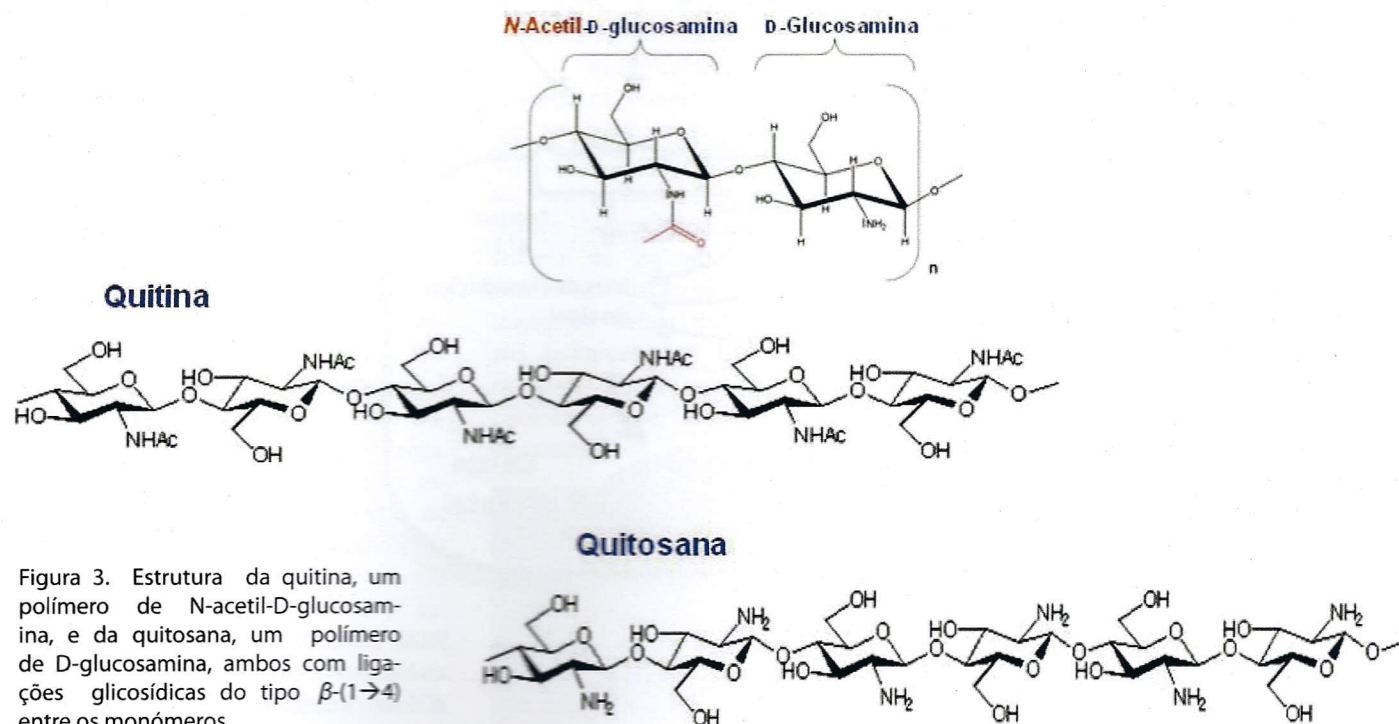
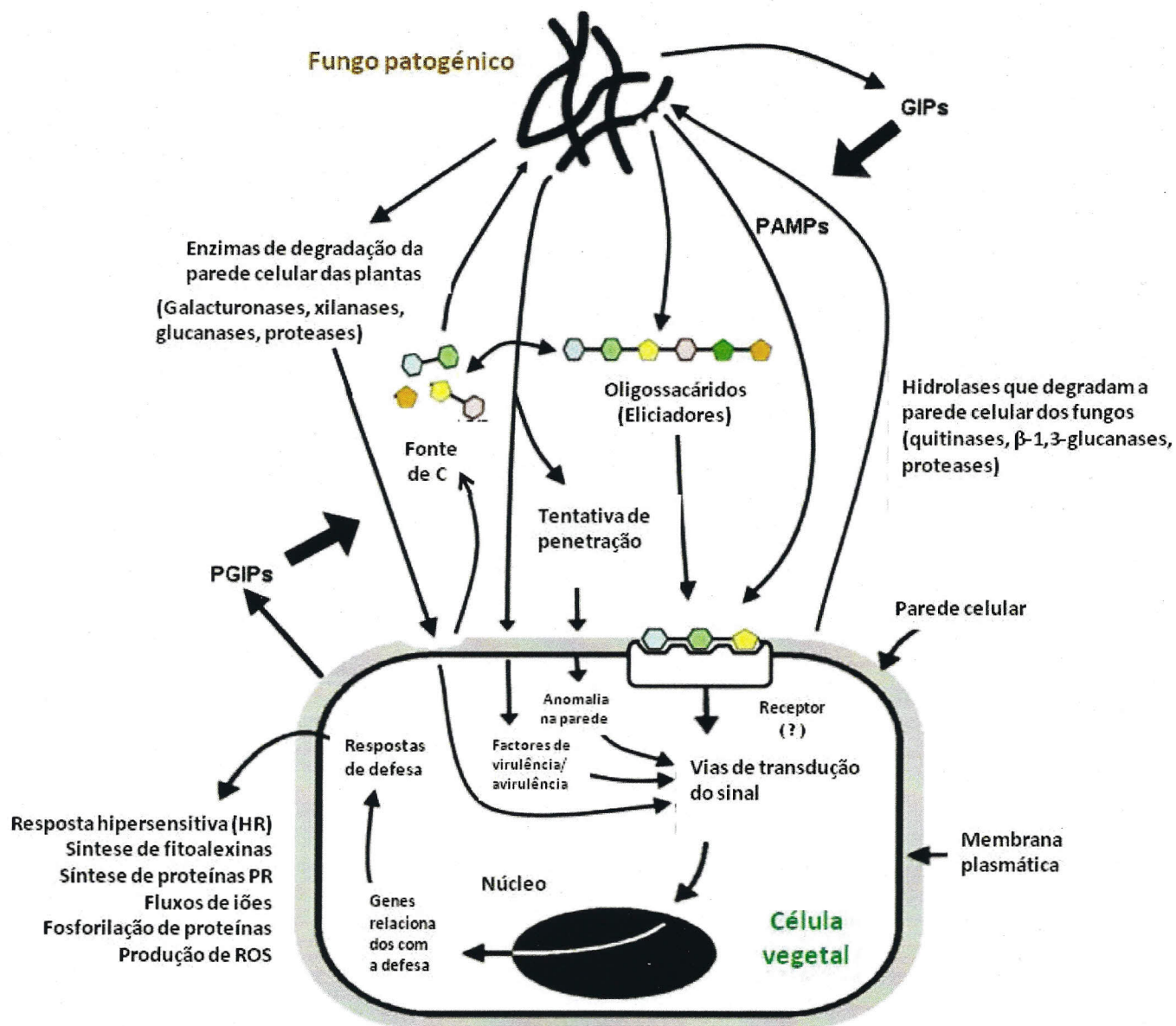


Figura 3. Estrutura da quitina, um polímero de N-acetil-D-glucosamina, e da quitosana, um polímero de D-glucosamina, ambos com ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) entre os monómeros.

¹Existe uma sobreposição considerável entre proteínas relacionadas com a patogenicidade (proteínas PR) e proteínas anti-fúngicas. Muitas das 17 famílias de proteínas PR hoje consideradas não exibem qualquer actividade anti-microbiana conhecida, ao passo que entre as 13 classes de proteínas anti-fúngicas, a maioria não é classificada como proteína PR.

Figura 5. A "guerra" de proteínas, que ocorre entre a planta hospedeira e o fungo atacante, durante uma tentativa de infecção e a via que leva à resposta de defesa da planta. Abreviaturas: PAMP- padrão molecular associado ao agente patogénico; GIP- proteína inibidora da glucanase; PGIP- proteína inibidora da poligalacturonase; HR- resposta hipersensitiva; PR- relacionada com a patogenicidade; ROS- espécies reactivas de oxigénio.



como metabolitos secundários de natureza não-proteica e massa molecular baixa, que são produzidas por muitas espécies de plantas. Exibem uma enorme diversidade química, apresentam actividades anti-microbianas e anti-fúngicas, a sua síntese é induzida por agentes patogénicos e por eliciadores e são sintetizadas por vias bioquímicas complexas, como é a via do ácido chiquímico. No caso da videira, por exemplo, as fitoalexinas pertencem

à família dos estilbenos dos compostos fenólicos e incluem o trans-resveratrol (Fig. 4), sintetizado pela enzima estilbeno sintase, e uma série de seus derivados, de que são exemplos a α- e a ε-viniferina, o trans- e o cis-piceido e a trans- e a cis-astringina.

Outro tipo de moléculas pequenas, importantes na interação planta/agentepatogénico, são as espécies reactivas de oxigénio

(ROS), como os aniões superóxido, os radicais hidroxilo e o peróxido de hidrogénio. As ROS são directamente tóxicas para os micróbios, catalisam a formação de ligações cruzadas oxidativas na parede celular no local da tentativa de penetração e participam na sinalização do início de outras reacções de defesa.

A base genética que determina a especificidade raça-cultivar nalgumas interações planta-agente patogénico foi inicial-

mente proposta, em 1955, por H.H. Flor, na sua teoria gene-por-gene, a partir dos estudos que fez sobre a interação entre o linho (*Linum usitatissimum*) e o fungo *Melampsora lini*. Segundo esta teoria, os genes de resistência à doença da planta hospedeira (R) medeiam o reconhecimento de componentes específicos derivados do agente patogénico, os produtos dos genes de avirulência (avr). Esta interação gene-por-gene foi posteriormente complementada com o modelo do receptor-ligando, no qual a proteína de avirulência (avr) se liga à proteína de resistência correspondente (R), a qual, por sua vez, desencadeia o sistema de vigilância da planta. No entanto, têm-se acumulado evidências de que as proteínas R poderão não ser o receptor primário das proteínas avr. Sempre que estão presentes os pares complementares dos genes R e avr, a interação entre hospedeiro e agente patogénico é incompatível, o que desencadeia os mecanismos de defesa do hospedeiro e determina resistência à doença. A falta, ou a presença de formas não-funcionais, de qualquer dos genes estabelece uma interação compatível hospedeiro-agente patogénico, traduzindo-se no estabelecimento da doença. De acordo com esta terminologia, o agente patogénico diz-se avirulento nas interações incompatíveis e virulento nas interações compatíveis. A identidade ou a função bioquímica da maioria das proteínas avr permanece desconhecida.

As defesas das plantas podem ser barreiras estruturais ou químicas, cada uma das quais se pode subdividir em constitutivas ou indutíveis. Um agente patogénico tem de ultrapassar, com sucesso, todas estas barreiras, antes de conseguir estabelecer a doença, o que pode incluir a protecção das estruturas do fungo dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a inibição das respostas de defesa da planta que são induzidas por eliciadores ou a supressão das defesas da planta. Muitas vezes, tem mesmo de modular ou modificar, em seu benefício, o padrão de expressão genética ou o metabolismo das células da planta e/ou de abolir determinados mecanismos de defesa do hospedeiro. Pode, por exemplo, provocar uma ruptura na ligação entre a parede celular e a membrana plasmática (as chamadas cadeias Hechtian, es-



senciais à expressão das respostas de defesa associadas à parede celular, durante a tentativa de penetração de fungos patogénicos biotróficos em plantas não-hospedeiras), reprimir a síntese de proteínas componentes do citoesqueleto ou usar qualquer outro mecanismo que impeça a transmissão do sinal de reconhecimento do agente patogénico pela planta ou a expressão das defesas por parte do hospedeiro.

Aparentemente, as plantas conseguem detectar perturbações na parede celular das suas células, pelo controlo da integridade da sua estrutura. Para o estabelecimento de biotrofia, muitos fungos podem manipular este sistema de vigilância, subvertendo, assim, a interligação aos sistemas de sinalização de defesa da planta. Por exemplo, mutantes de *Arabidopsis thaliana* no gene *CESA3*, que codifica a enzima celulose sintase, exibem uma activação constitutiva da expressão dos genes de



defesa mediada pelo jasmonato e pelo etileno, bem como uma resistência aumentada ao fungo responsável pelo ódio.

Uma questão primordial para a activação das defesas da planta é a percepção pronta do agente patogénico pelo hospedeiro. Inicia-se, então, uma guerra para a penetração do fungo, esquematicamente ilustrada na Fig. 5, a qual marca a transição do seu crescimento extracelular para crescimento invasivo. O resultado desta complexa confrontação determina, em larga medida, o sucesso ou o insucesso da tentativa de patogénese.

DO CRESCIMENTO EXTRACELULAR DO FUNGO AO CRESCIMENTO INVASIVO. RECONHECIMENTO E PENETRAÇÃO

Para penetrarem nos tecidos do hospedeiro, muitos fungos necessitam de feridas ou de aberturas na superfície deste. Para outros fungos, a entrada nos tecidos dá-se naturalmente pelos estomas, casos em que a diferenciação das estruturas de infecção depende, muitas vezes, de características topográficas da superfície do hospedeiro, como, por exemplo, da altura correcta das cristas formadas pelas células de guarda dos estomas.

Na generalidade dos casos, porém, a penetração das estruturas diferenciadas dos fungos dá-se através do tecido vegetal intacto, o que implica, inevitavelmente, a passagem através da cutícula e da parede celular, consideradas como a primeira linha de defesa das plantas contra a penetração dos agentes patogénicos. Este aspecto representa um passo crítico e crucial na patogénese da maioria dos fungos biotróficos e marca uma transição dramática de estilo de vida, de crescimento extracelular para crescimento invasivo. A Fig. 6 ilustra os principais passos no desenvolvimento da patogénese dos fungos biotróficos *Uromyces viciae-fabae* e *Erysiphe necator*.

As paredes celulares das plantas são essencialmente constituídas por polissacáridos (celulose, hemiceluloses e pectinas) e proteínas. Por este motivo, muitos fungos libertam uma gama de enzimas hidrolíticas (incluindo galacturonases, xilanases, glucanases e proteases), que fragmentam os polímeros da parede celular, facilitando a colonização das células do hospedeiro e libertando oligossacáridos. A

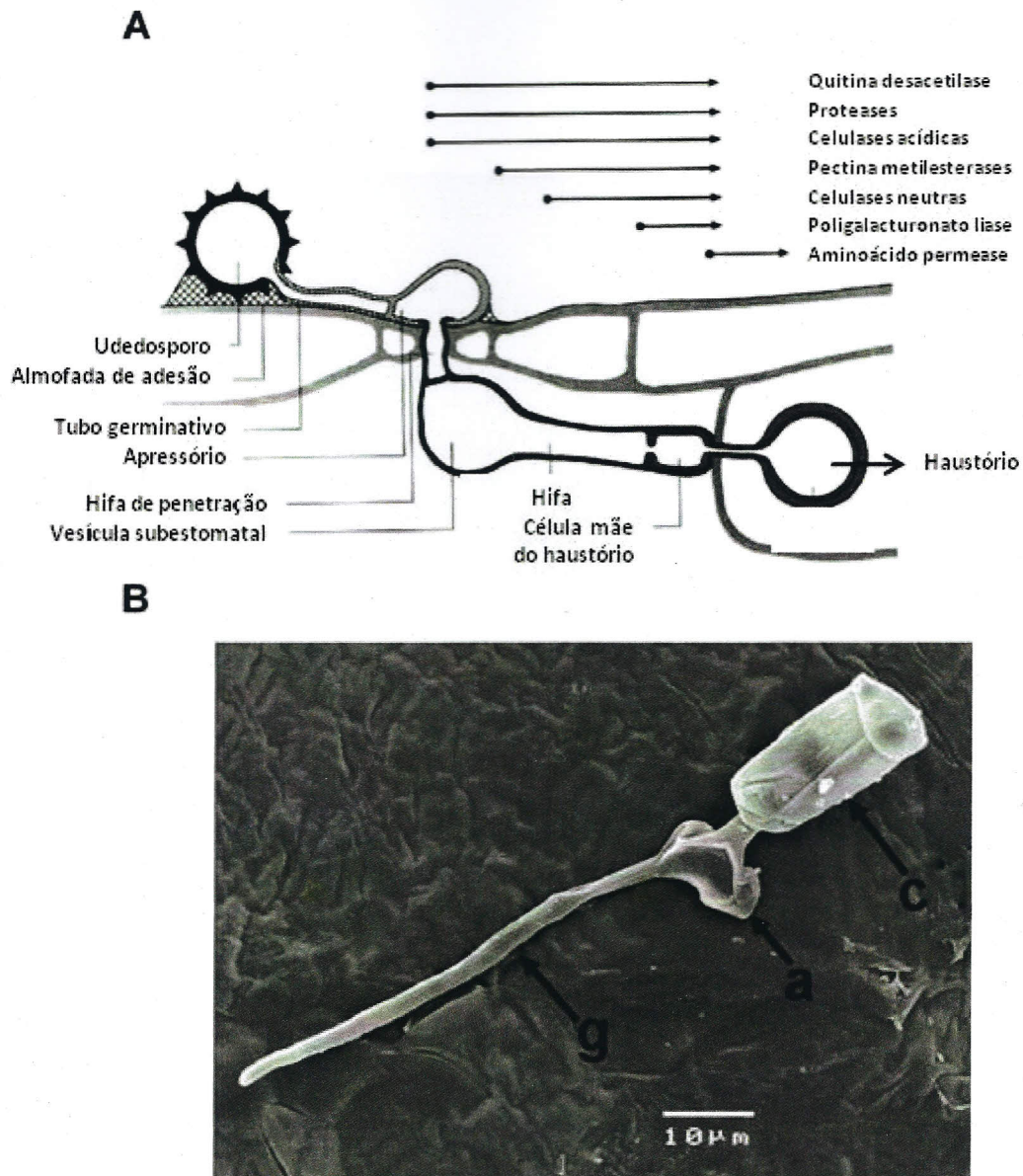


Figura 6. (A) Mecanismo concertado de diferenciação das estruturas de infecção e da produção de enzimas por *Uromyces viciae-fabae*. A penetração ocorre através dos estomas (Mendgen et al., 1996). (B) Conídio de *Erysiphe necator* (c), 16 h após a inoculação de uma folha de *Vitis vinifera* cv. Dona Maria, onde se pode ver o apressório (a) e o tubo germinativo (g). A penetração ocorre através da superfície intacta da folha (Ferreira et al., 2006).

importância das proteases é realçada pela observação que mutantes de fungos patogênicos deficientes em proteases perdem a capacidade de induzir lesões nas plantas. Durante a formação do apressório, algumas proteases exibem especificidade para glicoproteínas fibrosas, ricas em hidroxiprolina, que participam na fortificação das paredes celulares da planta.

Os oligossacáridos libertados servem como uma fonte de carbono orgânico para o fungo, mas são reconhecidos pela planta e elicitam os seus mecanismos de defesa. Deste modo, a pectina é fragmentada por endopoligalacturonases (EPGs) do fungo, com a acumulação temporária de oligogalacturônidos (OGAs), activos do ponto de vista de elicitação e com graus de polimerização entre

9 e 15. Por este motivo, os OGAs são rapidamente convertidos em fragmentos menores, biologicamente inactivos, pelas EPGs.

Para aumentar o período de existência dos oligossacáridos biologicamente activos, as plantas libertam inibidores das glicanases do fungo, incluindo inibidores das enzimas de degradação da pectina (poligalacturonases, pectinametilesterases e pectinilases) e das hemiceluloses (endoxilanasas e xiloglucana endoglucanases). Por exemplo, as proteínas inibidoras da poligalacturonase (PGIPs) são glicoproteínas presentes no apoplasto de muitas plantas que formam complexos reversíveis e de afinidade elevada com as EPGs dos fungos, reduzindo a sua actividade catalítica por uma a duas ordens de mag-

nitude. Ao limitarem a actividade das EPGs, as PGIPs aumentam o período de ocorrência dos OGAs, prolongando e/ou aumentando as respostas de defesa das plantas.

Apesar de sintetizarem cutinases e enzimas que degradam componentes da parede celular, os fungos que diferenciam apressórios melanizados, como os pertencentes aos géneros *Magnaporthe* e *Colletotrichum*, penetram a cutícula e a parede celular essencialmente com recurso a pressão de turgescência. Já foi medida, em apressórios de *M. grisea*, uma pressão de turgescência de 8,0 MPa (80 bar; comparar com a pressão normal de 0,2 MPa (2 bar) de um pneu típico de automóvel), aparentemente devida a concentrações molares de glicerol. No caso de *B.*

graminis f.sp. hordei, admite-se que a penetração resulta de uma acção combinada de actividade de celulase, presente na extremidade do tubo germinal do apressório no momento da penetração, com uma pressão de turgescência de cerca de 2 a 4 MPa. Um estudo elegante demonstrou que a penetração do bolor aquático *Saprolegnia ferax* é mediada por pressão de turgescência. Quando crescido na pressão de turgescência normal (0,44 MPa), as hifas de *S. ferax* conseguem penetrar meio de agar. Contudo, a introdução de osmólitos no seu meio de crescimento, que reduzem a pressão de turgescência para menos de 0,02 MPa, diminui a capacidade das hifas em penetrar o agar, mas não a de crescer em frente, na superfície do agar.

ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PELOS FUNGOS PARA EVITAREM A DETECÇÃO PELO HOSPEDEIRO OU PARA ESCAPAREM AOS MECANISMOS DE DEFESA DA PLANTA

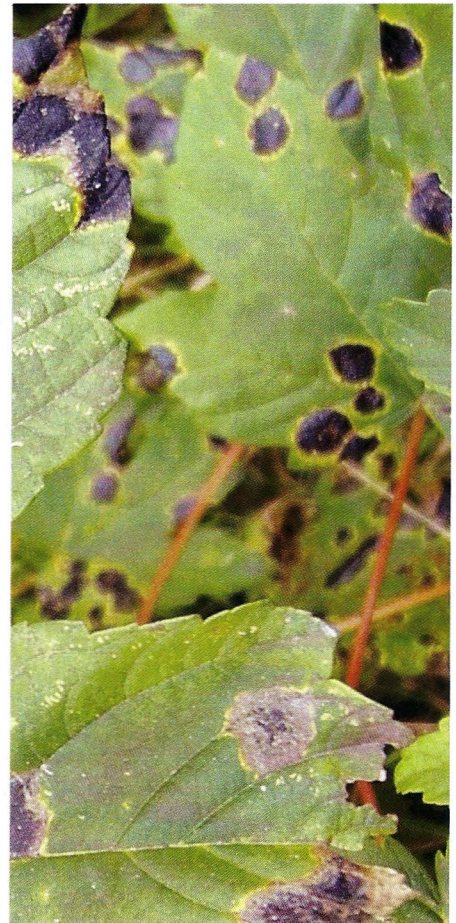
Experiências recentes têm demonstrado que a interacção molecular entre uma



planta e um fungo patogénico é bastante mais complexa que a simples produção de moléculas de ataque por parte do fungo e a resposta de moléculas defensivas por parte do hospedeiro. Por exemplo, evidências recentes questionam a visão tradicional da parede celular como uma barreira estrutural passiva, meramente constitutiva, à invasão dos agentes patogénicos. Neste sentido, as papilas são fortificações no interior da parede celular, localizadas no ponto de penetração do agente patogénico, e consideradas como uma barreira estrutural indutiva. Assim, no caso dos fungos responsáveis pelo oídio, tem-se considerado que as papilas desempenham um papel importante de defesa contra o crescimento invasivo de fungos. No entanto, observações mais recentes têm revelado que alguns processos moleculares que ocorrem na parede celular das plantas também poderão contribuir para a patogénese e, conseqüentemente, para o estabelecimento da doença. A calose, uma β -1,3-D-glucana, é rapidamente sintetizada e depositada nas paredes celulares quando a planta é atacada por um fungo patogénico. Mutantes de *A. thaliana* no gene que codifica a única glucana sintase responsável pela síntese de calose para as papilas, exibem uma resistência aumentada e de largo espectro aos fungos responsáveis pelo oídio, o que sugere um papel importante da forma não mutada do gene na colonização das células do hospedeiro pelo fungo. A calose poderá facilitar a penetração do agente patogénico nas células do hospedeiro por fornecer um colar estrutural de protecção ao intruso. A glucana também se acumula nos haustórios, após a invasão bem sucedida do agente patogénico nas células do hospedeiro. Foi, por isso, sugerido que a glucana sintase participa na contenção, no local da infecção, de eliciadores derivados do fungo, evitando, assim, a sua percepção pela planta ou protegendo o fungo invasor da acção de compostos anti-microbianos produzidos pelo hospedeiro.

Os fungos utilizam, basicamente, três tipos de mecanismos para evitarem a detecção ou a acção dos mecanismos de defesa do hospedeiro: (i) protecção das estruturas do fungo da acção dos mecanismos de defesa da planta; (ii) inibição das respostas de defesa da planta induzidas por eliciadores; (iii) supressão das defesas da planta. São apresentados, seguidamente, alguns exemplos destes tipos de estratégias.

O ataque da parede celular dos fungos pelas quitinases constitui um importante mecanismo de defesa da planta, por que liberta quitina-oligómeros biologicamente activos (são eliciadores) e enfraquece a parede celular do fungo. A actividade anti-fúngica da maioria das quitinases vegetais deriva da presença de



um domínio de estrutura de ligação à quitina, não-catalítico e específico das plantas (ChBD). O eliciador *avr4*, uma proteína *avr* extracelular produzida pelo fungo *Cladosporium fulvum* e detectada pela proteína do tomateiro Cf-4 LRR-RLP, protege o fungo da acção das quitinases do tomateiro por conter um novo tipo de ChBD. O centro de ligação para a quitina da *avr4* é maior do que o do ChBD da planta. Por isso, a *avr4* liga-se apenas à quitotriose, ao passo que o ChBD da planta também interacciona com o monómero N-acetil-D-glucosamina. A ligação de moléculas adicionais de *avr4* à quitina ocorre por interacções proteína-proteína que exibem uma cooperatividade positiva. Deste modo, a *avr4* escuda a quitina da parede celular do fungo, protegendo-a da acção das quitinases da planta.

Durante o crescimento invasivo do fungo biotrófico responsável pela ferrugem, a quitina está exclusivamente presente nas paredes celulares das estruturas exteriores do fungo. A superfície das hifas que crescem no interior das folhas do hospedeiro contém, em vez da quitina (molécula activa do ponto de vista de elicitação), quitosana (Fig. 3), um produto da desacetilação da quitina, produ-

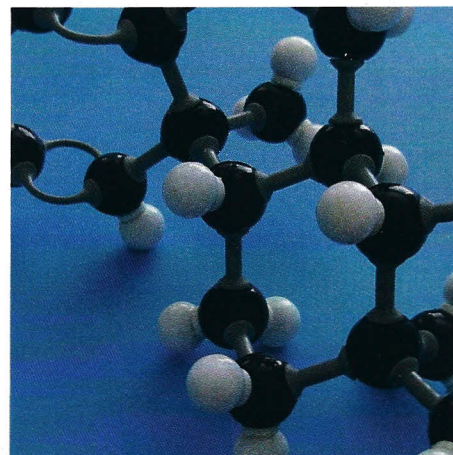
zido pela actividade enzimática de uma quitina desacetilase do fungo. A observação de que a quitosana não é activa do ponto de vista de elicitação levou Schulze-Lefert e Panstruga a propôr que "o lobo entra vestido de ovelha".

O agente patogénico do tabaco, *Alternaria alternata*, sintetiza e liberta manitol, um açúcar-álcool que faz o "quenching" das ROS, suprimindo as defesas da planta que são mediadas por estes agentes. Curiosamente, as plantas de tabaco hospedeiras, que não produzem manitol, respondem ao fungo pela expressão de manitol desidrogenase, uma enzima que cataboliza o manitol de origem fúngica.

Durante a fase de penetração das células do hospedeiro, os fungos responsáveis pela ferrugem parecem reduzir a aderência entre a membrana plasmática e a parede celular, com o objectivo de bloquear a expressão das respostas de defesa não-específicas da planta. A expressão das respostas de defesa da planta associadas à parede celular parecem depender da aderência entre a parede celular e a membrana plasmática. Péptidos contendo o motivo Arg-Gly- Asp (RGD), o qual interfere com a aderência membrana plasmática-parede celular a nível das cadeias de Hechtian, reduzem a expressão das respostas de defesa associadas à parede celular durante a penetração de células não-hospedeiras por fungos patogénicos biotróficos. Esta redução está associada a um aumento da eficiência da penetração do fungo. A ruptura dos microfilamentos não tem efeito nas cadeias de Hechtian, mas mimetiza o efeito dos péptidos RGD nas defesas da parede, o que sugere que a expressão das defesas associadas à parede envolvem a comunicação entre a parede celular e o citosol, através da membrana plasmática.

CONCLUSÃO

O estudo dos mecanismos moleculares que estão na base do estabelecimento de uma relação patogénica entre um microrganismo e um hospedeiro constitui, hoje, uma questão central, de importância primordial em Biologia. O conhecimento detalhado dos acontecimentos, a nível molecular, que têm lugar durante uma interacção planta-agente patogénico, é um objectivo essencial para o controlo das doenças no futuro e a única metodologia para o desenvolvimento de meios de luta eficazes e amigos do ambiente.



Bibliografia

- van den Burg, H.A., Spronk, C.A., Boeren, S., Kennedy, M.A., Vissers, J.P., Vuister, G.W., de Wit, P.J. and Vervoort, J. (2004) Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 279: 16786-16796.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A. and Teixeira, A.R. (2006) Fungal pathogens: The battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25 : 505-524.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A. and Teixeira, A.R. (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 8 : 677-700.
- Flor, H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*. 9: 275-296.
- Jennings, D.B., Daub, M.E., Pharr, D.M. and Williamson, J.D. (2002) Constitutive expression of a celery mannitol dehydrogenase in tobacco enhances resistance to the mannitol-secreting fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Plant Journal* 32: 41-49.
- Mellersh, D.G., and Heath, M.C. (2001) Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell*, 13: 413-424.
- Mendgen, K., Hahn, M., and Deising, H. (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 367-386.
- Money, N.P. (1995) Turgor pressure and the mechanics of fungal penetration. *Canadian Journal of Botany* 73: S96-S102.
- Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. (2003) Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 41: 641-667.

Ricardo Boavida Ferreira

Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 1349-017 Lisboa (rbferreira@isa.utl.pt)

Laboratório da Biologia da Doença e do Stresse, Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Apartado 127, 2781-901 Oeiras (rbferreira@itqb.unl.pt)