

Organizador
LEANDRO JOSÉ DALLAGNOL

RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A PATÓGENOS

RESISTÊNCIA GENÉTICA

DE PLANTAS A PATÓGENOS



Reitoria

Reitor: *Pedro Rodrigues Curi Hallal*

Vice-Reitor: *Luis Isaías Centeno do Amaral*

Chefe de Gabinete: *Taís Ullrich Fonseca*

Pró-Reitor de Graduação: *Maria de Fátima Cóssio*

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação: *Flávio Fernando Demarco*

Pró-Reitor de Extensão e Cultura: *Francisca Ferreira Michelin*

Pró-Reitor de Planejamento e Desenvolvimento: *Otávio Martins Peres*

Pró-Reitor Administrativo: *Ricardo Hartlebem Peter*

Pró-Reitor de Infra-estrutura: *Julio Carlos Balzano de Mattos*

Pró-Reitor de Assuntos Estudantis: *Mário Renato de Azevedo Jr.*

Pró-Reitor de Gestão Pessoas: *Sérgio Batista Christino*

Conselho Editorial

Presidente do Conselho Editorial: *João Luis Pereira Ourique*

Representantes das Ciências Agrônômicas: *Guilherme Albuquerque de Oliveira Cavalcanti* (TITULAR), *Cesar Valmor Rombaldi* e *Fabício de Vargas Arigony Braga*

Representantes da Área das Ciências Exatas e da Terra: *Adelir José Strieder* (TITULAR), *Juliana Pertille da Silva* e *Daniela Buske*

Representantes da Área das Ciências Biológicas: *Marla Piumbini Rocha* (TITULAR), *Rosangela Ferreira Rodrigues* e *Raquel Ludke*

Representantes da Área das Engenharias e Computação: *Darci Alberto Gatto* (TITULAR) e *Rafael Beltrame*

Representantes da Área das Ciências da Saúde: *Claiton Leoneti Lencina* (TITULAR) e *Giovanni Felipe Ernst Frizzo*

Representantes da Área das Ciências Sociais Aplicadas: *Célia Helena Castro Gonsales* (TITULAR) e *Sylvio Arnaldo Dick Jantzen*

Representante da Área das Ciências Humanas: *Charles Pereira Pennaforte* (TITULAR), *Edgar Gandra* e *Guilherme Camargo Massaiú*

Representantes da Área das Linguagens e Artes: *Josias Pereira da Silva* (TITULAR) e *Maristani Polidori Zamperetti*



**Editora
UFPel**

Filiada à A.B.E.U.

Rua Benjamin Constant, 1071 - Porto
Pelotas, RS - Brasil
Fone +55 (53)3227 8411
editora.ufpel@gmail.com

Direção

Ana da Rosa Bandeira
Editora-Chefe

Seção de Pré-Produção

Isabel Cochrane
Administrativo

Seção de Produção

Gustavo Andrade
Administrativo
Anelise Heidrich
Revisão
Ingrid Fabiola Gonçalves (Bolsista/
Estagiário)
Criação/Edição

Seção de Pós-Produção

Morgana Riva
Assessoria
Madelon Schimmelpfennig Lopes
Administrativo

Projeto Editorial e Diagramação

Ingrid Fabiola Gonçalves

Imagem da Capa

Keilor da Rosa Dorneles

Revisão Ortográfica

Anelise Heidrich

Dados de Catalogação na Publicação (CIP) Internacional
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R433 Resistência genética : de plantas a patógenos
[recurso eletrônico] / org. Leandro José Dallagnol.
– Pelotas : Ed. UFPel, 2018.
437 p. : il. – Bibliografia.
ISBN: 978-85-517-0024-2

1.Botânica. 2.Genética vegetal. 3.Melhoramento
genético. 4.Patologia vegetal. I.Dallagnol, Leandro José.

CDD: 581.15

APRESENTAÇÃO



A segurança alimentar é um tema de incontestável relevo para os Estados e para a população mundial sendo considerada inclusive como questão de segurança nacional. Patógenos que atacam as culturas cultivadas emergem frequentemente como grandes vilões, comprometendo a qualidade e a disponibilidade de alimentos. As variedades resistentes constituem ferramentas fundamentais para amenizar os danos causados por patógenos, garantido, via de regra, incrementos em produtividade. O livro, **Resistência genética de planta a patógenos**, contempla, portanto, aspectos genéticos, bioquímicos e epidemiológicos de cultivares possuindo resistência genética aos patógenos. Organizado em 9 capítulos, este livro inicia com uma visão geral da resistência de plantas a microrganismos. Em seguida são tratados aspectos voltados ao melhoramento de plantas para obtenção de genótipos resistentes, bem como os aspectos evolutivos do patógeno que estão associados à suplantação da resistência. Aspectos epidemiológicos importantes para compreender o desenvolvimento das epidemias de doenças frente aos tipos de resistência de hospedeiro são apresentados e discutidos, bem como os mecanismos de defesa que encontramos em plantas que restringem o desenvolvimento da doença. Considerando as particularidades que existem para cada grupo de patógenos (fungos, bactérias, vírus e nematoides) dedicamos capítulos específicos para tratar dos assuntos relativos à resistência de plantas aos diferentes grupos, destacando particularidades inerentes a cada grupo de patógenos, os tipos de resistência efetiva e genes de resistência conhecidos. Em suma, este livro fornece ao leitor informações básicas e aplicadas para compreensão da resistência genética de plantas aos diferentes agentes causais, contendo informações que podem ser úteis para profissionais e estudantes das áreas de Fitopatologia e Melhoramento de Plantas.

AUTORES



Ana Leticia Rocha Monteiro, Pesquisadora Dra.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Fitobacteriologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil.

Anderson L. Durante Danelli, Professor Dr.

UNIGUAÇU, Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu, União da Vitória, PR, Brasil.

Arione da Silva Pereira, Pesquisador Dr.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Caroline Marques Castro, Pesquisadora Dra.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Daniel Debona, Pesquisador Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório da Interação Planta-Patógeno, Viçosa, MG, Brasil.

Érico de Campos Dianese, Professor Dr.

UFG - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Setor de Fitossanidade, Goiânia, GO, Brasil.

Fabício de Ávila Rodrigues, Professor Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório da Interação Planta-Patógeno, Viçosa, MG, Brasil.

Hélvio Gledson Maciel Ferraz, Pesquisador Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Fitobacteriologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil.

Jerônimo Vieira de Araujo Filho, Professor Dr.

UFPel - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Nematologia, Pelotas, RS, Brasil.

João L. Nunes Maciel, Pesquisador, Dr.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Jonas Alberto Rios, Pesquisador Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório da Interação Planta Patógeno, Viçosa, MG, Brasil.

Jorge Luis Badel, Professor Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Fitobacteriologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil.

Leandro José Dallagnol, Professor Dr.

UFPel - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Interação Planta Patógeno, Pelotas, RS, Brasil.

Liane Bahr Thurow, Pesquisadora Dra.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Lúcio Mauro da Silva Guimarães, Pesquisador Dr.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia Florestal, Viçosa, MG, Brasil.

Marcelo Eiras, Pesquisador Dr.

Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, São Paulo, SP, Brasil.

Paulo Cesar Ceresini, Professor Dr.

UNESP – Universidade Estadual Paulista – Campus de Ilha Solteira, Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, Ilha Solteira, SP, Brasil.

Priscilla Aguiar Möller, Pesquisadora Dra.

UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Fitobacteriologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil.

Rita de Cássia Pereira-Carvalho, Professora Dra.

UNB - Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, Brasil.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: UMA VISÃO GERAL DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DA PLANTA A MICRORGANISMOS	13
1 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A MICRORGANISMOS	14
1.1 Mecanismos que atuam como barreira física à penetração dos microrganismos	14
1.2 Mecanismos que atuam como barreira tóxica aos microrganismos	19
1.3 Sistema de vigilância para microrganismos em plantas	22
1.3.1 Detecção pela planta de moléculas conservadas	22
1.3.2 Patógenos burlam o sistema de defesa da planta	29
1.3.3 Detecção pela planta de moléculas efetoras de microrganismos	30
1.3.3.1 Detecção do efector pelas proteínas NLRs: modelos propostos	32
1.3.3.2 Evolução de genes NLRs	34
2 RESISTÊNCIA QUE ATUA NA PLANTA NA AUSÊNCIA DE PTI E ETI	37
3 RESISTÊNCIA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO FRENTE AOS TIPOS DE PARASITISMOS	42
REFERÊNCIAS	47

CAPÍTULO 2: MELHORAMENTO DE PLANTAS VISANDO À RESISTÊNCIA A PATÓGENOS	65
1 FONTES DE RESISTÊNCIA	67
1.1 Cultivares elite	68
1.2 Coleções de germoplasma	68
1.3 Espécies silvestres	69
1.4 Mutações	70
2 EVOLUÇÃO DO PATÓGENO EM RESPOSTA A GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS	71
2.1 Mutação	72
2.2 Tamanho de população e deriva genética	73
2.3 Fluxo gênico	73
2.4 Reprodução e sistema de acasalamento	74
2.5 Seleção	75
3 MÉTODOS DE MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS	76
3.1 Melhoramento visando à resistência qualitativa	76
3.2 Melhoramento visando à resistência quantitativa	79
4 ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS	81
4.1 Um gene de cada vez (Genes R individuais)	82
4.2 Rotação de genes	83
4.3 Piramidação de genes	83
4.4 Multilinhas	84
4.5 Mistura de cultivares	85
4.6 Diversificação espacial de genes de resistência	85

5 ENGENHARIA GENÉTICA VISANDO À RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS	86
5.1 Transgenia	86
5.2 Cisgenia e Intragenia	88
5.3 Edição Genômica	89
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO 3: ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES, ABORDAGENS ANALÍTICAS E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DURÁVEL DE DOENÇAS BASEADAS NO POTENCIAL EVOLUTIVO DE FITOPATÓGENOS 103

1 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO DE FITOPATÓGENOS	103
2 MARCADORES GENÉTICOS: FERRAMENTAS IMPRESCINDÍVEIS PARA ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO DE FITOPATÓGENOS	107
3 ABORDAGENS ANALÍTICAS PARA O ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE FITOPATÓGENOS	108
3.1 Idade e origem das linhagens evolutivas de patógenos	110
3.2 Migração histórica entre populações	111
3.3 Tamanho populacional histórico	111
3.4 Recombinação	112
4 ESTRATÉGIAS DE MANEJO DURÁVEL DE DOENÇAS BASEADAS NO POTENCIAL EVOLUTIVO DE FITOPATÓGENOS	116
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	121

CAPÍTULO 4: EFEITO EPIDEMIOLÓGICO DA RESISTÊNCIA DE HOSPEDEIRO 126

1 EFEITO EPIDEMIOLÓGICO DA RESISTÊNCIA VERTICAL	127
1.1 Resistência vertical e sua popularidade	129
1.2 As cinco forças evolutivas dos patógenos	132
1.3 Estratégias de emprego de genes principais	135
1.4 Estratégias de emprego do gene R	136
1.4.1 Mistura varietal	136
1.4.2 Multilinhas	137
1.4.3 Piramidamento de genes	138
1.5 Resistência vertical e seu aumento do efeito da resistência horizontal	139
2 EFEITO EPIDEMIOLÓGICO DA RESISTÊNCIA HORIZONTAL	141
REFERÊNCIAS	145

CAPÍTULO 5: ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E ESTRUTURAIS EM PLANTAS INDUZIDAS APÓS A

DETECÇÃO DO PATÓGENO	150
1 MECANISMOS ESTRUTURAIS PÓS-FORMADOS	151
1.1 Reações de defesa citoplasmática	151
1.2 Halos	152
1.3 Papilas	153
1.4 Lignificação	154
1.5 Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina	156
1.6 Camadas de cortiça	158
1.7 Camadas de abscisão	158
1.8 Tiloses	159
2 MECANISMOS BIOQUÍMICOS PÓS-FORMADOS	161
2.1 Espécies reativas de oxigênio	161
2.2 Fitoalexinas	168
2.3 Proteínas relacionadas à patogênese	174
2.4 Reação de hipersensibilidade	178
3 UMA VISÃO INTEGRADA DAS RESPOSTAS DE DEFESA	181
REFERÊNCIAS	183

CAPÍTULO 6: RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A BACTÉRIAS	194
1 MECANISMOS MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	195
1.1 Genes envolvidos na imunidade desencadeada por PAMPs	195
1.2 Genes envolvidos na imunidade desencadeada por efetores	200
1.3 Genes de resistência executores	203
2 RESISTÊNCIA DE PLANTA NÃO HOSPEDEIRA A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	208
3 RESISTÊNCIA IDENTIFICADA EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	215
3.1 Soja	216
3.2 Feijão	218
3.3 Arroz	219
3.4 Mandioca	221
3.5 Trigo	222
3.6 Tomate	223
3.7 Pimentão	227
3.8 Café	227
4 MELHORAMENTO MEDIANTE CISGENIA, TRANSGENIA E SUPEREXPRESSÃO GÊNICA	228
5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS	232
5.1 Resistência sistêmica adquirida (RSA)	234
5.2 Resistência sistêmica induzida (RSI)	235
5.3 <i>Priming</i> da resistência	239
6 MECANISMOS MOLECULARES SUBJACENTES À VARIABILIDADE BACTERIANA	242

6.1 Variabilidade gerada por mutação	243
6.2 Transferência horizontal de genes	245
7 MECANISMOS BACTERIANOS DE SUPLANTAÇÃO DA RESISTÊNCIA VEGETAL	248
7.1 Suplantação da resistência mediada por modificações em MAMPs/PAMPs	249
7.2 Suplantação da resistência mediada por modificações nos efetores	249
7.3 Suplantação da resistência da planta não hospedeira	251
REFERÊNCIAS	254

CAPÍTULO 7: RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A VÍRUS **296**

1 VÍRUS DE PLANTAS: CONCEITOS E CARACTERÍSTICAS GERAIS	297
1.1 Sintomas: evidências da infecção viral	301
1.2 Viroses de importância econômica	302
2 VARIABILIDADE, EVOLUÇÃO E ORIGEM DOS VÍRUS DE PLANTAS	303
2.1 Espécies, estirpes, quase-espécie, patotipos e sorotipos	303
2.2 Mecanismos que geram variabilidade	306
2.3 Origem e evolução dos vírus de plantas	308
3 PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO E BANCOS DE GERMOPLASMA	311
4 CONTROLE DE VIROSES DE PLANTAS	317
4.1 Exclusão	318
4.1.1 Medidas quarentenárias	318
4.1.2 Uso de material de propagação sadio	318
4.1.3 Controle de vetores	319
4.2 Erradicação	320
4.3 Proteção	320
4.4 Terapia	320
4.5 Imunização	321
4.5.1 Imunização genética	321
4.5.2 Imunização biológica	323
4.5.3 Imunização química	323
4.6 Evasão	324
4.7 Regulação	324
5 IMUNIDADE EM PLANTAS CONTRA VÍRUS E RESISTÊNCIA GENÉTICA	325
5.1 Resistência associada a genes dominantes	327
5.2 Resistência associada a genes recessivos	331
6 RESISTÊNCIA TRANSGÊNICA	335
6.1 Histórico da transgenia para geração de plantas tecnologicamente superiores	338
6.2 Como gerar plantas transgênicas resistentes a vírus?	340
6.3 Exemplos de sucesso com aplicações em campo	342
6.4 Mecanismos de ação da resistência transgênica a vírus	342
7 VÍRUS DE PLANTAS: ALVOS E INDUTORES DE SILENCIAMENTO GÊNICO	343

8 EDIÇÃO DE GENOMAS, ALTERNATIVAS “NÃO TRANSGÊNICAS” PARA O CONTROLE DE VÍRUS DE PLANTAS	345
REFERÊNCIAS	347

CAPÍTULO 8: RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A FUNGOS **359**

1 TIPOS DE RESISTÊNCIA	360
1.1 Resistência vertical ou qualitativa	361
1.2 Resistência horizontal ou quantitativa	364
1.3 Resistência não hospedeira	365
1.4 Resistência durável	366
2 GENES DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS FÚNGICAS	368
3 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA	371
4 GENES RESISTÊNCIA E VARIABILIDADE DO AGENTE CAUSAL EM BRUSONE DO ARROZ E DO TRIGO	373
5 DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES RESISTENTES A DOENÇAS FÚNGICAS	377
REFERÊNCIAS	378

CAPÍTULO 9: RESISTÊNCIA DE PLANTAS A FITONEMATOIDES: IMPORTÂNCIA, TERMINOLOGIA & ASPECTOS BIOLÓGICOS **394**

1 ASPECTOS TERMINOLÓGICOS E A NATUREZA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A NEMATOIDES	398
2 BASES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE	406
3 GENES DE PARASITISMO VERSUS GENES DE RESISTÊNCIA	411
4 VARIABILIDADE DE POPULAÇÕES E SUAS IMPLICAÇÕES	416
REFERÊNCIAS	420

CAPÍTULO 1: UMA VISÃO GERAL DA RESISTÊNCIA GENÉTICA DA PLANTA A MICRORGANISMOS

Leandro José Dallagnol¹
Jerônimo Vieira de Araujo Filho²

¹UFPel - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Interação Planta Patógeno, Pelotas, RS, Brasil

²UFPel - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Nematologia, Pelotas, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

Plantas são constituídas, entre outros compostos, por carboidratos, proteínas, lipídeos e minerais, os quais estão organizados na forma estrutural e/ou funcional, sendo, portanto, uma excelente fonte de nutrientes. As plantas que habitam a superfície da terra atualmente derivam daquelas que emigraram da água há milhares de anos, e muito provavelmente os microrganismos acompanharam a evolução destas primeiras plantas (DANGL et al., 2013). Muitos destes microrganismos se adaptaram para ocupar novos nichos proporcionados a eles pela enorme diversidade de plantas (DANGL et al., 2013). Assim, quando uma planta ou partes delas morrem são decompostos por microrganismos os quais utilizam os constituintes vegetais como fonte de nutrientes para seu crescimento e desenvolvimento. Como a diversidade de microrganismos tende a ser bastante ampla em tecidos vegetais em decomposição, a competitividade por alimento torna-se uma luta árdua. Para fugir desta competitividade, uma provável alternativa empregada por alguns microrganismos foi adaptar-se a esses novos nichos, desenvolvendo estratégias de obtenção de alimentos onde a competitividade seja mínima – tecidos vivos de plantas. No entanto, apesar da planta secretar certa quantidade de nutrientes na rizosfera e/ou filosfera, a maior concentração deles está localizada dentro dos tecidos, no citoplasma e ou apoplasto, requerendo assim a invasão dos tecidos vegetais pelo microrganismo.

1 RESISTÊNCIA DE PLANTAS A MICRORGANISMOS

Plantas terrestres são sésseis e, apesar de não possuírem um sistema imune adaptativo semelhante aos animais, são resistentes à grande parte dos microrganismos que as atacam na tentativa de invadir seus tecidos. Este fenômeno, que caracteriza a resistência (resposta imune) como regra e a suscetibilidade a algum microrganismo como a exceção, é denominado de resistência de não hospedeiro (RNH) e é caracterizado por mecanismos que conferem resistência de todos os genótipos da espécie vegetal a todos os variantes genéticos de determinada espécie de microrganismo (HEATH 2000). A RNH nada mais é que um elaborado sistema de defesa que protege as plantas contra a invasão por microrganismos e que envolve mecanismos físicos e bioquímicos. Estes mecanismos podem ser constituintes morfofisiológicos da planta ou serem produzidos em função da detecção do microrganismo. A atuação dos mecanismos de defesa pode se dar de forma isolada e ou em conjunto, sendo a contribuição de cada mecanismo variável com o tipo de agente patogênico e o modo de infecção. Assim, mesmo que os mecanismos sejam didaticamente divididos em físicos e bioquímicos e/ou pré- e pós-formados em relação à presença do microrganismo, o efeito dos mesmos pode ocorrer de forma concomitante, sendo na prática muito mais difícil separar estes efeitos e identificar a real contribuição isolada de cada mecanismo. Neste sentido, a abordagem dos mecanismos de resistência será tratada de forma generalizada mostrando o seu efeito em patossistemas nos quais foi demonstrada uma contribuição significativa do mecanismo.

1.1 Mecanismos que atuam como barreira física à penetração dos microrganismos

Microrganismos não patógenos, normalmente, não conseguem penetrar numa planta não hospedeira por serem bloqueados pelas barreiras físicas presentes na sua superfície que se constituem em mecanismos de resistência pré-invasão (KAMOUN 2001; PINOSA et al., 2013). A primeira linha de defesa quando um microrganismo entra em contato com a planta é a barreira imposta pela cutícula e parede celular as quais são consideradas

importantes fatores da RNH.

A cutícula é estruturalmente variável entre espécies vegetais, mas em sua essência é composta por cutina, ceras e hidrocarbonetos, e está intimamente associada à parede celular das células da epiderme (SERRANO et al., 2014). Em algumas espécies vegetais, metabolitos secundários como flavonoides e triterpenoides, com ação antimicrobiana, também podem ser encontrados entre os componentes de ceras cuticulares (BUSCHHAUS; JETTER 2012; JETTER et al., 2006; SAMUELS et al., 2008). A importância desta estrutura vegetal é claramente evidenciada, por exemplo, em cevada, onde o gene *CYP96b22*, relacionado com a biossíntese de cera epicuticular, foi identificado com importante fator para a RNH devido sua contribuição na resistência à penetração de isolados de *Magnaporthe* não patogênicos (DELVENTHAL et al., 2014). Assim, a cutícula constitui *per se* uma barreira físico-química para penetração direta de microrganismos, especialmente para algumas espécies fúngicas. Neste sentido, para conseguir vencer a barreira imposta pela cutícula, o microrganismo necessita utilizar estratégias que reduz a resistência da mesma, como, por exemplo, a secreção de enzimas cutinases. A deficiência na secreção de cutinases ou a presença de inibidores da enzima na superfície vegetal resulta na prevenção da penetração do fungo na planta (AUYONG et al., 2015; KÖLLER et al., 1991). A importância das cutinases não se restringe ao rompimento da barreira física, mas são fundamentais para a adesão do conídio e do tubo germinativo do fungo na superfície vegetal, processos essenciais para a penetração na planta. Normalmente, o patógeno possuiu pequena quantidade da enzima associada ao conídio e monômeros de cutina servem de sinal para expressão dos genes da cutinase e aumento na produção da enzima pelo microrganismo desafiante.

Não obstante, a percepção pelo microrganismo de constituintes da cutícula ou sua hidrofobicidade também são requeridas para induzir a germinação do esporo e formação de estruturas especializadas para penetração, e a ausência desta percepção impede o avanço da patogênese. Por exemplo, monômeros de cutina são cruciais para induzir a germinação e formação do apressório de *Magnaporthe grisea*, formação do apressório por

Blumeria graminis e indução da proteína quinase LIPK (proteína quinase induzida por lipídeo) a qual é essencial para formação das estruturas de infecção por *Colletotrichum trifolli* (DICKMAN et al., 2003; FRANCIS et al., 1996; GILBERT et al., 1996). Ademais, os processos de pré-penetração de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* são estimulados por constituintes da cera cuticular, especialmente aldeídos de cadeias longas (HANSJOKOB et al., 2010; 2011; RINGELMANN et al., 2009). Em abacate, ceras da superfície, com a presença de triterpenoides, induzem à germinação e formação do apressório de *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno do abacate, enquanto que ceras de outras plantas não hospedeiras não induzem (KOLATTUKUDY et al., 1995; PODILA et al., 1993). Assim, enquanto que para alguns microrganismos é necessária a detecção de constituintes (componentes da cutícula) da planta para formação das estruturas de infecção, outros microrganismos são orientados pelo ambiente hidrofóbico formado pelas ceras da cutícula. Redução na hidrofobicidade da superfície foliar devido à alteração na proporção de álcool primário em mutantes *irg1* (*IRG1 – inhibitor of rust germ tube differentiation 1*: gene que codifica um fator de transcrição e regula a expressão de genes envolvidos na biossíntese da cera) inibe a diferenciação de estruturas de pré-penetração de ferrugens não adaptadas à alfafa (UPPALAPATI et al., 2012). A percepção da superfície hidrofóbica também é requerida por *B. graminis* f. sp. *hordei* para apropriada formação do tubo germinativo e apressório (CARVER et al., 1999). Estes resultados indicam, além da barreira física de cutícula, que seus componentes podem atuar como indutores para microrganismos patógenos desenvolver estruturas de infecção, e a falta do sinal apropriado (bioquímico ou físico) contribui para RNH.

Além da composição típica da cutícula, proteínas associadas à cutícula também podem ser importantes para RNH, como foi demonstrado para as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) (REINA-PINTO; YEPHREMOV 2009). Estudos têm mostrado uma complexa inter-relação entre lipídeos cuticulares e a resposta imune da planta, sugerindo que a cutícula não é simplesmente uma barreira física, mas também uma resposta de defesa dinâmica com circuitos de sinalização e moléculas elicitoras

(REINA-PINTO; YEPHREMOV 2009).

Logo abaixo da cutícula encontramos a parede celular e, em se tratando de parede celular, esta estrutura não pode ser vista apenas como uma barreira física aos microrganismos devido a sua constituição complexa englobando celulose, hemicelulose, pectina e lignina. É evidente que estes constituintes básicos da parede celular requerem por parte do microrganismo a presença de enzimas específicas (celulases, xilanases, poligalacturonases, pectato liase, pectina metil esterase, entre outras) para degradação e que a variação na complexidade de cada componente, sua concentração em relação ao órgão da planta e idade do tecido vegetal irá afetar seu nível de suscetibilidade ao ataque do microrganismo. Contudo, a parede celular de plantas é uma estrutura dinâmica e a perturbação por fatores bióticos e abióticos leva à rápida reorganização da mesma por mecanismos compensatórios para minimizar os danos. Por exemplo, mutantes de *Arabidopsis* deficientes em celulose exibem aumento na lignificação da parede celular (CANO-DELGADO et al., 2003; HAMANN 2012). Interessantemente, estas mudanças na parede surtiram efeito além de puramente estrutural, e resultaram em aumento na resposta de defesa contra agentes causais de oídio, quando a mutação afetou a deposição de celulose na parede primária, e contra patógenos necrotrofos (*Plectosphaerella cucumerina* e *Ralstonia solanacearum*), quando afetou também a parede secundária (CANO-DELGADO et al., 2003; ELLIS; TURNER, 2001; HAMANN et al., 2012; HERNANDEZ-BLANCO et al., 2007). Não obstante, proteínas quinases associadas à parede podem funcionar como sensores que monitoram a integridade da pectina pela detecção de oligogalacturonoides (liberados pela ação das poligalacturonases), os quais atuam como elicitores de resposta de defesa ativada por quinases (FERRARI et al., 2013; GALLETTI et al., 2009). No entanto, nosso conhecimento da interação planta e microrganismo ao nível de parede celular e como isto afeta a cascata de sinalização que leva à expressão das defesas ainda é bastante limitado. Para melhor compreensão é necessário expandir o entendimento do completo repertório de modificações na parede celular que ocorre durante a interação com microrganismos (MALINOVSKY et al., 2014).

Adicionalmente, a adesão entre a parede celular e a membrana

plasmática também é importante para resistência à penetração de microrganismos. A perda da conexão entre parede celular e membrana plasmática em feijão caupi resultou na redução de defesas associadas à parede celular e aumentou a penetração de fungos não adaptados à cultura (MELLERSH; HEATH 2001). Já diretamente na membrana plasmática, os fosfatídeos produzidos pela fosfolipase D são importantes componentes de sinalização e também estão associados à RNH de *Arabidopsis* contra *B. graminis* f. sp. *hordei* e *Erysiphe pisi* (PINOSA et al., 2013).

Ainda no que diz respeito à barreira física encontrada por microrganismos temos o citoesqueleto, o qual é uma rede de filamentos de proteínas (filamentos de actina), microtúbulos e pontes filamentosas interligadas que dão forma, estrutura e organização ao citoplasma da célula vegetal. Os filamentos de actina de plantas desempenham um importante papel na defesa contra penetração, especialmente contra fungos e oomicetos, e sua desestruturação, como, por exemplo, o uso de inibidores específicos de polimerização da actina, leva à perda da RNH contra vários microrganismos não patógenos, permitindo que os mesmos penetrem as células da planta (KOBAYASHI et al., 1992; 1997; YUN et al., 2003). Contudo, não podemos ver a contribuição do citoesqueleto para defesa somente como um componente estrutural das células eucarióticas para suporte das forças de compressão, mas também como constituinte essencial na resposta da planta contra penetração de potenciais patógenos por meio da formação de barreira fisiológica, reorganizando-se na agregação citoplasmática e atuando no transporte de compostos antimicrobianos, calose e componentes de fortificação da parede celular, no local da infecção (DAY et al., 2011; JANDA et al., 2014).

A importância do citoesqueleto como componente fundamental da defesa de plantas contra bactérias é evidenciada também pela secreção de efetores (moléculas, normalmente proteínas, secretadas por um patógeno para ajudar na infecção de uma determinada espécie de planta) pelo patógeno para atuar sobre seus constituintes, como demonstrado pela ação do efetor *HopW1* de *Pseudomonas syringae* que suprime a RNH permitindo que a bactéria cause infecção por meio da ruptura dos filamentos da actina em

Arabidopsis (KANG et al., 2014). Ademais, o citoesqueleto, em especial os filamentos de actina, também contribui para a RNH por desempenhar um importante papel no movimento (fechamento e abertura) estomático (DAY et al., 2011; PORTER; DAY 2016). O fechamento estomático em resposta à presença de microrganismos na superfície vegetal, especialmente para bactérias que requerem aberturas naturais ou ferimentos para penetrar o tecido da planta, foi demonstrado ser um importante mecanismo ativo limitando a entrada do microrganismo e um constituinte importante na RNH (MELOTO et al., 2006; 2008).

1.2 Mecanismos que atuam como barreira tóxica aos microrganismos

Microrganismos, antes de se estabelecer na planta, precisam também vencer uma barreira (bio)química. As plantas produzem uma ampla gama de metabólitos secundários, muitos dos quais podem atuar como antimicrobianos e assim contribuir para RNH. A maior parte dos compostos com ação antimicrobiana é derivada das rotas dos isoprenoides, fenilpropanoides, alcaloides ou ácidos graxos/policetídeos (DIXON 2001). Estes compostos são tóxicos à ampla gama de microrganismos e para que os mesmos se tornem patógenos da planta produtora destes metabólitos secundários é necessária a presença de mecanismos de detoxificação. Convencionalmente os compostos bioquímicos do metabólito secundário das plantas com ação antimicrobiana são classificados em fitoantecipinas e fitoalexinas (VanETTEN et al., 1994). Estas definições são baseadas na dinâmica de síntese dos compostos antimicrobianos e não na sua composição, o que pode gerar certa confusão às vezes, pois o mesmo composto químico pode ser considerado fitoalexina em uma planta e fitoantecipina em outra ou, até mesmo, a mesma molécula ser considerada, na mesma planta, uma fitoalexina em um órgão e fitoantecipina em outro órgão (GONZÁLES-LAMOTHE et al., 2009; GRAYER; KOKUBUN 2001).

As fitoantecipinas são os compostos antimicrobianos produzidos constitutivamente pela planta, sem a necessidade da presença do microrganismo, sendo as classes mais conhecidas dos fenóis e glicosídeos

fenólicos, lactonas insaturadas, compostos sulfúricos, glicosídeos cianogênicos, saponinas e glucosinolatos (BEDNAREK; OSBOURN 2009; GONZÁLES-LAMOTHE et al., 2009; OSBOURN 1996). Proteínas e peptídeos anti-microbianos como lisozimas, γ -tionin, defensinas, proteínas ligantes de quitina (PLQ), proteínas de transferência de lipídeos (LTPs), inibidores de protease e poligalacturonase, entre outras, também têm recebido atenção nos últimos anos como mecanismos de defesa de plantas a microrganismos (ABDALLAH et al., 2010; BEER; VIVIER, 2011; IWAI et al., 2002; LOBO et al., 2007; MOURA et al., 2007; NAWROT et al., 2014; SUN et al., 2008; PELEGRINI; FRANCO, 2005; WANG et al., 2005). Aparentemente, todas as espécies vegetais são capazes de biossintetizar constitutivamente compostos químicos com potencial função defensiva, sugerindo que esta capacidade é uma característica evolucionária (PIASECKA et al., 2015). Uma característica interessante dos compostos antimicrobianos é que alguns são encontrados na superfície da planta enquanto que outros são acumulados principalmente em células próximas à superfície do hospedeiro, especialmente vacúolos ou em organelas nas células da epiderme e liberados por meio de enzimas hidrolíticas após ataque do microrganismo (GONZÁLES-LAMOTHE et al., 2009). Alguns compostos são acumulados em sua forma ativa (exemplos: ácido gálico, catecol, avenacinas, entre outros), enquanto que outros são acumulados na forma inativa (laminarina, tuliposídeos, floridizina, arbutina, entre outras) e convertidos na forma ativa quando liberados devido à perturbação da estrutura celular por ferimentos ou ataque de microrganismos (DIXON 2001; OSBOURN 1996).

Por exemplo, em aveia, a presença a avenacina inibe o estabelecimento de *Parastagonospora nodorum* e *Gaeumannomyces graminis* f. sp. *tritici* tornando a planta não hospedeira destes fungos, enquanto que *G. graminis* f. sp. *avenae* que produz uma avenacinase, e consegue detoxificar a avenacina, é patógeno da aveia (BOWYER et al., 1995; OSBOURN 1996; PAPADOPOULOU et al 1999). No entanto, mutantes de aveia deficientes na produção de avenacina nas raízes são suscetíveis aos fungos *G. graminis* f. sp. *tritici* e a *Fusarium culmorum*, considerados não patógenos da cultura (PAPADOPOULOU et al 1999). Em *Arabidopsis*, a

presença de sulforofane é determinante para a RNH à *Pseudomonas syringae* (FAN et al., 2011), enquanto que a nicotinamida em *Amaranthus gangeticus* é determinante para a RNH ao fungo *Aphanomycese cochliodes* (ISLAM et al., 2004).

Apesar do grande número de fitoquímicos com contribuição confirmada na defesa da planta, pouco ainda é conhecido sobre seu mecanismo de ação. Das fitoantecipinas que há alguma informação acerca do modo de ação é verificado que atuam na desestabilização de membranas, na atividade de proteínas e enzimas, na homeostasis do redox celular, na cadeia de transporte de elétrons, biossíntese de proteínas, na biossíntese e integridade de constituinte parede celular, entre outros (ABDALLAH et al., 2010; ARMAH et al., 1999; BEER; VIVIER 2011; IWAI et al., 2002; LOBO et al., 2007; MOURA et al., 2007; PELEGRINI; FRANCO 2005; PIASECKA et al., 2015; PUSZTAHELYI et al., 2015; SUN et al., 2008; WANG et al., 2005). Dentre os exemplos com modo de ação mais conhecidos das fitoantecipinas estão a α -tomatina em tomate e a avenacina A-1 em aveia, as quais comprometem a bicamada lipídica da membrana do microrganismo levando à formação de poros e perda da funcionalidade biológica (ARMAH et al., 1999; PIASECKA et al., 2015).

As fitoalexinas são um grupo heterogêneo de compostos de baixo peso molecular, produzidas *de novo* a partir de um precursor remoto pelo metabolismo secundário de plantas quando expostas a algum estresse, com atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de microrganismos sendo, portanto, uma importante parte do repertório de defesas da planta (AHUJA et al., 2012; GONZÁLES-LAMOTHE et al., 2009; JEANDET et al., 2014; PIASECKA et al., 2015). O modo de ação no microrganismo das fitoalexinas é bastante variável e, semelhantemente às fitoantecipinas, para muitas moléculas ainda desconhecido. Por exemplo, para a camalexina – uma das fitoalexinas que é mais conhecida – os microrganismos sensíveis apresentaram danos na membrana celular (fungo e bactéria), redução na permeabilidade da parede celular (fungo), comprometimento na dobragem de proteínas no retículo endoplasmático (fungo) e indução da morte programada da célula (fungo) (AHUJA et al., 2012). No caso do estresse

biótico, a indução da produção de fitoalexina pode ser desencadeada pelo reconhecimento pela planta da presença de um patógeno adaptado, e também de um microrganismo não patógeno, atuando assim como importante fator para a RNH.

1.3 Sistema de vigilância para microrganismos em plantas

Assim, a linha de frente do sistema de defesa da planta consiste de barreiras físicas e químicas (apresentadas acima). Paralelamente a estes obstáculos, o microrganismo também se depara com um elaborado sistema de vigilância em cada célula, no qual sentinelas moleculares operam para ativar respostas de defesa local e com capacidade de sinalização sistêmica a partir do sítio de infecção (JONES; DANGL 2006).

1.3.1 Detecção pela planta de moléculas conservadas

Microrganismos produzem uma vasta gama de moléculas conservadas e essenciais a sua sobrevivência que funcionam como elicitores para o sistema de defesa da planta e que são chamados de padrões moleculares associados a microrganismo/patógeno (MAMP/PAMP – *microbe/pathogen-associated molecular patterns*) (Tabela 1). Alguns MAMPs têm função estrutural em algum componente celular do microrganismo como na parede celular, na membrana externa de bactérias gram-negativa, no flagelo, ou apresenta ação enzimática, atua na biossíntese de proteínas, atua como fator de virulência, entre outros (ALBERT 2013; BOLLER; FILEX 2009; BOUTROT; ZIPFEL 2017; COUTO; ZIPFEL, 2016; DODDS; TATHJEN 2010; GIRALDO; VALENT 2013; NEWMAN et al., 2013; WIRTHMUELLER et al., 2013).

Tabela 1. Padrões moleculares associados a microrganismo (MAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) que atuam como elicitores em plantas.

Tipo de elicitor		Origem	Elicitor
MAMPs	Proteína	Bactéria	Harpin, sideróforo, flagelina e epítomos (flg22 a flg15, flgII-28, CD2-1, proteína semelhante a Nep1 (NLP) e epítopo (nlp20), proteína de choque frio (CPS) e epítomos (csp22 e csp15), fator de elongação TU (EF-TU) e epítotos (elf18 a elf26, EFa50), superóxido dismutase (SOD), acil homoserina lactonas (AHL), RaxX e epítopo (RaxX21-sY)
		Fungo	Celulase, proteínas de avirulência (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5, Avr9, Avr3/Six1, Avr1/Six4, Ave1, PevD1, AvrStb6) xilanase indutora de etileno (EIX), proteína indutora de etileno e necrose (Nep1), proteína indutora de necrose (NIP1), endopoligalacturonase, proteína elicitora de <i>Magnaporthe grisea</i> (PemG1), serina protease, cutinase, hidrofobina, ciclodipeptídeos, fator de alcalinização rápida (RALF), SnTox1
		Oomiceto	Elicitina, transglutaminase GP42 e epítomos (Pep-12 e Pep25), CBEL/GP34 e CBEL epítopo (CBD2synth), NLP e NLP epítomos (nlp11, nlp20 e nlp24), PcF, glicosídeo hidrolase (XEG1)
		Vírus	Capa proteica
		Nematoide	Gr-VAP1
	Carboidrato	Bactéria	Exopolissacarídeos (EPS)
		Fungo	Quitina, oligoquitosana, β-1,3- glicano
		Oomiceto	Heptaglicosídeo, quitosacarídeos-glicano
	Lipídeo	Bactéria	Ácido lipoteicoico (LTA), ácido cis-11-metil-2-dodecenoico
		Fungo	Ergosterol
		Oomiceto	Ácido Eicosapentaenoico, ácido araquidônico

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Tipo de elicitor		Origem	Elicitor
MAMPs	Glicoproteína	Bactéria	Peptidoglicano
	Glicopeptídeo	Fungo	Invertase e epitopo (gp8c)
	Glicolípídeo	Bactéria	Lipopolissacarídeos (LPSs), Rhamnolipídeos
		Nematoídeo	Ascarosídeo
	Lipopeptídeo	Bactéria	Lipopeptídeo cíclico
	Metabolito	Fungo	Crisofanol, cerebrosídeo
	Ácido nucleico	Vírus	dsRNA
DAMPs	Proteína	Planta	Sistémica, sistémica glicopeptídeo rico em hidroxiprolina, fator de alcalinização rápida, AtPep1, subtilase, ATP sintase, peptídeos secretados induzidos por PAMP, PR-1b, grupo de alta mobilidade box 3 (HMGB3)
	Carboidrato	Planta	Glicose, D-alose, D-psicose, sacarose, trealose, galactinol, celobiose, β-1,4 glucano, oligogalacturonídeos (α-1,4 glucano), xiloglucano, laminarina, ulvan
	Lípídeo	Planta	Monômero de cutina (HESA)
	Nucleotídeo	Planta	ATP extracelular

Adaptado de Boutrot & Zipfel (2017)

O microrganismo também libera fragmentos do hospedeiro durante a tentativa de penetração no tecido vegetal, os quais também funcionam como elicitores e são chamados de padrões moleculares associados a danos (DAMP – *damage-associated molecular patterns*) (Tabela 1) (BOUTROT; ZIPFEL, 2017; CHOI; KLESSIG, 2016; NEWMAN et al., 2013). Estes elicitores (MAMP/PAMP/DAMP) são reconhecidos pela planta por meio de proteínas chamadas de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs – *Pattern recognition receptors*) (Tabela 2), os quais são sintetizados no retículo endoplasmático e transportados para a membrana plasmática (FRESCATADA-ROSA et al., 2015).

Tabela 2. Exemplos de fontes de padrões moleculares associados a microrganismo (MAPMs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e seus respectivos receptores em plantas.

MAMPs				
Microrganismos	Fonte	Molécula/fragmento	PRRs	Tipo de PRR
Bactérias	Proteína de choque frio	sps22	CORE	LRR-RLK
	Flagelina	fgl22	FLS2	LRR-RLK
		fglIII-28	FLS3	LRR-RLK
	Fator de elongação TU (EF-Tu)	elf18	EFR	LRR-RLK
	Componente da parede celular/ Membrana externa	Peptidoglucano	LYM1/LYM3	LysM-RLK
		Exopolissacarídeo	EPR3	LysM-RLK
		Lipopolissacarídeo	LORE	Lectina-RLK
Fungos	Toxina	SnTox1	Snn1	WAK-RLK
	Xilanase	EIX	LeEix1/LeEix2	LRR-RLP
	Pectinase	Endopoligalacturonase	RLP42/RBPG1	LRR-RLP
			RLP30	LRR-RLP
	Componente da parede celular	Quitina	OsCEBiP	LsyM-RLP
			AtLYM2	LsyM-RLP
			LYK5/CERK1	LsyM-RLK
	Componente proteináceo	SCFE1	RLP30	LRR-RLP
Oomicetos	Elicitina	INF1	ELR (SmRLP85)	LRR-RLP
	Necrose e peptídeo indutor de etileno	nlp20	RLP23	LRR-RLP

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

DAMPs				
Planta	Componente da parece celular	Oligogalacturonideos	WAK1	EGF-RLK
	Peptídeo elicitor de planta	Pep1-6	PEPR1	LRR-RLK
		Pep1-2	PEPR2	
	ATP extracelular	eATP	DORN1	Lectina-RLK
	Peptídeos secretados induzidos por PAMP	PIP1/PIP2	RLK7	LRR-RLK

Abreviações: EGF (*epidermal growth factor*): fator de crescimento epidermal; LRR (*leucine-rich repeat*); região rica em leucina; LysM (*lysine motif*):motivo de lisina; PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) padrão molecular associado a patógeno; PRR (*pattern recognition receptor*): receptor de reconhecimento de padrão; RLK (*receptor-like kinase*): receptor semelhante a quinase; RLP (*receptor-like protein*): proteína semelhante a receptor. Adpatado de Yu et al., (2017) e Boutrot & Zipel (2017).

As PRRs são classificadas em duas famílias: receptor tipo quinase (RLK, *Receptor-Like Kinase*) ou receptor tipo proteína (RLP, *Receptor-Like Protein*). RLK contém um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular de sinalização, enquanto que no RLP falta um domínio de sinalização intracelular (BOUTROT; ZIPEL 2017; YU et al., 2017). O reconhecimento dos elicitores (compostos que ativam o sistema de defesa da planta) pelos receptores da planta desencadeia sinalização para expressão gênica que resulta em resistência (resposta imune / RNH) também chamada de PTI (*PAMP/Pathogen triggered immunity*) (Figura 1). As PRRs normalmente formam um complexo dinâmico com correceptores e outras proteínas regulatórias para assegurar a imediata ativação da sinalização. As respostas de defesa iniciam de segundos a minutos após o reconhecimento do elicitor, sendo espaço temporal dinâmica, e continuamente expressa durante horas ou dias (Figura 1). Como os MAMPs/ PAMPs são altamente conservados e funcionalmente essenciais para a adaptabilidade/sobrevivência do microrganismo, o seu reconhecimento e a PTI desencadeada são eficientes componentes da RNH (LEE et al., 2017).

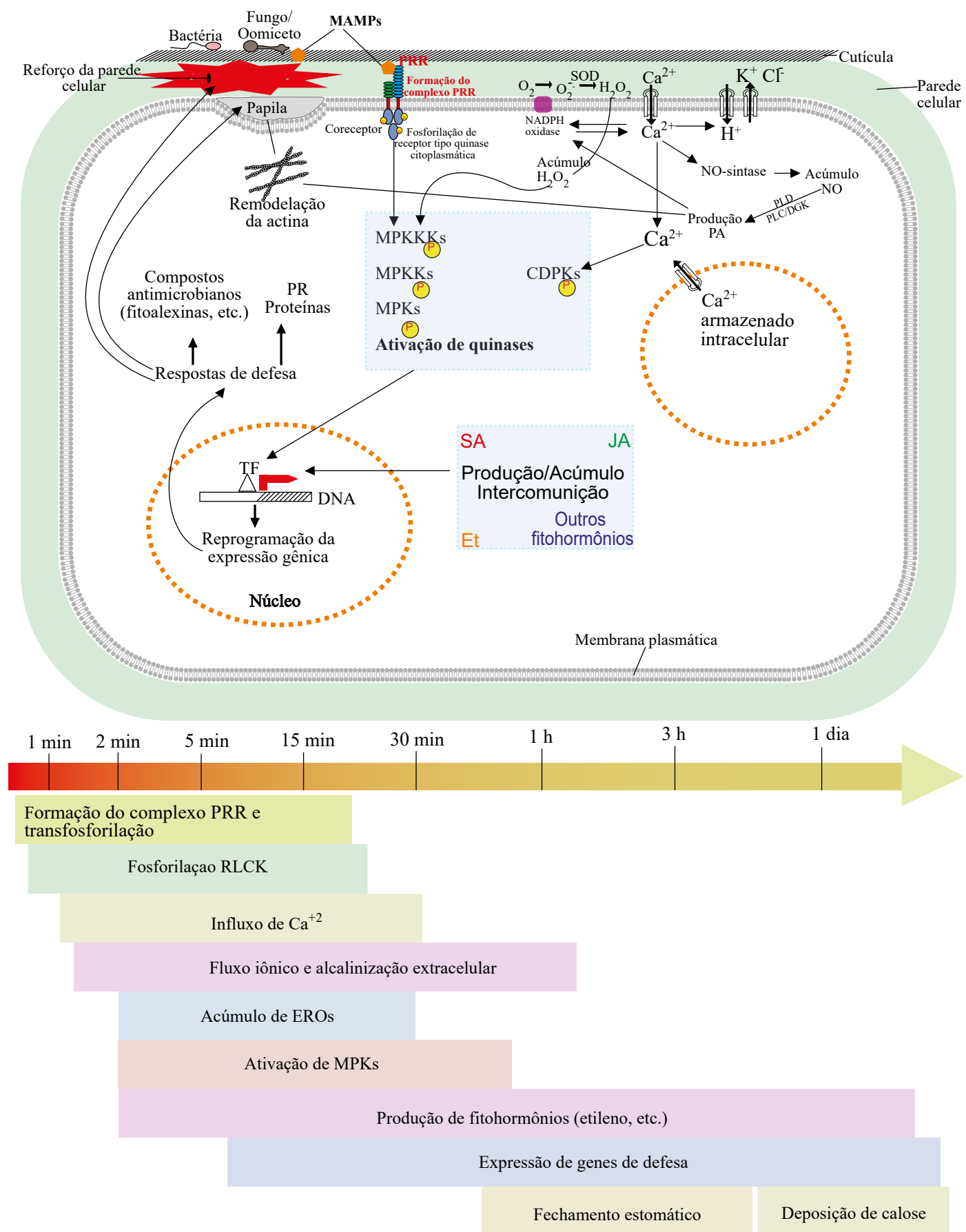


Figura 1. Representação esquemática dos eventos de defesa e sua dinâmica temporal de acontecimento após a detecção do microrganismo pelos receptores de padrões da planta (PRR). A percepção dos MAMPs pela PRR, a qual recruta coreceptores, leva a formação de uma série de respostas fisiológicas e celulares interconectadas. A formação do complexo PRR é acompanhada pela rápida fosforilação no complexo e fosforilação de quinases citoplasmáticas [MPKs e CDPKs (quinase dependentes de Ca^{2+})] as quais, juntamente com acúmulo de

fitohormônios, induzem mudança na transcrição gênica e outras respostas de defesa. As respostas típicas da PTI incluem rápido influxo e acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs: O^- ; H_2O_2 ; OH) e óxido nítrico (NO), efluxo de íons, produção de ácido fosfatídico (PA), remodelação dos filamentos de actina, produção de fitohormônios (SA: ácido salicílico; JA: ácido jasmônico; Et: Etileno), movimento estomático, deposição de calose e reforço da parede celular. Algumas destas defesas são induzidas apenas temporariamente enquanto outras são de longa duração. PLD: fosfolipase D; PLC/DGK: fosfolipase C/diacilglicerol; RLCK: receptor tipo quinase; SOD: Superóxido dismutase; TF: fator de transcrição. Fonte: BIGEARD et al. (2015); COUTRO; ZIPFEL (2016); KUSHLAPPA et al. (2016); YU et al. (2017)

A resistência (RNH) desencadeada pelo reconhecimento de elicitor pode ser fenotipicamente caracterizada pela ausência de sintomas ou com morte localizada de poucas células no local de penetração do microrganismo também chamada de resposta de hipersensibilidade (HR) (BAXTER et al., 2014; BOLLER; FELIX 2009; DODDS; RATHJEN 2010; MACHO; ZIPFEL 2015; STAEL et al., 2015; TRDÁ et al., 2015; UMA et al., 2011). Na RNH com HR é observado o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, sinalização envolvendo MAPKs, biossíntese de hormônios, especialmente ácido salicílico, ácido jasmônico ou etileno, reprogramação da expressão gênica em especial a indução de genes relacionados à defesa (AN; MOU 2012; BOLLER; FELIX 2009; CHENG et al., 2012; NARUSAKA et al., 2005; TRUJILLO et al., 2004; TSUDA; KATAGIRI 2010; YUN et al., 2003; ZHANG et al., 2011). Entre os genes de defesa ativados na RNH com HR podem ser encontrados aqueles relacionados com a produção das proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas), das rotas de biossíntese de compostos contendo nitrogênio, dos terpenoides, fenóis e flavonoides que poderão resultar no engrossamento e lignificação da parede celular, formação de papila, acúmulo de fitoalexinas, entre outros. Estes mecanismos de defesa bloqueiam a penetração e multiplicação do microrganismo na célula vegetal. No caso de RNH caracterizada pela ausência de qualquer sintoma (sem HR), tipo de resistência que provavelmente seja de ocorrência mais frequente na natureza, o processo de infecção pelo microrganismo é interrompido por barreiras físico-químicas pré-formadas (descritas anteriormente) e/ou por respostas de defesa induzidas. Contudo, mesmo sem desencadear HR ocorrem várias mudanças moleculares como ativação de genes que

codificam PR proteínas e outros mecanismos de defesa semelhantes aos ativados quando há HR (MYSORE; RYU 2004). Embora haja relatos de PRRs conferindo apenas resistência parcial à planta, normalmente a RNH é absoluta e qualitativa, ou seja, a espécie vegetal possui a RNH e impede que o microrganismo se estabeleça em seus tecidos, ou não possui a RNH e, neste caso, é hospedeira do microrganismo, o qual é então chamado de patógeno.

1.3.2 Patógenos burlam o sistema de defesa da planta

Patógenos adaptados à espécie vegetal produzem fatores de virulência, também chamados de efetores, codificados por genes específicos de virulência/avirulência (genes *Avr*) (BOLLER; FELIX 2009; OLIVER; SOLOMON 2010). Estes efetores, apesar de mais estudados em patógenos biotrófico e hemibiotrófico, são produzidos por qualquer patógeno independente do tipo de parasitismo (biotrófico, hemibiotrófico ou necrotrófico) que estabelece com o hospedeiro, e atuam suprimindo a RNH e a resistência de hospedeiro e modificando a fisiologia celular do hospedeiro para obtenção de nutrientes e favorecer a colonização (LO PRESTI et al., 2015).

Os efetores podem atuar no espaço intercelular (inibindo a atividade de enzimas de defesa, mascarando a presença do patógeno ou sequestrando oligômeros do patógeno que servem de elicitor para as defesas da planta) ou interior da célula (interferindo na sinalização, tráfego de vesículas, expressão gênica, proteólise, ubiquitinação de moléculas, homeostase hormonal, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, organização do citoesqueleto, entre outros alvos) (DESLANDES; RIVAS 2012; LO PRESTI et al., 2015). Bactérias (gram-negativas), patógeno que tipicamente coloniza o espaço intercelular, injetam os efetores diretamente dentro da célula do hospedeiro por meio de um sistema especializado para secreção de efetores chamado de sistema de secreção tipo III. Fungos e oomicetos secretam os efetores através da rota de secreção eucariótica geral no espaço intercelular do hospedeiro ou na matrix extrahaustorial (PANSTRUGA; DODDS 2009). A entrada na célula vegetal desses efetores ainda não está completamente esclarecida,

mas é provável que envolva a exploração da rota endocítica das células eucarióticas (KALE et al., 2010; PETRE; KAMOUN 2014). Nematoides por sua vez secretam efetores no espaço extracelular e/ou no citoplasma do hospedeiro por meio do estilete (REHMAN et al., 2016). Em contraste com os MAMPs altamente conservados, os efetores são altamente variáveis e frequentemente dispensáveis (DODDS; RATHJEN 2010). Ademais, a secreção dos efetores é ordenada e controlada durante a patogênese, sendo a ordem e a intensidade de secreção determinados pelas diferentes fases da infecção e colonização conforme é requerida a alteração de um processo fisiológico vegetal de defesa ou transporte de nutrientes (LEE; ROSE, 2010; STASSEN; ACKERVEKEN 2011).

1.3.3 Detecção pela planta de moléculas efetoras de microrganismos

Os microrganismos que conseguem vencer os mecanismos de RNH se tornam patógenos da espécie vegetal e precisam atuar contra a resistência de hospedeira que a planta possui. As plantas também possuem um sistema de vigilância que detecta/monitora a presença ou atividade das moléculas efetoras dentro de seus tecidos e células. Esse sistema de vigilância é composto por receptores específicos (proteínas R) codificados por genes *R* da planta (BOLLER; FELIX 2009; DU et al., 2015; JONES; DANGL 2006; SARRIS et al., 2015). As típicas proteínas R, também chamadas de receptor intracelular com ligação de nucleotídeos e domínios ricos em leucina (NLRs – *nucleotide-binding, leucine rich domain*), possuem um domínio rico em leucina (LRR – *leucine rich region*), um domínio de ligação ATPase (NB – *nucleotide binding ATPase*) e um domínio TIR (*Toll interleukin-1 receptor*) ou CC (*coiled coil*) formando as proteínas TIR-NB-LRR ou CC-NB-LRR, respectivamente (LI et al., 2015). No entanto, há outras três categorias de proteínas NLRs em plantas que incluem: as proteínas truncadas (nas quais falta um ou dois dos três domínios encontrados nas típicas proteínas R), as proteínas com domínios atípicos e as proteínas com montagem atípica (Tabela 3).

Tabela 3. Categorias das proteínas NLRs (genes *R*) e seus domínios.

Categorias dos genes NLRs	Domínios
NLRs típico	CC-NB-LRR TIR-NB-LRR
NLRs truncados	TIR-X NB-LRR TIR-NB X- TIR-NB-X X-CC
NLRs com domínios atípicos	TIR-NB-LRR-WRKY TIR-NB-LRR-LIM SD-CC-NB-LRR PK-NB-LRR ZF-NB-LRR α/β Hidrolase-NB-LRR BED-NB-LRR WRKY-TIR-NB-LRR-MAPKKK
NLRs com montagem atípica	TIR-NB -TIR-NB-LRR TIR-TIR-NB-LRR TIR-NB-LRR-TIR NB-TIR-NB-LRR TIR-NB-LRR-NB TIR-NB-LRR-NB-TIR TIR-NB-LRR-NB-TIR-LRR CC-NB-NB-LRR CC-NB-LRR-NB-LRR TIR-CC-NB-LRR

TIR (*Toll interleukin-1 receptor domain*): domínio receptor *Toll interleukin-1*; CC (*coiled coil domain*): domínio *coiled coil*; LRR (*leucine rich repeat domain*): domínio rico em repetições de leucina, NB (*nucleotide binding ATPase domain*): domínio de ligação ou hidrolise de nucleotídeo; X: domínio não caracterizado.

WRKY (DNA-binding domain): domínio de ligação a DNA; SD (*Solanaceae domain*): domínio encontrado especificamente em solanáceas; PK (*protein kinase domain*): proteína quinase; ZF (*zinc finger domain*): domínios dedos de zinco; BED (*zinc finger BED domain*); MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase domain*): proteína quinase-quinase-quinase ativada por mitógeno. Adaptado de Li et al., 2015.

Para uma NLR típica, o domínio CC/TIR funciona como uma plataforma de interação para proteínas monitoradas (veja a seguir modelos de reconhecimento), o domínio NB- serve para ligação do ATP e hidrólise/cascata de sinalização; e o domínio LRR atua para ativação/autoinibição (LUKASIK; TAKKEN 2009). No domínio LRR, a parte N-terminal atua na modulação da ativação enquanto que a parte C-terminal está relacionada com a especificidade de reconhecimento (LUKASIK; TAKKEN 2009). Proteínas dos genes NLRs em sua forma inativa (ausência do cognato efetor) tipicamente estão localizadas no citoplasma da célula hospedeiras ligadas à membrana plasmática, ao retículo endoplasmático ou tonoplasto e na presença do cognato efetor podem se mover para o núcleo interagindo com fatores de transcrição ou interagir com outras proteínas do citoplasma para iniciar a cadeia de sinalização para expressão das defesas (QI; INNES, 2013). As proteínas R são amplamente conhecidas como importantes componentes da resistência de hospedeiro, no entanto a possibilidade da participação de múltiplas proteínas R também na RNH não é descartada.

A detecção do efetor desencadeia uma cascata de sinalização que culmina na expressão de genes de defesa e HR para conter o avanço do patógeno, resultando na resistência raça específica. A resistência desencadeada por efetor, chamada de resposta imune desencadeada por efetor (*ETI- effector triggered immunity*), é qualitativa e também conhecida como resistência vertical (BOLLER; FELIX 2009; GIRALDO; VALENT, 2013). A ETI é um dos principais componentes da resistência de hospedeiro.

1.3.3.1 Detecção do efetor pelas proteínas NLRs: modelos propostos

A ETI é ativada pela interação direta ou indireta entre um ou mais efetores e uma ou mais proteínas NLR. A interação direta, também conhecida como modelo receptor-ligante, é o direto reconhecimento do efetor do

patógeno pelo receptor (proteína NLR) da planta. Poucos são os exemplos conhecidos até o momento em que o reconhecimento do efector se dá de forma de interação direta proteína efetora e proteína NLR. Alguns exemplos são a proteína Pi-ta em arroz que reconhece a proteína Avr-Pita de *Magnaporthe oryzae*, as proteínas L5/L6 de linho que reconhece o efector AvrL567 de *Melampsora lini*, e em arabidopsis a proteína RPP1 que reconhece o efector Atr1 de *Hyaloperonospora* e a proteína RRS1 que reconhece o efector PopP2 de *Ralstonia solanacearum* (LI et al., 2015).

Contudo, o que é mais comum é o reconhecimento indireto onde a proteína NLR interage com outras proteínas do hospedeiro as quais são alvos da ação do efector. No reconhecimento indireto, há dois modelos básicos para explicar o reconhecimento do patógeno: o modelo guarda no qual o NLR (monitor) detecta modificações induzidas pelo efector em uma proteína (monitorada) e o modelo *decoy* onde o NLR detecta alterações em uma proteína que mimetiza o alvo do efector, mas que não apresenta uma função biológica clara (STUART et al., 2013). No modelo guarda há duas hipóteses de atuação da proteína R. Na primeira hipótese, importantes alvos celulares do hospedeiro são monitorados pela proteína R e a indução da ETI ocorre se o alvo monitorado for perturbado pela ação do efector. Na segunda hipótese, a proteína R e o alvo estão juntos (ligados fisicamente) e inativos. Durante a infecção ocorre a modificação da proteína alvo (monitorada) pela ação do efector liberando a proteína R (monitora) permitindo assim que a mesma inicie a cascata de sinalização que leva à indução da ETI. Um exemplo do modelo guarda é a proteína RIN4 em Arabidopsis que é monitorada pelas proteínas RPM1 e RPS2. A proteína RIN4 é um regulador negativo da resistência de plantas, pois atua junto a H⁺-ATPase favorecendo a abertura estomática (LIU et al., 2011). Ao menos dois efetores de *Pseudomonas syringae* atuam sobre a proteína RIN4: o efector AvrB/AvrRpm1 atua induzindo a fosforilação do RIN4 e o efector AvrRpt2 atua clivando o RIN4. As duas proteínas R que monitoram o estado da proteína RIN4 detectam a fosforilação da mesma (proteína RPM1) ou sua clivagem (proteína RPS2). A ação do efector sobre a proteína RIN4 leva à ativação das proteínas RPM1 ou RPS2 ativando a resposta de defesa da planta e a expressão da ETI (SPOEL; DONG 2012).

O modelo *decoy* sugere que durante a evolução do hospedeiro este adquiriu proteínas que são similares ao alvo do efector e que funciona como sentinela para a presença do efector. Não se conhece outra função para os alvos do modelo *decoy* os quais devem ter sido originados por eventos de duplicação gênica ou variante do alvo normal do efector (STUART et al., 2013).

As proteínas NLR são codificadas pelos genes *R* que, por serem genes com elevado efeito no fenótipo, são aqueles comumente utilizados em programas de melhoramento para a obtenção de genótipos com resistência qualitativa. A explícita relação entre o gene *R* da planta e o gene *Avr* do patógeno foi base para o estabelecimento da hipótese da interação gene-a-gene entre planta e patógeno também conhecida como Teoria de Flor (FLOR 1971), a qual destaca a especificidade do reconhecimento entre a proteína *R* e sua cognata proteína *Avr* (efetor). Embora a interação genética entre o efector do patógeno e sua cognata proteína *R* geralmente siga o padrão gene-a-gene, o relacionamento bioquímico varia dependendo da especificidade do par proteína *R* e efector (LI et al., 2015). Contudo, as proteínas *R* são apenas um sistema de vigilância que ativa uma série de reações/sinalizações que culminam na expressão da HR a qual é resultado de vários mecanismos de defesa como acúmulo de espécies reativas de oxigênio, PR proteínas, fenóis, fitoalexinas, calose, entre outras respostas (KUSHALAPPA et al., 2016).

A resistência conferida pelos genes *R* exerce pressão de seleção na população do patógeno a favor de indivíduos que conseguem evadir da detecção pelas NLR, sendo, portanto, a durabilidade desta resistência dependente da essencialidade do efector para virulência ou adaptabilidade do patógeno e do seu potencial evolucionário.

1.3.3.2 Evolução de genes NLRs

A resistência completa, na maioria das vezes, conferida pelos genes *R* leva à conhecida corrida armamentista entre planta e patógeno. Estes ciclos interativos de adaptações do efector e receptor é que governam a coevolução de genes *R* em plantas e efetores no patógeno. Pelo lado do patógeno há o potencial de produção de inúmeros efetores, muitos dos quais apresentam função redundante, fato que permite que alguns dos efetores

possam ser perdidos ou modificados sem grande efeito na virulência do patógeno (WIN et al., 2012). Esta evolução dos efetores no patógeno é necessária para aumentar virulência ou escapar da detecção pela cognata proteína R, por outro lado, a planta também evolui seus genes *R* para detectar os novos efetores (RAVENSDALE et al., 2011). A família de genes NLR foi amplamente expandida em várias espécies de plantas. A massiva expansão rendeu aos genes NLRs uma das maiores e mais variáveis famílias de proteínas em plantas (CLARK et al., 2007; OSSOWSKI et al., 2008). Análises dos genes *R* em plantas mostram que os NLRs estão distribuídos desigualmente no genoma e mostram uma clara tendência para formação de clusters de tamanhos variáveis, podendo chegar até mais de 10 NLRs em algumas espécies (AMELINE-TORREGROSA et al., 2008; JUPE et al., 2012; ZHOU et al., 2004). Do ponto de vista evolucionário, a organização em cluster é considerada como um reservatório de variação genética (MICHELMORE et al., 1998).

Os clusters podem ser divididos em dois tipos dependendo do conteúdo dos NLRs (JACOB et al., 2013). Clusters homogêneos usualmente contêm o mesmo tipo de NLRs (CC-NB-LRR ou TIR-NB-LRR) ou clusters heterogêneos contêm uma mistura de diversos NLRs. Os clusters homogêneos são formados por duplicação em tandem enquanto que os heterogêneos são derivados de duplicação ecotópica, transposição e /ou duplicação segmental em larga escala com subsequente rearranjo local (MARONE et al., 2013). Há evidências indicando que o tamanho dos clusters de NLRs é positivamente correlacionado com a densidade de transposons no mesmo cromossomo, indicando que esses elementos móveis possivelmente estejam aumentando a instabilidade genômica e a probabilidade de recombinação (JACOB et al., 2013).

Assim, a evolução da família de genes NLR envolve a conjunção de duplicação, *crossing over* desigual, recombinação ecotópica ou conversão gênica, além da seleção positiva, uma força evolucionária que favorece o acúmulo de mutações (JACOB et al., 2013). Estes autores descreveram a dinâmica evolucionária de genes NLR em três diferentes níveis.

O primeiro envolve eventos de duplicação local e em larga escala

os quais são responsáveis pela expansão do repertório de NLR, contudo esse processo é parcialmente compensado por mecanismos de contração gênica. Esses processos resultam em uma alta rotação de genes que pode continuamente renovar o repertório de NLR e ao mesmo tempo limitar o número total destes genes, processo conhecido como nascimento e morte de genes (MICHELMORE et al., 1998). Do ponto de vista biológico, limitar o número de genes NLR pode ser algo importante uma vez que o produto destes genes pode ter um custo metabólico para a planta, enquanto que a diversidade e renovação gênica podem gerar e manter a ampla gama de especificidade da resistência.

O segundo nível envolve distintos padrões evolucionários nas subfamílias. Em alface (*Lactuca* spp.) foi identificado dois padrões evolucionários para NLRs: tipo I caracterizado por um modo rápido consistindo de frequente troca de sequências com outros loci de NLR e seguida de seleção diversificada; enquanto que o tipo II é caracterizado por um modo conservador com infrequente troca de sequências e seleção purificadora (KUANG et al., 2004). Estas observações também foram confirmadas para outras espécies vegetais sugerindo que esses dois mecanismos governam a evolução da maioria dos genes NLR em plantas (JACOB et al., 2013). Ademais, há uma tendência do tipo II ser encontrado numa minoria de genes NLR, presentes como únicos ou em poucas cópias, e o tipo I encontrado em NLRs de famílias multigênicas ou clusters, e havendo uma positiva correlação entre a frequência de troca na sequência com o número de cópias do gene e com o tamanho do cluster (CHEN et al., 2010; GUO et al., 2011). Isto explica parcialmente porque genes em famílias multigênicas ou em clusters são mais propensos à diversificação e porque genes únicos permanecem como tais (JACOB et al., 2013).

O terceiro nível envolve diferentes mecanismos de seleção que podem ser detectados a nível intragênico, especialmente nas regiões codificando distintos domínios dos genes NLR. O domínio NB tende a estar sob seleção purificadora desfavorecendo o acúmulo de mutações não sinônimas, enquanto seleção positiva para diversificação é frequentemente encontrada no domínio LRR e algumas vezes em outras partes do NLR (ASHFIELD et al., 2012; CHEN et al., 2010; MONDRAGÓN-PALOMINO

et al., 2002; SEEHOLZER et al., 2010).

Estes mecanismos de evolução em vários níveis contribuem para o alto grau de variação inter e intragênica dos NLRs e somam para alto repertório de NLRs específicos (CHEN et al., 2010; LI et al., 2010; YUE et al., 2012).

2 RESISTÊNCIA QUE ATUA NA PLANTA NA AUSÊNCIA DE PTI E ETI

A PTI e a ETI podem ser consideradas resistências qualitativas, ou seja, resistência completa contra o agente patogênico. Na ausência da PTI e ETI funcional, [devido à reduzida ou não funcionalidade das proteínas de reconhecimento dos MAMPs ou efetores/ da falta de ordenação e sincronização da sinalização para defesas e/ou da sua expressão, bem como ao amplo repertório de mecanismos funcionais de ataque do agente patogênico (diversidade de efetores secretados, enzimas e toxinas)] ocorre a infecção da planta. Nesse caso, o avanço da colonização pelo patógeno será combatido pela resistência basal do hospedeiro, também chamada resistência incompleta, resistência parcial ou resistência quantitativa (BOYD et al., 2013; KIM; HWANG 2015; NIKS et al., 2015; UMA et al., 2011; WASZCZAK et al., 2015).

O aspecto quantitativo da resistência quantitativa (parcial), de acordo com as definições de Parlevliet (1978), se refere ao aspecto do fenótipo da planta. Parlevliet (1978) define a resistência quantitativa como o tipo de resistência que retarda o desenvolvimento da epidemia no campo, embora a planta mostre um aspecto suscetível (sem HR). Assim, a resistência quantitativa é fenotipicamente uma resistência incompleta e caracterizada pela redução da intensidade da doença, mas não a sua ausência, quando comparada a fenótipos mais suscetíveis. A resistência quantitativa pode ser quantificada com base nos processos monocíclicos (componentes de resistência), como eficiência de infecção, período de incubação, período latente, taxa de expansão da lesão, taxa de esporulação por lesão, ou como processo policíclico, especialmente em condições de campo, como taxa aparente de infecção e

área abaixo da curva de progresso da doença (KUSHALAPPA; GUNNAIAH 2013). Ainda do ponto de vista fenotípico, a resistência quantitativa exibe uma distribuição contínua de valores de resistência que não se ajusta nas proporções de segregação Mendeliana. Embora na definição de Parlevliet (1978) não contenha a noção de que a herança seja poligênica, os resultados de pesquisa atuais demonstram que a resistência quantitativa normalmente é poligênica (NIKS et al., 2015). Genotipicamente a resistência quantitativa é baseada na junção do efeito combinado de vários (ou muitos) genes, cada um contribuindo quantitativamente para o nível de resistência da planta, podendo ser influenciados pelo ambiente e entre si (NIKS et al., 2015). Poland et al. (2009) ressaltam que os mecanismos que atuam na resistência quantitativa também podem estar relacionados em características associadas à regulação de crescimento e desenvolvimento, produção de compostos de defesa, tradução de sinal, ou fraca ETI ativada por proteínas “R” defeituosas ou outros mecanismos ainda não identificados.

A hipótese mais provável para a origem da resistência quantitativa é que ela seja proveniente de uma supressão incompleta da PTI pelos efetores do patógeno (NIKS et al., 2015). Isto está embasado no que é conhecido até o momento em relação à função das poucas proteínas identificadas como envolvidas na resistência quantitativa, tráfego de vesículas e transporte de proteínas/metabólitos, os quais são processos fisiológicos comuns relevantes para a resistência quantitativa (NIKS et al., 2015). Assim, NHR e resistência basal (resistência quantitativa) representam os mesmos mecanismos de defesa. Com o avanço no conhecimento da resistência quantitativa, fica cada vez mais evidente sua conexão com a ETI/PTI. NHR representa a completa ineficiência do microrganismo em suprimir a PTI e a resistência quantitativa uma supressão parcial da PTI (INGLE et al., 2006, NIKS; MARCEL, 2009). Ademais, devemos considerar que baseado no fato de genes de defesa contribuir para resistência quantitativa, e que patógenos secretam efetores que têm como alvos de ação mecanismos de defesa da planta, as variações genéticas entre diferentes acessos dos hospedeiros nos genes alvos de ação dos efetores são argumentos que suportam a hipótese que muito da resistência quantitativa também é devido à variação (variantes alélicas) nos genes de

defesa. Estes variantes podem levar a altos níveis de resistência, porque eles são expressos em altos níveis ou no momento mais apropriado ou porque podem ser mais difíceis de manipular pelos efetores (NIKS et al., 2015). Segundo Niks et al. (2015), é amplamente reconhecido que a capacidade do patógeno em suprimir PTI depende da espécie de planta atacada, mas pouca atenção tem sido dada à possibilidade que, dentro da espécie hospedeira, indivíduos diferem na facilidade pelo qual efetores de um certo patógeno ou raça do patógeno podem suprimir a PTI. Se as diferenças na resistência quantitativa entre acessos do hospedeiro são devido a diferenças no grau pelo qual o patógeno consegue suprimir a PTI, esta diferença na resistência quantitativa deve resultar da variação no alvo do efector entre os acessos do hospedeiro.

Estas variações podem explicar o aumento na resistência parcial de cultivares modernas, comparada às mais antigas, em certas espécies vegetais onde a seleção é baseada apenas no fenótipo. Conforme revisado por NIKS et al., (2015), nos patossistemas cevada – *Puccinia hordei* e trigo – *Puccinia striiformis*, abundantes genes para resistência quantitativa têm sido encontrados com alelos resistentes de diferentes parentais de modo que a segregação transgressiva é comumente observada. Isto explica porque a seleção fenotípica recorrente é uma estratégia útil (PARLEVLIET; van OMMEREN, 1988) e ainda bastante utilizada em programas de melhoramento vegetal. Neste modelo de seleção, melhoristas repetem ciclos de intercruzamentos de genótipos da planta selecionando contra altos níveis de suscetibilidade e consequentemente aumentando o nível de resistência parcial nos seus germoplasmas.

Embora a resistência quantitativa seja na maioria das vezes atrelada ao somatório do efeito da contribuição de vários genes com pequena influência no fenótipo, vários relatos de genes com grande efeito no fenótipo e conferindo resistência parcial foram descritos, como por exemplo os loci *Lr34* (KRATTINGER et al., 2009), *Lr67* (MOORE et al., 2015), *Fhb1* (RAWAT et al., 2016), *Yr36* (FU et al., 2009), *Pi21* (FUKUOKA et al., 2009), *ZmWAK* (ZUO et al., 2015), *Rhg1* (COOK et al., 2012), e *RKS1* (HUARD-CHAUVEAU et al., 2013). A proteína e o mecanismo pelo qual é conferida

resistência diferem dos genes *R* previamente mencionados (FRENCH et al., 2016; KRATTINGER; KELLER, 2016; NIKS et al., 2015), sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos no controle da resistência quantitativa.

A resistência do trigo conferida pelo *Lr34* é parcial em plantas adultas, sendo expressa especialmente na folha durante o enchimento de grãos (CAO et al., 2012). Este gene é expresso a níveis bastante baixos no estágio de plântula, mas a elevados níveis no estágio de planta adulta o que corrobora com a observação que o *Lr34* confere maior resistência no estágio de planta adulta que no estágio de plântula. Clonagem do locus *Lr34* determinou que um gene codificando um transportador ABC (*ATP-binding cassette*) é responsável pela resistência quantitativa a múltiplas doenças [ferrugem amarela (*Puccinia striiformis*), ferrugem da folha (*Puccinia triticina*), ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), e oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)]. Um possível mecanismo para a resistência mediada pelo *Lr34* pode ser o transporte de substâncias tóxicas para fora da célula (apoplasto), semelhante ao que ocorre com o *PEN3* de *Arabidopsis*, o qual transporta compostos tóxicos para o apoplasto da planta no sítio de interação com patógenos (LIPKA et al., 2008, 2010). Também em trigo, a resistência contra *P. striiformis* conferida pelo locus *Yr36* (codifica uma quinase e um domínio START) é expressa em alta temperatura (25 a 35°C), mas não em baixa temperatura (15°C).

A resistência quantitativa em soja ao nematoide *Heterodera glycines* é bastante complexa porque é baseada no número de cópias no genoma de pelo menos três genes [um transportador de aminoácidos, uma proteína α -SNAP que pode estar envolvida no tráfego de membrana e outra proteína ainda pouco caracterizada (WI12 – *wound-inducible protein 12*)] do locus *Rhg1* ligados geneticamente, o que, por conseguinte, leva a um aumento no nível de transcrição dos três genes e aumento na resistência (COOK et al., 2012). Em adição ao *Rhg1*, o nível de expressão dos genes na família GLP (*Germin-like proteins*) em arroz está ligado à resistência quantitativa a brusone (*Magnaporthe oryzae*) e à queima das bainhas (*Rhizoctonia solani*) (MANOSALVA et al., 2009). Em cevada, a análise funcional de GLPs indicou um complexo papel das mesmas na resistência basal contra oídio

(*Blumaria graminis* f. sp. *hordei*). A função hipotética das proteínas GLP na resistência de doença envolve a produção da enzima superóxido dismutase para geração de peróxido de hidrogênio, o qual está envolvido nas defesas de parede celular, na HR, na sinalização da resistência sistêmica adquirida e na expressão de genes de defesa (MANOSALVA et al., 2009).

Em suma, a importância do estágio de desenvolvimento, do ambiente, do número de cópias e nível de expressão do gene na planta para expressão da resistência quantitativa tem se mostrado cada vez mais clara. Vários loci que conferem resistência quantitativa que foram clonados mostram sua expressão em um determinado estágio de desenvolvimento (*Lr34* e *ZmWAK*) ou em um ambiente específico (*Yr36*). Assim, a possibilidade do efeito pleiotrófico na resistência a doenças de genes afetando o crescimento e desenvolvimento, bem como a arquitetura da planta, não é descartada.

Ademais, plantas não têm apenas reguladores positivos da defesa, mas também negativos. Genes de suscetibilidade (genes *S*) são genes dominantes os quais quando bloqueados levam à resistência recessiva (PAVAN et al., 2010). Um dos exemplos bem conhecidos de genes de resistência recessiva é o *mlo* em cevada o qual confere resistência especialmente contra oídio. O gene *Mlo* codifica uma proteína de membrana plasmática a qual é essencial para a infecção de agentes causais de oídios. Homólogos do gene *Mlo* de cevada, os quais quando nocauteados levaram a aumento de resistência, foram encontrados em *Arabidopsis*, tomate, ervilha, pimentão e trigo (NIKS et al., 2015).

Do ponto de vista de durabilidade da resistência, diferentemente do que é observada para resistência conferida por genes *R* (resistência qualitativa), a pressão evolucionária no patógeno conferida pela resistência quantitativa é significativamente reduzida, constituindo-se, portanto, em uma fonte de resistência durável. Ademais, embora para alguns patossistemas o nível de resistência alcançado não seja suficiente para proteger suficientemente a cultura, dependendo da região ou condição climática, a resistência quantitativa é ainda útil devido à redução no número nas aplicações requeridas de fungicidas (NAERSTAD et al., 2007).

Embora significativo progresso tenha sido obtido na compreensão

da resistência de plantas a patógenos, a distinção entre PTI e ETI, bem como resistência qualitativa e quantitativa, não é clara, sendo muitas vezes as mesmas respostas apenas vistas de ângulos diferentes. A resposta de defesa da planta é um processo integrativo e essencialmente estocástico combinando a detecção de MAMPs, DAMPs, e efetores e sua ação (THOMMA et al., 2011).

3 RESISTÊNCIA GENÉTICA DO HOSPEDEIRO FRENTE AOS TIPOS DE PARASITISMOS

Os microrganismos associados com plantas podem ser categorizados, de forma simples e extremista, em mutualista, parasita e patógeno (NEWTON et al., 2010). A interação mutualista se dá quando as duas espécies envolvidas são beneficiadas mutuamente. A interação parasítica é o relacionamento entre duas espécies na qual uma das espécies, o parasita, se beneficia do outro, o hospedeiro, comumente causando prejuízo. No caso da patogênica, o patógeno causa dano para a planta seja por meio de interação parasítica (descrita abaixo) ou não parasítica, como ocorre com a fumagina (*Capnodium* spp.) que afeta processos fisiológicos da planta por meio de barreira mecânica, interferindo nas trocas gasosas e na interceptação de fótons pelos tecidos verdes da planta.

Os microrganismos parasitas que conseguem obter alimento de tecidos vivos de plantas utilizam diferentes estratégias de parasitismo e são classificados em três tipos: parasitas necrotróficos, parasitas hemibiotróficos e parasitas biotróficos. A diferença fundamental entre eles está em seu modo de infecção, natureza do agente causal, nos sintomas causados, na gama de hospedeiro e, por fim, no tipo de resistência de hospedeiro da planta.

Patógenos necrotróficos incluem espécies de fungos, oomicetos e bactérias, utilizam estratégias de patogênese altamente destrutivas resultando em rápida maceração dos tecidos vegetais e extensiva necrose. Assim, uma característica marcante desses patógenos é a habilidade de conseguir extrair nutrientes a partir de tecidos vegetais mortos. Para causar doença, patógenos necrotróficos secretam fatores de patogenicidade como fitotoxinas, enzimas

com ação sobre constituintes de parede celular, lamela média, ou outros constituintes celulares do hospedeiro durante infecção e também durante a colonização (OLIVER; IPACHO 2004). As fitotoxinas podem atuar sobre limitada gama de hospedeiros (toxina específica) ou com ação em ampla gama de hospedeiro (toxina não específica). Geralmente, a toxina específica tem um efeito determinante para a patogenicidade do microrganismo. Por outro lado, as toxinas não específicas estão mais associadas à agressividade (desenvolvimento da lesão e severidade da doença) do patógeno. Os alvos celulares das fitotoxinas são bastante variáveis e incluem: metabolismo de aminoácidos, biossíntese de celulose, transferência de energia, metabolismo de lipídeos, função de membranas, afeta mitose, biossíntese de ácidos nucleicos, compostos fotodinâmicos (geração de espécies reativas de oxigênio), biossíntese e ou inativação proteica, metabolismo de açúcares, biossíntese de terpenoides, entre outros (MÖBIUS; HERTWECK, 2009; DUKE; DAYAN, 2011). Ambos os tipos de toxina de uma forma ou de outra levam à morte da célula do hospedeiro, pré-requisito fundamental para que o microrganismo consiga estabelecer sua patogenicidade. Com o intuito de favorecer o progresso da doença, alguns fungos também manipulam a maquinaria celular do hospedeiro para suprimir as defesas por meio da influência na homeostase dos fitohormônios, seja alterando as concentrações internas dos fitohormônios ou pela sua própria biossíntese e secreção durante a colonização do hospedeiro. Não obstante, há também a indução do acúmulo de espécies reativas de oxigênio como mecanismo de patogenicidade/agressividade do parasita.

Os patógenos biotróficos e seus hospedeiros têm um relacionamento altamente especializado a nível estrutural e bioquímico, e requerendo células vivas do hospedeiro para obtenção de nutrientes e ou multiplicação. Patógenos com parasitismo tipo biotrófico são encontrados em fungos, oomicetos, vírus, nematoides, entre outros. Para fungos biotróficos, algumas características são marcas registradas, como a presença de estruturas de infecção altamente desenvolvidas, atividade secretória limitada, especialmente de enzimas líticas, camadas de interface rica em carboidratos e proteínas que separam o fungo da membrana plasmática da planta, supressão continuada do sistema de

defesa da planta, e formação de hifa especializada (haustório) para absorção e metabolismo de nutrientes (MENDGEN; HAHN 2002). Um balanço constante entre fatores de virulência e evasão das defesas da planta com métodos furtivos mostra uma forma de patogenicidade bastante sofisticada dos patógenos biotróficos, fato que pode estar atrelado à estrita gama de hospedeiros que, de modo geral, possuem (LATUNDE-DADA et al., 2001; OLIVER; IPACHO 2004; SCHULZE-LEFERT; PANSTRUGA 2003). Por exemplo, a secreção de proteínas de avirulência (efetores) normalmente é em sequência altamente coordenada durante estágios específicos da infecção e colonização (CATANZARITI et al., 2006; LINK et al., 2008).

A colonização pelo tipo biotrófico pode ocorrer em várias formas: intercelular (*Cladosporium fulvum*), subcuticular (*Venturia inaequalis*), inter e intracelular (*Claviceps purpurea*, *Ustilago maydis*), extracelular com haustório formando nas células da epiderme (agentes causais de oídios), intercelular com haustório nas células do parênquima (agentes causais de ferrugens e míldios) (MENDGEN; HAHN 2002). Um exemplo típico de patógeno biotrófico são as ferrugens que podem estabelecer interação com seu hospedeiro que pode durar até meses (MENDGEN et al., 2000). Estudos realizados com *Uromyces fabae* revelaram que a secreção de enzimas com ação sobre constituintes de parede celular está sob estrito controle do desenvolvimento e evolução da patogênese. Por exemplo, a secreção de celulase e pectina esterase não é detectada até que o apressório e hifa infectiva sejam formados, enquanto que a pectato liase somente é detectada após a formação da célula mãe do haustório (DEISING et al., 1995). Esta secreção sequencial e em sítios específicos das enzimas está correlacionada com a demanda para penetração localizada da célula do hospedeiro durante a formação do haustório.

Um tipo transiente de biotrófico é observado nos hemibiotróficos (*Magnaporthe grisea*, *Phytophthora infestans* e *Colletotrichum* spp.). Hemibiotróficos iniciam infecção com um período de biotrofia, seguido pela fase necrótica, possuindo propriedades de ambos os grupos. No estágio inicial da infecção, o patógeno prolifera assintomaticamente no hospedeiro suprimindo a morte programada de célula ou impedindo as respostas de

defesa do hospedeiro, mas na fase final da infecção eles estão sob transição fisiológica do biotrófico assintomático para a altamente destrutiva fase necrotrófica (MÜNCH et al., 2008). Espécies de *Colletotrichum* têm um amplo conjunto de genes relacionados à patogenicidade, como genes codificando efetores, enzimas com ação sobre pectina, enzimas do metabolismo secundário, transportadores e peptidases. Análises da expressão gênica indica que esses genes são transcritos em ondas sucessivas que estão lincadas com a transição patogênica: efetores e enzimas do metabolismo secundário são induzidos antes da penetração e durante a fase biotrófica, enquanto que a maioria das hidrolases e transportadores é secretada mais tarde, na transição para necrotrófica (O'CONNELL et al., 2012). *Colletotrichum lindemuthianum* é um exemplo clássico de um patógeno hemibiotrófico. Após penetrar a cutícula e a parede celular ele inicia o crescimento como um biotrófico com hifa primária intracelular por um ou poucos dias. Evidências citológicas da interface do hemibiotrófico *C. lindemuthianum* mostram que após a penetração, a hifa primária e a vesícula de infecção intracelular estão circundadas por uma matriz extracelular, e colonizam apenas algumas células do hospedeiro. Após a fase biotrófica, hifa necrotrófica delgada se desenvolve e prolifera por crescimento necrotrófico concomitante com o início da secreção de grande quantidade de enzimas com ação sobre constituintes de parede celular como as endopoligalacturonase (PERFECT et al., 2000; YAKOBY et al., 2001).

Independente do modo de parasitismo do patógeno, a tentativa de infecção ativa as respostas de defesa da planta as quais envolvem complexos eventos histológicos, celulares, bioquímicos e moleculares que juntos limitam a proliferação do patógeno ou a expressão dos sintomas da doença. Nos estágios iniciais de infecção, as respostas de defesa são associadas com produção de vários metabólitos secundários, peptídeos antimicrobianos, hormônios (etileno, ácido salicílico, ácido abscísico, ácido jasmônico, etc.), bem como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, calose e várias outras modificações celulares que culminam na morte celular do hospedeiro. A cinética destas respostas e a relativa quantidade e momento de expressão pode variar, mas são respostas comuns para todas as infecções. A contribuição

destas repostas para resistência varia dependendo do tipo de parasitismo do patógeno.

No caso de patógenos biotróficos há duas principais estratégias empregadas por plantas para restringir a invasão e crescimento do patógeno: resistência à penetração e a resposta de hipersensibilidade (HR). A resistência à penetração se dá por meio do reforçamento de parede celular e defesas junto à membrana plasmática para prevenir a formação do haustório. O segundo mecanismo de resistência, HR, é ativado pelas proteínas R e é caracterizado pela indução da morte programa da célula no local de infecção por um patógeno biotrófico, limitando o seu desenvolvimento, e é um indicador clássico de resistência conferindo fenotipicamente resistência completa (qualitativa) contra o patógeno. A HR também é um importante mecanismo de defesa contra patógeno hemibiotróficos.

Contudo, enquanto que a HR confina o patógeno biotrófico e hemibiotrófico impedindo o avanço da infecção, a morte celular tem papel marcadamente distinto na resposta a necrotrófico, sendo ela um indicador de infecção sucedida (GOVRIN e t al., 2006, van KAN, 2006). Com exceção ao *RLM3* (*Resistance to Leptosphaeria maculans 3*) que confere resistência a vários patógenos necrotróficos em *Arabidopsis* (STAAL et al., 2008), nenhum gene *R* tem sido associado à resistência a necrotróficos. Isso implica que os determinantes primários da ETI (proteínas R) e sua resposta imune não são reguladores efetivos para a resistência a necrotróficos. De fato, respostas da planta a certas toxinas específicas são correlacionadas inversamente com a ETI; uma regulação gene a gene entre a toxina e a proteína de resistência no hospedeiro que resulta em suscetibilidade e é designada de suscetibilidade ativada por efector (OLIVER; SOLOMON 2010). A resistência gene a gene não é observada nas interações com necrotróficos, a qual é quase que exclusivamente quantitativa ao invés de qualitativa (YANG et al., 2017). Isto se deve porque os mecanismos de resistência qualitativa são frequentemente associados à HR e a morte celular do hospedeiro é frequentemente benéfica para patógenos necrotróficos. Não obstante, estes agentes exploram a morte celular da planta para aumentar sua própria virulência e ou agressividade.

Em suma, a resistência mediada por genes *R* é específica a

determinadas raças do patógeno, portanto efetiva contra parasitas biotróficos e hemibiotróficos por desencadear ETI, e, por conseguinte, conferindo resistência qualitativa. Por outro lado, a resistência quantitativa confere um meio para controle de patógenos biotróficos, hemibiotróficos e necrotróficos, sendo efetiva contra várias raças de um patógeno, provendo resistência de amplo espectro ou, em alguns casos específicos, efetiva contra vários patógenos (KRATTINGER et al., 2009).

REFERÊNCIAS:

- ABDALLAH, N. A., et al. Stable integration and expression of a plant defensin in tomato confers resistance to Fusarium wilt. *GM crops*, v. 1, p. 344-350, 2010.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, v. 17, p. 73-90, 2012.
- ALBERT, M. Peptides as triggers of plant defense. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, p. 5269-5279, 2013.
- AMELINE-TORREGROSA, C. et al. Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, v. 146, p. 5-21, 2008.
- AN, C.; ANDMOU, Z. Non-host defense response in a novel *Arabidopsis-Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathosystem. *PLoS One*, v.7, p. e31130, 2012.
- ARMAH, C. N., et al. The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophysical journal*, v. 76, p. 281-290, 1999.
- ASHFIELD, T. et al. Evolution of a complex disease resistance gene cluster in diploid *Phaseolus* and tetraploid *Glycine*. *Plant Physiology*, v. 159, p. 336-354, 2012.

- AUYONG, A. S. M.; FORD, R.; TAYLOR, P. W. J. The role of cutinase and its impact on pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, v. 6, p. 259, 2015.
- BAXTER, A.; MITTLER, R.; SUZUKI, N. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 1229-1240, 2014.
- BEDNAREK, P. et al. A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, v. 323, p.101-106, 2009.
- BEER, A.; VIVIER, M. Four plant defensins from an indigenous South African Brassicaceae species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes. *BMC Research notes*, v. 4, p. 459, 2011.
- BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, v. 8, p. 521-539, 2015.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, p. 379-406, 2009.
- BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.55, p. 257-286, 2017.
- BOYD, L. A. et al. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, v. 29, p. 233-240, 2013.
- BOWYER, P. et al. E. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science*, v. 267, p. 371-374, 1995.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: β -amyrin negatively affects the intracuticular water barrier. *Plant Physiology*, v. 160, p. 1120-1129, 2012.
- CAÑO-DELGADO, A. et al. Reduced cellulose synthesis invokes lignifi-

cations and defense response in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, v. 34, p. 351-362, 2003.

CARVER, T. L. W. et al. Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. Mycological Research, v. 103, p. 547-560, 1999.

CATANZARITI, A. M. et al. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. Plant Cell, v. 18, p. 243-256, 2006.

CAO, X. H. et al. Identification and validation of a major quantitative trait locus for slow-rusting resistance to stripe rust in wheat. Journal of Integrative Plant Biology, v. 54, p. 330-344. 2012.

CHEN, Q., et al. Strong positive selection drives rapid diversification of *R*-genes in *Arabidopsis* relatives. Journal of Molecular Evolution, v.70, p. 137-148, 2010.

CHENG, Y. et al. Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. BMC Plant Biology, v. 12, p.96-107, 2012.

CHOI, H. W.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. BMC Plant Biology, v. 16, p. 232, 2016.

CLARK, R. M. et al. Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. Science, v.317, p. 338-342, 2007.

COOK, D. E. et al. Copy number variation of multiple genes at *Rhgl* mediates nematode resistance in soybean. Science, v. 338, p. 1206-1209, 2012.

COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. Nature Review Immunology, v. 16, p. 537-552, 2016.

DEISING, H. et al. Differentiation and cell wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. Canadian Journal of Botany, v. 73 p. 624-631, 1995.

DAY, B. et al. The pathogen actin connection: a platform for defense signaling in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 49, p. 483-506, 2011.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, v. 341, p. 746-751, 2013.

DELVENTHAL, R. et al. Ectoparasitic growth of *Magnaporthe* on barley triggers expression of the putative barley wax biosynthesis gene *CYP96B22* which is involved in penetration resistance. *BMC Plant Biology*, v. 14, p.26, 2014.

DESLANDES, L.; RIVAS, S. The plant cell nucleus. A true arena for the fight between plant and pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6, p. 42-48, 2011.

DICKMAN, M. B. et al. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v. 16, p. 411-421, 2003.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v. 411, p. 843-847, 2001.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Review Genetics*, v. 11, p. 539-548, 2010.

DU, J. et al. Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants*, v. 1, p.15034, 2015.

DUKE, S. O.; DAYAN, F. E. Modes of action of microbially-produced phytotoxins. *Toxins*, v. 3, p. 1038-1064, 2011.

ELLIS, C.; TURNER, J. G. The *Arabidopsis* mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *Plant Cell*, v. 13, p. 1025-1033, 2001.

FAN, J., et al. *Pseudomonas* sax genes overcome aliphatic isothiocyanate mediated non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science*, v. 331, p. 1185-1188, 2011.

FERRARI, S. et al. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 49, 2013.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, v. 9, p. 275-296, 1971.

FRANCIS, S. A.; DEWEY, F. M.; GURR, S. J. The role of cutinase in germling development and infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.49, p. 201-211. 1996.

FRENCH E.; KIM B.-S.; IYER-PASCUZZI, A. S. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 56, p. 201-208, 2016.

FRESCATADA-ROSA, M.; ROBATZEK, S.; KUHN, H. Should I stay or should I go? Traffic control for plant pattern recognition receptors. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 28, p. 23-29, 2015.

FU, D., et al. A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science*, v. 323, p. 1357-1360, 2009.

FUKUOKA, S. et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science*, v. 325, p. 998-1001, 2009.

GALLETTI, R.; DELORENZO, G.; FERRARI, S. Host-derived signals activate plant innate immunity. *Plant Signaling Behavior*, v.4, p.33-34, 2009.

GILBERT, R. D.; JOHNSON, A. M.; DEAN, R. A. Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 48, p. 335-346, 1996.

GIRALDO, M. C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in

action. *Nature Review Microbiology*, v. 11, p. 800-814, 2013.

GONZÁLES-LAMOTHE, R. et al. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p.3400-3419, 2009.

GRAYER, R.J.; KOKUBUN, T. Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 253-263, 2001.

GOVRIN, E. M. et al. An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, v. 96, p. 299-307, 2006.

GUO, Y.-L. et al. Genome-wide comparison of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 157, p. 757-769, 2011.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 3, v.77, 2012.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, p. 315-319, 2000.

HANSJAKOB, A. et al. Very-long-chain aldehydes promote in vitro prepenetration processes of *Blumeria graminis* in a dose and chain length-dependent manner. *New Phytologist*, v. 188, p. 1039-1054, 2010.

HANSJAKOB, A.; RIEDERER, M.; HILDEBRANDT, U. Wax matters: absence of very-long-chain aldehydes from the leaf cuticular wax of the glossy11mutant of maize compromises the prepenetration processes of *Blumeria graminis*. *Plant Pathology*, v. 60, p. 1151-1161, 2011.

HERNANDEZ-BLANCO, C. et al. Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell*, v. 19, p. 890-903, 2007.

- HOCH, H. C. et al. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science*, v. 235, p. 1659-1662, 1987.
- HUARD-CHAUVEAU, C. et al. An atypical kinase under balancing selection confers broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, v. 9, p. e1003766, 2013
- ISLAM, M. et al. Interruption of the homing events of phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* zoospores by secondary metabolites from nonhost *Amaranthus gangeticus*. *Journal of Pesticides Science*, v. 29, p. 6-14, 2004.
- IWAI, T. et al. Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing oat cell-wall-bound thionin. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 15, p. 515-521, 2002.
- JOHNSON, R. Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, v. 71, p. 567-568, 1981.
- KALE, S. D. et al. External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell*, v. 142, p. 284-295, 2010.
- KANG, Y. et al. HopW1 from *Pseudomonas syringae* disrupts the actin cytoskeleton to promote virulence in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens*, v. 10, p. e1004232, 2014.
- KAMOUN, S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: Novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 295-300, 2001.
- KIM, N. H.; HWANG, B. K. Pepper pathogenesis related protein 4c is a plasma membrane-localized cysteine protease inhibitor that is required for plant cell death and defense signaling. *Plant Journal*, v. 81, p. 81-94, 2015.
- KOBAYASHI, I. et al. Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts. *Canadian Journal of Botany*, v. 70, p. 1815-1823, 1992.
- KOBAYASHI, Y. et al. Actin microfilaments are required for the expression

of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiology*, v. 38, p. 725-733, 1997.

KOLATTUKUDY, P. E. et al. Surface signaling in pathogenesis. *Proceedings of the National Academic of Science of the United State of America*, v. 92, p. 4080-4087, 1995.

KÖLLER, W.; PARKER, D. M.; BECHER, C. M. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, v. 81, p. 1375-1379, 1991.

KRATTINGER, S. G. et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, v. 323, p. 1360-1363, 2009.

KRATTINGER, S. G.; KELLER, B. Molecular genetics and evolution of disease resistance in cereals. *New Phytologist*, v. 212, p. 320-332, 2016.

KUANG, H. et al. Multiple genetic processes result in heterogeneous rates of evolution within the major cluster disease resistance genes in lettuce. *Plant Cell*, v. 16, v. 2870-2894, 2004.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. *Trends in Plant Science*, v. 18, p. 522-531, 2013.

KUSHALAPPA, A. C.; YOGENDRA, K. N.; KARRE, S. Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 35, p. 38-55, 2016.

INGLE, R. A.; CARSTENS, M.; DENBY, K. J. PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays*, v. 28, p. 880-889, 2006.

JACOB, F.; VERNALDI, S.; MAEKAWA, T. Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in Immunology*, v. 4, p. 297, 2013.

JEANDET, P. et al. Deciphering the role of phytoalexins in plant-microorganism interactions and human health. *Molecules*, v. 19, p. 18033-

18056, 2014.

JANDA, M., et al. Interconnection between actin cytoskeleton and plant defense signaling. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, p. e976486, 2014.

JETTER, R.; KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Composition of plant cuticular waxes, in: *Biology of the Plant Cuticle*. RIEDERER, M.; MÜLLER, C. Eds., vol. 23, pp. 145-181, Blackwell Publishing Ltd., United Kingdom, 2006.

JOHNSON, R. Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, v. 71, p. 567-568, 1981.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323-329, 2006.

JUPE, F. et al. Identification and localization of the NB-LRR gene family within the potato genome. *BMC Genomics*, v. 13, p. 75, 2012.

LATUNDE-DADA, A. O. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, v. 2 p. 187-198, 2001.

LEE, S-J.; ROSE, J. K. C. Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant signaling & Behaviour*, v. 5, p. 769-772, 2010.

LEE, H.-A. et al. Current understanding of plant nonhost resistance. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 30, p. 5-15, 2017.

LI, J. et al. Unique evolutionary pattern of numbers of gramineous NBS-LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics*, v.283, p. 427-438, 2010.

Li, X.; KAPOUS, P.; ZHANG, Y. NLRs in plants. *Current opinion in Immunology*, v. 32, p. 114-121, 2015.

LINK, T. I.; VOEGELE, R. T. Secreted proteins of *Uromyces fabae*: similarities and stage specificity. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 59-66, 2008.

LIPKA, U.; FUCHS, R.; LIPKA, V. *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 404-411, 2008.

LIPKA U, et al. Live and let die-Arabidopsis nonhost resistance to powdery mildews. *European Journal of Cell Biology*, v. 89, p. 194-199, 2010.

LIU, J. et al. RIN4 Functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biology*, v. 7, p. e1000139, 2009.

LO PRESTI, L. et al. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual review of Plant biology*, v. 66, p. 513-545, 2015.

LOBO, D. S. et al. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry*, v. 46, p. 987-996, 2007.

LUKASIK, E.; TAKKEN, F. L.W. STANDIng strong, resistance proteins instigators of plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, p. 427-436, 2009.

MACHO, A.P., AND ZIPFEL, C. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Current Opinion Microbiology*, v. 23, p. 14-22, 2015.

MALINOVSKY, F. G.; FANGEL, J. U.; WILLATS, W. G. T. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, v.5, p. 178, 2014.

MANOSALVA, P. M. et al. A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology*, v. 149, p. 286-296, 2009.

MARONE D, et al. Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat(NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Science*, v. 14, p. 7302-7326, 2013.

MELLERSH, D. G.; HEATH, M. C. An investigation into the involvement

of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 16, p. 398-404, 2003.

MELOTTO M, et al. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, v. 126, p. 969-980, 2006.

MELOTTO, M; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 101-122, 2008.

MENDGEN, K. et al. Biotrophy and rust haustoria. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 56, p. 141-145, 2000.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 352-356, 2002.

MICHELMORE, R. W.; MEYERS, B. C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research*, v. 8, p. 1113-1130, 1998.

MÖBIUS, N.; HERTWECK, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, p. 390-398, 2009.

MONDRAGÓN-PALOMINO, M. et al. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*, v. 12, p. 1305-1315, 2002.

MOORE, J.W. et al. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics*, v. 47, p. 1494-1498, 2015.

MOURA, F. T. et al. Effects of a chitin-binding cicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletotrichum lindemuthianum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 260-266, 2007.

MÜNCH, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, v. 165, p. 41-51, 2008.

MYSORE, K.S.; RYU, C-M. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 97-104, 2004.

NAERSTAD, R.; HERMANSEN, A.; BJØR, T. Exploiting host resistance to reduce the use of fungicides to control potato late blight. *Plant Pathology*, v. 56, p. 156-166, 2007.

NARUSAKA, Y. et al. Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology*, v. 6, p. 615-627, 2005.

NAWROT, R. et al. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, v. 59, p. 181-196, 2014.

NEWMAN, M-A. et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, v.4, p.139, 2013.

NEWTON, A. C. et al. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, v. 18, p. 365-373, 2010.

NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist*, v. 182, p. 817-28, 2009.

NIKS, R.; LI, X.; MARCEL, T. C. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p.445-470, 2015.

O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In *Colletotrichum: Host specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction* Prusky, D. et al., eds., pp. 57-77, APS Press, 2000.

O'CONNELL, R. J. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses.

Nature Genetics, v. 44, p. 1060-1065, 2012.

OLIVER, R. P.; IPCHO, S. V. S. Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. Molecular Plant Pathology, v. 5, p. 347-352, 2004.

OLIVER, R. P.; SOLOMON, P. S. New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. Current Opinion in Plant Biology, v.13, p.415-419, 2010.

OSBOURN, A. Saponins and plant defence - a soap story. Trends in Plant Science, v. 1, p. 4-9, 1996.

OSSOWSKI, S. et al. Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. Genome Research, v. 18, p. 2024-2033, 2008.

PAPADOPOULOU, P. et al. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. Proceedings of the National Academic of Science of the United State of America, v. 96, p. 12923-12928, 1999.

PANSTRUGA, R.; DODDS, P. N. Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. Science, v. 324, p. 748-750, 2009.

PARLEVLIET, J. E. Race-specific aspects of polygenic resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. Netherlands Journal of Plant Pathology, v. 84, p. 121-126, 1978.

PARLEVLIET, J. E.; VAN OMMEREN, A. Accumulation of partial resistance in barley to barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. Euphytica, v. 37, p. 61-74, 1988.

PAVAN, S. et al. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. Molecular Breeding, v. 25, p. :1-12, 2010.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. The

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PERFECT, S. et al. The distribution and expression of a biotrophy-related gene, *CIH1*, within the genus *Colletotrichum*. Molecular Plant Pathology, v. 1, p. 213-221, 2000.

PETRE, B.; KAMOUN, S. How Do Filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? PLoS Biology, v. 12, p. e1001801, 2014.

PIASECKA, A.; JEDRZEJCZAK-REY, N.; BEDNAREK, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. New Phytologist, v. 206, p. 948-964, 2015.

PINOSA, F. et al. Arabidopsis phospholipase dd is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi. Plant Physiology, v. 163, p. 896-906, 2013.

PODILA, G. K.; ROGERS, L. M.; KOLATTUKUDY, P. E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Physiology, v. 103, p. 267-272, 1993;

POLAND, J. A. et al. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. Trends in Plant Science, 14: 21-29, 2009.

PORTER, K.; DAY, B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. Journal of Integrative in Plant Biology, v. 58, p. 299-311, 2016.

PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. Frontiers in Plant Science, v. 6, p. 573, 2015.

QI, D.; INNES, R. W. Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling. Frontiers in immunology, v.4, p. 348, 2013.

RAVENSDALE, M. et al. Co- evolutionary interactions between host resistance and pathogen effector genes in flax rust disease. Molecular Plant

Pathology, v. 12, p. 93-102, 2011.

REHMAN, S.; GUPTA, V. K.; GOYAL, A. K. Identification and functional analysis of secreted effectors from phytoparasitic nematodes. BMC Microbiology, v. 16, p. 48, 2016

RAWAT, N. et al. Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to Fusarium head blight. Nature Genetics, v.48, p. 1576-1580, 2016.

REINA-PINTO, J. J.; YEPHREMOV, A. Surface lipids and plant defenses. Plant Physiology and Biochemistry, v, 47, p. 540-549, 2009.

RINGELMANN, A. et al. Two sides of a leaf blade: *Blumeria graminis* needs chemical cues in cuticular waxes of *Lolium perenne* for germination and differentiation. Planta, v.230, p.95-105, 2009.

SARRIS, P. F., et al. A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. Cell, v. 161, p. 1089-1100, 2015.

SERRANO, M., et al. The cuticle and plant defense to pathogens. Frontiers in Plant Science, v. 5, p.274, 2014.

SAMUELS, L.; KUNST, L.; JETTER, R. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. Annual Review in Plant Biology, v.59, p. 683-707, 2008.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. Annual review of Phytopathology, v. 41, p. 641-667, 2003.

SEEHOLZER, S. et al. Diversity at the *Mla* powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection. Molecular Plant Microbe Interaction, v. 23, p. 497-509, 2010.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. Nature reviews immunology, v. 12, p.89-100, 2012.

STAAL, J. et al. RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal*, v. 55, p. 188-200, 2008.

STAEL, S. et al. Plant innate immunity - sunny side up? *Trends in Plant Science*, v. 20, p. 3-11, 2015.

STASSEN, J. H. M.; ACKERVEKEN, G. V. How do oomycete effectors interfere with plant life? *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 407-414, 2011.

STUART, L. M.; PAQUETTE, N.; BOYER, L. Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nature reviews immunology*, v. 13, p. 199-206, 2013.

SUN, J-Y., et al. Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 21, p. 346-360, 2008.

THOMMA, B. P. H. J.; NURNBERGER, T.; JOOSTEN, M. H. A. J. Of PAMPs and Effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, v. 23, p. 4-15, 2011.

TRDÁ, L., et al. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 219, 2015.

TRUJILLO, M.; KOGEL, K. H.; HÜCKELHOVEN, R. Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate *formae speciales* of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v.17, p.304-312, 2004.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 459-465, 2010.

UMA, B.; RANI, T.S.; PODILE, A. R. Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 2141-

2152, 2011.

UPPALAPATI, S. R. et al. Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens. *Plant Cell*, v. 24, p. 353-370, 2012.

WANG, S. et al. First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 327, p. 820-827, 2005.

WASZCZAK, C. et al. Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 2923-2934, 2015.

WIN, J. et al. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 77, p. 235-247, 2012.

WIRTHMUELLER, L.; MAQBOOL, A.; BANFIELD, M. J. On the front line: structural insights into plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 761-776, 2013.

YAKOBY, N. et al. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 14, p. 988-995, 2001.

YANG, Q.; BALINT-KURTI, P.; XU, M. Quantitative disease resistance: dissection and adoption in maize. *Molecular Plant*, v.10, p. 402-413, 2017.

YU, X.; FENG, B.; H. E. P.; SHAN, L. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition. *Annual review of Phytopathology*, v. 55, p. 109-137, 2017.

YUE J-X, et al. Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine- rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytologist*, v. 193, p. 1049-1063, 2012.

YUN, B-W. et al. Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity,

in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *The Plant Journal*, v. 34, p. 768-777, 2003.

VAN KAN, J. A. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, v.11, p. 247-253, 2006.

VANETTEN, H. D. et al. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus “phytoanticipins”. *Plant Cell*, v. 6, p. 1191-1192, 1994.

ZHANG, H. et al. Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. *Planta*, v. 234, p.979-991, 2011.

ZHOU, T. et al. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Molecular and Genetics Genomics*, v. 271, p. 402-15, 2004.

ZUO, W. et al. A maize wall-associated kinase confers quantitative resistance to head smut. *Nature Genetics* v.47, p. 151-157, 2015.

Liane Bahr Thurow^{1,2}
Caroline Marques Castro¹
Arione da Silva Pereira¹

¹EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

²UFPeL - Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

INTRODUÇÃO

A população mundial mais do que dobrou nos últimos 50 anos e estima-se que passará de nove bilhões em 2050 (FAO 2010). O crescente aumento populacional exige um aumento constante da produção agrícola, a qual vem sendo dificultada pelas alterações climáticas e o surgimento de novas doenças, assim como alterações genéticas nos patógenos, resultando na perda de fontes de resistência anteriormente eficazes.

Perdas substanciais decorrentes da incidência de fungos e oomicetos, como, por exemplo, a brusone (*Magnaporthe oryzae*) em arroz, a ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) em trigo, o carvão (*Ustilago maydis*) em milho, a requeima (*Phytophthora infestans*) em batata e a ferrugem asiática (*Phakospora pachyrhizi*) em soja, representam uma ameaça atual e crescente à segurança alimentar. Estima-se que estas perdas seriam suficientes para alimentar, no mínimo, 8,5% da população atual estimada em mais de sete bilhões de pessoas (FISHER et al., 2012).

Problemas sérios podem ocorrer quando cultivares suscetíveis de uma cultura são atacadas por patógenos agressivos e virulentos, em condições favoráveis para o desenvolvimento da doença. Em circunstâncias extremas, podem ocorrer epidemias devastadoras como aconteceu na Irlanda em 1845, quando cerca de 80% dos campos de batata foram perdidos devido à epidemia da requeima causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans*. Devido a este desastre, mais de dois milhões de pessoas morreram de fome e muitos outros foram forçados a migrar para outras regiões (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO 2012).

Em 1999, uma nova raça altamente virulenta do fungo *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, denominada Ug99, foi encontrada em Uganda. A raça Ug99 é capaz de suplantar todos os genes de resistência das cultivares comerciais de trigo atualmente cultivadas e tem se disseminado rapidamente no continente Africano e na Ásia (AYLIFFE et al., 2008; SINGH et al., 2015). Outra séria ameaça à segurança alimentar, especialmente nos países em desenvolvimento, é o mal-do-Panamá, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, uma doença endêmica de todas as regiões produtoras de banana do mundo e o melhor meio para o controle consiste na utilização de cultivares resistentes (BUTLER 2013).

Recentemente, alguns estudos têm mostrado que, no Brasil, a ferrugem asiática da soja foi responsável por 37-67% da redução da produção (KUMUDINI et al., 2008). Desde o seu surgimento em 2001, esta doença causou perda de rendimento de mais de 10 bilhões de dólares para os produtores de soja no Brasil (LANGENBACH et al., 2016). Na Ásia, as perdas devido à ferrugem asiática da soja chegaram a 80%. Uma grande quantidade de fungicidas, com efeitos econômicos e ambientais negativos, seria economizada, nos campos de soja, se cultivares resistentes estivessem disponíveis (BORÉM; FRITSCHÉ-NETO 2012).

Esses exemplos destacam a necessidade sempre presente de uma melhor compreensão das interações planta-patógeno e a maneira pela qual este conhecimento pode ser aplicado em estratégias de melhoramento visando à uma resistência durável e efetiva.

Talvez a mais reconhecida contribuição do melhoramento à agricultura seja a criação de cultivares resistentes a doenças. Em algumas culturas este é o único meio de controle disponível, além de ser o mais econômico, de baixo impacto ambiental e fácil adoção pelos produtores (LOPES; BOITEUX 2012). Algumas viroses de grande importância, pelos elevados prejuízos que causam, somente são controladas pelo uso de cultivares resistentes. Fungos fitopatogênicos, de grande capacidade virulenta e alta variabilidade genética, somente puderam ser controlados após a descoberta de fontes de resistência às diversas raças do patógeno (BUENO et al., 2006).

No entanto, antes de iniciar um programa para o desenvolvimento

de cultivares resistentes é necessário estabelecer seus objetivos, fazer um levantamento prévio das doenças que ocorrem na cultura e priorizá-las segundo os danos econômicos causados. Para se obter sucesso, é fundamental ter variabilidade genética e fontes de resistência disponíveis, conhecer a complexidade da herança da resistência, além de dispor de um processo eficiente de melhoramento onde ensaios para a resistência a doenças estão integrados com outros caracteres agrônômicos importantes (BROWN 2015).

Este capítulo não pretende esgotar o tema proposto, mas contribuir para um maior conhecimento sobre as etapas básicas de um programa de melhoramento, visando à obtenção e utilização de cultivares resistentes, compreendendo a identificação de fontes de resistência disponíveis no germoplasma da espécie, a seleção do método de melhoramento para incorporação da resistência em cultivares comerciais, assim como as melhores estratégias de incorporação destes genes de resistência, traçadas a partir do conhecimento da estrutura genética e do potencial evolucionário das populações patogênicas. Este capítulo aborda também avanços e progressos em relação à utilização de seleção assistida por marcadores, o desenvolvimento de cultivares transgênicas, cisgênicas e o início de uma promissora nova era para o desenvolvimento de resistência a fitopatógenos através do uso de tecnologias de edição genômica.

1 FONTES DE RESISTÊNCIA

A disponibilidade de fontes adequadas de genes de resistência é um pré-requisito básico para programas de melhoramento que têm como objetivo desenvolver cultivares mais resistentes a patógenos. A escolha dos genótipos a serem utilizados como doadores está diretamente relacionada com o sucesso do programa e, por isso, é fundamental uma escolha criteriosa dos genitores a serem recombinados (cruzados). Em plantas cultivadas há quatro importantes grupos de fontes de genes de resistência: cultivares elite, coleções de germoplasma, espécies silvestres e mutações.

1.1 Cultivares elite

Genes de resistência a patógenos encontrados em linhagens e/ou cultivares de alto potencial produtivo são os mais visados. Estas fontes de resistência apresentam a vantagem de já serem adaptadas, possuírem características agronômicas favoráveis e baixa frequência de alelos indesejáveis.

1.2 Coleções de germoplasma

Uma das principais fontes potenciais de genes de resistência em espécies cultivadas são as coleções de germoplasma. Quando aparecem novas doenças ou novas raças de um patógeno já consolidado, a busca na diversidade do germoplasma, representada nas coleções mundiais de plantas cultivadas, tem conseguido localizar fontes adequadas de resistência (ALLARD 1999).

Há muito tempo que os programas de melhoramento fazem uso de bancos de germoplasma, especialmente na introgressão de características qualitativas de interesse econômico. Dentre os exemplos mais conhecidos, grande parte refere-se à introgressão de genes de resistência de plantas a patógenos, oriundos de cultivares tradicionais ou de parentes silvestres, para linhagens elite agronomicamente adaptadas (FERREIRA; RANGEL 2011). Como exemplo, a resistência para o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), atualmente incorporada em diversas cultivares comerciais, é predominantemente derivada de dois genótipos, 'Peking' e PI 88788 (MITCHUM 2016). Além disso, o acesso PI 88788 também foi identificado com resistência ao vírus do mosaico da soja (*Soybean mosaic virus* - SMV) (GUNDUZ et al., 2004).

A conservação da variabilidade genética em bancos de germoplasma é muito importante para garantir que genes de resistência não sejam perdidos. Além da conservação, também é importante a caracterização das diferentes fontes de germoplasma para a resistência aos mais diversos patógenos da cultura.

Graças aos avanços na área de biotecnologia e genética molecular,

novas fontes de resistência e marcadores moleculares associados à resistência genética de plantas têm sido identificados e, conseqüentemente, melhor explorados. Estudos de associação genômica ampla (*genome-wide association studies* - GWAS) têm possibilitado avaliar o germoplasma a nível global a fim de explorar a variabilidade genética disponível em programas de melhoramento. Alguns exemplos de genes e regiões genômicas associados com resistência identificados através de GWAS incluem: resistência à ferrugem do colmo em trigo (YU et al., 2011; BAJGAIN et al., 2015); resistência à helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) (DING et al., 2015) e ferrugem comum em milho (*Puccinia sorghi*) (OLUKOLU et al., 2016); resistência à brusone (RABOIN et al., 2016) e a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em arroz (DILLA-ERMITA et al., 2017), assim como a caracterização de locos de resistência a várias patógenos em soja (CHANG et al., 2016).

1.3 Espécies silvestres

As espécies silvestres afins às plantas cultivadas constituem o que se denomina parentes silvestres de tais plantas. Estas espécies, por estarem distribuídas e se desenvolverem em uma ampla diversidade de habitats, são fontes importantes de genes de resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos.

No entanto, a utilização de fontes silvestres não é tão direta, principalmente em função de problemas relacionados com a incompatibilidade de cruzamento, esterilidade do híbrido, além da ligação de diversos caracteres indesejáveis com os desejáveis (*linkage drag*), o que dificulta o seu uso.

Mesmo com esta potencial dificuldade de uso direto desse germoplasma, as espécies silvestres são protagonistas como fontes de resistência a importantes patógenos. Um exemplo clássico de característica transferida de espécie silvestre para uma cultivada foi a resistência a *Phytophthora infestans* em batata, obtida pela introgressão de genes de *Solanum demissum*, uma espécie silvestre encontrada no México. Desde a grande fome causada por este patógeno na Europa na metade do século XIX, a espécie silvestre *S. demissum* tem sido extensivamente utilizada como fonte de resistência à requeima em programas de melhoramento, baseada na resistência raça-

específica dos genes *R1* a *R11* (PEREIRA et al., 2012). Além de *S. demissum*, uma ampla gama de espécies silvestres de batata tem sido identificada como fontes potenciais de genes de resistência.

Cientistas do CIMMYT (*International Maize and Wheat Improvement Center*) têm feito cruzamentos envolvendo *Triticum durum* e parentes silvestres desde o início da década de 1990. Tais cruzamentos têm resultado em materiais sintéticos, que podem ser facilmente cruzados com cultivares melhoradas para que novos genes úteis sejam incorporados, garantindo, por exemplo, resistência à septoriose (*Parastagonospora nodorum*) e à giberela ou fusariose da espiga do trigo (*Fusarium graminearum* species complex) (CIMMYT 2004). Outros exemplos de alelos de resistência identificados em germoplasma silvestre e utilizados com sucesso no melhoramento de cereais, como o trigo, a cevada e o centeio, são encontrados em Feuillet et al. (2008).

1.4 Mutações

Quando fontes de resistência não estão disponíveis no germoplasma, uma alternativa consiste na indução de resistência mediante agentes mutagênicos em plantas.

A baixa taxa de ocorrência da mutação natural pode ser superada através da exposição de material vegetal (sementes, estacas, pólen, calos provenientes da cultura de tecidos) a agentes mutagênicos (XIONG et al., 2015). Vários agentes mutagênicos são utilizados para este propósito e podem ser divididos em dois grupos principais: mutagênicos físicos (raios X, radiações gama, radiação ultravioleta) e mutagênicos químicos (colchicina, EMS (etilmetanossulfonato), MMS (metilmetanossulfonato)) (HUSSAIN 2015).

Um exemplo clássico de mutação identificando uma valiosa fonte de resistência é o gene *MLO*, que confere resistência de amplo espectro à *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* em cevada. O primeiro mutante de cevada identificado com resistência à oídio foi induzido artificialmente por raios X e descrito em 1942. Posteriormente, foi identificada a ocorrência de mutantes espontâneos em *landraces* de cevada coletadas na Etiópia (JORGENSEN 1992).

O gene *MLO* é amplamente conservado em vegetais e regula negativamente as respostas de defesa da planta. Mutantes recessivos para o gene *MLO* conferem resistência durável e de amplo espectro para todos isolados do fungo *Blumeria graminis* f.sp *hordei* (ACEVEDO-GARCIA et al., 2014). O alelo *MLO-11* introgridido no pool gênico de cevada na Europa confere resistência raça não específica à *B. graminis* f.sp *hordei*, que tem se mantido robusta e durável há mais de 30 anos (JORGENSEN 1992).

2 EVOLUÇÃO DO PATÓGENO EM RESPOSTA A GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

A supressão da resistência genética por populações de patógenos é um dos maiores desafios no controle genético de doenças (PALLOIX et al., 2009).

Para compreender os processos que levam à suplantação de genes de resistência, é necessário um melhor entendimento dos processos que governam a evolução do patógeno. Populações de patógenos com um alto potencial evolucionário são mais propensas a suplantar genes de resistência em relação a populações de patógenos com um baixo potencial evolucionário. Além disso, oferecem os maiores riscos de evoluir e neutralizar outras medidas de controle, tais como aplicações de fungicidas.

O potencial evolutivo de uma população do patógeno se reflete em sua estrutura genética populacional, ou seja, na quantidade e distribuição da variação genética entre e dentro de populações (McDONALD; LINDE 2002a).

A estrutura genética de uma população é determinada pela sua história evolutiva, consequência das interações entre as cinco forças evolucionárias que afetam as populações do patógeno: mutação, tamanho de população e deriva genética, fluxo gênico, reprodução e sistema de acasalamento, e seleção. Assim, para o desenvolvimento de estratégias de uso de genes de resistência visando à resistência durável, é fundamental o entendimento da genética de populações do patógeno (McDONALD 2014).

A seguir serão descritas as cinco forças evolucionárias. Para

exemplificação, cada força será considerada individualmente. Porém, na natureza, todas interagem para determinar o curso da evolução e para gerar a estrutura genética de populações de patógenos.

2.1 Mutação

Dentre as forças evolutivas, a mutação é a única capaz de criar variabilidade genética. Mutações são alterações na sequência de bases do DNA por meio de substituição de uma base por outra, ou por meio de adição ou deleção de um ou muitos pares de bases. Mutações adicionais podem ocorrer por amplificação de um segmento particular de DNA em múltiplas cópias, por inserção ou excisão de elementos transponíveis e por inversão de um segmento de DNA (AGRIOS 2005).

As mutações ocorrem devido a erros na replicação do DNA, os quais podem ocorrer tanto na meiose (indivíduos de reprodução sexuada), quanto na mitose (indivíduos de reprodução assexuada). Desta forma, a mutação é a fonte de introdução de novos alelos em populações patogênicas. É o processo que origina novas estirpes virulentas do patógeno que suplantam a resistência de genes maiores, assim como origina estirpes com maior agressividade que podem erodir a resistência quantitativa (McDONALD; LINDE 2002b).

Taxas de mutação são geralmente baixas, embora possam diferir entre regiões genômicas e patógenos (STUKENBROCK; McDONALD 2008). Uma mutação que ocorre isoladamente de outras forças evolutivas, provavelmente não ocorreria a uma taxa suficientemente alta para produzir alterações detectáveis nas frequências alélicas, ou seja, não seria capaz de causar suplantação da resistência. No entanto, quando a mutação é acompanhada de seleção direcional, mutantes virulentos aumentam rapidamente em frequência e provocam a perda da eficácia do gene de resistência.

Tamanhos populacionais maiores tornam mais prováveis o aparecimento de mutantes com maior aptidão dentro do hospedeiro, com capacidade de multiplicar-se e assim se espalhar para novos hospedeiros antes que a mutação seja perdida por deriva genética. Além disso, patógenos

com altas taxas de mutação apresentam maior risco de suplantar genes de resistência do que patógenos com baixas taxas de mutação, devido à maior probabilidade da presença de mutação de avirulência para virulência (McDONALD; LINDE 2002a).

2.2 Tamanho de população e deriva genética

O tamanho da população afeta a frequência de sobrevivência dos indivíduos mutantes e, conseqüentemente, a diversidade de genes na população. Populações de patógenos em uma determinada área geográfica muitas vezes não são suficientemente grandes para garantir que cada indivíduo possua progênie na próxima geração. Desta forma, ocorrem eventos aleatórios que influenciam a frequência alélica, processo este conhecido como deriva genética (AGRIOS 2005).

Quanto menor o tamanho da população, maior o efeito da deriva. Eventos de deriva são numerosos em fitopatógenos, especialmente quando infectam culturas anuais, uma vez que ocorrem reduções severas no tamanho da população do patógeno quando a sua fonte de alimento desaparece, processo denominado efeito de gargalo (*bottlenecks*). Além disso, também podem ocorrer eventos fundadores, onde uma nova população tem início a partir de um pequeno número de indivíduos (LINDE 2010).

A deriva genética leva à fixação de alelos ou genótipos nas populações e, portanto, tende a diminuir os níveis de variação genética total disponível. Populações de patógenos com grande tamanho efetivo tendem a apresentar menor deriva genética e, como consequência, maior variabilidade genética (mais alelos) e maior estabilidade ao longo do tempo (ZHAN 2016).

Com relação ao efeito de fundador, este ocorre frequentemente quando um patógeno é introduzido em uma nova área acidentalmente ou como resultado de uma violação de quarentena (McDONALD; LINDE 2002b).

2.3 Fluxo gênico

Similar à mutação, o fluxo gênico é uma fonte direta de variação genética, introduzindo novos alelos e/ou combinação de alelos de populações

vizinhas, além de, indiretamente, reduzir as chances de acasalamento de indivíduos relacionados e, conseqüentemente, aumentar o tamanho efetivo de populações patogênicas e a capacidade evolucionária de patógenos (ZHAN et al., 2015).

O fluxo gênico é um processo no qual alelos particulares (genes), ou indivíduos (genótipos), são trocados entre populações geograficamente separadas. Para patógenos estritamente assexuados, ou seja, aqueles que não recombina genes, genótipos inteiros podem ser trocados entre as populações (McDONALD; LINDE 2002b; AGRIOS 2005). O fluxo gênico rompe as barreiras que poderiam isolar populações, sendo de grande relevância para introdução de novas variações genéticas em campos agrícolas distantes do local da mutação inicial.

Fluxo gênico e/ou fluxo de genótipos é o processo que move alelos mutantes virulentos e genótipos entre diferentes populações no campo. Patógenos com elevado fluxo gênico representam maior risco do que patógenos com baixo fluxo de genes, devido ao aumento do tamanho efetivo da população pelo fluxo de genes entre populações vizinhas (AGRIOS 2005).

O fluxo de genes envolvendo propágulos assexuados (fluxo de genótipos) representa maior risco do que o movimento de propágulos sexuais (fluxo de genes). Propágulos assexuais representam um conjunto de genes coadaptados que apresentam elevado nível de aptidão ao ambiente de origem da cultura. Por outro lado, propágulos sexuais representam novas combinações de alelos que ainda não foram testados no ambiente onde serão introduzidas por fluxo gênico (McDONALD; LINDE 2002a). Um exemplo drástico de fluxo gênico foi o movimento de um ou alguns clones do patógeno *Phytophthora infestans* do México para os Estados Unidos em 1843, em seguida, para a Europa em 1845 e, posteriormente, por todo o mundo na década de 1850 (GOODWIN et al., 1994).

2.4 Reprodução e sistema de acasalamento

Reprodução e sistema de acasalamento afetam a forma como a diversidade genética é distribuída dentro e entre indivíduos de uma população. A reprodução pode ser sexuada, assexuada ou mista (McDONALD; LINDE 2002a; CROLL et al., 2015).

O potencial evolucionário de uma população está fortemente correlacionado com a extensão da recombinação. Patógenos com reprodução sexuada obtêm rapidamente novas combinações de alelos, levando a muitos genótipos diferentes nas populações e, assim, apresentam maior capacidade de suplantar os mecanismos de resistência do hospedeiro. Em contrapartida, patógenos que possuem reprodução assexuada tendem a manter combinações existentes de genes, levando a uma menor diversidade genotípica nas populações (BARRET et al., 2008). A reprodução assexuada, assim como a endogamia regular, também apresenta vantagens para o patógeno, pois tendem a produzir linhagens clonais, com blocos de alelos ligados formando um complexo de genes coadaptados, que permanecem unidos e podem ser amplamente disseminados (McDONALD; LINDE 2002b).

Patógenos com sistema de reprodução misto apresentam riscos mais elevados, pois potencialmente se beneficiam das vantagens inerentes aos dois tipos de reprodução (sexuada e assexuada). Durante o ciclo sexual, várias novas combinações de alelos (genótipos) são originadas por recombinação. A recombinação permite que novas combinações de alelos sejam agrupadas e testadas em novos ambientes. Combinações de alelos mais adaptadas são mantidas através de reprodução assexuada e podem aumentar sua frequência em clones selecionados. A distribuição espacial e temporal das linhagens clonais dentro e entre populações dependerá principalmente do potencial de dispersão dos propágulos assexuados, desta forma, se o esporo assexual ou propágulo é capaz de dispersão de longa distância, os clones com maior aptidão podem ser distribuídos por uma ampla área através do fluxo de genótipos, causando epidemias (McDONALD; LINDE 2002a).

2.5 Seleção

Seleção é a principal força que impulsiona mudanças nas frequências de alelos mutantes. A forte seleção direcional, que ocorre quando um gene de resistência principal (receptor) torna-se amplamente distribuído por uma grande área geográfica, leva a um aumento na frequência do mutante virulento que perdeu o elicitor (alelo de avirulência), até que ocorra a supressão do gene de resistência (McDONALD; LINDE 2002b).

Populações de patógenos que são expostas à forte seleção direcional ao longo de várias gerações representam um risco maior do que as populações que, devido à resistência parcial, são expostas à seleção mais fraca. Os agroecossistemas compostos por genes de resistência individuais, como as monoculturas geneticamente uniformes, exercem forte seleção direcional na população do patógeno. Por outro lado, os agroecossistemas formados por misturas de genes de resistência, ou rotação de genes através do tempo e espaço, irão reduzir a eficiência de seleção e diminuir a frequência de mutantes virulentos (McDONALD; LINDE 2002b; ZHAN et al., 2015).

3 MÉTODOS DE MELHORAMENTO DE PLANTAS PARA RESISTÊNCIA A DOENÇAS

O melhoramento para resistência a doenças não difere fundamentalmente do melhoramento para outros caracteres. Consequentemente, qualquer dos diversos métodos de melhoramento apropriados para a espécie em questão podem ser utilizados para desenvolver cultivares com resistência a doenças (ALLARD 1999). A escolha do melhor método de seleção leva em consideração, principalmente, a natureza genética da resistência, se qualitativa ou quantitativa, e o tipo de reprodução do hospedeiro, se autógama ou alógama (AGRIOS 2005; CAMARGO 2011).

3.1 Melhoramento visando à resistência qualitativa

A resistência qualitativa está associada com a habilidade de genes maiores controlarem a infecção causada por raças específicas do patógeno. Para transferência de resistência qualitativa, o retrocruzamento é o método de melhoramento mais utilizado. Consiste na introgressão de um caráter alvo (resistência à doença) controlado por um ou poucos genes, geralmente provenientes de uma espécie silvestre (doador) para um genótipo elite altamente adaptado (receptor), denominado genitor recorrente (FAROKHZADEH; ALIFAKHERI 2014).

O objetivo do retrocruzamento é recuperar o genótipo do genitor

recorrente, exceto para uma ou poucas características consideradas insatisfatórias, as quais o melhorista procura transferir a partir do genitor doador. O esquema clássico deste método inicia-se com o cruzamento entre o genitor recorrente e o doador, resultando no híbrido F1. Indivíduos F1 que possuem a resistência do genitor doador são selecionados e retrocruzados com o genitor recorrente em sucessivas gerações (BORÉM; MIRANDA 2013).

A cada ciclo de seleção, a proporção do genoma do genitor doador na progênie vai diminuindo, até que após vários ciclos, em geral cinco a seis, o genótipo resultante possua as características desejáveis do genitor recorrente e a resistência do genitor doador.

A transferência de alelos dominantes é realizada mais diretamente do que a de alelos recessivos. Se o alelo em transferência for dominante, há duas classes fenotípicas: resistente e suscetível, neste caso, somente é necessária a autofecundação da progênie do último retrocruzamento para identificar os genótipos não segregantes. Se o alelo a ser transferido for recessivo, há apenas fenótipos suscetíveis, sendo necessárias autofecundações intercaladas aos retrocruzamentos, para identificar as plantas que serão descartadas e quais serão retrocruzadas ao genitor recorrente (CAIXETA; ZAMBOLIM 2014).

Mais recentemente, marcadores moleculares associados a genes de resistência têm sido utilizados na seleção. Assumindo que marcadores de DNA podem prever com segurança o fenótipo, a seleção assistida por marcadores (MAS – *marker-assisted selection*) pode substituir ou assistir no *screening* de germoplasma para resistência a doenças. Ao determinar o alelo do marcador de DNA, plantas que possuem determinados genes podem ser identificadas baseadas no genótipo em vez do fenótipo (RAGIMEKULA et al., 2013).

O uso de marcadores moleculares para selecionar um loco alvo minimiza o arraste de ligação (*linkage drag*) e acelera a recuperação do genoma do genitor recorrente durante o retrocruzamento (ASHKANI et al., 2015).

Existem três níveis de seleção em que marcadores podem ser aplicados

no melhoramento por retrocruzamento. A cada ciclo de retrocruzamento, marcadores moleculares podem ser utilizados para identificar o genótipo com o caráter desejado (*foreground selection*), ou para acelerar a reconstrução do genótipo do genitor recorrente (*background selection*), e ainda para selecionar a progênie de retrocruzamento com o gene alvo com marcadores flaqueadores fortemente ligados a fim de minimizar o arraste de ligação (*recombinant selection*) (RAGIMEKULA et al., 2013).

Exemplos de retrocruzamento assistido por marcadores, visando à resistência a doenças em cereais, como cevada, arroz e trigo, podem ser encontrados em Collard & Mackil (2008). O retrocruzamento também pode ser utilizado para a transferência de mais de um gene simultaneamente. Um exemplo é o piramidamento de genes (ver item 4.3).

Para a piramidação de genes, vários cruzamentos são feitos e os híbridos F1 resultantes são cruzados entre si. A descendência deste cruzamento é novamente cruzada entre si e este processo é assim continuado até que os genes de interesse estejam combinados em um único genótipo. Desta forma, genes de resistência de várias fontes são combinados em cultivares individuais (HUSSAIN 2015).

Piramidar múltiplos genes de resistência através do melhoramento convencional é possível, mas extremamente difícil. Quando dois ou mais genes são introgrididos, com avaliação fenotípica convencional, não é possível distinguir com precisão o efeito individual de gene, uma vez que cada gene pode conferir resistência para múltiplas raças do patógeno. Além disso, na presença de um alelo dominante e um recessivo, o efeito do gene recessivo é mascarado (COLLARD; MACKILL 2008).

Com o uso de marcadores de DNA estreitamente associados a cada um dos genes de resistência é possível facilmente identificar as plantas com múltiplos genes, resultando em economia de tempo e recursos (SHANTI et al., 2010). Em teoria, MAS pode também ser utilizada para piramidação de genes de múltiplos genitores (ex: populações derivadas de múltiplos cruzamentos). Outra estratégia promissora para o desenvolvimento de resistência durável é a introgressão de resistência quantitativa controlada por QTLs (*quantitative trait loci*).

Fatores como o número de genes a ser transferido, a distância entre os genes alvo e marcadores flanqueadores, o número de genótipos selecionados em cada geração de melhoramento e a natureza do germoplasma são cruciais para obter sucesso na piramidação de genes de resistência (ASHKANI et al., 2015). Alguns exemplos de piramidação baseada em MAS em cereais podem ser encontrados em Collard & Mackil (2008).

Quando, através do retrocruzamento, os genes são transferidos independentemente para uma mesma cultivar recorrente, obtém-se linhagens quase isogênicas, cada uma contendo um gene diferente de resistência. Estes genes podem ser combinados em uma única cultivar (piramidamento), mas também podem ser mantidos em linhagens separadas, que serão plantadas em misturas, dando origem às multilinhas (ver item 4.4).

3.2 Melhoramento visando à resistência quantitativa

A resistência quantitativa é controlada por múltiplos genes de efeito menor na planta, promovendo resistência parcial ao patógeno e uma diminuição na severidade de sintomas e/ou no progresso das epidemias ao longo do tempo (St.CLAIR 2010).

Os métodos de melhoramento para resistência quantitativa não diferem dos demais métodos para outros caracteres agronômicos de herança quantitativa. O melhoramento é obtido através do acúmulo gradual de alelos favoráveis nos vários genes que controlam o caráter. Por ser controlado por muitos genes, qualquer método adotado prevê a seleção com baixa herdabilidade e com influência do ambiente, especialmente quando não há presença de genes maiores (CAMARGO 2011).

Para seleção em espécies alógamas, os métodos de seleção massal e de famílias são os mais utilizados visando a acumular genes de resistência. A seleção massal é o método de introdução mais simples, onde os indivíduos mais resistentes são selecionados e suas sementes são colhidas, misturadas, dando origem a uma nova população (AGRIOS 2005). O processo é repetido até alcançar o nível de resistência desejado. As plantas são selecionadas baseadas em suas reações individuais à doença. Para ocorrer progresso é necessário que o caráter ou gene de interesse esteja presente em alta

frequência, já que a seleção é feita apenas com base no fenótipo (CARVALHO et al., 2008). Na seleção de famílias (progênes), ao contrário, as plantas são selecionadas baseadas nas reações de suas progênes. As sementes de plantas cujas progênes mostraram-se mais resistentes são usadas no próximo ciclo de seleção.

Em espécies autógamas, os métodos de seleção mais utilizados para resistência quantitativa são o genealógico (*Pedigree*) e o populacional (*Bulk*).

No método genealógico, uma população F_2 é estabelecida e os melhores indivíduos são selecionados para os caracteres desejados, incluindo resistência a doenças. Estas plantas são autofecundadas, gerando famílias F_3 , que serão avaliadas no campo. A seleção, a partir desta geração, é feita tanto dentro de famílias, como entre famílias. As sementes selecionadas irão compor a geração F_4 . A seleção entre e dentro de famílias é repetida até que o nível de homozigose desejado seja obtido. Quanto aos tipos de seleção, nas gerações iniciais a seleção é com ênfase em caracteres qualitativos facilmente visualizados, enquanto nas gerações mais avançadas, à medida que aumenta a homozigose, a seleção tem ênfase em caracteres quantitativos (BORÉM; MIRANDA 2013).

O método populacional difere do genealógico, pois nenhuma seleção artificial é feita nas gerações segregantes iniciais e a colheita é realizada em *bulk*. Em gerações avançadas, quando a maioria das plantas está em homozigose, plantas individuais são selecionadas para resistência e as suas progênes avaliadas da mesma forma que no método genealógico (CARVALHO et al., 2008).

Dada à extensão e complexidade da seleção requerida, bem como o número e o tamanho de populações a serem avaliadas, marcadores moleculares podem ser utilizados em qualquer fase do programa de melhoramento. Consequentemente, MAS apresenta grande vantagem em gerações iniciais, porque plantas com combinações de genes indesejáveis, especialmente as que não apresentam genes de resistência, podem ser eliminadas. Plantas com genes ou QTLs de resistência são selecionadas e alelos podem ser fixados em homozigose, assim melhoristas podem focar em um menor número de linhas que apresentam a combinação de genes ou alelos desejados (COLLARD;

MACKILL 2008; RAGIMEKULA et al., 2013).

Ribaut & Betran (1999) propuseram o uso de MAS em gerações iniciais, F_2 ou F_3 , originadas de genitores elite, através de uma estratégia denominada “seleção única em larga escala”. Esta abordagem utiliza marcadores que flanqueiam até três QTLs. Estes QTLs devem explicar ampla proporção da variação fenotípica, além de serem estáveis em diferentes ambientes (COLLARD; MACKILL 2008).

Dentre as vantagens da seleção precoce assistida por marcadores está a que os alelos favoráveis dos QTLs de interesse são fixados nas gerações iniciais (F_2/F_3). Como a seleção ocorre somente nas regiões genômicas alvo, grande variação alélica ainda estará presente no restante do genoma dos genótipos selecionados, para ser explorada por seleção fenotípica. Além disso, alelos dos QTLs de maior efeito podem também ser utilizados na piramidação de genes (RIBAUT; BETRAN 1999).

4 ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

Para retardar a evolução do patógeno, as estratégias de uso dos genes de resistência de plantas visando à resistência durável focam tanto no aumento da diversidade de genes, como de genótipos.

A disponibilidade de mais de uma fonte de resistência possibilita o uso de estratégias de implantação tanto em escala temporal quanto espacial. Dentre estas estratégias, destacam-se o uso do gene de resistência até a ruptura da resistência conferida e sua substituição por um novo gene de resistência (genes *R* individuais); a alternância periódica de diferentes genes de resistência no mesmo local (rotação de genes); a introgressão de vários genes de resistência na mesma planta (piramidação) e o uso de diferentes genes de resistência em diferentes genótipos no mesmo local (multilinhas ou mistura de cultivares) ou implantação em diferentes locais (diversificação espacial).

4.1 Um gene de cada vez (Genes *R* individuais)

Células de plantas mantêm constante vigilância contra patógenos através da expressão de uma ampla gama de genes *R*, os quais codificam proteínas capazes de detectar a presença de patógenos. Em muitos casos, um único gene *R* pode conferir resistência completa a uma ou mais raças de um patógeno, quando transferido para uma cultivar anteriormente suscetível. Por esta razão, genes *R* têm sido utilizados há décadas em programas de melhoramento visando à resistência de plantas a doenças (MCDOWELL; WOFFENDEN 2003).

Embora em um programa de melhoramento seja mais fácil manipular genes *R* individuais, a desvantagem está na vulnerabilidade a diferentes ou novas raças do patógeno. Análises epidemiológicas e de patogenicidade de patógenos para um grande número de culturas onde genes *R* individuais controlam doenças fúngicas, como para a ferrugem do colmo em trigo, a requeima em batata, o oídio em cevada e a canela-preta em canola, mostram uma tendência do uso desta estratégia em promover a proteção por um período limitado de tempo (BURDON et al., 2014). Porém, em ambientes em que a doença ocorre em severidade baixa à moderada um único gene de resistência pode ser adequado por um longo período de tempo, economizando recursos para melhoramento de resistência durável para doenças mais severas/ frequentes (MUNDT 2014).

Quando genes *R* são implantados individualmente em um ambiente onde uma população significativamente grande do patógeno é mantida pela presença de cultivares suscetíveis, sejam cultivares que não apresentam resistência, ou cultivares contendo genes de resistência que tenham sido previamente superados, e/ou hospedeiros alternativos, a proteção em longo prazo fornecida será determinada pelo produto do tamanho efetivo da população, a taxa de mutação do patógeno e a probabilidade de que um novo mutante sobreviva e aumente em frequência na população (BARRETT et al., 2008). Por outro lado, devido à forte seleção direcional que uma cultivar altamente resistente imprime na população do patógeno existente, levando à morte imediata de propágulos não infecciosos, um novo mutante capaz de infectar esta cultivar apresenta uma maior vantagem seletiva (BURDON et al., 2014).

4.2 Rotação de genes

Rotação de genes envolve a implantação de um gene de resistência efetiva, com a sua posterior substituição por um gene diferente após o aparecimento de uma raça virulenta do patógeno e, no futuro, a reutilização da resistência original após o declínio da frequência da correspondente raça virulenta (MUNDT 2014).

Mesmo que as rotações de genes sejam simplesmente restringidas a diferentes cultivares da mesma espécie (diferentes genes *R*), em algumas circunstâncias, esta estratégia resulta em níveis inferiores da doença, aumentando a longevidade de genes *R* específicos e apresenta alterações significativas na estrutura de população do patógeno (BURDON et al., 2014).

O princípio deste método é o mesmo da rotação de culturas. Neste caso, as cultivares que serão utilizadas na rotação possuem genes de resistência a diferentes raças do patógeno. É possível rotacionar genes *R* no tempo (cada ano ou dois anos realizar a troca do gene *R*) e no espaço (diferentes regiões de cultivo). A rotação de genes apresenta como principais dificuldades a logística necessária para monitorar a virulência de forma precisa, a concordância entre todos os agricultores para substituir cultivares, assim como a disponibilidade de sementes em quantidades adequadas para tal (MUNDT 2014).

4.3 Piramidação de genes

A piramidação de genes consiste na introgressão de múltiplos genes de resistência em um único genótipo de modo a diversificar a pressão de seleção sobre o patógeno. A piramidação pode ser estabelecida com a introdução de genes maiores e menores, genes específicos e não específicos, ou qualquer outro tipo de gene que confira resistência ao patógeno (BORÉM; MIRANDA 2013).

Os mecanismos pelo qual a piramidação aumenta a durabilidade da resistência não estão claros. O dogma padrão tem sido que, caso os genes de resistência não tenham sido previamente implantados individualmente ou em combinações menos complexas, a probabilidade de um patógeno

assexuado sofrer mutação para virulência contra todos os genes de resistência piramidados seria o produto das probabilidades para cada gene individualmente, assim a probabilidade de surgimento de uma super-raça virulenta seria baixa (MUNDT 2014).

Teoricamente, múltiplos genes *R* apresentariam maiores obstáculos na evolução do patógeno. No entanto, a extensão com que isto ocorre dependerá, entre outros fatores, do tamanho efetivo da população do patógeno e da frequência de mutação dos genes envolvidos (BURDON et al., 2014).

4.4 Multilinhas

Multilinhas são uma mistura, em proporções previamente estabelecidas, de isolinhas (linhagens quase isogênicas), as quais diferem entre si por possuírem diferentes genes de resistência vertical (genes *R*) a determinado patógeno.

As isolinhas são obtidas através do método de retrocruzamento, sendo que cada isolinha recebe genes de resistência a uma ou algumas raças predominantes do patógeno. Estas isolinhas são então misturadas (*bulk*) e a linha resultante é denominada multilinha (HUSSAIN 2015), resultando assim em um mosaico que previne a cultura de adquirir um único isolado patogênico predominante (FAWKE et al., 2015).

Para que a diversidade seja funcional, deve haver uma correspondência adequada entre os genes de resistência incorporados em multilinhas e os genes de avirulência presentes na população do patógeno alvo. Assim, uma matriz de genótipos do hospedeiro e patógeno é geralmente considerada, numa tentativa de minimizar a porcentagem da população do hospedeiro para a qual uma determinada raça será virulenta (MUNDT 2002).

As multilinhas foram sugeridas como uma alternativa para minimização das perdas decorrentes de doenças causadas por patógenos que apresentam raças, cuja prevalência se modifica de ano para ano. Nas multilinhas as plantas resistentes à determinada raça se constituem em uma barreira para a dispersão de esporos das plantas suscetíveis. Apesar das plantas suscetíveis serem infectadas, há uma diminuição na concentração e dispersão dos esporos. Isto atrasa o desenvolvimento da epidemia e faz com

que os prejuízos com a doença sejam diminuídos.

Os melhoristas têm desenvolvido muitas cultivares através deste método, como, por exemplo, o desenvolvimento de multilinhas para resistência à brusone no arroz (ASHKANI et al., 2015). Além disso, o melhoramento de multilinhas tem sido relatado como promissor para o desenvolvimento de resistência horizontal (MUNDT 2014).

4.5 Mistura de cultivares

Mistura de cultivares refere-se a uma mistura espacial homogênea de diferentes genótipos de uma cultura no campo, com um princípio similar às multilinhas, visando à diminuição potencial do inóculo e constituindo uma barreira para dispersão do patógeno.

A maior dificuldade no uso de misturas é encontrar uma adequada combinação de cultivares, com ciclo, estágio de desenvolvimento, tratos culturais e caracteres agronômicos semelhantes, que permita seu plantio conjunto (CAMARGO 2011).

Em geral há uma maior adesão em favor de mistura de cultivares do que uso de multilinhas (MUNDT 2002). A mistura de cultivares apresenta vantagem de não necessitar esforço adicional de melhoramento, permitindo a incorporação de cultivares agronomicamente superiores assim que estas estejam disponíveis.

4.6 Diversificação espacial de genes de resistência

A estratégia de diversificação espacial de genes de resistência promove a diversidade entre campos de cultivo e não dentro de campos, como é o caso das misturas. Segundo esta estratégia, o plantio de cultivares contendo diferentes genes de resistência segue um padrão planejado de distribuição geográfica (CAMARGO 2011).

A implantação regional de genes de resistência é recomendada como meio de controle para agentes patogênicos que se dispersam em escala continental durante um ciclo de cultivo, como é o caso da ferrugem de cereais nos Estados Unidos, assim como de oídio em cevada e da requeima em batata, na Europa (BURDON et al., 2014).

5 ENGENHARIA GENÉTICA VISANDO À RESISTÊNCIA DE PLANTAS A DOENÇAS

Nas últimas décadas, os avanços obtidos na área da engenharia genética foram significativos. Desde o desenvolvimento da primeira geração de plantas geneticamente modificadas (plantas transgênicas) até, mais recentemente, a automação do sequenciamento, um novo horizonte se abre com grande potencial para desenvolvimento de plantas resistentes a doenças. Genomas inteiros, tanto de plantas, quanto de patógenos, são sequenciados a um baixo custo e em curto período de tempo. Estratégias genômicas, como a identificação de efetores conservados no patógeno, assim como dos genes *R* do hospedeiro ativados por estes efetores, têm sido possíveis (DANGL et al., 2013). Através do conhecimento do modo de herança e do controle genético de caracteres desejáveis ou indesejáveis, melhoristas têm conseguido manipular com precisão o gene que codifica o caráter, criando novos fenótipos através do uso de tecnologias de DNA recombinante, assim como o uso de ferramentas de edição do genoma, pela alteração direcionada e precisa do DNA, tem revolucionado o melhoramento genético de plantas.

5.1 Transgenia

A transgenia permite a inserção de genes de espécies não relacionadas em um hospedeiro de interesse. Métodos de transgenia podem transferir múltiplos genes simultaneamente, sem o problema do arraste de ligação (*linkage drag*). Além disso, a transgenia possibilita a transferência de uma pirâmide de genes de uma cultivar elite para outra de forma direta (WULFF et al., 2011).

Através da transgenia, melhoristas podem manipular com precisão o gene que codifica um caráter de interesse através da tecnologia do DNA recombinante. Os principais métodos utilizados para transformação de plantas são: transformação via *Agrobacterium*, bombardeamento de partículas e eletroporação de protoplastos (XIONG et al., 2015).

Atualmente, três estratégias principais de transgenia são utilizadas visando ao controle de doenças: a) uso de genes que interfiram na fisiologia

do patógeno, inibindo sua patogenicidade; b) transferência de genes *R* envolvidos no reconhecimento do patógeno; c) transferência de genes do próprio patógeno que, uma vez expressos, ativam o sistema de defesa da planta (CAMARGO 2011).

A clonagem de genes *R* tem permitido a transferência de genes *R* funcionais entre espécies sexualmente incompatíveis. Em geral, a maioria tende a funcionar em espécies pertencentes à mesma família de origem, como é o caso do gene *Bs2* em pimenta (*Capsicum annuum*), que confere resistência efetiva a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, agente causal da mancha bacteriana em tomate. A maioria dos exemplos funcionais de transferência de genes, disponíveis na literatura, são da família *Solanaceae* (WULFF et al., 2011).

A transferência de genes *R* entre plantas sexualmente incompatíveis por meio de transgenia tem sido proposta como uma alternativa de obter resistência durável a patógenos. Esta abordagem permite que diferentes alelos do gene *R* sejam combinados em pirâmide (*stacks*). No entanto, a transferência de genes *R* entre espécies sexualmente incompatíveis pode apresentar alguns problemas. A maioria dos genes *R* efetivamente expressos na espécie doadora é perdida no receptor devido à supressão do gene *R* (BOYD et al., 2013). Estudos utilizando transgenia para transferência de genes *R* revelaram reações de defesa desencadeadas por genes *R* na ausência do patógeno ou aumento específico de suscetibilidade a outros patógenos (WULFF et al., 2011). Genes *R* provavelmente necessitam de genes adicionais para desencadear a sua função, como os que atuam no modelo guarda, os quais não são encontrados na espécie receptora (BOYD et al., 2013).

Outro exemplo do uso de transgenia visando à resistência é o feijão geneticamente modificado desenvolvido pela Embrapa, que é resistente ao vírus do mosaico dourado (*Bean golden mosaic virus*), um grande problema da cultura no Brasil e na América do Sul. Em linhas gerais, a planta foi geneticamente modificada para que produzisse pequenos fragmentos de RNA, chamados de RNAi (RNA interferente), responsáveis pela ativação de seu mecanismo de defesa contra o vírus do mosaico dourado. Além disso,

os fragmentos de RNA podem causar resistência a várias estirpes do mesmo vírus (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO et al., 2013).

5.2 Cisgenia e Intragenia

Uma das principais preocupações em relação ao uso de cultivares transgênicas se refere à transferência de genes entre espécies não relacionadas, ou até mesmo microorganismos. Visando a atender a esta preocupação, o desenvolvimento da cisgenia e da intragenia surgem como alternativas à transgenia.

A cisgenia e a intragenia se baseiam no uso exclusivo de sequências de DNA da mesma espécie ou de espécies sexualmente compatíveis (HOLME et al., 2013). No caso da cisgenia, o gene inserido é uma cópia completa do DNA de um gene natural, contendo seus *introns* e regiões regulatórias como o promotor e terminador nativos, na orientação *sense* (SCHOUTEN et al., 2006; SCHOUTEN; JACOBSEN 2008). Já na intragenia, novas composições são feitas isolando sequências codificadoras e regulatórias específicas, as quais são rearranjadas *in vitro* e esta nova combinação inserida na planta, na orientação *sense* ou *antisense*, nesta última se o objetivo for o silenciamento gênico através de RNAi (ROMMENS et al., 2007; CARDI 2016).

O *pool* gênico explorado tanto pela cisgenia quanto pela intragenia é o mesmo disponível para o melhoramento genético tradicional (HOLME et al., 2013). No entanto, alguns autores defendem que a cisgenia pode ser considerada mais próxima do melhoramento tradicional em comparação com a intragenia, uma vez que cultivares cisgênicas não possuem genes ou caracteres diferentes dos já disponíveis no germoplasma para uso no melhoramento genético tradicional. Já “intragenes” são novas combinações de partes funcionais de genes deste *pool* gênico, as quais não ocorrem naturalmente ou como resultado de hibridação (SCHOUTEN; JACOBSEN 2008).

Culturas comercialmente difundidas através da propagação vegetativa (clones), a exemplo da batata, macieira, morangueiro e videira, apresentam grande dificuldade para transferência de genes através de métodos clássicos devido à elevada heterozigose e estão entre as primeiras culturas a utilizarem

abordagens cisgênicas/intragênicas com o objetivo de desenvolver plantas com maior resistência a patógenos (HOLME et al. 2013).

Plantas de batata cisgênicas (*Solanum tuberosum*) expressando os genes de resistência introduzidos a partir de *S. venturii* e *S. stoloniferum* apresentaram resistência de amplo espectro a *Phytophthora infestans* (JO et al. 2014).

Em macieira, foram desenvolvidas plantas cisgênicas visando à resistência a *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna da macieira. A cultivar Gala foi geneticamente modificada através da inserção do gene de resistência *Rvi6* derivado da cultivar Florina e originalmente encontrado no acesso silvestre (clone 821) de *Malus floribunda*, conferindo resistência à sarna da macieira (VANBLAERE et al., 2011; VANBLAERE et al., 2014). Em outro estudo, foram desenvolvidas linhagens intragênicas de macieira resistentes à sarna, utilizando o gene *HcrVf2*, combinado com sequências regulatórias do gene da Rubisco, ao invés de utilizar o promotor e terminador nativos do gene *HcrVf2* e são, portanto, referidos como intragenes (JOSHI et al., 2011). Ainda em macieira, foram desenvolvidas plantas cisgênicas com resistência para a queima bacteriana das rosáceas, causada por *Erwinia amylovora* (KOST et al., 2015).

Em arroz, melhoristas e fitopatologistas têm iniciado o desenvolvimento de linhagens resistentes à brusone (*Magnaporthe oryzae*) através de cisgenia (DELWAIDE et al., 2015).

Mesmo com as inúmeras vantagens do uso de cisgenia/intragenia para o desenvolvimento de plantas com maior resistência a patógenos, o desenvolvimento e comercialização de cultivares cisgênicas/intragênicas, assim como das transgênicas, ainda dependem em grande parte da aceitação do consumidor.

5.3 Edição Genômica

Tecnologias de edição genômica ou edição de genes podem acelerar o melhoramento genético de plantas através da introdução de mutações sítio-específicas em genes de interesse. Desta forma, a edição genômica tem permitido modular a resistência de plantas a patógenos, modificando

componentes importantes, envolvidos no sistema de defesa da planta (ANDOLFO et al., 2016).

A edição genômica é baseada na quebra da dupla fita de DNA (*double-strand breaks* - DSBs) em um loco predeterminado, utilizando nucleases artificiais que reconhecem sequências genômicas específicas (HUANG et al., 2016).

A quebra da dupla fita de DNA, conseqüentemente, estimula os mecanismos celulares de reparo, incluindo reparo por união de extremidades não homólogas (*non-homologous end joining* – NHEJ) e recombinação homóloga (*homologous recombination* – HR), os quais podem acumular diferentes modificações no genoma (XIONG et al., 2015). Após a quebra da dupla fita de DNA e na ausência de sequências de DNA exógeno, ambas as extremidades tendem a se ligar novamente através do reparo NHEJ. Porém, como este processo é propenso a erros, frequentemente acontecem pequenas inserções e deleções (*indels*) que podem resultar em mutações na sequência de leitura quando ocorrem na região codificante do gene e, conseqüentemente, em perda de função ou silenciamento gênico (*knockout*). Quando fragmentos de DNA homólogos à sequência alvo são inseridos dentro da célula, o mecanismo de reparo por recombinação homóloga pode substituir alguns nucleotídeos na sequência do gene a ser modificado, ou inserir novos genes ou elementos regulatórios em posição predeterminada do genoma (BORTESI; FISCHER 2015; CARDI 2016).

Nucleases artificiais como ZFNs (*zinc finger nucleases*) e TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) podem ser criadas para reconhecer e clivar a dupla fita de DNA em locais específicos no genoma (LLOYD et al., 2005; CHRISTIAN et al., 2010). Mais recentemente, uma nova tecnologia de edição genômica, denominada CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat - associated protein9*) foi desenvolvida utilizando como base o sistema imune adaptativo tipo II descoberto em bactérias. CRISPR/Cas9 utiliza uma pequena sequência de RNA (gRNA) para guiar a nuclease Cas9 até a sequência específica de DNA a ser clivada (DNA-alvo), resultando em modificações no gene (BELHAJ et al., 2013).

CRISPR/Cas9 apresenta inúmeras vantagens em termos de simplicidade, eficiência, versatilidade e custo (BELHAJ et al., 2015; MA et al., 2016; NEJAT et al., 2016). Diferentemente de ZFNs e TALENs, onde a especificidade é determinada pela interação proteína-DNA, o sistema CRISPR/Cas9 identifica sequências de DNA-alvo através do pareamento de bases com o gRNA (BORTESI; FISCHER 2015). Além disso, CRISPR/Cas9 permite a introdução simultânea de DSBs em múltiplos sítios, possibilitando a edição de vários genes ao mesmo tempo (LI et al., 2013; XING et al., 2014). A edição multiplex com CRISPR/Cas9 requer apenas a modificação da sequência de nucleotídeos do gRNA, sequências estas sintetizadas em complementaridade aos genes de interesse e, desta forma, múltiplos gRNAs podem ser testados para cada gene alvo de uma forma simples e rápida. Já ZFNs e TALENs requerem proteínas “engenheiradas” separadamente para cada sítio alvo específico, tornando o processo oneroso e muitas vezes inviável (BORTESI; FISCHER 2015).

Tecnologias de edição genômica vêm sendo utilizadas com sucesso em diversas espécies vegetais. Genes que conferem suscetibilidade ao hospedeiro têm sido manipulados a fim de promover resistência a patógenos (ANDOLFO et al., 2016). As tecnologias de edição genômica TALEN e CRISPR/Cas9 foram ambas utilizadas em trigo hexaplóide para introduzir mutações simultâneas nos três alelos homólogos que codificam proteínas *MLO*, as quais são responsáveis por reprimir as defesas da planta contra oídio. A modificação (*knockout*) das três cópias *MLO* na mesma planta conferiu resistência herdável de amplo espectro à *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (WANG et al., 2014).

Em arroz, plantas que superexpressam o gene *OsERF922*, fator de transcrição envolvido na rota do etileno, apresentam redução na expressão de genes relacionados à defesa e aumento da suscetibilidade a *Magnaporthe oryzae* (LIU et al., 2012). Uma mutação específica no gene *OsERF922* via CRISPR/Cas9 causou a supressão de fatores de resposta ao etileno (ERF) e foi efetiva para o aumento da resistência a brusone em arroz (WANG et al., 2016).

A possibilidade de editar genes do patógeno também foi comprovada,

através da edição do gene efetor *Avr4/6* secretado por *Phytophthora sojae*. A interrupção do gene, ou substituição do gene efetor através dos mecanismos de reparo de DSBs induzidos por Cas9, contribuiu para o reconhecimento de *Avr4/6* pelos genes *R* da soja, ativando os mecanismos de defesa da planta (FANG; TYLER 2016).

Um sítio de reconhecimento do patógeno não funcional pode ser modificado através de tecnologias de edição genômica, obtendo um gene *R* sintético funcional. Além disso, outro potencial uso da edição de genes consiste em explorar a combinação de vários sítios de reconhecimento do patógeno de diferentes genes *R* em um único novo gene *R*, capaz de ativar resistência a efetores conservados do patógeno e/ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ANDOLFO et al., 2016). Desta forma, tecnologias de edição genômica marcam o início de uma nova era, visando a fortalecer o sistema de defesa da planta e aumentar a resistência a fitopatógenos diversos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rápidos avanços na área da genômica estão revolucionando as formas como a resistência de plantas a doenças pode ser manipulada em programas de melhoramento genético. Estas possibilidades fortalecem ainda mais a necessidade de ampliar o conhecimento sobre os princípios evolucionários do patógeno às estratégias de implantação, com foco no aumento da diversidade de genes ou no aumento da diversidade de genótipos, em diferentes contextos espaciais e temporais, visando retardar a evolução do patógeno.

Progresso no melhoramento de plantas para resistência a doenças pode ser relativamente rápido quando o melhoramento para resistência for o principal objetivo. No entanto, resistência de plantas a doenças é um dos vários objetivos do melhoramento, que de outro lado necessita de níveis aceitáveis de produtividade, adaptação, qualidade e outros caracteres agronômicos favoráveis.

É necessário ressaltar que os vários métodos de melhoramento

disponíveis para o desenvolvimento de cultivares resistentes apresentam benefícios e limitações, e a escolha do método mais adequado irá depender, entre outros fatores, do tipo de planta, do patógeno, assim como dos recursos disponíveis. Métodos tradicionais fornecerão a base de genótipos que contêm importantes combinações de caracteres enquanto a engenharia genética auxiliará na transferência ou manipulação dos genes de interesse, de forma mais precisa.

Como perspectivas futuras, o melhoramento de plantas para resistência a doenças deve considerar duas abordagens principais que são igualmente válidas e complementares. A primeira centra-se na identificação de PAMPs e efetores que são conservados no patógeno e essenciais para a sua sobrevivência. Os genes de plantas que reconhecem estas moléculas conservadas, teoricamente têm uma maior possibilidade de permanecer eficazes ao longo do tempo, devido às limitações evolutivas sobre o patógeno. A segunda abordagem está relacionada à planta. Estudos têm mostrado que muitos QTLs que conferem resistência parcial e muitas vezes durável codificam genes diretamente envolvidos na resistência. Através da clonagem destes QTLs é possível determinar os mecanismos de resistência e, assim, acumular genes de resistência com mecanismos diferentes e contrastantes que podem ser utilizados em conjunto visando à resistência durável.

Por fim, a diminuição dos custos do sequenciamento de genomas e a variabilidade genética presente no germoplasma, extensivamente manipulado por melhoristas de plantas por mais de um século, encontram agora novos meios para o desenvolvimento de resistência durável através da identificação e edição de genes, visando reduzir a infecção por patógenos e o desenvolvimento de sintomas. Embora os desafios sejam grandes, as perspectivas de sucesso são ainda maiores.

REFERÊNCIAS

ACEVEDO-GARCIA, J.; KUSCH, S.; PANSTRUGA, R. Magical mystery tour: MLO proteins in plant immunity and beyond. *New Phytologist*, v. 204, p. 273-281, 2014.

AGRIOS, G. N. Plant pathology. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005, 922 p.

ALLARD, R. W. Principles of plant breeding. New York: J. Wiley, 1999. 254 p.

ANDOLFO, G. et al. Genome-editing technologies for enhancing plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1813, 2016.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *Journal of Biotechnology*, v. 166, p. 42-50, 2013.

ASHKANI, S. et al. Molecular breeding strategy and challenges towards improvement of blast disease resistance in rice crop. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 886, 2015.

AYLIFFE, M.; SINGH, R.; LAGUDAH, E. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 187-192, 2008.

BAJGAIN, P. et al. Association mapping of North American spring wheat breeding germplasm reveals loci conferring resistance to Ug99 and other African stem rust races. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 249, 2015.

BARRETT, L. G. et al. Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 23, p. 678-685, 2008.

BELHAJ, K. et al. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, v. 9, p. 39, 2013.

BELHAJ, K. et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 32, p. 76-84, 2015.

BONFIM, K. et al. RNAi-Mediated resistance to *bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 6, p. 717-726, 2007.

- BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. Challenges for plant breeding to develop biotic-resistant cultivars. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Plant breeding for biotic stress resistance. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 1-11.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. B. V. Melhoramento de plantas. 6. ed. rev. ampl. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.
- BORTESI, L.; FISCHER, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, v. 33, p. 41-52, 2015.
- BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.
- BROWN, J. K. M. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 513-539, 2015.
- BUENO, L. C. de S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 319 p.
- BURDON, J. J. et al. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. *Evolutionary Applications*, v. 7, p. 609-624, 2014.
- BUTLER, D. Fungus threatens top banana. *Nature*, v. 504, p. 195-196, 2013.
- CAIXETA, E. T.; ZAMBOLIM, E. M. Melhoramento genético de plantas visando resistência a doenças. In: ZAMBOLIM, E. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A (eds.). O essencial da fitopatologia: controle genético de plantas. Viçosa: Suprema, 2014. p. 553-576.
- CAMARGO, L. E. A. Controle genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. Volume 1 Piracicaba: Ceres, 2011. p. 325-341.
- CARDI, T. Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding*, v. 135, p. 139–147, 2016.

CARVALHO, F. I. F. et al. Condução de populações no melhoramento genético de plantas. 2.ed. rev. e ampl. Pelotas: UFPel Editora Universitária, 2008. 288 p.

CHANG, H. X. et al. Characterization of disease resistance loci in the USDA soybean germplasm collection using genome-wide association studies. *Phytopathology*, v. 106, n. 10, p. 1139-1151, 2016.

CHRISTIAN, M. et al. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, v. 186, p. 757-761, 2010.

CIMMYT. International Maize and Wheat Improvement Center. Wild wheat relatives help boost genetic diversity. Mexico: CIMMYT, 2004.

COLLARD, B. C. Y.; MACKILL, D. J. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v. 363, p. 557-572, 2008.

CROLL, D. et al. The impact of recombination hotspots on genome evolution of a fungal plant pathogen. *Genetics*, v. 201, p. 1213-1228, 2015.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, v. 341, p. 746-751, 2013.

DELWAIDE, A. et al. Revisiting GMOs: Are there differences in European consumers' acceptance and valuation for cisgenically vs transgenically bred rice?. *Plos One*, v. 10, n. 5, p. e0126060, 2015.

DILLA-ERMITA, C. J. et al. Genome-wide association analysis tracks bacterial leaf blight resistance loci in rice diverse germplasm. *Rice*, v. 10, p. 8, 2017.

DING, J. et al. Genome-wide association mapping reveals novel sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. *BMC Plant Biology*, v. 15, p. 206, 2015.

FANG, Y.; TYLER, B. Efficient disruption and replacement of an effector

gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Molecular Plant Pathology*, v. 17, n. 1, p. 127-139, 2016.

FAO. The state of food security in the world: addressing food insecurity in protracted crises, food and agriculture organization of the United Nations. Rome: FAO, 2010.

FAROKHZADEH, S.; ALIFAKHERI, B. Marker-assisted selection for disease resistance: applications in breeding (Review). *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, v. 7, n. 14, p. 1392-1405, 2014.

FAWKE, S.; DOUMANE, M.; SCHORNACK, S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 79, n. 3, p. 263-280, 2015.

FERREIRA, M. E.; RANGEL, P. H. N. Aporte biotecnológico ao pré-melhoramento vegetal. In: LOPES, M. A.; FÁVERO, A. P.; FERREIRA, M. A. J. F.; FALEIRO, F. G.; FOLLE, S. M.; GUIMARÃES, E. P. Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p. 59-84.

FEUILLET, C.; LANGRIDGE, P.; WAUGH, R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics*, v. 24, n. 1, p. 24-32, 2008.

FISHER, M. C. et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, 2012.

GOODWIN, S. B.; COHEN, B. A.; FRY, W. A. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 11591-11595, 1994.

GUNDUZ, I. et al. Genetic and phenotypic analysis of Soybean mosaic virus resistance in PI 88788 soybean. *Phytopathology*, v. 94, p. 687-692, 2004.

HOLME, I. B.; WENDT, T.; HOLM, P. B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, v. 11, p. 395-407, 2013.

- HUANG, S.; WEIGEL, D.; BEACHY, R.; LI, J. A proposed regulatory framework for genome-edited crops. *Nature Genetics*, v. 48, n. 2, p. 109-111, 2016.
- HUSSAIN, B. Modernization in plant breeding approaches for improving biotic stress resistance in crop plants. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, v. 39, p. 515-530, 2015.
- JO, K. et al. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 50, 2014.
- JORGENSEN, I. H. Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, v. 63, p. 141-152, 1992.
- JOSHI, S. G. et al. Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Molecular Biology*, v. 75, p. 579-591, 2011.
- KOST, T. D. et al. Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *Plos One*, v. 10, n. 12, p. e0143980, 2015.
- KUMUDINI, S. et al. Mechanisms involved in soybean rust-induced yield reduction. *Crop Science, Madison*, v. 48, p. 2334-2342, 2008.
- LANGENBACH, C. et al. Fighting Asian soybean rust. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, 2016.
- LI, J. et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 688-691, 2013.
- LINDE, C. C. Population genetic analyses of plant pathogens: new challenges and opportunities. *Australasian Plant Pathology*, v. 39, p. 23-28, 2010.
- LIU, D. et al. The rice ERF transcription factor *OsERF922* negatively regulates resistance to *Magnaporthe oryzae* and salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 3899-3911, 2012.

LLOYD, A. et al. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United State of America*, v. 102, p. 2232-2237, 2005.

LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Breeding for resistance bacterial diseases. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. *Plant breeding for biotic stress resistance*. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 37-55.

MA, X. et al. CRISPR/Cas9 Platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Molecular Plant*, v. 9, p. 961-974, 2016.

McDOWELL, J. M.; WOFFENDEN, B. J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, v. 21, p. 178-183, 2003.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 349-379, 2002a.

McDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, v. 124, p. 163-180, 2002b.

McDONALD, B. A. Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. *Tropical Plant Pathology*, v. 39, p. 191-196, 2014.

MITCHUM, M. G. Soybean resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*: an update. *Phytopathology*, v. 106, p. 1444-1450, 2016.

MUNDT, C. C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 27, p. 446-455, 2014.

MUNDT, C. C. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 381-410, 2002.

- NEJAT, N. et al. Plant-pathogen interactions: toward development of next generation disease-resistant plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, p. 1-9, 2016.
- OLUKOLU, B. A. et al. Genome-wide association study for partial resistance to maize common rust. *Phytopathology*, v. 106, p. 745-751, 2016.
- PALLOIX, A.; AYME, V.; MOURY, B. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, v. 183, p. 190-199, 2009.
- PEREIRA, A. et al. Breeding for fungus resistance. In: FRITSCHENETO, R.; BORÉM, A. *Plant breeding for biotic stress resistance*. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2012. p. 13-35.
- RABOIN, L. M. et al. Association mapping of resistance to rice blast in upland field conditions. *Rice*, v. 9, p. 59, 2016.
- RAGIMEKULA, N. et al. Marker assisted selection in disease resistance breeding. *Journal of Plant Breeding and Genetics*, v. 1, p. 90-109, 2013.
- RIBAUT, J. M.; BETRÁN, J. Single large-scale marker-assisted selection (SLS–MAS). *Molecular Breeding*, v. 5, p. 531-541, 1999.
- ROMMENS, C. M. et al. The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in Plant Science*, v. 12, p. 397-403, 2007.
- SCHOUTEN, H. J.; JACOBSEN, E. Cisgenesis and intragenesis, sisters in innovative plant breeding. *Trends in Plant Science*, v. 13, p. 260-261, 2008.
- SCHOUTEN, H. J.; KRENS, F. A.; JACOBSEN, E. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO reports*, v. 7, p. 750-753, 2006.
- SHANTI, M. L. et al. Marker-Assisted breeding for resistance to bacterial leaf blight in popular cultivar and parental lines of hybrid rice. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, p. 495-501, 2010.

- SINGH, R. P. et al. Emergence and spread of new races of wheat stem rust fungus: continued threat to food security and prospects of genetic control. *Phytopathology*, v. 105, p. 872-884, 2015.
- ST.CLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 247-68, 2010.
- STUKENBROCK, E. H.; McDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 75-100, 2008.
- VANBLAERE, T. et al. The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology*, v. 154, p. 304-311, 2011.
- VANBLAERE, T. et al. Molecular characterization of cisgenic lines of apple 'Gala' carrying the *Rvi6* scab resistance gene. *Plant Biotechnology Journal*, v. 12, p. 2-9, 2014.
- WANG, Y. et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 947-952, 2014.
- WANG, F. et al. Enhanced rice blast resistance by CRISPR/ Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene *OsERF922*. *Plos One*, v. 11, p. e0154027, 2016.
- WULFF, B. B. H.; HORVATH, D. M.; WARD, E. R. Improving immunity in crops: new tactics in an old game. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 468-476, 2011.
- XING, H. et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, v. 14, p. 327, 2014.
- XIONG, J.; DING, J.; LI, Y. Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Horticulture Research*, v. 2, n. 15019, 2015.

YU, L. et al. Association mapping and gene-gene interaction for stem rust resistance in CIMMYT spring wheat germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 123, p. 1257-1268, 2011.

ZHAN, J. Population genetics of plant pathogens. *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-7, 2016.

ZHAN, J. et al. Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology*, v. 53, p. 19-43, 2015.

CAPÍTULO 3: ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES, ABORDAGENS ANALÍTICAS E ESTRATÉGIAS DE MANEJO DURÁVEL DE DOENÇAS BASEADAS NO POTENCIAL EVOLUTIVO DE FITOPATÓGENOS

Paulo C. Ceresini¹

¹UNESP – Universidade Estadual Paulista – Campus de Ilha Solteira, Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, 15385-000 Ilha Solteira, SP, Brasil

Glossário (McDONALD 2004; MILGROOM 2015)

- **Genética de populações:** Componente da biologia de populações de fitopatógenos cujo objetivo é determinar os processos evolutivos que geram e mantêm variação genética dentro e entre populações. Os processos evolutivos que moldam populações são inferidos a partir de padrões de variação genética, quer sejam frequências de alelos, genótipos ou fenótipos ou variação na sequência de nucleotídeos.

- **Evolução:** Na definição mais simples, refere-se a mudanças em frequências alélicas ou genotípicas em populações em períodos relativamente curtos. Se ocorrer em escala de tempo maior, pode resultar na evolução de espécies geneticamente isoladas. Independente da escala de tempo e da magnitude das mudanças, a evolução ocorre pelos mesmos cinco processos: seleção natural, mutação, deriva genética, migração e recombinação.

- **Seleção natural:** Força evolutiva poderosa agindo sobre o fenótipo de um indivíduo, mas os genes, que definem tal fenótipo, é que são transmitidos para a próxima geração, pela produção de progênies. Os alelos para esses genes aumentam ou diminuem em frequência sob ação da seleção. Seleção ocorre quando três critérios são satisfeitos: i) há variação fenotípica numa população; ii) o fenótipo é herdável, ou seja, tem base genética; e iii) fenótipos variam em adaptabilidade (fitness), definida como número esperado de progênie produzida pelos indivíduos, que em termos informais implica na média de sobrevivência e reprodução dos indivíduos de cada fenótipo. Os dois exemplos mais notórios que ocorrem atualmente são a seleção para raças de patógenos em sistemas gene-a-gene e seleção para resistência a fungicidas.

1 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO DE FITOPATÓGENOS

O objetivo da genética de populações é descrever e quantificar variação genética em populações e usar esta variação para fazer inferência sobre processos evolutivos afetando populações. Forças evolutivas como mutação, migração, deriva genética, seleção e recombinação podem alterar a frequência de genes em populações e moldar sua estrutura genética (McDONALD 2004; MILGROOM 2015). Informação sobre a estruturação genética de populações de fitopatógenos revela o nível de diversidade genética, e como esta diversidade é distribuída dentro e entre populações. Permite também compreender o papel das cinco forças

- **Mutação:** É definida como alterações herdáveis no genoma de um organismo (por exemplo, em sequências de DNA). Podem ser tão pequenas como a substituição de um único nucleotídeo por outro devido a erro de replicação (conhecidas como mutações de ponto); ou tão grandes quanto rearranjos genômicos nos quais segmentos de um cromossomo são perdidos ou ganhos, duplicados, invertidos, translocados. Mutação é a fonte de toda variação genética. As taxas de mutação são frequentemente muito baixas; dessa forma, a mutação isoladamente é uma força evolutiva fraca afetando frequências alélicas ou fenotípicas em curta escala de tempo. Entretanto, combinada com outras forças evolutivas, pode resultar em rápidas mudanças evolutivas, adaptação a novos ambientes ou à divergência de subpopulações. Na ausência de recombinação, pode resultar em eventual extinção de populações ou espécies.

- **Deriva genética:** Mudanças na composição genética de uma população (por exemplo, na frequência de alelos), que ocorrem simplesmente ao acaso. Pode ser comparada a um processo de amostragem. Um subgrupo de indivíduos (e seus genes) que sobrevivem ao acaso numa população, pode ser pensado como sendo amostrados. Por exemplo, um esporo de um fungo fitopatogênico que, ao acaso, é depositado sobre um hospedeiro suscetível num ambiente favorável pode ser pensado como um evento ao acaso ou uma amostra ao acaso tirada de um pool de esporos em uma população. Pelo acaso, após infecção no hospedeiro, os alelos carregados por esse esporo serão transmitidos para a próxima geração. Este processo é diferente da seleção natural porque a probabilidade de um esporo ser depositado num hospedeiro suscetível em ambiente favorável independe de seu genótipo. O efeito da deriva genética depende do número de indivíduos que sobrevive, o que determina o número de alelos transmitidos para a próxima geração. Há três consequências da deriva genética: i) mudanças ao acaso nas frequências alélicas; ii) perda de variação genética (essa perda de variação genética é conhecida como gargalo de garrafa ou efeito fundador) dentro de populações porque alguns alelos são extintos; e iii) divergência genética entre subpopulações porque mudanças ocorrem ao acaso independentemente em diferentes locais.

- **Migração:** É o movimento de indivíduos ou gametas de uma população para outra, resultando em fluxo gênico quando os migrantes contribuem seus genes para o pool de genes da nova população. Como força evolutiva, a migração tem dois efeitos importantes: i) a expansão da amplitude de ocorrência de uma espécie, muitas vezes a longas distâncias, por exemplo pela introdução de fitopatógenos em populações de hospedeiros em novas áreas; ii) contrabalança a divergência entre

evolutivas específicas (seleção, mutação, deriva genética, migração e recombinação) afetando populações (Glossário). Compreensão das forças evolutivas que controlam populações de fitopatógenos é essencial para o desenvolvimento e implementação de medidas efetivas e duráveis para manejo de doenças de plantas.

Compreensão sobre a variação genética em populações de fitopatógenos é extremamente útil e relevante para esforços de melhoramento genético visando à resistência a doenças. Neste contexto, cinco questões chave abordadas por estudos de genética de populações podem ser úteis para programas de melhoramento que almejam sucesso (McDONALD 2004; MILGROON 2015; PEEVER et al., 2000):

a) Como a variação genética de populações do patógeno é espacialmente distribuída?

A distribuição geográfica de genótipos do patógeno é uma consideração importante para “screening” de resistência em programas de melhoramento. As populações dos patógenos são frequentemente geograficamente subestruturadas, o que pode apenas ser revelada através de extensiva amostragem e da apli-

populações que ocorreria pela deriva genética ao acaso na ausência de migração. É uma força unificadora introduzindo novos alelos em populações e impedindo que populações divirjam geneticamente. Análises da estrutura de populações compara frequências alélicas ou nucleotídicas de indivíduos amostrados em diferentes locais ou subpopulações para inferir taxas médias de migração em escala de tempo longo.

- **Recombinação:** É a troca de genes ou outros segmentos de sequências de nucleotídeos entre diferentes genomas. Em eucariotos, a recombinação ocorre durante a meiose na reprodução sexuada como consequência de “assortment” e “crossing-over” entre cromossomos homólogos. A reprodução sexuada, em efeito, rearranja a variação genética que origina por mutação para formar gametas geneticamente únicos, que se unem para formar zigotos diploides geneticamente únicos. É uma força considerada poderosa na evolução da maioria dos fitopatógenos. A recombinação tem duas consequências evolutivas importantes: i) o expurgo de mutações deletérias nas progênes recombinantes; ii) resulta em novas combinações de alelos em diferentes loci; essas combinações são denominadas genótipos multiloci. A diversidade de genótipos multiloci que resulta da recombinação permite a uma população se adaptar rapidamente a ambientes em alteração. A recombinação também reduz ou elimina o desequilíbrio de ligação, que é definido como a associação não casual entre alelos em diferentes loci.

- **Potencial evolutivo dos fitopatógenos:** A habilidade de um patógeno evoluir para evadir medidas de manejo naturais (genes de resistência) ou derivadas da atividade humana (fungicidas). O potencial evolutivo de uma população de um patógeno resulta da ação das cinco forças evolutivas, i.e., seleção natural, mutação, deriva genética, fluxo gênico (genotípico) e modo de reprodutivo (sistema de acasalamento), que, juntas, determinam o tamanho efetivo da população e a probabilidade de evolução do patógeno [MCDONALD; LINDE (2002^a) oferecem uma discussão detalhada].

- **Seleção disruptiva:** Em uma população polimórfica de um patógeno com múltiplos picos de adaptabilidade incompatíveis, a heterogeneidade do ambiente seleciona, espacialmente e temporalmente, para vários fenótipos. Porque nenhum dos fenótipos pode se adaptar a todos os ambientes, este tipo de seleção diminui, ou mesmo impede, a emergência de super-raças e nova infectividade/virulência em populações do patógeno. Seleção disruptiva é também denominada de seleção diversificadora.

cação de marcadores moleculares apropriados. A efetividade e a durabilidade da resistência do hospedeiro podem ser previstas com base no conhecimento detalhado da estrutura da população do patógeno.

b) As primeiras gerações de variedades resistentes estão expostas a toda variação potencial no patógeno?

O “screening” de germoplasma resistente frequentemente é feito em apenas uma localidade e/ou as plantas são frequentemente inoculadas apenas com um número limitado de genótipos do patógeno. Para estudos usando inoculação controlada, é importante expor as plantas resistentes a toda variação potencial na população do patógeno. Isto pode envolver a inoculação de um número muito maior de genótipos do patógeno do que é normalmente usado em muitos programas de melhoramento. Dessa forma, na recomendação de variedades resistentes, é essencial conhecer se a população do patógeno no local de “screening” é representativa da variação na população do patógeno.

c) Como a variação genética em populações do patógeno é distribuída temporalmente?

A composição das populações do patógeno pode mudar ao longo do

tempo. A substituição completa de um genótipo dominante de um fitopatógeno por outro pode ocorrer e essa mudança deve ser levada em consideração no desenvolvimento de programas de melhoramento. Populações de patógenos devem ser monitoradas com frequência para determinar se novos genótipos de fitopatógenos foram introduzidos numa região e se as frequências de certos genótipos de patógenos têm mudado ao longo do tempo.

d) Há evidência de interações entre genótipos do fitopatógeno com genótipos do hospedeiro?

A existência de interações entre genótipos do fitopatógeno com genótipos do hospedeiro pode ter impacto significativo na taxa pela qual a infectividade/virulência dos patógenos evolui em plantas hospedeiras e na durabilidade da resistência. A resistência que é efetiva contra um grande número de genótipos do patógeno (i.e., quando há ausência de interações) é também conhecida como resistência não específica a raças (ou resistência parcial). Acredita-se que a resistência parcial pode ser mais duradoura que a resistência específica a raças porque há menor probabilidade dos patógenos evoluírem para superar a resistência parcial.

e) Qual o papel da recombinação genética na estrutura de populações do fitopatógeno?

Muito embora haja evidências de que alguns fungos fitopatogênicos infectam através das estruturas sexuais, este fato por si só não garante que populações do patógeno estejam se recombinando, caso se trate de um organismo com predominância de endogamia. O efeito relevante da recombinação é a produção de genótipos recombinantes e a associação casual de alelos em loci distintos. Esta informação é extremamente importante para programas de melhoramento visando à resistência específica a raças, pois alelos associados à virulência podem estar sujeitos à recombinação, resultando em diferentes genótipos.

Publicação de McDonald (2004), disponibilizada na página de *web* da Sociedade Americana de Fitopatologia (APS), é excelente fonte de consulta sobre aspectos teóricos e aplicados da genética de populações de fitopatógenos (<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/popgenetics/>). Outra publicação relevante como fonte de referência

sobre biologia de populações de fitopatógenos, genética, ecologia e evolução, foi publicado pela APS (MILGROOM 2015).

2 MARCADORES GENÉTICOS: FERRAMENTAS IMPRESCINDÍVEIS PARA ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES E EVOLUÇÃO DE FITOPATÓGENOS

Para viabilizar qualquer estudo de genética de populações, são imprescindíveis a amostragem, a escolha e o uso de marcadores genéticos apropriados, e a implementação de ferramentas, técnicas e métodos de análises de dados. Inicialmente é necessário estabelecer métodos de amostragem de populações que permitam que as amostras sejam grandes o suficiente para permitir que se determine o movimento de indivíduos entre populações e, eventualmente, as divisas entre populações distintas.

Como as análises e testes estatísticos aplicados em dados de genética de populações são baseadas em frequência de alelos em loci distintos (marcadores), é vital que o tamanho da amostra seja adequado para permitir estimativas estatísticas confiáveis.

A escolha dos marcadores genéticos tem impacto substancial na análise e interpretação dos dados de genética de populações. Os marcadores genéticos devem ser usados com objetivo principal de testar hipóteses ecológicas e epidemiológicas e não apenas para catalogar a variação existente nas populações dos patógenos. Por exemplo, para questões envolvendo determinação do papel do fluxo gênico, sistemas de cruzamento (ocorrência de recombinação) e tamanho da população, são recomendados os marcadores seletivamente neutros, altamente informativos, reproduzíveis e relativamente fáceis de manipulação. Como exemplos de marcadores, bastante utilizados há mais de uma década, podem ser citados os microssatélites e o sequenciamento de múltiplos genes.

Atualmente, com o avanço e maior acessibilidade do sequenciamento de última geração e com a disponibilidade de recursos e programas para computação de alto desempenho, é possível gerar e analisar dados sobre

polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) que abrangem todo o genoma do organismo. Para questões envolvendo efeitos de seleção, o uso de marcadores seletivos (como loci relacionados com a resistência a fungicidas, genes de avirulência). Para questões envolvendo a detecção de linhagens clonais, recomenda-se o uso de marcadores que permitam determinar *fingerprinting* (ou impressão digital) de DNA, como os AFLPs. A combinação de marcadores é recomendada.

A escolha de marcadores genéticos para fungos haploides e bactérias é mais simples. Entretanto, para oomicetos e fungos basidiomicetos que são heterocários, diploides ou poliploides em seu ciclo de vida, os marcadores considerados dominantes (como AFLPs), que não podem distinguir entre homozigotos e heterozigotos, não devem ser utilizados. Para tais grupos de organismos apenas marcadores codominantes podem ser utilizados, como microsatélites e SNPs.

3 ABORDAGENS ANALÍTICAS PARA O ESTUDO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE FITOPATÓGENOS

A descrição de abordagens analíticas clássicas para estudo da estrutura genética contemporânea de populações pode ser encontrada em Falconer & Mackay (1996) e Hartl & Clark (1997). Baseando-se em frequências alélicas em um conjunto de marcadores genéticos neutros (microsatélites, SNPs e sequências de DNA de múltiplos genes), incluem, por exemplo, medidas da diversidade gênica, como riqueza alélica, e diferenciação genética (F_{ST}) entre populações para determinar a magnitude do fluxo gênico; medidas da associação de alelos entre e dentro de marcadores genéticos para determinação de equilíbrio gamético, para fungos haploides, e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e de coeficiente de endogamia (F_{IS}) para oomicetos e fungos basidiomicetos que são heterocários, diploides, ambos visando a determinar o modo reprodutivo predominante nas populações de fitopatógenos. Para se determinar o nível de clonalidade nas populações utiliza-se medidas de diversidade genotípica e fração clonal das populações

dos fitopatógenos.

Abordagens analíticas contemporâneas para análise da estrutura genético populacional dos fitopatógenos oferecem ferramentas poderosas para diferenciar entre populações ancestrais e descendentes e inferir sobre a história evolutiva de espécies ou de populações de fitopatógenos. Estas ferramentas modernas, particularmente baseadas na teoria coalescente, possibilitam testar hipóteses ou questões contrastantes quanto à origem de fitopatógenos emergentes ou reemergentes no agroecossistema (GRÜNWALD; GOSS 2011). Por exemplo: a) É mais provável que uma população de um fitopatógeno emergente ou reemergente tenha sido introduzida por um ou mais eventos de migração ou se trata de uma população residente que emergiu, via mudança de hospedeiro, devido a mudanças nas práticas agronômicas? b) Se há suspeitas de mudança recente de hospedeiro, há ainda fluxo gênico contínuo com a população doadora que pode estar gerando variação genética na população receptora? c) Se, associado a esta emergência, há evidências para expansão do tamanho da população, esta expansão é antiga ou só teve início recentemente? d) Há evidência para gargalo de garrafa populacional anterior a uma expansão recente, como se espera de um evento de mudança de hospedeiro, com a introdução de um patógeno exótico, ou com a introdução de um novo fungicida na agricultura? e) A recombinação sexual está gerando variação genética na população do patógeno com o potencial de gerar progênie mais adaptada ou mais virulenta?

As respostas para estas questões podem ter impacto direto sobre o manejo de doenças, tais como: a) a identificação de vias de migração para mitigar a dispersão geográfica do patógeno; b) o planejamento de rotações com baixo risco evolutivo para diminuir a pressão de seleção para resistência associada com o manejo químico centrado em fungicidas de alto risco; c) a busca por genes de resistência em plantas hospedeiras silvestres; c) a atenção às populações particulares de fitopatógenos (p.e., que se reproduzem sexualmente, geneticamente variáveis, e as que se expandem rapidamente).

No geral, estes estudos permitem melhor compreensão de como os patógenos emergem e reemergem, além de permitir a adoção de medidas para mitigar ameaças futuras às culturas agrícolas. É possível inferir, por

exemplo, a idade e origem das linhagens evolutivas de patógenos, as taxas e direcionalidade da migração histórica entre populações, o tamanho efetivo populacional histórico, as taxas e a magnitude da recombinação histórica.

3.1 Idade e origem das linhagens evolutivas de patógenos

Um foco importante no estudo de patógenos emergentes é a investigação sobre suas origens. Diversas perguntas importantes podem ser respondidas usando-se métodos coalescentes que datam eventos e permitem estimar a idade de espécies, de populações e de linhagens evolutivas de fitopatógenos. Por exemplo: um certo patógeno emergente tem origem evolutiva recente (isto é, uma nova espécie ou subespécie) ou é novo para um hospedeiro ou para um agroecossistema? Um patógeno emergente evoluiu de populações locais ou trata-se de uma nova introdução? Populações variáveis de fitopatógenos são resultantes de diversificação desde a emergência ou de múltiplos eventos como migração e troca de hospedeiros? Uma ferramenta muito usada para responder a estas perguntas é o programa de linhas de comando GeneTree (BAHLO; GRIFFITHS 2000; CARBONE et al., 2004; CORANDER et al., 2008), que possibilita estimar a máxima verossimilhança de genealogias coalescentes a partir de sequências de dados de loci não recombinantes e que evoluem de acordo com o modelo de sítios infinitos de sequências de DNA (GRIFFITHS; TAVARE 1995). Especificamente, muitas simulações coalescentes, cada uma com uma probabilidade associada, são utilizadas para estimar a topologia com a maior verossimilhança. Esta topologia pode então ser utilizada para estimar as idades relativas das mutações e o tempo até o ancestral comum mais recente (TACMR) da amostra. O resultado é uma genealogia que detalha as relações evolutivas entre os alelos. Quando existem duas (ou mais populações) representadas, pode-se estimar as taxas de migração entre as populações e estimar a população de origem para cada mutação e do ACMR de cada população e de toda a amostra. O programa SNAP Workbench oferece uma interface gráfica para preparar os arquivos de dados para entrada e análise no programa GeneTree (CARBONE et al., 2004; PRICE; CARBONE 2005).

3.2 Migração histórica entre populações

O fluxo gênico entre as populações regionais de fitopatógenos é uma preocupação central na epidemiologia de doenças emergentes. Análises baseadas na teoria coalescente permitem o teste de modelos específicos de migração, em vez de estimar grosseiramente as taxas de migração baseados em valores de F_{ST} . Quando se sabe que uma população de um patógeno emergente teve origem de uma população específica, e que estas populações são divergentes (por deriva genética ou por outras características específicas), o modelo de migração com isolamento genético implementado pelo programa IM (abreviação de isolamento com migração, (HEY 2010; HEY; NIELSEN 2004; 2007)) pode ser testado para estimar o tempo desde a divergência entre populações e a magnitude da migração em curso entre essas populações. Se o objetivo é estudar um cenário de migração em equilíbrio, tais como a migração entre populações dentro de uma espécie, e que apresentam pouca ou nenhuma divergência, o programa MIGRATE (BEERLI 2006; BEERLI; FELSENSTEIN 1999; 2001) é a melhor escolha.

3.3 Tamanho populacional histórico

Fitopatógenos emergentes podem ter passado por gargalos populacionais severos durante o processo de emergência. Populações com tamanho inicial pequeno podem ser resultado de introdução numa nova região ou num novo hospedeiro, ou de uma nova linhagem virulenta do patógeno que emergiu de um único clone ou de eventos de reprodução sexual. Após o período de gargalo, as condições podem se tornar mais favoráveis à rápida expansão da população do patógeno. Com base em sequências de DNA, a teoria coalescente pode ser usada para se determinar se houve crescimento exponencial da população e qual a magnitude do crescimento e também para detectar gargalos populacionais. Mudanças no tamanho da população podem mudar a taxa de eventos coalescentes. Assim, modificações no tamanho da população dos patógenos emergentes podem ser detectadas por desvios na distribuição de eventos coalescentes esperados se o tamanho da população fosse mantido constante ao longo do tempo (KUHNER

et al., 1998). O programa LAMARC pode ser usado para estimar a taxa de crescimento exponencial da população (μ) do patógeno emergente, na presença de migração e recombinação, utilizando dados de uma variedade de marcadores genéticos (KUHNER 2006). O programa BEAST também pode ser usado para calcular as variações no tamanho da população ao longo do tempo usando traçados de horizontes obtidos por estimadores Bayesianos (*Bayesian skyline plots*) ou BSP (DRUMMOND et al., 2005).

3.4 Recombinação

Uma das primeiras perguntas a respeito de um patógeno emergente é se há evidência de reprodução sexuada em sua população. A reprodução sexuada pode permitir que fitopatogênicos se adaptem rapidamente a novos ambientes pelo embaralhamento da variação genética para adaptação local, via recombinação homóloga ou introgressão de alelos por hibridização com espécies residentes. A teoria coalescente pode ser utilizada para estimar as taxas de recombinação em genealogias. Foram desenvolvidos vários métodos para estimar as taxas de recombinação utilizando o coalescente (GRIFFITHS; MARJORAM 1996; GRIFFITHS; TAVARE 1995; KUHNER et al., 2000; McVEAN et al., 2002) e o seu desempenho comparativo (FEARNHEAD; DONNELLY 2001). Para visualizar eventos de recombinação em uma genealogia gênica, pode-se construir gráficos de recombinação ancestral (GRAs). Estes gráficos rastreiam eventos passados de recombinação seguindo todas as sequências ancestrais e podem ser bastante complexos. O programa BEAGLE constrói GRAs mínimos, mostrando uma ordem inferida de recombinação e eventos coalescentes de volta para uma raiz inferida ou designada (LYNGSO et al., 2005). O GRA mínimo inclui apenas os eventos de recombinação que são necessários devido a histórias filogenéticas conflitantes nos dados, facilitando assim sua interpretação. O GRA pode ser usado para inferir relações entre os blocos de recombinação e a ancestralidade de sequências recombinantes (CARBONE et al., 2007). No entanto, o GRA mínimo produzido pelo BEAGLE não é representado numa escala de tempo como uma verdadeira genealogia coalescente.

Finalmente, um desafio específico para os métodos coalescentes é

que, com cada recombinação passada, há um evento de divisão, criando antepassados adicionais que devem ser rastreados ao longo do tempo. Assim, a incorporação de recombinação no modelo coalescente é matematicamente e computacionalmente difícil. Como alternativa, algumas análises exigem a remoção de sítios de nucleotídeos exibindo histórias filogenéticas conflitantes em função da ocorrência de recombinação ou de homoplasia (com mais de dois estados) .

Uma vez que o conjunto de dados é finalizado, é preciso decidir quais processos evolutivos requerem parametrização (por exemplo, o tamanho efetivo das populações, o número de populações, as taxas de migração, as taxas de crescimento populacional, as taxas de recombinação, etc), e o método mais adequado ou programa, para inferir os parâmetros necessários, dada a biologia do organismo.

Em termos de perspectivas, a teoria coalescente proporciona uma estrutura para testes de hipóteses sobre a estrutura genética de população e / ou cenários evolutivos. A aplicação de ferramentas evolutivas baseadas no modelo coalescente fornece novas visões críticas sobre as forças que moldam a estrutura das populações atuais de fitopatógenos que podem nortear o manejo de epidemias de doenças emergentes.

Como exemplo da aplicação de diversas abordagens analíticas para o estudo da estrutura genética de populações de fitopatógenos, escolhemos o estudo de Ciampi et al. (2008). Nele, os autores buscaram determinar o modo reprodutivo e estimar parâmetros demográficos da divergência entre populações do fungo basidiomiceto fitopatogênico *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associados à mela da soja no Brasil, determinados com base na variação em 10 loci microssatélites. Além das medidas clássicas de EHW e coeficiente de endogamia (F_{IS}), para determinação do modo reprodutivo predominante, e do índice de fixação F_{ST} , que reflete níveis contemporâneos de fluxo gênico, determinou-se o coeficiente de membesia (Q) para genótipos multiloci, usando teste de associação implementado no programa STRUCTURE para inferir sobre mistura populacional (Figura 1). Usando o modelo coalescente, foram estimados, também, os valores de teta (que indicam tamanho populacional) e as taxas de migração. Tanto os valores de

teta quanto das taxas de migração foram estimados usando MIGRATE 2.3 (Figura 1).

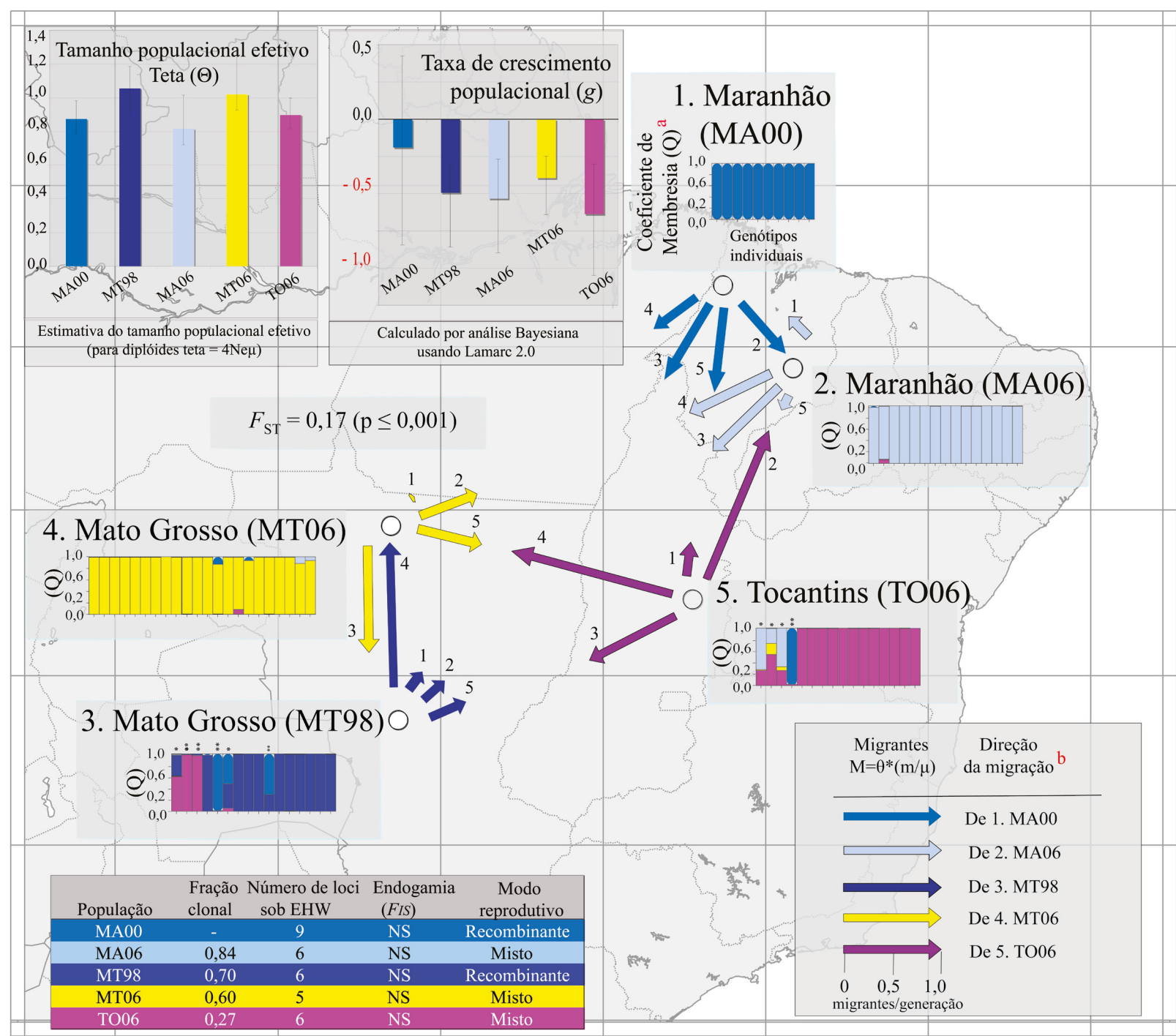


Figura 1. Análise detalhada da estrutura genética de populações geográficas do patógeno *Rhizoctonia solani* AG-1 IA associado à mela da soja no Brasil (adaptado de CIAMPI et al., 2008). a) A altura das barras coloridas na figura indica seu coeficiente de membresia (Q) a populações diferenciadas por cores distintas, determinado usando o programa STRUCTURE. b) Taxas e direcionalidade assimétrica da migração foram estimadas usando modelo de isolamento com migração, implementadas no programa MIGRATE 2.3. F_{IS} NS = Coeficientes de endogamia não significativos.

Testou-se a hipótese de que populações geográficas de *R. solani* AG-1 IA da soja no Brasil são geneticamente homogêneas (i.e. não subdivididas ou diferenciadas) e que estas populações apresentam estrutura típica de modo reprodutivo recombinante.

Evidenciou-se divisão populacional entre populações geográficas do patógeno ($F_{ST} = 0,17$, $p \leq 0,001$), rejeitando-se, assim, a hipótese inicial estabelecida. Detectou-se, também, migração assimétrica histórica entre populações geográficas do patógeno, o que poderia explicar os níveis observados de subdivisão. A evidência de alta migração assimétrica com origem na população do patógeno amostrada em Tocantins (TO06) sugere que ela pode ter sido a população fundadora que contribuiu a maioria dos imigrantes para todas as demais populações do patógeno, talvez por movimento de sementes infectadas. Altos índices de mistura foram observados entre as populações TO06 e MT98 (Figura 1).

Nenhuma das populações do patógeno da mela da soja mostraram redução do tamanho populacional (efeito de gargalo), uma vez que as taxas de crescimento (g) não foram significativamente diferentes de zero (Figura 1).

Em três, das cinco populações do patógeno da mela da soja estudadas, o modo reprodutivo misto predominou, indicando que a reprodução sexual moldou a estrutura genética dessas populações [maioria dos loci em EHW e coeficientes de endogamia (F_{IS}) não significativos], mas que a reprodução assexuada também contribuiu de forma relevante para a estrutura observada (fração clonal variando de 0,27 a 0,84) (Figura 1). Em outras duas populações a estrutura genética detectada foi essencialmente recombinante. Essas observações refletem, de fato, a biologia do patógeno, que em fase inicial do ciclo biológico produz estruturas sexuadas (basídiosporos), com importante papel na geração de genótipos recombinantes e variação genética nas populações. Também reflete a importância da fase assexuada (micélio e escleródios) na multiplicação clonal do patógeno (FENILLE et al., 2002; PADASHT-DEHKAEI et al., 2013).

Estamos entrando numa nova era na Fitopatologia na qual sequências de genomas completos ou um grande número de SNPs de muitos indivíduos

de uma espécie de fitopatógeno se tornam mais acessíveis e prontamente disponíveis à comunidade científica no geral, com avanços iminentes. A análise coalescente com base em dados genômicos ou de genômica populacional (i.e., com alta densidade de dados de sequenciamento) proporcionará nível mais complexo e detalhado de análise evolutiva, computacionalmente intensa.

Análises de genômica populacional objetiva descobrir os mecanismos responsáveis por fenótipos associados com caracteres adaptativos tais como patogenicidade, infectividade/virulência, resistência a fungicidas e especialização a hospedeiros. Este campo emergente engloba análises detalhadas de populações naturais, análises genômicas comparativas de espécies relacionadas, identificação de genes sob seleção, e análise de ligação envolvendo estudos de associação em populações naturais ou segregantes, resultantes de cruzamentos. A era da genômica populacional certamente proporcionará novas oportunidades e desafios para aplicação a estudos de populações de fungos e oomicetos, requerendo novas ferramentas computacionais e analíticas e novas abordagens metodológicas. Os primeiros passos mais importantes iniciam com a definição das questões biológicas e evolutivas relevantes, seguido de amostragem, genotipagem e fenotipagem, terminando com o desenvolvimento de métodos analíticos e interpretação dos resultados (GRÜNWALD et al., 2016).

4 ESTRATÉGIAS DE MANEJO DURÁVEL DE DOENÇAS BASEADAS NO POTENCIAL EVOLUTIVO DE FITOPATÓGENOS

As populações de patógenos evoluem em resposta ao uso de genes de resistência (genes *R* em variedades resistentes) e fungicidas seletivos de alto risco em agroecossistemas. Uma consequência dessa evolução é a ocorrência dos conhecidos ciclos populacionais de altos e baixos, após o uso de variedades resistentes ou de fungicidas, muito comuns nos agroecossistemas. Estes ciclos acontecem quando as populações de fitopatógenos se adaptam à presença de um gene *R* maior de resistência ou de um fungicida seletivo

de alto risco, depois de serem utilizados extensivamente por vários anos, e desenvolvem uma nova população que pode superar essas estratégias de controle. Nesses casos, a perda de eficácia da estratégia de manejo da doença se deve à evolução da população local de patógenos em decorrência da seleção de mutantes, recombinantes ou imigrantes que estão melhor adaptados à cultivar resistente ou fungicida.

A resposta evolutiva da população de um patógeno, que leva à suplantação de um gene de resistência ou ao desenvolvimento da resistência a fungicidas, é afetada pelas forças evolutivas que definem a estrutura genética das populações dos patógenos, ou seja: a taxa de mutação, a magnitude do fluxo gênico / genotípico, o sistema de acasalamento / reprodução, o tamanho efetivo das populações do patógeno, além da seleção exercida pelo tipo de gene de resistência / fungicida utilizado e estratégia de uso de genes R ou de fungicidas em larga escala (McDONALD; LINDE 2002a e b). A Tabela 1 resume os riscos associados à magnitude de cada uma dessas forças evolutivas atuando sobre as populações dos fitopatógenos.

Tabela 1. Condições extremas de risco evolutivo apresentadas por fitopatógenos e exemplos de fatores que afetam a determinação do nível de risco *.

Risco mais alto para evolução de um fitopatógeno	Risco mais baixo para evolução de um fitopatógeno
Alta taxa de mutação Elementos transponíveis ativos Grande tamanho populacional efetivo Grande população sobrevivente entre estações de cultivo Extinção de populações locais rara Sem deriva genética, sem perda de alelos Alto fluxo gênico/genotípico Propágulos assexuais dispersos pelo ar a longas distâncias Movimento a longa distância mediado por atividade humana é comum Sistema reprodutivo misto (sexual e assexual) Alogamia sexual anual e produção de esporos assexuais Seleção direcional eficiente Uso de genes R maiores em monocultura geneticamente uniforme Uso de genes R maiores continuamente e extensivamente	Baixa taxa de mutação Ausência de elementos transponíveis Pequeno tamanho populacional efetivo Ausência de propágulos de sobrevivência entre estações de cultivo Extinção de populações locais comum Deriva genética significativa, perda de alelos Baixo fluxo gênico/genotípico Propágulos assexuais no solo Quarentena é efetiva Sistema reprodutivo assexual Apenas esporos assexuais são produzidos Seleção disruptiva Uso de genes R maiores em misturas/multilinhas Uso de genes R maiores em rotações no espaço e no tempo

*Conforme McDONALD; LINDE (2002a)

Nesse contexto, um modelo quantitativo para prever o risco evolutivo e classificar os fungos, vírus e nematoides fitopatogênicos quanto ao potencial evolutivo foi proposto por McDonald & Linde (2002a e b). Os autores concluíram que grande parte da durabilidade dos genes de resistência ou dos fungicidas é devida à natureza da população dos patógenos e não à natureza do gene de resistência ou fungicida.

De forma complementar, baseando-se no potencial evolutivo atribuído aos fitopatógenos, McDonald & Linde (2002a e b) propuseram um diagrama que norteia a tomada de decisão sobre que estratégia de melhoramento para resistência a doenças de plantas adotar, visando a prolongar a expectativa de vida de genes maiores de resistência, quebrando assim, os ciclos de altos-e-baixos e resultando em controle durável de doenças (Figura 2).

Diagrama semelhante pode ser desenvolvido para nortear estratégias de uso de fungicidas de alto e baixo risco seletivo, visando a prolongar a vida útil dos princípios ativos e evitar a emergência e a disseminação da resistência a fungicidas em ecossistemas agrícolas (Figura 3).

Com base na informação sobre a estrutura genética de populações de *R. solani* AG-1 IA no Brasil (CIAMPI et al., 2008, usado como exemplo de estudo), detectou-se que o patógeno da mela da soja tem restrição ao fluxo gênico a longa distância, e o modo reprodutivo de suas populações variou de misto a recombinante. Dessa forma, o patógeno da mela da soja *R. solani* AG-1 IA pode ser classificado, quanto ao potencial evolutivo, dentro da categoria de risco médio a alto (McDONALD; LINDE 2002). Segundo esses diagramas, para manejo da mela da soja com resistência varietal, recomenda-se o desenvolvimento de variedades com resistência quantitativa (Figura 2). Para o manejo químico da mela, a recomendação é de uso preferencial de fungicidas de atividade multissítios, não sistêmicos (MSNS), enquanto o uso de fungicidas de atividade em sítio simples, sistêmico (SSS), deve ser feito apenas em escala regional.

As iniciativas locais para classificar os fitopatógenos de importância para a agricultura brasileira quanto ao potencial evolutivo vem aumentando nestes últimos anos. Além do patógeno da mela soja *R. solani* AG-1 IA, há informação relevante sobre a estrutura genética de populações de *R.*

solani AG-1 IA da queima foliar da braquiária e queima da bainha do arroz (CHAVARRO MESA et al., 2015), de *R. oryzae-sativae* das manchas do arroz (PEREIRA et al., 2017), de *Pyricularia graminis-tritici* da brusone do trigo (MACIEL et al., 2014), de *P. oryzae* da brusone do arroz (D'ÁVILA et al., 2016), de *Moniliophthora perniciosa* da vassoura de bruxa do cacau (PATROCÍNIO et al., 2017), e da bactéria *Xylella fastidiosa* do amarelinho dos citros e queima dos ponteiros do cafeeiro (FRANCISCO et al., 2017).

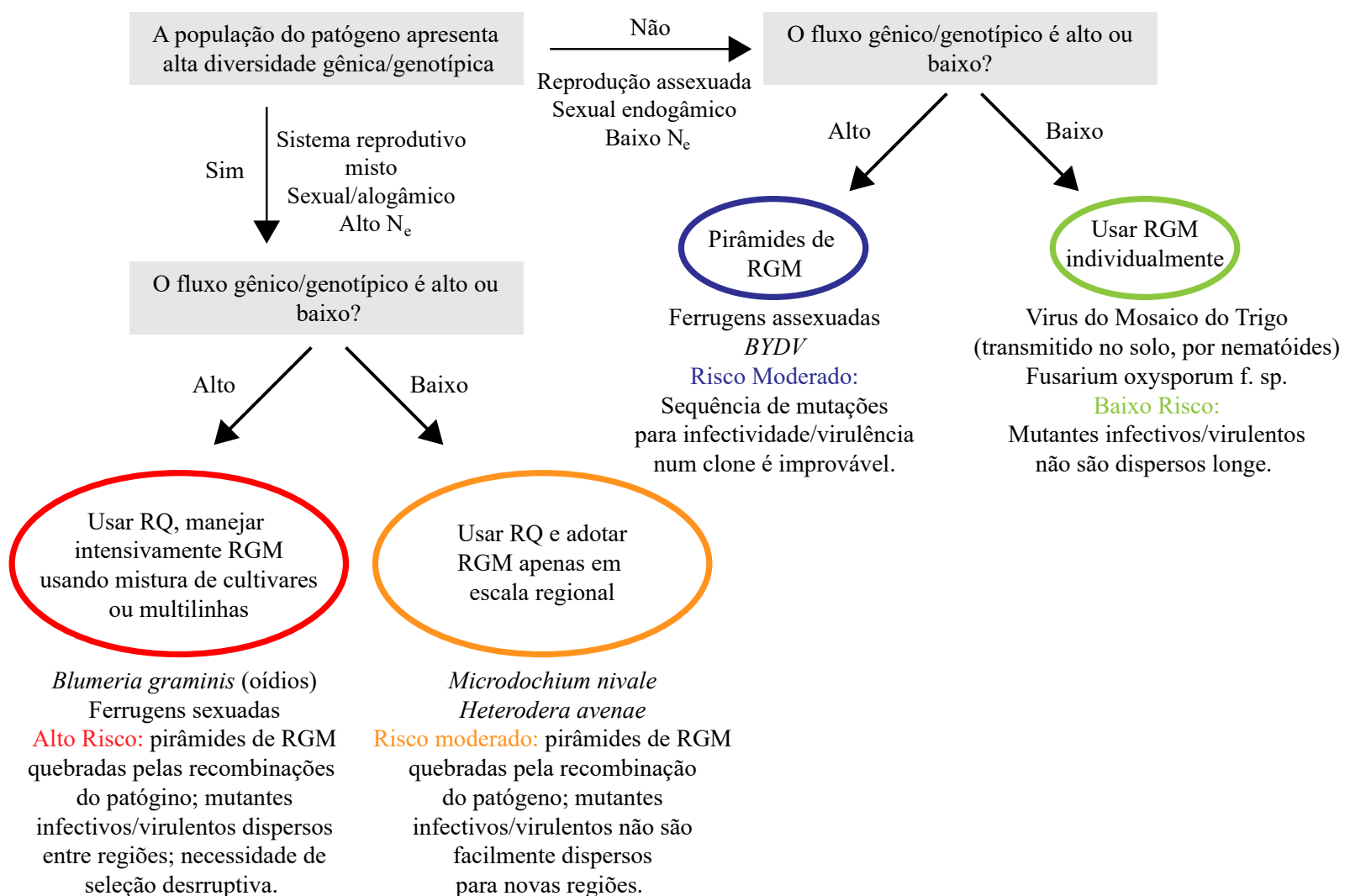


Figura 2. Um diagrama simplificado de decisão para auxiliar no desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético para obtenção de resistência durável a doenças baseado no conhecimento sobre o potencial evolutivo dos fitopatógenos (adaptado de McDONALD; LINDE 2002a).

*Resistência de gene maior (RGM): resistência que possui efeitos maiores, baseada em resposta de hipersensibilidade e segue o modelo receptor-elicitor das interações gene-a-gene, efetiva contra uma raça específica do patógeno. Resistência quantitativa (RQ): resistência que tem, em média, efeitos pequenos, aproximadamente iguais, e aditivos que são igualmente efetivos contra todas as linhagens do patógeno.

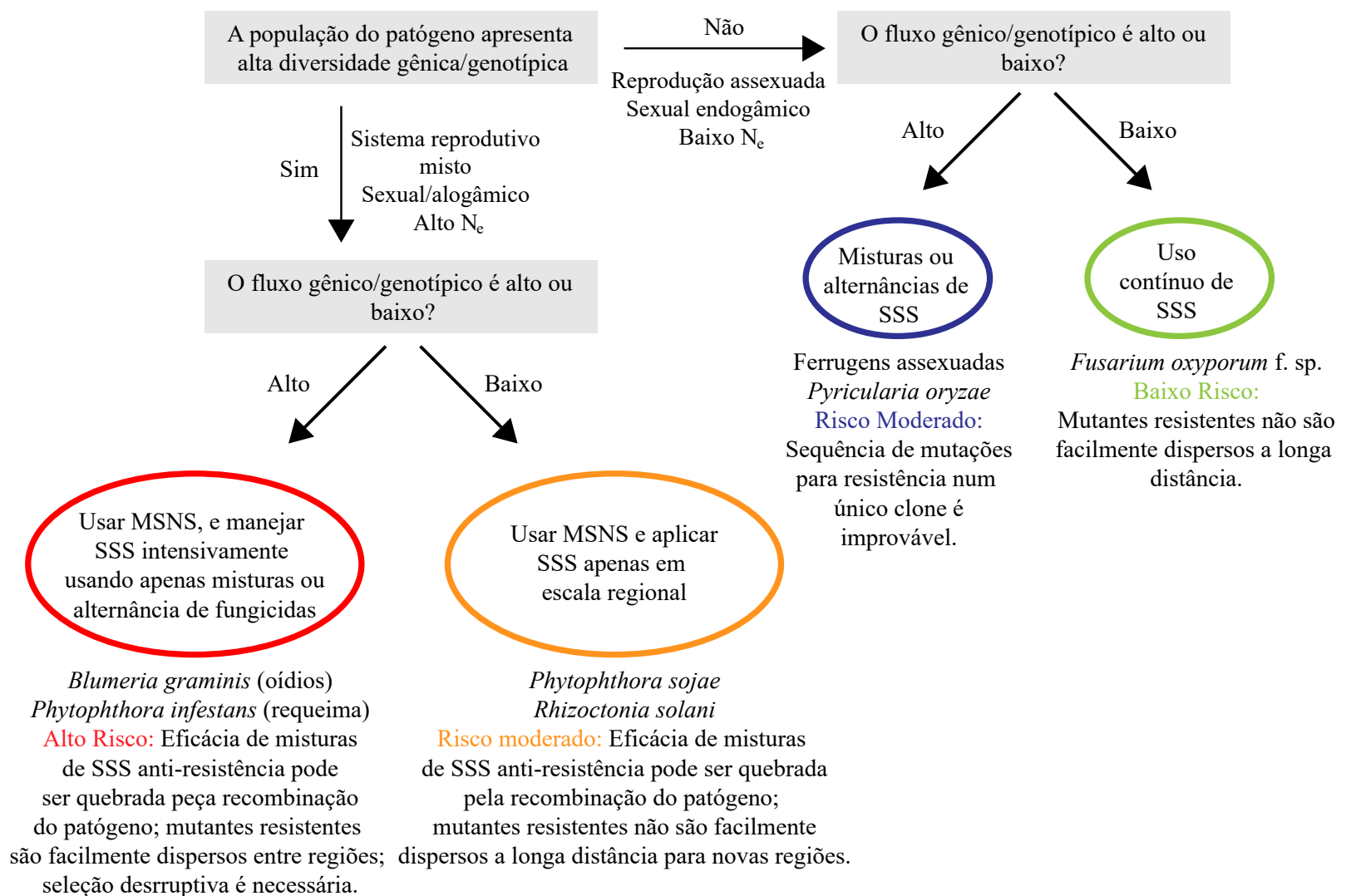


Figura 3. Um diagrama simplificado de decisão para auxiliar no uso de fungicidas visando a prolongar a vida útil dos princípios ativos e evitar a emergência e dispersão de resistência, baseado no conhecimento sobre o potencial evolutivo dos fitopatógenos (adaptado de McDONALD; LINDE 2002a).

* Fungicidas de atividade multissítios, não sistêmicos (MSNS), atuando em muitos genes ou rotas metabólicas alvo, não específicos, com ação contra ampla gama de patógenos ou doenças, de baixo risco para resistência. Fungicidas de atividade em sítio simples, sistêmicos (SSS), atuando em único gene ou rota metabólica, específico a gama de patógenos ou doenças restrita, de alto risco para resistência.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O conhecimento sobre a estrutura genética de populações e sobre o potencial evolutivo dos fitopatógenos pode contribuir para o manejo sustentável (i.e., duradouro) das doenças de plantas. Entretanto, as estratégias ainda utilizadas para manejo de doenças de plantas (resistência varietal e fungicidas, principalmente) têm sido aplicadas sem considerar adequadamente o potencial evolutivo, bem como a provável resposta dos

patógenos às pressões de seleção impostas pelas estratégias de manejo.

Por sua vez, é notável o aumento na percepção de que a aplicação de princípios evolutivos pode tornar sistemas de manejo sustentável (e duradouro) de doenças de plantas uma realidade. Nesse sentido, com o uso de ferramentas teóricas e experimentais contemporâneas, tem havido aumento considerável da abordagem de questões evolutivas a respeito da origem da infectividade/virulência, padrões de adaptação de patógenos e de hospedeiros, padrões comparativos de interações patógeno-hospedeiro em ecossistemas naturais e agrícolas, e efeitos de práticas culturais sobre a evolução dos patógenos. A aplicação de tais conceitos evolutivos, combinados ao avanço em tecnologias, como melhoramento assistido por marcadores, e abordagens sofisticadas de agricultura de precisão no campo aumentam a possibilidade real de colocar as populações dos patógenos sobre pressões seletivas disruptivas sustentáveis (ZHAN et al., 2014).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BAHLO, M.; GRIFFITHS, R. Inference from gene trees in a subdivided population. *Theoretical Population Biology*, v. 57, p. 79-95, 2000.

BEERLI, P. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, v. 22, p. 341-345, 2006.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, v. 152, p. 763-773, 1999.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p.4563-4568, 2001.

CARBONE, I. et al. Recombination, balancing selection and adaptive evolution in the aflatoxin gene cluster of *Aspergillus parasiticus*. *Molecular*

Ecology, v. 16, p. 4401-4417, 2007.

CARBONE, I. et al. Recombination and migration of Cryphonectria hypovirus 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. Genetics, v. 166, p. 1611-1629, 2004.

CHAVARRO MESA, E. et al. The *Urochloa* foliar blight and collar rot pathogen *Rhizoctonia solani* AG-1 IA emerged in South America via a host shift from rice. Phytopathology, v. 105, p. 1475-1486, 2015.

CIAMPI, M. B. et al. Genetic structure of populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-1 IA from soybean in Brazil. Phytopathology, v. 98, p. 932-941, 2008.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. BMC Bioinformatics, v. 9, 2008.

D'ÁVILA, L. S. et al. Genetic structure and mating type analysis of the *Pyricularia oryzae* population causing widespread epidemics in southern Brazil. Tropical Plant Pathology, v. 41, p. 297-305, 2016.

DRUMMOND, A. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. Molecular Biology and Evolution, v. 22, p. 1185-1192, 2005.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics, 4th ed. Essex: Longmans Green, Harlow, 1996.

FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L.; KURAMAE, E. E. Characterization of *Rhizoctonia solani* associated with soybean in Brazil. European Journal of Plant Pathology, v. 108, p. 783-792, 2002.

FEARNHEAD, P.; DONNELLY, P. Estimating recombination rates from population genetic data. Genetics, v. 159, p. 1299-1318, 2001.

FRANCISCO, C. S. et al. Spatial genetic structure of coffee-associated *Xylella fastidiosa* populations indicates that cross-infection does not occur with sympatric citrus orchards. Phytopathology, v. 107, p. 395-402, 2017

GRIFFITHS, R.; MARJORAM, P. Ancestral inference from samples of DNA sequences with recombination. *Journal of Computational Biology*, v. 3, p. 479-502, 1996.

GRIFFITHS, R. C.; TAVARE, S. Unrooted genealogical tree probabilities in the infinitely-many-sites model. *Mathematical Biosciences*, v. 127, p. 77-98, 1995.

GRÜNWALD, N. J.; GOSS, E. M. Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: novel tools and approaches. *Annual Review of Phytopathology*, v. 49, p. 249-267, 2011.

GRÜNWALD, N. J.; MCDONALD, B. A.; MILGROOM, M. G. Population genomics of fungal and oomycete pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 54, p. 323-346, 2016.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. *Principles of Population Genetics*, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.

HEY, J. Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution*, v. 27, p. 905-920, 2010).

HEY, J.; NIELSEN, R. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D-persimilis*. *Genetics*, v. 167. p. 747-760, 2004.

HEY, J.; NIELSEN, R. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 2785-2790, 2007.

KUHNER, M. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, v. 22, p. 768-770, 2006.

KUHNER, M.; YAMATO, J. FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics*, v. 149, p. 429-434, 1998.

- KUHNER, M.; YAMATO, J.; FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of recombination rates from population data. *Genetics*, v. 156, p. 1393-1401, 2000.
- LYNGSO, R. et al. Minimum recombination histories by branch and bound. *Algorithms in Bioinformatics, Proceedings*, v. 3692, p. 239-250, 2005.
- MACIEL, J. L. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Magnaporthe oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. *Phytopathology*, v. 104, p. 95-107, 2014.
- McDONALD, B. A. Population genetics of plant pathogens. Saint Paul: The American Phytopathological Society. 2004. Available at <<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/popgenetics/>>. 2004
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p.349-379, 2002a.
- MCDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics and the durability of disease resistance. *Euphytica*, v. 124, p. 163-180, 2002b.
- McVEAN, G.; AWADALLA, P.; FEARNHEAD, P. A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics*, v. 160, p. 1231-1241, 2002.
- MILGROOM, M. Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution. St. Paul: APS Press. 328p, 2015.
- PADASHT-DEHKAEI, F. et al. Population genetic evidence that basidiospores play an important role in the disease cycle of rice-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Iran. *Plant Pathology*, v. 62, p. 49-58, 2013.
- PATROCÍNIO, N. G. R. B. et al. Population structure and migration of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa* from cacao, cultivated and wild solanaceous hosts in southeastern Brazil. *Plant Pathology*, v. 66, p. 900-911, 2017.

PEEVER, T. L. et al. Pathogen population genetics and breeding for disease resistance. Saint Paul: The American Phytopathological Society. Available at <<http://www.apsnet.org/online/feature/PathPopGenetics/>> 2000.

PEREIRA, D. A. S. et al. Population genetic structure of *Rhizoctonia oryzae-sativae* from rice in Latin America and its adaptive potential to emerge as pathogen on pastures. *Phytopathology*, v. 107, p. 121-131, 2017.

PRICE, E.; CARBONE, I. SNAP: workbench management tool for evolutionary population genetic analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p. 402-404, 2005.

ZHAN, J.; THRALL, P. H.; BURDON, J. J. Achieving sustainable plant disease management through evolutionary principles. *Trends in Plant Science*, v. 19, p. 570-575, 2014.

Jonas Alberto Rios¹
Daniel Debona¹

¹UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório da Interação Planta-Patógeno, Viçosa, MG, Brasil

INTRODUÇÃO

Durante seu ciclo de vida, plantas cultivadas são constantemente desafiadas por fatores de natureza biótica, como bactérias, fungos, nematoides, oomicetos e vírus. Para sobreviverem, portanto, as plantas devem ser capazes de detectar potenciais fitopatógenos e ativar suas respostas de defesa. Atualmente, diversos termos têm sido empregados para definir a resistência (horizontal, raça não específica, multigênica, quantitativa, qualitativa, parcial, genes de efeito menor, vertical, raça específica, genes de efeito maior). Geneticamente, esta variação de termos pode ser simplificada pelo agrupamento em dois termos genéricos: raça específica (gene de efeito principal) e raça não específica. Assim, a resistência raça específica é governada por poucos genes de efeito maior, sendo geralmente associada ao paradigma da teoria gene-a-gene (FLOR 1956). Por outro lado, a resistência não específica (efetiva contra todas as raças do patógeno), pode ser considerada multigênica, sendo governada por vários genes de efeito menor (PARLEVLIET 1993). Neste capítulo, adotaremos um conceito de cunho epidemiológico, sugerido por Nelson (1978), em que aquelas duas resistências de hospedeiro podem ser diferenciadas com base no seu efeito sobre o inóculo inicial ou a taxa de progresso. Assim, a resistência vertical é caracterizada pela redução do inóculo inicial, enquanto que a resistência horizontal está associada à redução da taxa de progresso da doença.

Contudo, este capítulo objetivou determinar o efeito da resistência vertical e horizontal no progresso da doença, bem como nos parâmetros

epidemiológicos associados a cada uma destas. De modo geral, a resistência vertical está associada ao atraso no início da epidemia sem necessariamente promover uma alteração na taxa de progresso da doença. Por outro lado, o efeito da resistência horizontal está associado com a redução na taxa de progresso sob qualquer condição ambiental (VANDERPLANK 1978).

1 EFEITO EPIDEMIOLÓGICO DA RESISTÊNCIA VERTICAL

O principal efeito associado ao uso da resistência vertical está na redução da quantidade de inóculo inicial e, conseqüentemente, no início da epidemia. Este atraso inicial pode ser considerado determinante por reduzir os possíveis danos causados pela doença em uma determinada cultura. Para uma melhor compreensão desse efeito vamos aqui reproduzir o exemplo sugerido por Vanderplank (1978). Hipoteticamente, dois campos com a cultura da batateira foram conduzidos lado a lado em uma região onde a requeima pode ser considerada endêmica. A requeima, causada por *Phytophthora infestans*, é considerada uma das doenças mais destrutivas na cultura da batateira, sendo responsável por perdas significativas em praticamente todas as regiões produtoras (KAMOUN et al., 2001). Os sintomas iniciais são pequenas lesões escuras, encharcadas e com bordas cloróticas nas folhas/caules, que posteriormente se expandem rapidamente tornando-se necróticas. No primeiro campo foi utilizada uma variedade que não possuía o gene *R* para a resistência vertical contra a requeima. Diferentemente, outro campo foi cultivado com uma variedade que possuía o gene *R1*, o qual conferia resistência vertical a determinadas raças de *P. infestans*. Considera-se que os dois campos estão localizados em uma região onde o inverno é rigoroso e, portanto, a presença deste patógeno é significativamente reduzida no início da estação de cultivo. Conseqüentemente, a principal fonte de inóculo é representada por plantas de batateira de regiões circunvizinhas previamente infectadas pelo patógeno. A dispersão dos esporângios de *P. infestans* ocorre principalmente pelo vento (KAMOUN et al., 2001), sendo que em condição climática de alta umidade relativa o inóculo pode ser transportado a longas distâncias. Supondo que 99% destes esporos pertencem a raças do patógeno

que não são capazes de infectar a variedade contendo o gene *R1*, como as raças (0), (2), (3), (4), (2, 3), etc., estes podem infectar somente o campo que possuem variedades sem resistência vertical. Para 1% dos esporos pertencentes às raças que podem infectar a variedade com o gene *R1*, como as raças (1), (1,2), (1,3), (1,4), (1,2,3), etc., estes são capazes de infectar as variedades de ambos os campos de cultivo de batateira, independentemente da presença do gene *R1*. Portanto, ambas as variedades, em seus respectivos campos, apresentam o mesmo nível de suscetibilidade a este 1% dos esporos.

Assim, o campo com a variedade contendo o gene *R1* iniciou com 100 vezes menos esporos efetivos em causar infecção quando comparado ao campo cultivado com variedade sem o gene. Desse modo, a menor quantidade de inóculo inicial (aproximadamente 1%), provocou um atraso no início da epidemia. A Figura 1 ilustra o progresso da requeima da batateira em ambos os campos de cultivo. Os esporos provavelmente chegaram ao campo de cultivo a partir da segunda metade de julho. Contudo, supõe-se que a intensidade da doença variou entre os campos de cultivo, afetando inicialmente somente 0.1% das folhas da variedade suscetível e 0.001% nas variedades resistentes (esta quantidade corresponde a uma lesão por planta na variedade suscetível e uma lesão a cada 100 plantas na variedade resistente). As duas curvas de progresso da doença apresentam formato idêntico, mas a curva do campo contendo a variedade resistente começou a evoluir somente 10 dias depois do campo suscetível ter apresentado a epidemia. Foi observado que a intensidade de requeima atingiu o patamar de 50% no dia 13 de agosto no campo em foi cultivada a variedade sem o gene *R*, e somente em 23 de agosto para o campo ao qual foi cultivada a variedade contendo o gene *R1*. Uma vez iniciado o progresso da doença, ambos os campos apresentaram a mesma taxa de progresso.

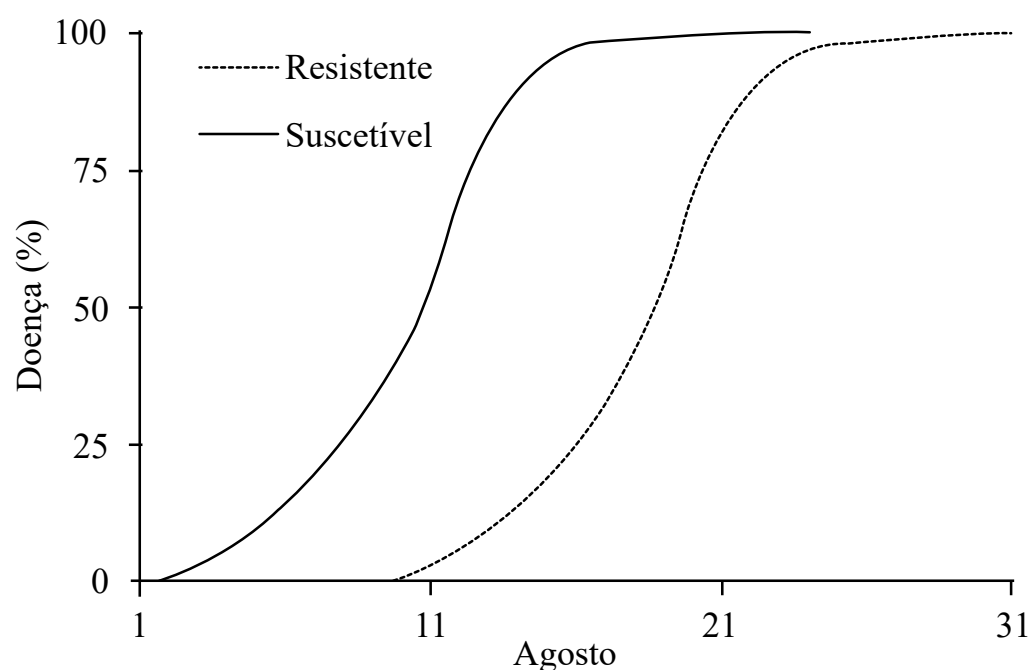


Figura 1. Representação do efeito da resistência vertical à requeima da batateira conferida pelo gene *R1* durante o mês de agosto. Plantas contendo (linhas pontilhadas) ou não (linhas contínuas) o gene de resistência (VANDERPLANK 1963).

Após a infecção inicial ter ocorrido, a taxa de aumento da doença não é reduzida pela presença de genes *R*. A taxa de infecção para a variedade com resistência vertical é tão rápida quanto aquela da variedade suscetível. Assim, a raça (1), por exemplo, pode atacar uma variedade com o gene *R1* tão facilmente quanto a raça (0) pode atacar uma variedade sem um gene *R*. Os esporos germinam e penetram da mesma maneira, coloniza tecidos da mesma maneira e os esporos são produzidos da mesma maneira. Todo o processo de infecção ocorre de forma idêntica.

1.1 Resistência vertical e sua popularidade

Logicamente, o proeminente efeito associado ao uso de variedades com resistência vertical em reduzir a intensidade da doença fez com que os produtores passassem a utilizá-las mais intensivamente no campo. A maior popularidade varietal está associada ao aumento da frequência de raças virulentas e, conseqüentemente, ocorrerá uma significativa redução do efeito da resistência vertical nestas variedades. Assim, uma nova variedade contendo outro gene *R*, efetivo contra as raças virulentas predominantes, deverá ser desenvolvida. Este período de “boom” (alta popularidade varietal e cultivo em larga escala) continua até que os patótipos virulentos predominem e causem uma nova epidemia. A variedade, agora suscetível, perde a popularidade e

sua extensão de área cultivada declina drasticamente (“bust”), uma vez que a resistência já foi suplantada pelos patótipos virulentos. Isso tem sido chamado de ciclo de “boom” e “bust” por Priestey (1970). Consideramos um processo cíclico, pois os eventos se repetem sucessivamente, sendo: *i*) uma variedade perde sua eficiência devido à predominância de patótipos virulentos; *ii*) os melhoristas devem desenvolver uma nova variedade com um novo gene *R* com características de resistência vertical; *iii*) esta nova variedade também vai estar sujeita ao ciclo “boom” e “bust”; e *iv*) novamente, os melhoristas deverão disponibilizar novas variedades (Figuras 2 e 3). Geralmente, o período médio de duração de uma variedade é de cinco anos para patógenos fúngicos. Em muitos casos, este período pode ser menor, uma vez que a variedade pode apresentar suplantação de sua resistência mesmo antes de atingir campos de produção.

Como visto anteriormente, o ciclo “boom” e “bust” está relacionado à pressão de seleção exercida pelo hospedeiro sobre o patótipos virulentos do patógeno. Segundo McDonald (2002), a pressão de seleção é a principal força que direciona as mudanças na frequência dos alelos mutantes. A seleção direcional ocorre quando um gene de efeito principal torna-se amplamente distribuído sobre uma área geográfica. Isto leva ao aumento na frequência daquele mutante virulento que perdeu o elicitor (alelo de virulência) e promoveu a perda da eficácia do gene de resistência nos genótipos do hospedeiro. Os muitos exemplos de suplantação dos genes de efeito principal são fortes evidências de que a seleção é eficiente nos ecossistemas agrícolas que são baseados na monocultura e na uniformidade genética.

Imagine que uma determinada variedade com resistência vertical está sendo frequentemente utilizada em grandes áreas de cultivo agrícola. As plantas desta variedade atuam como fortes agentes de seleção, uma vez que somente os patótipos virulentos podem causar doença. Portanto, estes patótipos vão se reproduzir e aumentar rapidamente a sua frequência na população. Estes patótipos podem ter desenvolvido esta capacidade infecciosa recentemente ou estarem presentes em uma frequência muito baixa na população patogênica. Logo, a sua alta frequência alcança um nível capaz de gerar uma epidemia. Normalmente, esta epidemia ocorrerá depois

de poucos anos após a primeira detecção destes patótipos virulentos. A popularidade varietal, bem como a área de cultivo desta variedade, reduziu consideravelmente após a ocorrência desta epidemia. Consequentemente, menor será a pressão de seleção aos patótipos virulentos. Assim, a sua frequência na população patogênica tenderá a reduzir significativamente (Figura 2 e 3).

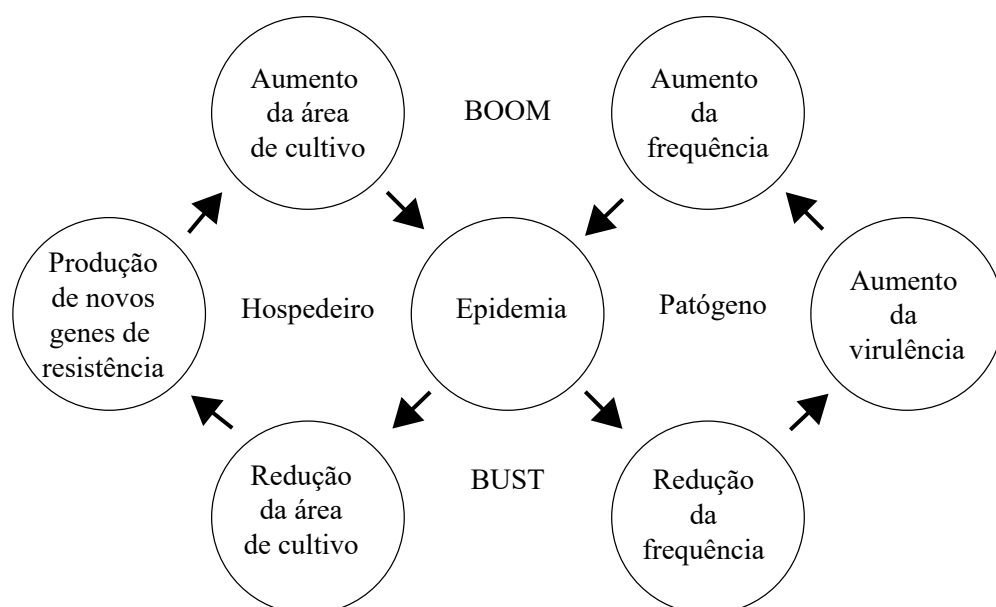


Figura 2. Ciclo boom e bust.

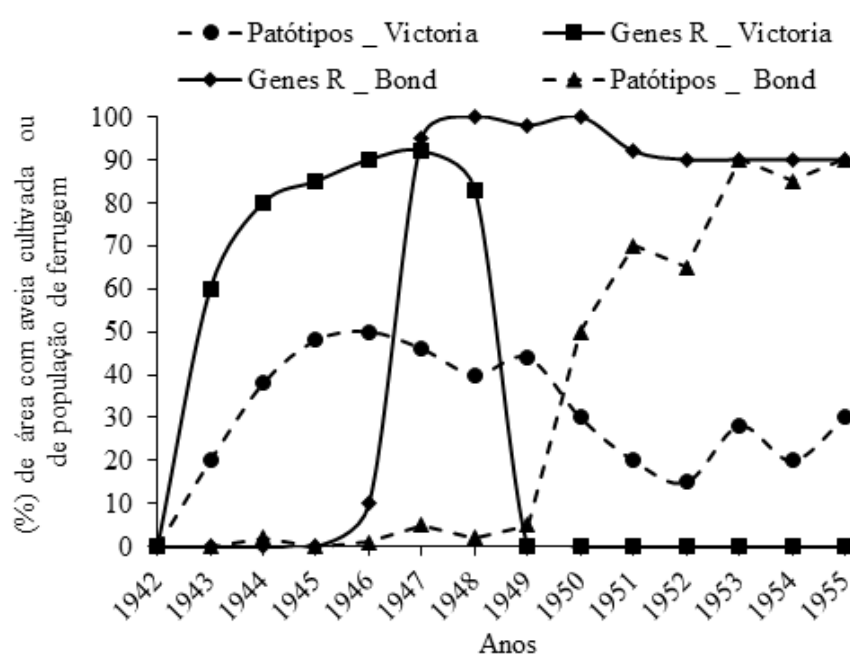


Figura 3. Exemplo de um clássico ciclo “boom” e “bust” envolvendo gene de resistência vertical contra patógenos. Linhas contínuas indicam a porcentagem de aveia plantada com cultivares possuindo resistência vertical Victoria ou Bond; e linhas pontilhadas representam a porcentagem de populações virulentas causando ferrugem em aveia nas cultivares contendo estes genes de resistência (adaptado de MCDONALD, 2004).

1.2 As cinco forças evolutivas dos patógenos

A durabilidade da resistência está relacionada ao potencial evolutivo da população dos patógenos. Patógenos considerados de alto potencial evolutivo apresentam maior tendência de suplantar a resistência varietal quando comparados aos patógenos considerados de menor potencial. O tipo de reprodução e o fluxo gênico são considerados os mais importantes processos associados ao desenvolvimento de um modelo evolutivo do patógeno. Assim, os patógenos que apresentam alto risco de suplantar a resistência possuem sistema de reprodução mista, com o ciclo sexual gerando variabilidade e a reprodução assexual gerando epidemia, bem como o alto potencial para o fluxo gênico. Por outro lado, patógenos que apresentam baixo risco evolutivo caracterizam-se por apresentar apenas reprodução assexual e baixo potencial de fluxo gênico. A importância da compreensão do potencial evolutivo ou riscos de suplantação da resistência por parte dos patógenos sobre uma variedade está na recomendação integrada ou não de outros métodos de controle (como aplicação de fungicidas), objetivando reduzir o nível populacional de patógenos presentes. McDonald & Linde (2002) resumiram o potencial evolutivo dos patógenos, com base em sua estrutura genética, baseando-se nos riscos inerentes em cinco forças evolutivas: 1) Patógenos apresentando uma maior taxa de mutação apresentam alto risco evolutivo quando comparado aos patógenos com menor taxa de mutação. Isso se deve à maior probabilidade da mutação afetar os genes de avirulência e, conseqüentemente, ocorrer ausência do reconhecimento pelo hospedeiro. Seguindo a mesma tendência, as populações de patógenos com alto índice de elementos transponíveis (“transposons”) ativos podem apresentar grande risco evolutivo em relação àquelas populações sem estes elementos ativos. Contudo, somente essa variabilidade genética associada ao processo de mutação não seria suficiente para alterar a frequência de alelos de uma população do patógeno, sendo também necessária a ocorrência concomitante de outras forças evolutivas. 2) O tamanho da população patogênica também influencia no potencial evolutivo dos mesmos, sendo que um alto nível populacional apresenta um maior potencial evolutivo quando comparado a patógenos com menor índice populacional. Este efeito está associado à

maior probabilidade de ocorrência de indivíduos contendo alelos mutantes em populações maiores. Esta flutuação populacional pode ser resultado de condições climáticas extremas entre as estações de cultivo, reduzindo a diversidade genotípica destes patógenos quando comparado àqueles pertencentes a populações constantes durante todo o ano. 3) Patógenos com alto fluxo de genes possuem maior risco evolutivo quando comparados aos patógenos que apresentam um baixo fluxo de genes por duas razões: *i*) alto fluxo gênico nas populações apresentam maior índice populacional efetivo e assim um maior número de alelos *ii*) patógenos com alto fluxo são mais eficientes na dispersão destes genes mutantes e virulentos através de uma grande área geográfica. 4) O envolvimento de propágulos assexuais (fluxo genotípico) apresenta maior risco que a dispersão de propágulos sexuais (fluxo de genes), pois o propágulo assexual representa um “pacote” de genes previamente selecionados e adaptados ao ambiente onde a cultura se encontra estabelecida. Assim, os propágulos sexuais (ex. ascósporos) representam novas combinações de alelos que precisam ser ainda testados em diferentes condições ambientais. Os patógenos que apresentam regulares recombinações no seu material genético, seja pela anastomose de hifas/recombinação parassexual em fungos ou pelo processo de conjugação bacteriana ou recombinação viral, apresentam um maior risco evolutivo quando comparados aos que não possuem ou sofrem pouca recombinação. Estes processos permitem que novas combinações de alelos se juntem e sejam então testadas em diferentes condições ambientais. Um determinado patógeno que apresenta recombinações regulares pode representar novas combinações de alelos mutantes, como alelos de virulência, que consequentemente determinam para os melhoristas o desenvolvimento de novas variedades contendo outros genes de resistência. Não podemos alterar diretamente o sistema de reprodução dos patógenos, mas podemos empregar estratégias que alterem a sua ocorrência. Estas devem promover a eliminação de hospedeiros intermediários, que são necessários para ocorrer a reprodução sexual, e modificação das condições ambientais favoráveis à reprodução sexual (ex. enterrio de restos culturais). De modo geral, patógenos que apresentam recombinação regular pelo processo da meiose, por propiciar

o surgimento de novos genótipos patogênicos, representam maior risco do que os patógenos que apresentam endogamia. A endogamia regular, que envolve a reprodução assexuada, também oferece algumas vantagens aos patógenos por produzir linhagens clonais com conjuntos ligados de alelos que podem formar um complexo de genes coadaptados. Assim, as populações de patógenos, tais como os carvões que passam por ciclos regulares de endogamia, podem desenvolver um conjunto muito adequado de alelos coadaptados que permanecem amplamente disseminados. Patógenos com sistemas de reprodução mistos, que incluem a reprodução sexual e assexual, representam o maior risco de evolução, porque recebem benefícios de ambos os estilos de reprodução. A recombinação sexual permite que muitas novas combinações de alelos se juntem e então sejam testadas no ambiente local. Por outro lado, a reprodução assexuada permite que o genótipo mais adequado se reproduza como um clone, mantendo em conjunto uma combinação adequada de alelos e tornando possível que esta combinação de alelos se distribua amplamente quando os propágulos assexuados são dispersos a longas distâncias. Contudo, diante da maior dificuldade de interferir na dispersão natural (ex., vento, água, insetos) de propágulos do patógeno, podemos, pelo menos, evitar sua dispersão a longas distâncias em material vegetal, solo ou equipamento contaminado. Podemos também empregar plantas resistentes (ou plantas não hospedeiras) que atuam como barreiras vivas entre populações de hospedeiros suscetíveis adjacentes. 5) As populações de patógenos que são expostas a uma forte seleção direcional durante muitas gerações representam um maior risco evolutivo comparadas com as populações que estão expostas a uma seleção disruptiva, como aquela gerada pela resistência horizontal. Esta seleção pode ser considerada a força evolutiva de maior influência em relação ao sistema de cultivo empregado no campo. Assim, agroecossistemas baseados no emprego generalizado de um único gene de resistência (monocultura com material geneticamente uniforme) proporcionam forte seleção direcional na população de patógenos. Agroecossistemas que implantam genes de resistência principal em misturas ou em rotações no tempo e no espaço irão reduzir a eficiência da seleção ou impor uma seleção estabilizadora ou disruptiva que pode retardar a taxa de aumento na frequência de mutantes virulentos.

1.3 Estratégias de emprego de genes principais

Objetivando reduzir a suplantação da resistência vertical, devem ser adotadas táticas de manejo durante a implantação ou aplicação dos genes *R* no campo visando a alterar a pressão de seleção sobre a população dos patógenos pelo hospedeiro. As estratégias que serão discutidas a seguir baseiam-se no princípio proposto por Vanderplank (1963) de que “raças com genes desnecessários de virulência são menos aptas em sobreviver”. O postulado de Vanderplank implica na presença de um mecanismo de homeostase genética, onde a frequência de genes de virulência em determinada população do patógeno, após ser perturbada por algum evento (como a introdução de uma cultivar resistente), tende a reverter ao seu estado original quando da remoção do evento perturbador. Este mecanismo foi denominado por Vanderplank de seleção estabilizadora, em contraste com a seleção direcional, onde ocorre a seleção em direção à virulência. Imagina-se, como exemplo, que uma cultivar com o gene *R1* de um hospedeiro qualquer esteja sendo cultivado numa grande extensão de área. No início, ocorre seleção direcional, favorecendo a raça que tem o genótipo suficiente para suplantiar a resistência conferida por *R1*: a raça que contém o gene 1 de virulência. Se a cultivar for substituída por outra contendo os genes *R1* e *R2*, a população do patógeno, também por seleção direcional, passará a se constituir, em sua maioria, de indivíduos da raça contendo os genes 1 e 2 de virulência. Se, após algum tempo, a cultivar *R1R2* for substituída por uma cultivar com o gene *R1*, a raça (1,2) do patógeno, embora virulenta em *R1*, estaria menos apta a se adaptar às novas condições do que a raça (1), pois carrega um gene desnecessário de virulência (o gene 2). Dessa forma, ocorreria seleção estabilizadora favorecendo a raça (1), que voltaria a prevalecer no campo.

Assim, o piramidamento de genes, inserção de vários genes de efeito principal (genes *R*) em apenas uma variedade, baseia-se na menor probabilidade de um patógeno em sofrer uma sequência de várias mutações correspondentes a cada gene de resistência. Alternativamente, uma menor pressão do patógeno pode ser conseguida pelo manejo dos genes no tempo e no espaço com o emprego de rotações e misturas de cultivares com diferentes

genes de resistência, respectivamente. Essas estratégias promovem a seleção disruptiva por reduzir a taxa de aumento do alelo/genótipo mutante. A rotação de genes e misturas de genes não têm sido amplamente exploradas em agroecossistemas agrícolas, embora resultados preliminares tenham mostrado um grande potencial contra diferentes fitopatógenos (BROWNING; FREY 1969; WOLFE 1985; ZHU et al., 2000). Segundo Parlevliet (1993), a melhor utilização de um gene *R* objetivando sua durabilidade deve ser baseada em estratégias que levam em consideração o espaço e o tempo.

1.4 Estratégias de emprego do gene *R*

A implantação de genes de resistência em campo pode ser realizada em pequenas regiões geográficas tais como dentro de um único campo de cultivo. Segundo vários autores, o uso de diversas cultivares que diferem nos níveis de resistência resulta em uma maior heterogeneidade populacional do patógeno (PARLEVLIET 1993). Consequentemente, deve ocorrer uma redução no progresso da epidemia e prevenir a seleção de uma única raça compatível dentro de uma população. Assim, o emprego de genes *R* em campo deve ser baseado em estratégias como mistura varietal, misturas de espécies de plantas e o emprego de multilinhas.

1.4.1 Mistura varietal

Consiste no cultivo simultâneo de diferentes genótipos pertencentes a uma mesma espécie do hospedeiro. Em alguns países europeus, o emprego desta estratégia tornou-se comum, isto é, sementes de três ou quatro cultivares de uma espécie hospedeira podem ser utilizadas no manejo de uma doença (WOLFE 1985). De acordo com Burdon (1997), a mistura varietal prolonga a vida útil das variedades resistentes e retarda o desenvolvimento ou evolução de raças virulentas. Os mecanismos associados à redução na intensidade da doença incluem a menor disponibilidade de tecido suscetível e, portanto, uma diminuição na pressão de inóculo do patógeno. Este efeito “tampão” decorrente da mistura varietal proporciona um elevado grau de estabilidade da população do patógeno, reduzindo a probabilidade do surgimento de

“super-raças”. Adicionalmente, ocorre um aumento da distância entre plantas suscetíveis, constituindo assim uma barreira física que promove proteção transversal para as plantas resistentes (WOLFE 1885). Assim, a mistura de variedades apresenta uma vantagem epidemiológica por reduzir a dispersão dos esporos virulentos entre as variedades suscetíveis. Wolfe (1885) relatou que a mistura de variedades de cevada reduziu em 80% a severidade do oídio quando comparado ao cultivo utilizando somente uma variedade com um determinado gene *R*. Quanto maior o número de genes *R* na mistura, mais prolongada deverá ser a vida útil das variedades (JORGENSEN 1993). Entretanto, esta estratégia pode apresentar falhas se, na mistura varietal, ocorrer grande percentagem de plantas suscetíveis (JORGENSEN 1993). Outra dificuldade consiste em encontrar a melhor combinação varietal, visto que, na maioria dos casos, esta variação não é desejável comercialmente.

1.4.2 Multilinhas

O termo “multilinhas” foi definido pela primeira vez por Jensen (1952) como uma mistura varietal de linhas de plantio, sendo que em cada linha é cultivado um genótipo contendo um gene *R* distinto. Segundo Borlaug (1966), estas misturas abrangem linhagens fenotipicamente semelhantes, mas que são genotipicamente diferentes para a resistência a uma determinada doença. Assim, as multilinhas são uma mistura de linhagens agronomicamente semelhantes (ou quase idênticas), mas que diferem entre si por possuírem, cada qual, um diferente gene de resistência vertical (gene *R*). As multilinhas são o oposto da pirâmide de genes, pois, na pirâmide, os genes são concentrados em um único indivíduo. Multilinhas têm sido empregadas no controle de doenças de culturas autógamas, tais como trigo e aveia. As multilinhas proporcionam uma redução das perdas por promover uma proteção física entre os genótipos contra os patógenos virulentos. Assim, quanto maior a distância ou mais eficiente for a barreira menor será a capacidade de dispersão dos esporos. Nas multilinhas essas barreiras são constituídas por plantas resistentes, as quais não são infectadas pelos esporos provenientes das plantas suscetíveis. Sabe-se que uma raça fisiológica somente se dispersa rapidamente a partir do foco de infecção inicial, quando

encontra grande número de hospedeiros suscetíveis. Isso não ocorre nas multilinhas, porque parte dos esporos cai em plantas resistentes, reduzindo o número de focos secundários e, portanto, diminuindo a concentração e dispersão destes esporos. É de consenso que raças fisiológicas mais complexas são menos abundantes, o que talvez se explique por uma menor capacidade de sobrevivência dessas raças, como constatado em *Puccinia graminis* e *P. infestans*.

1.4.3 Piramidamento de genes

O piramidamento de genes é uma estratégia de uso de genes de resistência vertical cujo objetivo é o de prevenir o aparecimento de novas raças do patógeno. Segundo esta estratégia, vários genes de resistência vertical (genes *R*) são incorporados em uma única cultivar. O sucesso do piramidamento depende da premissa de que a probabilidade de aparecimento de uma “super-raça”, contendo todos os genes de virulência necessários para atacar esta combinação de genes de resistência, é muito baixa. Assim, quanto maior o número de genes incorporados, mais longa será a resistência do cultivar. No entanto, os críticos do piramidamento acreditam que o aparecimento de “super-raça” não é um evento tão raro, ainda mais sob a prática do piramidamento, uma vez que esta acaba impondo uma elevada pressão direcional em favor das “super-raças”. Aparecendo uma “super-raça”, argumentam os críticos, todos os genes de resistência incorporados serão inutilizados de uma só vez, o que seria uma catástrofe. Além disso, o processo de obtenção da pirâmide de genes é lento e custoso, o que representa uma séria limitação da estratégia. O piramidamento, acúmulo de genes *R* em um único genótipo ou cultivar, pode ser uma solução para aumentar o nível de resistência bem como a sua durabilidade (NELSON 1972). Embora seja promissor, poucos estudos têm sido publicados envolvendo genes *R* piramidados em diferentes interações planta-patógeno. Barloy et al. (2007) observaram um maior nível de resistência contra o nematoide dos cistos em trigo quando os genes *CreX* e *CreY* foram piramidados. Similarmente, vários grupos de pesquisa reportaram que o piramidamento de genes em arroz propiciou um aumento da resistência contra a mancha bacteriana (HUANG

et al., 1997; SINGH et al., 2001; YOSHIMURA et al., 1995; ZHANG et al., 2006). Enquanto alguns estudos demonstraram que o piramidamento de múltiplos “quantitative trait loci” (QTL) resultaram em maior resistência contra a ferrugem em cevada, Richardson et al. (2006) demonstraram maior nível de resistência utilizando somente um QTL. Assim, a maioria dos estudos demonstrou um efeito aditivo do piramidamento de dois genes *R* em aumentar o nível de resistência das cultivares contra diferentes patógenos. O piramidamento de dois genes de resistência, $R_{Pi-mcd1}$ e R_{Pi-ber} , em cultivar de batateira, demonstrou um efeito aditivo entre estes dois genes na resistência a *P. infestans* em condições de campo (ADILLAH TAN et al., 2010).

1.5 Resistência vertical e seu aumento do efeito da resistência horizontal

A frequência de raças virulentas é apenas um dos fatores associados ao efeito da resistência vertical. Adicionalmente, a taxa de infecção/progresso também pode ser alterada durante a epidemia. Recorde o exemplo da Figura 1, a variedade resistente é suscetível a 1% dos esporos e isto proporcionou um atraso no início da epidemia em 10 dias. Apenas como estimativa, este período de 10 dias é o tempo necessário para a epidemia aumentar 100 vezes. Contudo, se a taxa de infecção tivesse sido reduzida concomitantemente, este atraso da epidemia poderia ter sido de 20 dias e a resistência vertical teria sido duas vezes mais eficaz (a doença teria levado 20 dias para aumentar 100 vezes).

Podemos afirmar que quanto maior é a taxa de progresso menor será a eficiência da resistência vertical. As condições ambientais são um dos fatores que influenciam a taxa de progresso, uma vez que se as condições ambientais favorecem a epidemia a taxa de progresso aumenta e a eficiência da resistência vertical é reduzida. Por outro lado, se as condições climáticas estão desfavoráveis, a eficiência da resistência vertical tende a aumentar. Contudo, a resistência horizontal por influenciar na taxa de progresso de uma doença pode ser determinante para a maior eficiência da resistência vertical. Considere quatro variedades hipotéticas representadas na Figura 4. A variedade A, representada pela curva A, apresenta pouca resistência

horizontal e ausência de resistência vertical. A variedade B, representada pela curva B, tem a mesma quantidade de resistência horizontal da variedade A, mas possui resistência vertical. Esta resistência vertical é suficiente para retardar a epidemia na variedade B por 10 dias. A variedade C, representada pela curva C, assemelha-se à variedade A, em não apresentar resistência vertical, mas em contrapartida apresenta um considerável nível de resistência horizontal. Esta resistência horizontal é suficiente para reduzir em 50 % a taxa de infecção. Assim, a variedade C leva o dobro do tempo para se equiparar à intensidade encontrada na variedade A (a doença na variedade C leva 9,6 dias para aumentar de 10 para 50%, enquanto que para variedade A este período é de apenas 4,8 dias). A variedade D, representada pela curva D, apresenta o mesmo nível de resistência vertical da variedade B e o mesmo nível de resistência horizontal que a variedade C. Então a curva D apresenta a mesma inclinação que a curva C; mas, enquanto a curva B apresenta 10 dias de atraso em relação à curva A, a curva D apresenta um atraso de 20 dias em relação à curva C. Este resultado se deve ao efeito da resistência horizontal que reduziu pela metade a taxa de progresso e também duplicou a eficiência da resistência vertical. O efeito da resistência horizontal apresentada pela variedade D aumentou consideravelmente a eficiência da resistência vertical. Embora os efeitos isolados de ambas as resistências (representados pelas variedades B e C) não apresentassem resultados promissores, a combinação de ambas as resistências (variedade D) mostra-se bastante eficaz. Note que a variedade D apresenta sintomas da doença apenas no final da estação, o que é considerado fundamental para se evitar maiores prejuízos.

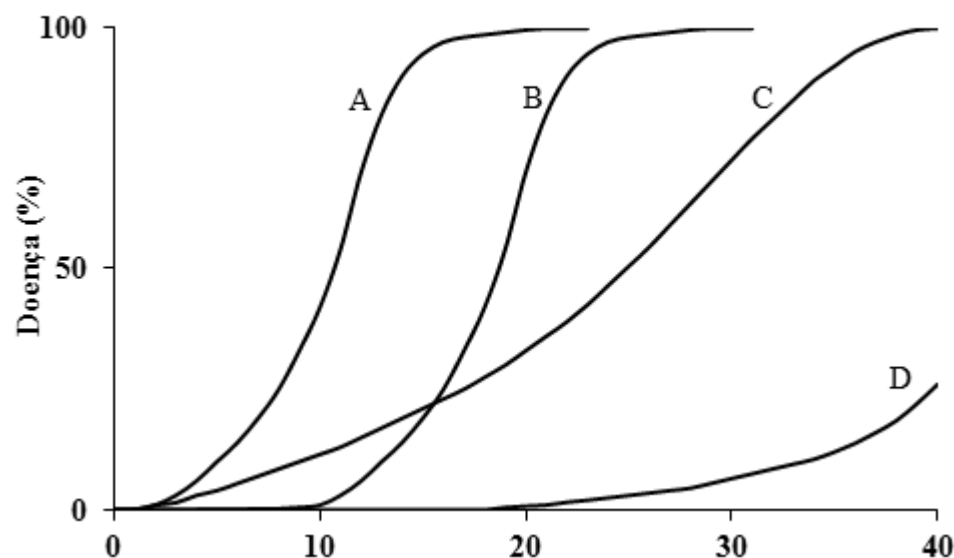


Figura 4. Representação do efeito da resistência horizontal e vertical, isolado ou combinado, de quatro variedades de batateira (A, B, C e D) sobre a severidade da requeima (Adaptado de VANDERPLANK 1968).

2 EFEITO EPIDEMIOLÓGICO DA RESISTÊNCIA HORIZONTAL

Resistências quantitativa e qualitativa são os dois tipos de resistência de hospedeiro contra patógenos que têm sido selecionadas pelos melhoristas nas últimas décadas (AINSWORTH 1981). Resistência qualitativa pode também ser descrita como resistência gene-a-gene, resistência de gene principal ou resistência raça específica, sendo de controle genético relativamente simples (FLOR 1971; DANGL; JONES 2001). Assim, em uma interação incompatível, governada pela resistência qualitativa, patógenos produzem moléculas elicitoras que são reconhecidas por receptores específicos na planta. Então, o processo de defesa é ativado, conferindo ao hospedeiro uma resposta de imunidade contra o patógeno. Mutações podem ocorrer no patógeno e levar ao não reconhecimento pelo receptor no hospedeiro, resultando em um ganho de virulência por parte do patógeno. Dentro desse modelo, a suplantação da resistência resulta do aumento da proporção do patótipo virulento. Contudo, nas últimas décadas, a maioria dos estudos tem procurado demonstrar os mecanismos associados à resistência qualitativa (THOMPSON; BURDON 1992; BONHOEFFER 2002; VAN DEN BOSCH; GILLIGAN 2003). Em contraste, os mecanismos e a base genética da resistência quantitativa contra patógenos ainda necessita ser melhor elucidada. Essa resistência proporciona a redução na severidade da doença,

diferentemente da resposta qualitativa, em que a doença não ocorre (YOUNG 1996). A resistência quantitativa é um sistema de defesa inespecífico, sendo expresso na presença do patógeno, e associado a um conjunto de alterações bioquímicas e estruturais desencadeadas após o início do processo de infecção (GARCION et al., 2007; NIKS; MARCEL 2009). Diferentes subclasses da resistência quantitativa são conhecidas por uma variedade de termos ou sinônimos (tais como parcial, horizontal, raça não específica, genes de efeito menor, resistência constitutiva ou de planta adulta, poligênica, etc.). O fenótipo da resistência quantitativa pode ser usualmente associado ao número de QTLs envolvidos no fenótipo de resistência (YOUNG 1996; CLAIR 2010). Esta natureza genética implica que muitas alterações genéticas na população do patógeno são requeridas para que patógenos adquiram a capacidade de suplantar a resistência. Consequentemente, evidências de que patógenos consigam suplantar a resistência quantitativa são escassas quando comparadas à resistência qualitativa (VANDERPLANK 1982; EVERMEYER; KRAMER 2000; BOYD 2005). Isto suporta a hipótese de que a resistência quantitativa tende a ser mais durável, ou seja, permanece efetiva por um prolongado período de tempo de uso contra doenças. Por isso, a resistência horizontal (quantitativa) tem novamente despertado um interesse de melhoristas de plantas a fim de desenvolver cultivares com resistência de herança poligênica. Se por um lado a resistência poligênica não inibe a reprodução como ocorre na resistência monogênica (vertical), por outro lado ela proporciona uma maior durabilidade em campo. Fitopatologistas têm questionado o grau de dificuldade dos patógenos em suplantar a resistência poligênica (NELSON 1978; VANDERPLANK 1978); muitos acreditam que tal adaptação a partir de patógenos virulentos pode de fato ocorrer, todavia esse processo seria muito mais demorado se comparado à resistência monogênica. A grande desvantagem da resistência poligênica, além da dificuldade de se desenvolver variedades comerciais contendo vários genes com efeito de resistência, reside na sua natureza quantitativa. Este exige maior cautela na avaliação da intensidade da doença durante o reconhecimento da resistência quantitativa, sendo uma prática considerada, às vezes, difícil de realizar. Vanderplank (1968) relatou que

esta dificuldade se torna maior quando avaliada em pequenas parcelas no campo, principalmente quando comparada a parcelas menores contendo cultivares suscetíveis. Patógenos de doenças policíclicas, tais como ferrugens e oídios, se desenvolvem rapidamente sobre as cultivares suscetíveis e logo se dispersam para as parcelas contendo as variedades resistentes. Esta interferência entre parcelas contendo variedades resistentes e suscetíveis pode subestimar o nível de resistência da cultivar quando cultivada em larga escala em campos comerciais. Parlevliet (1979) demonstrou que quando não ocorre esta interferência entre parcelas, as cultivares de cevada ‘L94’ e ‘Vada’ diferiram em um fator maior que 2500 quanto ao número de urédias de *Puccinia hordei* por colmo no final da epidemia no campo. Por outro lado, quando estas duas cultivares foram cultivadas adjacentes e em parcelas de quatro linhas, houve diferença de apenas 30 urédias por colmo. Alternativamente, uma melhor determinação da resistência quantitativa é a determinação de certos componentes de resistência, principalmente em experimentos com inoculação controlada. De modo geral, o comportamento esperado desses componentes em uma cultivar com resistência quantitativa é a redução da eficiência de infecção, maior período latente (período que parte da inoculação até a esporulação), redução da esporulação e do período infeccioso das urédias. (PARLEVLIET 1979). De acordo com Zadoks (1971), a eficiência de infecção e produção de esporos pode ser combinada em um fator de multiplicação diário. Vanderplank (1963) demonstrou que a taxa de progresso foi significativamente alterada com as mudanças no período latente, mas foi menos sensível às mudanças do fator de multiplicação diária. A determinação individual dos componentes de resistência, contudo, não são suficientes para uma avaliação precisa dos efeitos epidemiológicos de uma cultivar resistente, sendo necessária a simulação destes componentes combinados em complexos modelos matemáticos (ZADOKS 1971).

Patógenos causadores de doenças policíclicas são responsáveis por causar severas epidemias a cada estação cultivo, assim o uso de variedades com resistência quantitativa pode reduzir significativamente a intensidade da doença. Vanderplank (1963; 1968) expressou este acúmulo com taxa r (denominada taxa de progresso da doença), sendo este proporcional ao

progresso de doença em uma determinada região ao longo do tempo. O efeito da resistência horizontal consiste em reduzir a taxa de progresso dentro de qualquer conjunto de fatores ambientais. Este tipo de resistência também pode ser caracterizado como parcial. Aqui consideraremos que somente a resistência horizontal está associada à resistência parcial. A Figura 5 compara a curva de progresso da requeima de três cultivares de batata: Bintje (A), Eigenheimer (B) e Voran (C). Estas curvas representam dados oriundos de 117 campos experimentais de batata (ANÔNIMO 1954). Elas possuem forma sigmoide e refletem a diferença de suscetibilidade entre as três cultivares testadas. As taxas de progresso encontradas foram de 0.42, 0.21 e 0.16 para Bintje, Eigenheimer e Voran, respectivamente. Assim, essas taxas de progresso refletiram significativamente no progresso da doença em cada cultivar.

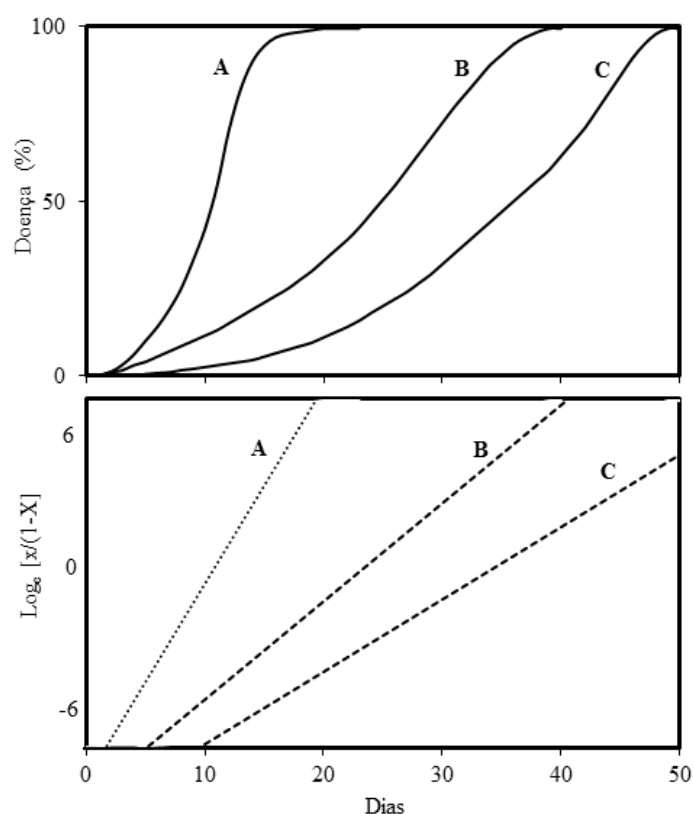


Figura 5. Representação do efeito da resistência horizontal sobre a severidade da doença (%) e a taxa de progresso da requeima da batateira. O progresso da requeima foi avaliado em três variedades de batata Bintje (A), Eigenheimer (B) e Voran (C). (VANDERPLANK 1963) (adaptado). Podemos afirmar que a resistência horizontal manifesta-se em diferentes formas nas variedades: 1-Plantas resistem à infecção quando inoculadas com o mesmo número de esporos, poucas lesões são formadas nas plantas em uma variedade com a resistência horizontal; 2-A esporulação é menos abundante na variedade com resistência horizontal comparada à variedade suscetível; 3-A partir da inoculação, a variedade com resistência horizontal apresenta maior tempo para iniciar fase de esporulação quando comparada à variedade

suscetível. Assim, o período latente é mais longo; 4-As lesões permanecem por menor período de tempo com a capacidade de esporulação, reduzindo assim o período infeccioso.

Vários estudos têm demonstrado a alteração dos componentes de resistência em plantas com resistência horizontal, caracterizando estes como importantes marcadores epidemiológicos para resistência. A quantificação

dos componentes de resistência permite a separação de genótipos em classes de resistência e podem sugerir possíveis mecanismos envolvendo a resistência (PARLEVLIET 1979; SILLERO; RUBIALES 2002). Componentes, tais como período de incubação, número de lesões, taxa de expansão das lesões, produção de esporos por área de lesão, severidade da doença e frequência de infecção, foram determinados e avaliados no patossistema *Solanum tuberosum* -*Alternaria solani* (PELLETIER; FRY 1989; 1990; CHRIST 1991; CHRIST; HAYNES 2001). Rodriguez et al. (2001) determinaram a influência da idade das folhas de batateira de quatro cultivares, apresentando diferentes níveis de resistência, sobre a requeima, utilizando componentes de resistência. Similarmente, foi observado um maior período de incubação e latente, associado a uma redução da taxa de progresso da doença, da expansão da lesão, do tamanho de lesão e da área abaixo da curva de progresso da doença e da lesão em cultivares resistentes de fescuta contra *Magnaporthe grisea* (TREDWAY et al., 2003).

REFERÊNCIAS

- ADILLAH TAN M. Y. et al. The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes *RPi-mcd1* and *RPi-ber* in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 121, p. 117-125, 2010.
- AINSWORTH, G. C. *Introduction to the History of Plant Pathology*. Cambridge University Press, New York City, NY, USA, 1981.
- BARLOY, D. et al. Marker-assisted pyramiding of two cereal cyst nematode resistance genes *Aegilops variabilis* in wheat. *Molecular Breeding*, v. 20, p. 31-40, 2007.
- BONHOEFFER, S. Managing antibiotic resistance: what models tell us? In: DIECKMANN, U.; METZ, A. J.; SABELIS, M. W.; SIGMUND, K. (Eds.). *Adaptive Dynamics of Infectious Diseases in Pursuit of Virulence Management*, Cambridge Studies in Adaptive Dynamics. Cambridge University Press, 2002.

- BORLAUG, N. E. Basic concepts which influence the choice of methods for use in breeding for disease resistance in cross-pollinated and self-pollinated crop plants. In: *Breeding Pest-Resistant Trees*. Oxford, England: Pergamon Press, 1966. p. 327-344.
- BOYD, L.A. Can robigus defeat an old enemy? Yellow rust in wheat. *Journal of Agricultural Science*, v. 143, p. 233-243, 2005.
- BURDON, J. J.; SILK, J. Sources and patterns of diversity in plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 87, p. 664-669, 1997.
- CHRIST, B. J.; HAYNES, K. G. V. Inheritance to early blight disease in a diploid potato population. *Plant Breeding*, v.120, p. 169-172, 2001.
- CHRIST, B. J. Effect of disease assessment method on ranking potato cultivars for resistance to early blight. *Plant Disease*, v. 75, p. 353-356, 1991.
- CLAIR, D. A. S. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p. 247-268, 2010.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826-833, 2001.
- EVERSMEYER, M. G.; KRAMER, C. L. Epidemiology of wheat leaf and stem rust in the central great plains of the USA. *Annual Review of Phytopathology*, v. 38, p. 491-513, 2000.
- FLOR, H. H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advanced Genetics*, v. 8, p. 29-54, 1956.
- FLOR, H. H. Current status of gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, v. 9, p. 275-296, 1971.
- GARCION, C.; LAMOTTE, O.; METRAUX, J.-P. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Eds.). *Induced Resistance for Plant Disease Control: A Sustainable Approach to Crop Protection*. Blackwell publishing: Oxford. 2007. p.109-132

HUANG, N. et al. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 95, p. 313-320, 1997.

JENSEN, N. F. Intra-varietal diversification in oat breeding. *Agronomy Journal*, v. 44, p. 30-34, 1952.

JORGENSEN, J. H. Durability in the pathosystem: Barley powdery mildew. In: JACOBS, T. H.; PARLEVLIET, J. E. (Eds.). *Durability of Disease Resistance*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 1993. p. 159-176.

KAMOUN, S. Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 295-300, 2001.

DITA RODRIGUEZ, M. A. et al. Components of Resistance to Early Blight in Four Potato Cultivars: Effect of Leaf Position. *Journal of Phytopathology*, v. 154, p. 230-235, 2006.

McDONALD, B. A. Population genetics of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 2004

McDONALD, B. A.; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 349-79, 2002.

NELSON, R. R. Stabilizing racial populations of plant pathogens by use of resistance genes. *Journal of Environmental Quality*, v. 1, p. 220-227, 1972.

NELSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v. 16, p. 359-378, 1978.

NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist*, v. 182, p. 817-828, 2009.

PARLEVLIET, J. E. What is durable resistance, a general outline. In: JACOBS, T. H.; PARLEVLIET, J. E. (Eds.). *Durability of Disease Resistance*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. The Netherlands. 1993. p. 23-39.

PARLEVLIET, J. E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*, v.17, p. 203-222, 1979.

PARLEVLIET, J. E. What is durable resistance: a general outline. In: *Durability of Disease Resistance*. JACOBS, T; PARLEVLIET, J. E. (Eds.). Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 1993. p. 23-40.

PELLETIER J. R.; FRY W. E. Characterization of resistance to early blight in three potato cultivars: incubation period, lesion expansion rate, and spore production. *Phytopathology*. v. 79, p. 511-517, 1989.

PRIESTLEY, R. H. Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust. In: *Plant Disease Epidemiology* (SCOTT, P. R.; BAINBRIDGE, A. (Eds.)). Black well: Oxford, 1978. p. 63-70.

RICHARDSON, K. L. et al. Pyramiding and dissecting disease resistance QTL to barley stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, p. 485-495, 2006.

SILLERO, J. C., RUBIALES, D. Histological characterization of resistance to *Uromyces viciae-fabae* in faba bean. *Phytopathology*. v. 92, p. 294-299, 2002.

SINGH, S. et al. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*Xa5*, *Xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 102, p. 1011-1015, 2001.

THOMPSON, J.; BURDON, J. Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*. v. 360, p. 121-125, 1992.

TREDWAY, L. P.; STEVENSON, K. L.; BURPEE, L. L. 2003. Components of resistance to *Magnaporthe grisea* in 'Coyote' and 'Coronado' tall fescue. *Plant Disease*, v. 87, p. 906-912, 2003.

VAN DEN BOSCH, F.; GILLIGAN, C. A. Measures of durability of resistance. *Phytopathology*, v. 93, p. 616-625, 2003.

VANDERPLANK, J. E. Host-Pathogen Interaction in Plant Disease. Academic Press, New York/London, 1982.

VANDERPLANK, J. E. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press: London New York. 1963. p. 349.

VANDERPLANK J. E. Genetic and molecular basis of plant pathogenesis. Springer: Berlin Heidelberg New York. 1978. p. 167.

WOLFE, M. S. The current status and prospects of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease resistance. Annual Review of Phytopathology, v. 23, p. 251-273, 1985.

YOSHIMURA, S. et al. Tagging and combining bacterial-blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. Molecular Breeding, v. 1, p. 375-387, 1995.

YOUNG, N. D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology, v. 34, p. 479-501. 1996.

ZADOKS, J. C. Systems analysis and the dynamics of epidemics. Phytopathology, v. 61, p. 600-610, 1971.

ZHANG, J. et al. Pyramiding of *Xa7* and *Xa21* for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. Plant Breeding, v. 125, p. 600-605, 2006.

Daniel Debona¹
Fabrício de Ávila Rodrigues¹

¹Laboratório da Interação Planta-Patógeno, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil

INTRODUÇÃO

Na natureza, as plantas são constantemente atacadas por patógenos. Para resistir à infecção patogênica, as plantas evoluíram um elaborado sistema de defesa. A primeira linha de defesa é representada por mecanismos estruturais e bioquímicos que estão presentes antes mesmo da deposição do inóculo (constitutivos, passivos ou pré-formados). Cutícula, estômatos (número, formato, localização e período de abertura), fibras e tricomas são exemplos de mecanismos estruturais, enquanto fenois, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos cianogênicos e sulfurados, fototoxinas e proteínas/peptídeos constituem mecanismos bioquímicos pré-formados.

Entretanto, a maioria dos mecanismos de defesa é ativada em resposta à infecção pelo patógeno. Durante o contato inicial com o patógeno, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como quitina e glucanas em fungos, flagelina e fator de elongação Tu em bactérias, são reconhecidos pela planta através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). O reconhecimento de PAMPs desencadeia uma série de eventos de sinalização e a resistência basal, chamada de imunidade ativada por PAMPs (PTI). Patógenos evoluíram efetores que interferem em diferentes processos de sinalização envolvidos na defesa da planta, suprimindo a PTI e promovendo a virulência, desencadeando a suscetibilidade ativada por efetores (ETS). As plantas, por sua vez, adquiriram genes de resistência (*R*) que detectam efetores específicos do patógeno, resultando na imunidade ativada por efetores (ETI). A ETI é uma versão mais rápida e mais forte da PTI, normalmente

envolvendo reação de hipersensibilidade (HR), uma forma de morte celular programada que limita a colonização pelo patógeno. A HR é mediada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que além de possuírem um efeito tóxico sobre o patógeno podem atuar como mensageiros secundários para a ativação de respostas de defesa. As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) modulam a atividade de reguladores transcricionais e fitohormônios. Ácido salicílico (SA), etileno e ácido jasmônico são os principais hormônios envolvidos na sinalização, dependendo do estilo de vida do patógeno envolvido. Outros hormônios, como ácido abscísico e citocininas, também têm emergido como participantes das vias de sinalização para a defesa.

Como resultado do reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e da consequente ativação das vias de transdução de sinais diversos mecanismos de defesa são formados para limitar a infecção. Esses mecanismos ativados a partir do reconhecimento do patógeno, chamados de ativos, induzíveis ou pós-formados, podem ser de natureza estrutural e bioquímica. Na primeira categoria, estão reações de defesa celulares e histológicas, incluindo alterações citoplasmáticas, formação de halos, papilas, lignificação, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses. Entre as respostas bioquímicas, encontram-se o acúmulo de ROS, as fitoalexinas, as proteínas relacionadas à patogênese (PR proteínas) e a HR. No presente capítulo, serão discutidos alguns aspectos das respostas de defesa estruturais e bioquímicas ativadas em resposta à infecção pelo patógeno.

1 MECANISMOS ESTRUTURAIS PÓS-FORMADOS

1.1 Reações de defesa citoplasmática

Células vegetais sob ataque de patógenos respondem com alterações citoplasmáticas peculiares. O acúmulo de uma massa citoplasmática densa, denominada agregado citoplasmático, logo abaixo do apressório, constitui uma das primeiras respostas evidentes na interação planta-patógeno, ocorrendo

em 94% das interações entre *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* e células de cevada (BUSHNELL; BERGQUIST 1974). Nessa mesma interação, a incompatibilidade foi associada à paralisação da corrente citoplasmática, a qual foi precedida por acúmulo de citoplasma próximo do haustório (BUSHNELL 1981). Microfilamentos de actina foram demonstrados pavimentar o caminho para o transporte polar de materiais antimicrobianos, além de desempenharem um papel na regulação estrutural e funcional do vacúolo, levando à ativação da HR (HIGAKI et al., 2011). Aumentos na densidade de poliribossomos nas cisternas do retículo endoplasmático situadas abaixo do ponto de penetração, bem como na densidade de poros nucleares e na granulação nucleolar, foram observados em células de caupi portadoras de gene de resistência à ferrugem (*Uromyces vignae*), indicando que houve um aumento na transcrição, tradução e biogênese de ribossomos antes do contato do fungo com a membrana plasmática. Inicialmente, a atividade transcricional foi restrita à área adjacente ao ponto de penetração, mas conforme o fungo cresceu dentro do lúmen celular a mesma foi intensificada em toda a célula, cessando mais tarde em paralelo com o encolhimento nuclear (MOULD; HEATH, 1999).

1.2 Halos

Os halos se formam em torno dos sítios de penetração em resposta à degradação da parede superior e adjacente das células epidérmicas por fungos. Os principais materiais constituintes dos halos são calose, lignina, lipídeos cuticulares e silício, os quais contribuem para limitar a perda de água dos sítios de penetração. Em trigo inoculado com fungos não patogênicos e em pepino exibindo resistência sistêmica adquirida (SAR) contra *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae* os halos parecem contribuir para a resistência à infecção fúngica por serem altamente resistentes a tratamentos químicos e enzimáticos (PASHOLATI 2011).

1.3 Papilas

Papilas constituem um dos mecanismos de defesa estruturais mais importantes na restrição da penetração da hifa de infecção fúngica, cujo exemplo arquétipo é representado pela interação cevada-*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. As papilas são aposições em forma de cúpula que fortalecem a parede celular e ocorrem entre a parede celular e a membrana plasmática. Quanto à composição, papilas de cevada mostraram conter calose (β -1,3-glucana), fenois (lignina e fenois conjugados), arabinogalactanas, proteínas, compostos antimicrobianos, elementos inorgânicos e ROS (ZEYEN et al., 2002).

A calose é um componente abundante e ubíquo das papilas. O acúmulo localizado de materiais semelhantes à papila dentro das células do hospedeiro, próximo às células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, nos tecidos do mesofilo de espécies de citros resistentes à bactéria (LEE et al., 2009), bem como a demonstração de que o silenciamento de um gene que codifica para a síntese de calose (*CalS1*) aumenta a suscetibilidade do limoeiro ao cancro cítrico (ENRIQUE et al. 2011), sugere que a formação de papilas seja importante na resistência dos citros à doença. O exopolissacarídeo xanthana de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foi demonstrado suprimir o acúmulo de calose e intensificar a suscetibilidade de *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis* à podridão negra (YUN et al., 2006), reforçando a importância da papila para a resistência.

As papilas são formadas em resposta a *formae speciales* de fungos causadores de oídio patogênico ou não a determinada espécie vegetal, e acredita-se que atuem como uma barreira mecânica e química para barrar a penetração ou atrasem a infecção até que outras defesas vegetais se tornem ativas (HUCKELHOVEN 2007). Células epidérmicas de cevada contendo o gene de resistência recessivo *mlo* preveniram a penetração e a formação de haustórios de *B. graminis* f. sp. *hordei* através da deposição bifásica (picos de deposição às 4-6 e 12-15 h após inoculação) de papila nos sítios de ataque do fungo (CLARK et al., 1995). Células radiculares ou foliares de milho responderam à inoculação com *Colletotrichum graminicola* através da formação de papilas, e a aplicação de um inibidor transcricional

(cicloheximida) inibiu a formação de papilas, intensificando a penetração pelo fungo (SHERWOOD et al., 1987).

No entanto, a formação de papilas não assegura que a penetração será malsucedida e, baseado no resultado da tentativa de penetração, as papilas podem ser classificadas em efetivas e inefetivas. Um elegante estudo, usando sondas e anticorpos da parede celular, foi conduzido por Chowdhury et al. (2014) para visualizar e quantificar polímeros da papila de células epidérmicas de cevada sob ataque de *B. graminis* f. sp. *hordei*. Maiores concentrações de arabinoxilana, calose e celulose foram encontradas nas papilas efetivas do que nas inefetivas. As papilas foram estruturadas em camadas, com fenois em seu centro, arabinoxilana e calose em toda a sua extensão e uma encapsulação externa constituída por arabinoxilana e celulose.

1.4 Lignificação

A lignina é um polímero aromático que é depositado principalmente nas paredes secundárias espessas, onde confere resistência e impermeabilidade. Em monocotiledôneas e dicotiledôneas, a lignina é formada principalmente a partir dos monolignóis (álcoois de coniferil e sinapil) que originam unidades de guaiacil e siringil, respectivamente. O álcool *p*-cumaril, que origina o *p*-hidroxifenil no polímero de lignina, é um monolignol presente em baixa quantidade e um pouco mais abundante em paredes celulares de monocotiledôneas do que nas de dicotiledôneas. Além disso, outros fenóis podem atuar como monômeros de lignina (MIEDES et al., 2014).

A rota de biossíntese de lignina tem sido descrita em algumas espécies vegetais como álamo, alfafa, *Arabidopsis* e tabaco e é dividida em duas ramificações: a rota geral dos fenilpropanoides, desde a fenilalanina até feruloil-CoA, e a rota específica dos monolignóis, desde feruloil-CoA até monolignóis. Onze enzimas têm sido demonstradas estar envolvidas na biossíntese de monolignóis a partir da fenilalanina: fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), 4-cumarato:CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil-CoA shiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase (HCT), *p*-cumarato 3-hidroxilase (C3H), cafeoil shiquimato esterase (CSE), cafeoil-CoA metiltransferase (CCoAOMT), cinamoil-CoA redutase (CCR),

ferulato 5-hidroxilase (F5H), ácido cafeico *O*-metiltransferase (COMT) e álcool cinamil deidrogenase (CAD). Após sua biossíntese, os monolignóis são transportados à parede celular onde eles são oxidados por lacases e/ou peroxidases a radicais monolignóis, que finalmente formam vários tipos de ligações químicas, das quais éter, resinol e cumarana são as mais proeminentes (MIEDES et al., 2014).

A biossíntese e deposição de lignina na parede celular vegetal secundária são controladas de uma maneira programada e dependente do estágio de desenvolvimento, mas lignina e polímeros fenólicos semelhantes à lignina são rapidamente sintetizados e depositados na parede celular em resposta ao ataque por patógenos (MIEDES et al., 2014). Em couve chinesa, o conteúdo de lignina aumentou em mais de 40%, e 12 genes que putativamente codificam para enzimas envolvidas na biossíntese de lignina foram induzidos pela infecção por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (ZHANG et al., 2007). Elictores fúngicos induziram rápida estimulação da rota dos monolignóis em culturas de suspensões celulares de linho, conforme evidenciado pelos aumentos na expressão dos genes *CAD*, *CCR* e *PAL* e na atividade da PAL (HANO et al., 2006). Lignina rica em siringil foi demonstrada acumular durante HR em folhas de trigo inoculadas com *Puccinia graminis* f sp. *tritici* (MENDEN et al., 2007).

A lignina pode dificultar a infecção patogênica de diversas maneiras: 1) tornando as paredes celulares mais resistentes à penetração mecânica; 2) conferindo maior resistência à dissolução por enzimas patogênicas; 3) restringindo a difusão de enzimas e toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro e de água e nutrientes do hospedeiro em direção ao patógeno; 4) precursores fenólicos da lignina de baixo peso molecular e radicais livres produzidos durante a polimerização podem inativar membranas, enzimas, toxinas e elicitores de patógenos; 5) o ápice da hifa pode se tornar lignificado e perder a plasticidade necessária ao crescimento (VANCE et al., 1980).

Estudos envolvendo cultivares com diferentes níveis de resistência, plantas transgênicas e mutantes têm fornecido evidências adicionais do papel da lignina e fenóis solúveis na resistência de plantas a patógenos. O acúmulo de lignina tem sido correlacionado com a resistência de cultivares em diversos

patossistemas, incluindo algodoeiro-*Verticillium dahliae* (XU et al., 2011), meloeiro-*Podosphaera fusca* (ROMERO et al., 2008) e tomateiro-*Ralstonia solanacearum* (MANDAL et al., 2011). Plantas transgênicas de tabaco com o gene *PAL* suprimido e, por conseguinte, com baixo conteúdo de ácido clorogênico (o principal fenol solúvel) foram mais suscetíveis a *Cercospora nicotianae* (MAHER et al., 1994), enquanto que plantas superexpressando o gene exibiram maior conteúdo de lignina e foram mais resistentes a *C. nicotianae* e *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* (WAY et al., 2002; 2011). Em trigo (*Triticum monococcum*), o silenciamento transiente mediado por RNAi dos genes *PAL*, *CAOMT*, *F5H*, *CCoAMT* e *CAD* na epiderme aumentou a eficiência da penetração por *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (BHUIYAN et al., 2009). Similarmente, a suscetibilidade do linho a *Fusarium oxysporum* foi aumentada em plantas cujo gene *CAD* foi silenciado (WRÓBEL-KWIATKOWSKA et. al., 2007). Em um *screening* de plantas transgênicas de arroz superexpressando o gene *NH1* (homólogo de *NPR1*), foi identificada uma mutação no gene *SUPPRESSOR OF NH1-MEDIATED LESION FORMATION AND RESISTANCE*, *SNL6*, o qual codifica para uma proteína semelhante à CCR; os mutantes *snl6* apresentaram menor conteúdo de lignina e foram mais suscetíveis a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (BART et al., 2010).

1.5 Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina

Embora glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (GRHPs), bem como em prolina e glicina, sejam proteínas estruturais da parede celular, sua quantidade pode aumentar mais de 10 vezes em decorrência da infecção por patógenos. As GRHPs ocorrem em duas formas, uma solúvel (simplasto) e outra insolúvel (apoplasto). A insolubilização de tais proteínas via ligações cruzadas oxidativas induzidas pelo ataque por patógenos é característica de duas classes de GRHPs, extensinas e prolinas/GRHPs, e contribui para o fortalecimento da parede celular durante a defesa de plantas contra patógenos, tornando-a mais resistente à degradação enzimática (DEEPAK et al., 2010). O processo de ligação cruzada envolve ligações de isoditirosina, a qual representa um dímero de tirosina acoplado oxidativamente pela reação de

oxidação envolvendo peroxidase e H_2O_2 (DEEPAK et al., 2007b). Proteínas da parede celular, incluindo GRHPs, foram insolubilizadas em uma interação incompatível, mas não em uma compatível, entre soja e *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (BRISSON et al., 1994). Genótipos de sorgo resistentes à antracnose acumularam maiores quantidades de hidroxiprolina dois dias após a inoculação com *Colletotrichum sublineolum* e anticorpos policlonais contra GRHPs identificaram quatro bandas. Uma dessas proteínas nos genótipos resistentes foi insolubilizada após a inoculação com o fungo em paralelo com o acúmulo de H_2O_2 , indicando um papel da proteína nas ligações cruzadas oxidativas da parede celular e na resistência do sorgo à antracnose (BASAVARAJU et al., 2009). Análises de *Northern blot* indicaram acúmulo de transcritos de *GRHPs* em uma cultivar de milho resistente ao míldio duas a seis horas após a inoculação com *Sclerospora graminicola*. Estudos imunocitoquímicos e de imunofluorescência mostraram que as GRHPs foram depositadas nas paredes celulares das células parenquimáticas no tecido vascular do coleóptilo. Além disso, o conteúdo de hidroxiprolina em GRHPs foi duas vezes maior na cultivar resistente do que na cultivar suscetível e ligações cruzadas dependentes de H_2O_2 ocorreram concomitantemente ao acúmulo de isoditrosina (DEEPAK et al., 2007a). A inoculação de uma estirpe do *Potato virus Y* (PVY^N), que causa necrose das nervuras, aumentou o conteúdo de hidroxiprolina em folhas de plantas de tabaco Havana 425, induzindo resistência contra *Erysiphe cichoracearum* (RAGGI 2000). A indução de resistência em milho ao míldio mediada por um análogo do jasmonato também foi correlacionada com maiores níveis de GRHPs (DEEPAK et al., 2007b).

Além do seu papel no fortalecimento da parede celular, as GRHPs podem ter um efeito direto sobre patógenos. Tubérculos de batata contêm GRHPs que aglutina certos isolados avirulentos de *Ralstonia solanacearum*, desempenhando um papel na imobilização da bactéria nos espaços intercelulares (LEACH et al., 1982). Uma GRHP isolada do calo de cultura de tecidos de tabaco aglutinou células de um isolado avirulento (B-1) de *R. solanacearum*, mas não de seu parental virulento (K-60). Zoósporos de *P. parasitica* var. *nicotianae* de raça virulenta e avirulenta também foram

aglutinados pela glicoproteína (MELLON; HELGESON 1982). Algumas GHRPs são capazes de se ligar à quitina. Em feijoeiro, três GHRPs com propriedade de ligação à quitina foram identificadas; uma delas foi demonstrada estar ligada à membrana plasmática na interface com a parede celular e foi capaz de se ligar a *Colletotrichum lindemuthianum in vitro* (WOJTASZEK et al., 1997).

1.6 Camadas de cortiça

A infecção por bactérias, fungos, nematoides e vírus pode induzir a formação de várias camadas de células que inibem a colonização pelo patógeno por bloquear o fluxo de substâncias tóxicas para o hospedeiro e de nutrientes e água de áreas saudáveis para aquelas infectadas, comprometendo a nutrição do patógeno. As camadas de cortiça originam-se a partir do felogênio (tecido meristemático) e apresentam grande quantidade de suberina (polímero insolúvel associado a ceras solúveis). Os tecidos mortos envoltos pelas camadas de cortiça podem permanecer no hospedeiro, formando lesões necróticas, como na interação morangueiro-*Mycosphaerella fragariae*. As lesões necróticas apresentam tamanho e formato particular da interação patógeno-hospedeiro. Alternativamente, os tecidos mortos podem ser empurrados por tecidos saudáveis do hospedeiro, resultando no sintoma conhecido como sarna, a exemplo da interação macieira-*Venturia inaequalis*. Tubérculos de batata também reagem à infecção por *Rhizoctonia solani* através da formação de camadas de cortiça. Em espécies arbóreas, a formação de áreas suberizadas contribui para a resistência a fungos causadores de cancro. Variedades de cipreste resistentes a *Seridium cardinale* apresentaram quatro a seis camadas de células com paredes suberizadas, enquanto as suscetíveis tiveram apenas duas camadas descontínuas, que, neste caso, permitiu a penetração pelo fungo (AGRIOS 2005; PASCHOLATI 2011).

1.7 Camadas de abscisão

Camadas de abscisão constituem um mecanismo de defesa, no qual partes infectadas do hospedeiro são eliminadas juntamente com o patógeno.

Após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro, células da periferia da lesão tornam-se lignificadas, limitando a colonização, e enzimas pectinolíticas e celulolíticas iniciam a dissolução entre duas camadas de células adjacentes, formando uma zona de abscisão, levando à queda dos tecidos contendo o patógeno. A camada de abscisão, portanto, separa o tecido doente do sadio, protegendo este último da infecção e de substâncias tóxicas secretadas pelo patógeno. A formação de camadas de abscisão é uma resposta típica de defesa do pessegueiro a *Wilsonomyces carpophilus* e da ameixeira a *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, cujo sintomas de perfurações (“furo de bala”) nas folhas devem-se à queda de pequenos círculos de tecidos doentes. Na interação seringueira-*Pseudocercospora ulei*, a camada de abscisão pode ser formada no pecíolo, acarretando a queda de folhas infectadas pelo fungo, protegendo as demais folhas da planta em condições naturais. No entanto, em condições de monocultivo, com elevada densidade de inóculo e condições ambientais favoráveis ao mal das folhas, esse mecanismo de defesa pode levar à desfolha completa das plantas, inviabilizando a produção (STANGARLIN et al., 2010; PASCHOLATI 2011).

1.8 Tiloses

Um mecanismo de defesa comum contra patógenos que colonizam os vasos do xilema consiste na formação de tiloses. As tiloses constituem uma hipertrofia do protoplasma das células do parênquima adjacentes aos vasos, formando protuberâncias semelhantes a bolhas que invadem o xilema através das pontuações, restringindo a colonização pelo patógeno. A produção de tiloses tem sido observada tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis embora a velocidade e a extensão de sua formação seja variável (YADETA; THOMMA 2013). Estudos histológicos em cultivares de tomateiro resistente e suscetível à murcha bacteriana mostraram que, na primeira, as tiloses resultaram na oclusão dos vasos infectados e daqueles contíguos, limitando a colonização por *Ralstonia solanacearum*, enquanto que na cultivar suscetível a formação de tiloses foi retardada e menos focada quando comparada à da cultivar resistente, pois diversos vasos não colonizados foram obstruídos pelas tiloses (GRIMAULT et al., 1994). A

resistência do tomateiro à murcha de Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) governada por um único gene dominante também foi associada à rápida formação de tiloses, sendo que no hospedeiro suscetível o início de sua formação foi atrasado em dois dias e a oclusão completa de vasos do xilema demorou pelo menos sete dias após a inoculação (BECKMAN et al., 1972). De maneira similar, tiloses e gomas ocasionalmente preencheram os elementos do xilema infectados e foram capazes de encapsular a bactéria *Xylella fastidiosa*, sendo sete a oito vezes mais frequentes em cultivares de videira resistentes à doença de Pierce do que na cultivar suscetível (MOLLENHAUER; HOPKINS 1976).

A formação de tiloses normalmente está associada com o acúmulo de géis e gomas. Análises imunocitoquímicas realizadas em *Platanus acerifolia* infectado com *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* revelaram que material rico em pectina foi acumulado em três regiões: 1) nas células do parênquima associadas aos vasos, 2) próximo às membranas das pontuações e 3) circundando as tiloses que estavam emergindo (CLÉRIVET et al., 2000). Plantas de pimentão de uma cultivar resistente à murcha bacteriana foram capazes de formar um material de revestimento da parede celular de maneira rápida nos vasos inicialmente infectados por *R. solanacearum* e adjacentes, impedindo a invasão bacteriana de outros vasos do xilema através das pontuações (RAHMAN et al., 1999).

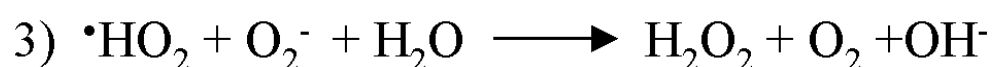
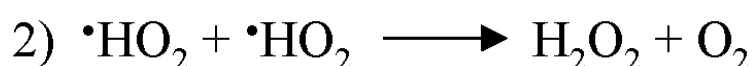
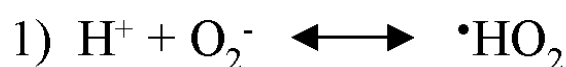
Em virtude de as tiloses restringirem o fluxo de seiva, ao mesmo tempo em que limitam a colonização pelo patógeno, esse mecanismo de defesa torna-se interessante apenas se for ativado precocemente, ou seja, antes da invasão de todos os vasos de um feixe, e de maneira localizada, no sítio de infecção do patógeno (BECKMAN et al., 1972). Caso muitos vasos sejam afetados concomitante e paralelamente à ausência da formação de novos elementos de vaso, as plantas podem entrar em colapso (YADETA; THOMMA 2013).

2 MECANISMOS BIOQUÍMICOS PÓS-FORMADOS

2.1 Espécies reativas de oxigênio

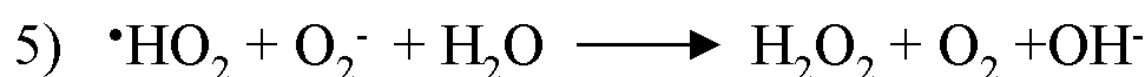
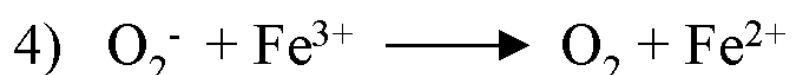
Embora o oxigênio molecular (O_2) seja relativamente não reativo e atóxico, alterações na distribuição de elétrons na sua camada externa originam espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS podem ser geradas como resultado da excitação no elétron externo, produzindo oxigênio simples ($^1O_2$), ou de adições sucessivas de elétrons, resultando na formação do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($\cdot OH$). Essas moléculas são chamadas “ativas” porque não necessitam de energia externa para reagir com outras moléculas. Embora as ROS sejam produzidas normalmente nas células vegetais como consequência de processos envolvendo transferência de elétrons, a exemplo da fotossíntese e respiração, estresses de natureza abiótica e biótica induzem a produção de ROS e mecanismos envolvidos no seu acúmulo/detoxificação podem contribuir para a tolerância ou resistência a agentes estressantes (LAMB; DIXON 1997; RESENDE et al., 2003).

A primeira reação na redução parcial do O_2 consiste na adição de um único elétron para formar O_2^- , o qual, sob condições de baixo pH, pode ser protonado para originar o radical perihidroxil ($\cdot HO_2$) (Equação 1). O_2^- e $\cdot HO_2$ podem passar por dismutação espontânea, produzindo H_2O_2 (Equações 2 e 3). No entanto, a importância da dismutação espontânea decresce conforme o pH aumenta. A metaloenzima superóxido dismutase (SOD), que contém Cu/Zn, Mn ou Fe, catalisa a conversão de $O_2^-/\cdot HO_2$ a H_2O_2 numa velocidade 10^{10} vezes mais rápida do que a da dismutação espontânea.



Diferentemente do O_2^- , o H_2O_2 é um oxidante relativamente estável

e sem carga, o que facilita sua passagem através das membranas celulares, o que lhe confere a habilidade de atuar como mensageiro secundário. No entanto, o O_2^- pode atuar como agente redutor de um metal que, por sua vez, reage com o H_2O_2 , originando $\cdot HO$ (Equações 4 e 5). O $\cdot HO$ é um oxidante forte e pode reagir em cadeia com diversas moléculas orgânicas, levando à peroxidação de lipídeos, inativação enzimática e degradação de ácidos nucleicos.



O H_2O_2 é detoxificado por enzimas como catalase (CAT) e várias peroxidases, incluindo as peroxidases do ascorbato (APX) e da glutathiona (Equações 6 e 7). A reação dessas enzimas é similar, uma vez que a reação catalisada pela CAT também pode ser considerada como peroxidativa, na qual o H_2O_2 atua tanto como substrato quanto aceptor. A APX, juntamente com as redutases do dehidroascorbato, do monodehidroascorbato e da glutathiona, compreende o ciclo do ascorbato/glutathiona. Nesse ciclo, o H_2O_2 é reduzido pela APX usando o ascorbato como doador de elétrons, formando o radical monodehidroascorbato, o qual é, então, dismutado a dehidroascorbato, regenerando o ascorbato. Nas reações peroxidativas, um grupo R aromático (difenol) pode ser convertido a diidroquinona, a qual é de fundamental importância para a polimerização a lignina (Equação 7).



A peroxidase também pode gerar O_2^- e H_2O_2 a partir da oxidação prévia do NADH por quantidades traço de H_2O_2 . Subsequentemente, o radical $\cdot NAD$ reduz o O_2 a O_2^- , o qual é dismutado a H_2O_2 e O_2 . Esse mecanismo de geração extracelular de H_2O_2 é estimulado por Mn^{2+} e monofenóis e parece ser de fundamental importância para a polimerização a lignina.

A produção de ROS de maneira rápida e transiente, chamada de explosão oxidativa, representa uma das principais respostas de plantas após

o reconhecimento de patógenos (TORRES, 2010). A produção de ROS é tipicamente apoplástica e dois tipos de cinética de indução de EROs têm sido observados (Figura 1). A fase I é transitória e ocorre em poucos minutos após o ataque do patógeno, possivelmente envolvendo o reconhecimento de um elicitor do patógeno por um receptor da planta (RESENDE et al., 2003). Essa fase é inespecífica, ou seja, pode ser ativada tanto em interações compatíveis bem como naquelas incompatíveis. Por outro lado, a fase II, que acontece algumas horas após o ataque do patógeno, se caracteriza por uma explosão oxidativa mais robusta e prolongada, sendo característica das interações incompatíveis, conduzindo à indução de defesas e à HR (LAMB; DIXON 1997). No caso da resistência de hospedeiro, a fase II é dependente da interação de uma proteína Avr no patógeno com a proteína R correspondente no hospedeiro.

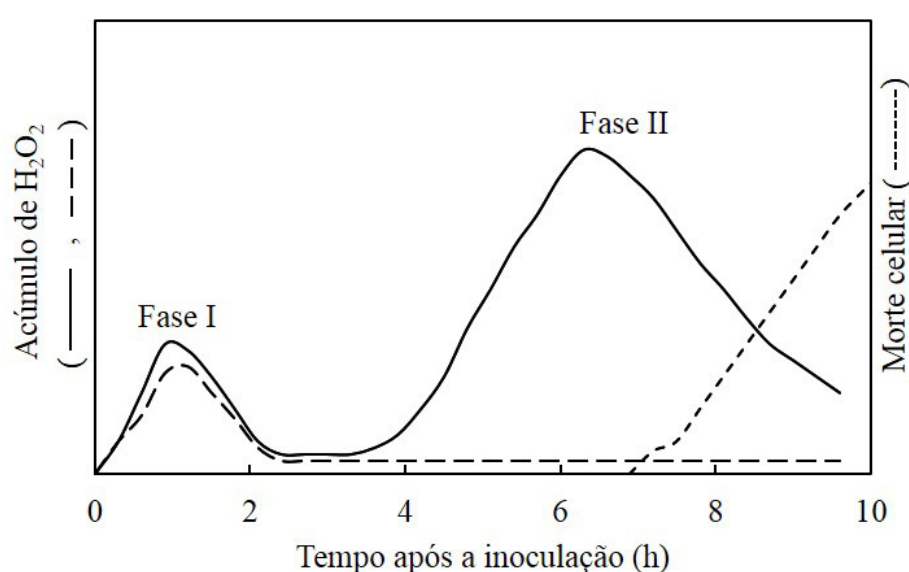


Figura 1. Cinética do acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e morte celular em resposta à inoculação com um patógeno avirulento ou um patógeno de não hospedeiro e cinética de acúmulo de H_2O_2 em resposta à inoculação com um patógeno virulento ou não patógeno. Na inoculação com um patógeno avirulento ou um patógeno de não hospedeiro, ocorre um acúmulo bifásico de H_2O_2 (linha contínua), precoce e transitório (Fase I), seguido de uma explosão oxidativa robusta e prolongada que ocorre algumas horas mais tarde (Fase II). Essa explosão oxidativa resulta em morte celular (linha com traços curtos). Na inoculação com um patógeno virulento ou um não patógeno, somente a Fase I de acúmulo de H_2O_2 pode ser visualizada (linha com traços longos) (Adaptado de LAMB; DIXON 1997).

I), seguido de uma explosão oxidativa robusta e prolongada que ocorre algumas horas mais tarde (Fase II). Essa explosão oxidativa resulta em morte celular (linha com traços curtos). Na inoculação com um patógeno virulento ou um não patógeno, somente a Fase I de acúmulo de H_2O_2 pode ser visualizada (linha com traços longos) (Adaptado de LAMB; DIXON 1997).

O acúmulo de ROS em uma interação incompatível foi demonstrado pela primeira vez em 1983, quando redução do citocromo *c* e do corante nitroazul de tetrazólio foram observadas em tubérculos de batata inoculados com uma raça avirulenta de *P. infestans*, sugerindo que os tecidos de batata responderam ao patógeno avirulento pela geração de O_2^- no início da HR. A inoculação com uma raça virulenta falhou em estimular a produção de O_2^- .

(DOKE 1983). O efector *Avr9* de *Cladosporium fulvum* também estimulou a explosão oxidativa quando infiltrado em folhas de tomateiro contendo o gene de resistência correspondente *Cf9* (VERA-ESTRELLA et al., 1992)

A principal rota de produção de ROS na explosão oxidativa da maioria das interações planta-patógeno ocorre através da redução incompleta do O_2 apoplástico a O_2^- pela oxidase da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) (TORRES; DANGL 2005; MATIKA; LOAKE 2014). A importância da NADPH oxidase, também conhecida como oxidase da explosão respiratória (*Respiratory burst oxidase, Rbo*), na imunidade foi inicialmente descrita em fagócitos de mamíferos e, em seguida, homólogos da enzima (*Rboh*) foram encontrados em diversas espécies vegetais (TORRES; DANGL 2005). Assim como em animais, os genes *Rboh* constituem uma grande família, com dez homólogos descritos em *Arabidopsis* (*AtrbohA-J*) (TORRES; DANGL 2005). No entanto, existem algumas diferenças estruturais entre a oxidase de animais e plantas: a oxidase dessas apresenta uma extensão com motivos de ligação com cálcio “EF-hand” ausente em animais, sugerindo uma regulação diferenciada das oxidases nas plantas (TORRES 2010).

Um sistema de geração extracelular de O_2^- e dependente de NADPH, localizado predominantemente na membrana plasmática, foi estimulado em tubérculos de batata inoculados com uma raça avirulenta de *P. infestans* ou tratados com elicitores derivados da parede celular do oomiceto. A atividade de oxidase, contudo, permaneceu inalterada quando tais tecidos foram inoculados com uma raça virulenta. Protoplastos tratados com os elicitores mantiveram a habilidade de produção de O_2^- , indicando que enzimas ou frações da parede celular não são requeridas para o estabelecimento da explosão oxidativa (DOKE 1983). Subsequentemente, a produção de O_2^- também foi demonstrada em discos foliares de tabaco contendo o gene *N* para a resistência ao vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus*) e mostrou ser dependente de NADPH e de Ca^{2+} (DOKE; OHASHI 1988).

Inibidores da oxidase da NADPH de mamíferos, como difenil iodônio (DPI), bloqueiam a explosão oxidativa desencadeada por elicitores do patógeno. DPI, em concentrações comparáveis às aquelas que inibem a atividade da enzima em mamíferos (5 μ M), inibiu completamente o acúmulo

de H_2O_2 induzido por um elicitor de *Phytophthora sojae* ou pela inoculação com uma raça avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* em células de soja (LEVINE et al., 1994).

A identificação de linhagens mutantes/anti-senso em *Rboh* deficientes na produção de ROS extracelular fornecem suporte adicional à importância da NADPH oxidase na geração de ROS na ETI. Em *Arabidopsis*, *AtrbohD* e *AtrbohF* foram requeridas para a produção completa de ROS durante interações incompatíveis com a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*avrRpm1*) e com o oomiceto *Peronospora parasitica* (TORRES et al., 2002). Estudos envolvendo silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) indicaram que *NbrbohA* e *NbrbohB* foram indispensáveis para o acúmulo de H_2O_2 e para a resistência do tabaco a *P. infestans* (YOSHIOKA et al., 2003).

Embora a atividade da NADPH oxidase e a consequente produção de ROS sejam correlacionadas com a resistência de plantas a patógenos biotróficos, patógenos com estilo de vida predominantemente necrotrófico podem se beneficiar do acúmulo de ROS. De fato, estudos recentes mostraram que um grupo de genes *Rboh* em soja (*GmRRBOH-VI*) teve sua expressão aumentada após a inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum*. Plantas de soja que tiveram tais genes silenciados foram mais resistentes ao mofo branco, enquanto que sua superexpressão transiente em *Nicotiana benthamiana* aumentou a suscetibilidade (RANJAN et al., 2018). Uma toxina, chamada ácido oxálico (AO), é produzida por *S. sclerotiorum* e induz a produção de ROS em estágios avançados da patogênese, sendo que mutantes deficientes na produção de AO são praticamente não patogênicos (WILLIAMS et al., 2011). Interessantemente, esses mutantes foram incapazes de ativar NADPH oxidase em soja (RANJAN et al., 2018), fornecendo suporte adicional à importância da produção de ROS para o sucesso da infecção por *S. sclerotiorum*.

Plantas apresentam fontes alternativas de ROS, incluindo a oxalato oxidase e peroxidase ligada à parede celular. Uma oxalato oxidase, que produz H_2O_2 a partir do oxalato, foi detectada pela primeira vez em folhas de cevada contendo o gene *Mla1* e inoculadas com *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (ZHANG et al., 1995). Uma oxidase apoplástica sensível à

azida e insensível a DPI geradora de H_2O_2 em resposta a uma preparação da parede celular de *F. oxysporum* foi encontrada em *Arabidopsis*. Nesse caso, a explosão oxidativa e a resistência a patógenos fúngicos e bacterianos foi comprometida em plantas transgênicas expressando um cDNA antisense para uma peroxidase tipo III (BINDSCHIEDLER et al., 2006). Interessantemente, o fungo causador do carvão do milho (*Ustilago maydis*) produz um efector (*Pep1*) que inibe a explosão oxidativa apoplástica por interagir diretamente com e inibir a peroxidase tipo III (HEMETSBERGER et al. 2012), indicando que a supressão da explosão oxidativa é um fator chave na virulência. Portanto, a origem enzimática das ROS pode variar de acordo com a interação planta-patógeno.

Convém ressaltar que apesar da explosão oxidativa ativada a partir do reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro ser preponderantemente apoplástica, as ROS geradas intracelularmente também podem atuar na defesa. Diferentes processos metabólicos, incluindo a fotossíntese, fotorrespiração e o transporte de elétrons mitocondrial, podem gerar ROS, particularmente em condições de estresse. O acúmulo interno (endomembranal, citoplasmático e nuclear) de H_2O_2 induzido pelo elicitor criptogeína de *Phytophthora cryptogea* foi mais rápido do que o apoplástico em suspensões celulares de tabaco BY-2 (ASHTAMKER et al., 2007). Interessantemente, há uma comunicação cruzada entre os *pools* internos e apoplásticos de ROS. O ácido linoleico, o mais abundante dos ácidos graxos trienoicos (AGTs), foi demonstrado ativar a NADPH oxidase em *Arabidopsis*, e a mutação *fad7fad8*, que previne a síntese dos AGTs no cloroplasto, reduziu o acúmulo de ROS em folhas inoculadas com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*avrRpm1*), comprometendo a resistência a várias linhagens avirulentas da bactéria (YAENO et al., 2004). Em adição, a sub-regulação do sistema antioxidativo interno pode contribuir para a elevação do nível de ROS. Plantas de tabaco antisense com reduzida atividade da APX e CAT e inoculadas com *Pseudomonas* spp. apresentaram reduzida habilidade em detoxificar ROS e foram hiper-responsivas à bactéria (MITTLER et al., 1999). Em contrapartida, a supressão ou o atraso na produção de ROS, com o concomitante acúmulo de metabólitos antioxidativos, foi uma das

alterações metabólicas induzidas por *Magnaporthe oryzae* em uma interação compatível com o arroz (PARKER et al., 2009).

As ROS apresentam várias funções na resistência de plantas a patógenos. As ROS têm sido postuladas funcionar como antibióticos, porém sua importância nesse contexto varia de acordo com os níveis de ROS acumulados no sítio de infecção e com a sensibilidade do patógeno a tais concentrações (MEHDY et al., 1996). Plantas transgênicas de batata expressando um gene da glicose oxidase, que produz H_2O_2 a partir da oxidação da glicose, foram altamente resistentes à podridão mole e à requeima, efeito que foi associado à atividade antimicrobiana do H_2O_2 , pois estudos *in vitro* mostraram que baixas concentrações dessa ROS (100 μM) inibiram completamente e em mais de 95% o crescimento de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. infestans*, respectivamente (WU et al., 1995).

O H_2O_2 também pode contribuir para o fortalecimento da parede celular. O tratamento de células de soja ou de feijoeiro com elicitores fúngicos causou rápida (2 min) insolubilização de proteínas estruturais da parede celular ricas em (hidroxi)prolina, envolvendo ligações cruzadas dependentes de H_2O_2 (BRADLEY et al., 1992). Em outro estudo, foi demonstrado que a insolubilização de tais proteínas em soja foi induzida por um elicitor de *P. sojae*, por uma interação incompatível com *P. syringae* pv. *glycinea*, mas não por uma compatível, e por H_2O_2 . A aplicação de ditiotreitol, um inibidor da peroxidase ligada à parede celular, bloqueou a insolubilização das proteínas ricas em (hidroxi)prolina, confirmando a importância do H_2O_2 na indução desse processo (BRISSON et al., 1994). Essas alterações estruturais, associadas à lignificação pela peroxidase usando o H_2O_2 substrato, tornam a parede celular mais refratária à degradação enzimática e à penetração por patógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES 1996).

A relativa estabilidade e a habilidade de atravessar membranas fazem do H_2O_2 um excelente candidato para atuar como mensageiro secundário nas respostas de defesa de plantas a patógenos. Com o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e a resultante explosão oxidativa e HR, é importante que moléculas sinalizadoras sejam translocadas para células vizinhas para limitar o desenvolvimento da lesão, promovendo a sobrevivência das demais células da planta. A inoculação com *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

(*avrRpt2*) em *Arabidopsis thaliana* (*RPS2*) causou sintomas macroscópicos de HR no sítio de inoculação e levou ao desenvolvimento de resistência à inoculação com um isolado virulento da bactéria em folhas não inoculadas (secundárias), demonstrando a natureza sistêmica da resistência (SAR); nas folhas secundárias, acúmulo de H_2O_2 foi detectado, o qual foi importante para a indução de microexplosões oxidativas e micro-HRs (ALVAREZ et al., 1998).

Em interações incompatíveis com bactérias, fungos e vírus, o SA foi demonstrado acumular tanto local quanto sistemicamente, sendo indispensável para a indução de genes de defesa e SAR. O SA pode ser sintetizado a partir de ácido benzoico (BA) através de uma citocromo P450 monoxigenase (ácido benzoico 2-hidroxilase, BA2-H) ativada a partir da liberação de BA conjugado. Quando infiltrado em folhas de fumo, o H_2O_2 aumentou a atividade da BA2-H, induzindo acúmulo de SA (LÉON et al., 1995).

2.2 Fitoalexinas

Fitoalexina vem do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele. As fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, de natureza não proteica, formando um grupo heterogêneo e apresentando atividade biológica contra uma ampla gama de patógenos, cuja síntese é induzida por estresses. A produção de fitoalexinas pode ser induzida por patógenos biotróficos e necrotróficos (bactérias, fungos, oomicetos e vírus); pelo reconhecimento de substâncias derivadas do patógeno (PAMPs), como o peptídeo 1 indutor de necrose e etileno (Nep1) de oomicetos e a flagelina e o peptideoglicano de bactérias, por fragmentos da parede celular vegetal liberados como resultado da atividade patogênica (oligogalacturonídeos), e por estresses abióticos, incluindo as radiações UV-B e UV-C, compostos químicos e metais pesados. A formação de fitoalexinas em resposta à infecção por patógenos ocorre *de novo* e a diferença entre interações compatíveis e incompatíveis reside na dinâmica de sua biossíntese ao invés de sua presença/ausência em plantas resistentes/suscetíveis. Dessa forma, acúmulos mais rápidos e elevados de fitoalexinas são observados em cultivares resistentes

comparadas com cultivares suscetíveis (AHUJA et al., 2012).

O termo fitoalexina foi introduzido por Müller & Börger em 1940. Ao estudarem a interação batata-*P. infestans*, os autores observaram que a inoculação prévia de tubérculos de batata com uma raça avirulenta do oomiceto induzia resistência contra uma raça virulenta. Esse resultado levou-os a hipotetizar que a inoculação com a raça avirulenta induzia a produção de substâncias (fitoalexinas) nos tecidos dos tubérculos, os quais se tornavam, portanto, protegidos da infecção pela raça virulenta. A primeira fitoalexina, pisatina, foi isolada de ervilha infectada com *Sclerotinia fructicola*; seu acúmulo como resultado da infecção pelo fungo e sua natureza antifúngica satisfizeram o critério originalmente proposto para a definição de fitoalexina (AHUJA et al., 2012).

Mais de 300 tipos de fitoalexinas, de diferentes classes químicas, têm sido caracterizados em várias famílias botânicas, principalmente dicotiledôneas (Tabela 1). Na família Brassicaceae, a maioria das fitoalexinas são alcaloides derivados do aminoácido triptofano e contém enxofre, a exemplo da camalexina em *Arabidopsis*, bem como da brassinina, brassilexina, ciclobrassinina, espirobrassinina, rutalexina e rapalexin A em canola, nabo e mostarda. Em Fabaceae, predominam os flavonoides, como as araquidinas em amendoim, a faseolina em feijoeiro, a medicarpina em alfafa e a gliceolina em soja. Embora o resveratrol (um estilbeno) também possa ser encontrado em amendoim, tal composto, além de piceídeos, pterostilbenos e viniferinas constituem as principais fitoalexinas da videira (família Vitaceae). Um sesquiterpeno bicíclico (capsidiol) e uma hidroxycumarina (escopoletina) são as fitoalexinas predominantes em pimentão e tabaco (família Solanaceae), respectivamente. Em plantas monocotiledôneas da família Poaceae, fitoalexinas de diferentes classes químicas têm sido isoladas, incluindo diterpenoides (kauralexinas e zealexinas) em milho, fenois (avenantramidas) em aveia, diterpenoides (fitocassanos A-E, momilactonas A e B, orizalexinas A-F e orizalexina S) e flavonoides (sakuranetina) em arroz. O sorgo sintetiza um grupo peculiar de fitoalexinas chamadas de 3-deoxiantocianidinas (de coloração laranja-avermelhada) e foi demonstrado que as flavanas luteolina e apigenina foram as principais fitoalexinas que acumularam em sorgo em

interações sorgo-*Colletotrichum sublineolum* incompatíveis e compatíveis, respectivamente. Entre as fitoalexinas conhecidas, o ácido benzoico, precursor do SA, formado em macieira em resposta ao ataque por *Nectria galligena*, parece ter a estrutura química mais simples. No entanto, o enxofre elementar, produzido como ciclo-octaenxofre (S₈) foi demonstrado apresentar atividade antifúngica e acumular em células do parênquima do xilema e dos vasos do xilema em contato com *Verticillium dahliae* em genótipos de cacauete resistentes ao fungo (HAMMOND-KOSACK; JONES 1996; AHUJA et al., 2012).

Tabela 1. Exemplos de fitoalexinas induzidas em plantas em resposta à infecção por patógenos.

Plantas	Fitoalexinas	Patógenos
Brassicaceae: canola, nabo e mostarda (<i>Brassica rapa</i> e <i>Brassica juncea</i>)		
<i>B. rapa</i> e <i>B. juncea</i>	Brassinina, espirobrassinina, ciclobrassinina, rutalexina, rapalexina A e brassilexina	<i>Albugo candida</i> e <i>Alternaria brassicicola</i>
Fabaceae (Leguminosae): amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>), alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), ervilha (<i>Pisum sativum</i>), luzerna-cortada (<i>Medicago truncatula</i>), tremoço (<i>Lupinus angustifolius</i>) e soja (<i>Glycine max</i>)		
<i>A. hypogaea</i>	Resveratrol, araquidina-1, araquidina-2, araquidina-3, isopentadienil-4,3',5'-trihidroxiestilbeno, SB-1, arahipina-1, arahipina-2, arahipina-3, arahipina-4, arahipina-5, arahipina-6, arahipina-7, aracarpeno-1 e aracarpeno-2	Espécies de <i>Aspergillus</i> : <i>A. caelatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> e <i>A. niger</i>
	Resveratrol e piceatanol	<i>Botryodiplodia theobromae</i> e <i>Ganoderma lucidum</i>
	Resveratrol, araquidina-1, araquidina-2, araquidina-3, isopentadienil-4,3', 50'-trihidroxiestilbeno, SB-1 e fitoalexinas derivadas	<i>Rhizopus oligosporus</i>

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Plantas	Fitoalexinas	Patógenos
<i>M. sativa</i>	Medicarpina e sativana	<i>Colletotrichum trifolii</i>
<i>P. sativum</i>	Pisatina	<i>Nectria haematococca</i>
<i>M. truncatula</i>	Medicarpina e seus precursores isoflavonas	<i>Phoma medicaginis</i>
<i>L. angustifolius</i>	Luteonia e wighteona	<i>Colletotrichum lupini</i>
<i>G. max</i>	Gliceolina	<i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Phytophthora sojae</i>
<i>G. max</i>	Gliceolina e cumestrol	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glycines</i>
	Gliceolina e gliceolidina	<i>Rhizopus microsporus</i>
	Gliceolina	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus sojae</i> e <i>Rhizopus oligosporus</i>
Solanaceae: tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) e tabaco selvagem (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>)		
<i>N. tabacum</i>	Escopoletina e capsidiol	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phytophthora nicotianae</i> e <i>Phytophthora palmivora</i>
<i>N. plumbaginifolia</i>	Capsidiol	<i>Botrytis cinerea</i>
Vitaceae: videira (<i>Vitis vinifera</i>) e videira selvagem (<i>Vitis amurensis</i>)		
<i>V. vinifera</i>	Resveratrol, viniferinas, piceídeos e pteroestilbeno	<i>Plasmopara viticola</i> , <i>Erysiphe necator</i> e <i>Botrytis cinerea</i>
<i>V. amurensis</i>	Resveratrol	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Poaceae: milho (<i>Zea mays</i>), aveia (<i>Avena sativa</i>), arroz (<i>Oryza sativa</i>) e sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)		
<i>O. sativa</i>	Momilactona A, momilactona B, fitocassano A - fitocassano E, sakuranetina e orizalexina E	<i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> e <i>Magnaporthe oryzae</i>
<i>A. sativa</i>	Avenantramidas	<i>Puccinia coronata</i>
<i>S. bicolor</i>	Luteolina, apigenina e 3-deoxianthocianidinas	<i>Colletotrichum sublineolum</i> e <i>Cochliobolus heterostrophus</i>
<i>Z. mays</i>	Kauralexinas e zealexinas	<i>Rhizopus microsporus</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Cochliobolus heterostrophus</i> e <i>Aspergillus flavus</i>

Adaptado de AHUJA et al. (2012).

As diferentes classes de fitoalexinas são produzidas a partir de rotas metabólicas centrais interconectadas que, grosseiramente, podem ser separadas em metabolismo dos alcaloides, isoprenoides (terpenoides) e fenilpropanoides (Figura 2). Os alcaloides são formados nas vias do ciclo do ácido cítrico ou shiquimato a partir de várias enzimas P450, usando o triptofano como precursor. Os isoprenoides são formados a partir de isopentenil difosfato e seu isômero dimetilalil difosfato cuja síntese envolve as rotas do metileritritol fosfato nos plastídeos ou ácido mevalônico no citosol. A conversão do aminoácido aromático fenilalanina ao intermediário ácido cinâmico pela fenilalanina amônia liase representa o passo inicial na via do ácido shiquímico que conduz à formação dos metabólitos fenilpropanoides (GROßKINSKY et al., 2012).

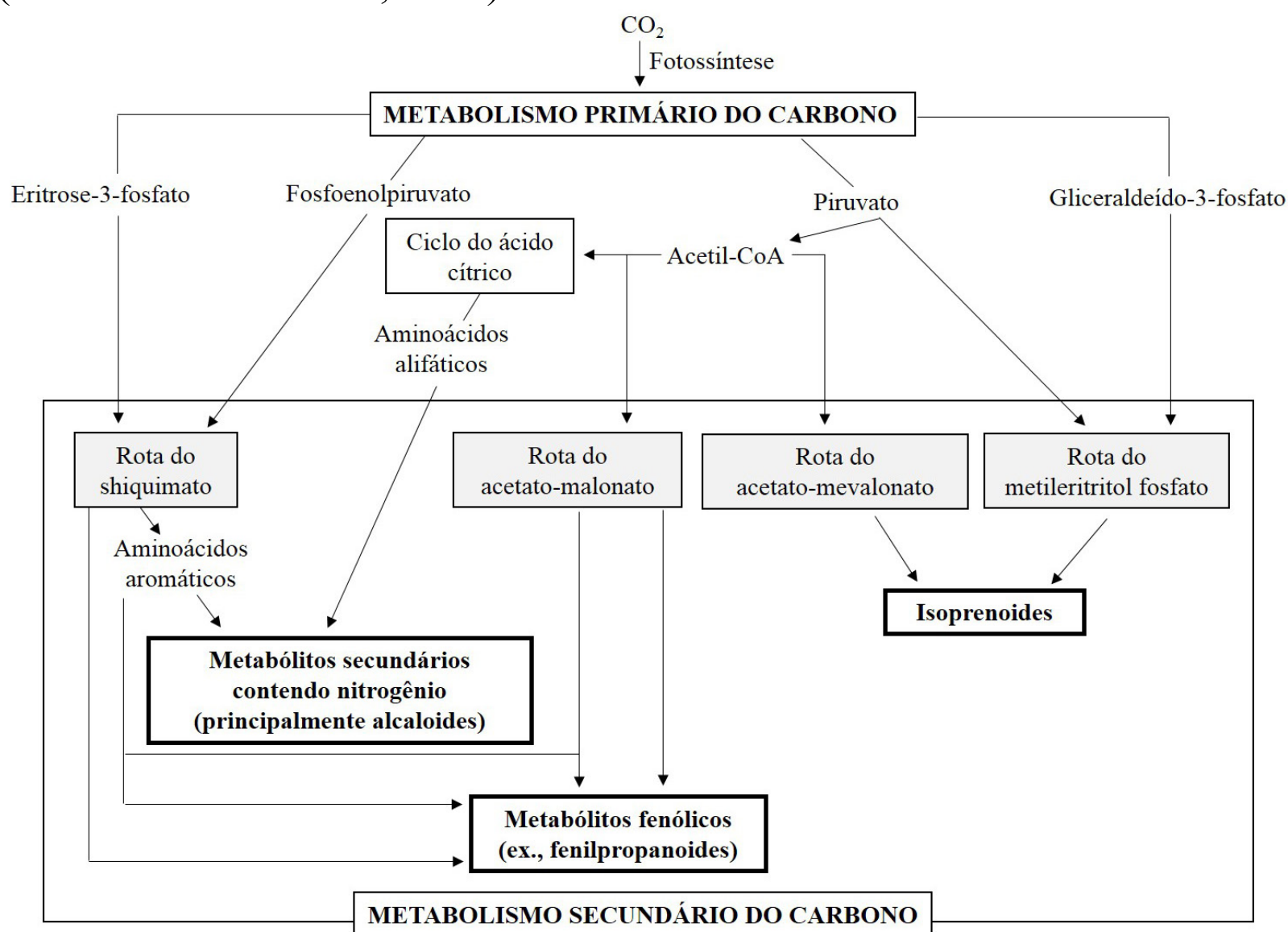


Figura 2. Network de rotas biossintéticas e metabólitos conduzindo à formação de fitoalexinas. Intermediários oriundos do metabolismo primário do carbono são usados como precursores para a síntese específica de diferentes classes de metabólitos secundários (negrito) (Adaptado de GROßKINSKY et al. 2012).

As fitoalexinas podem ser encontradas em diferentes órgãos vegetais como folhas, flores, hastes, sementes e raízes, e podem atuar como fitoalexina ou fitoantecipina (composto de defesa pré-formado) dependendo do órgão. A momilactona A em arroz, por exemplo, ocorre constitutivamente nas brácteas e colmos (LEE et al., 1999), porém sua biossíntese é induzida nas folhas (CARTWRIGHT et al., 1981).

Diferentes abordagens têm sido usadas para atestar o papel das fitoalexinas na resistência de plantas a doenças. Primeiro, plantas resistentes exibem aumentos mais rápidos e pronunciados na concentração de fitoalexinas e na atividade de enzimas-chaves envolvidas na sua biossíntese do que plantas suscetíveis. Segundo, a remoção de fitoalexinas do sítio de infecção, bem como a aplicação de inibidores da sua síntese ou a existência de mecanismos de detoxificação no patógeno, diminui a resistência da planta. Finalmente, o acúmulo de fitoalexinas no local e tempo apropriados para causar a inibição do patógeno nos tecidos do hospedeiro, a indução da sua biossíntese como resultado de elicitores específicos do patógeno, bem como o aumento da resistência da planta pela aplicação de fitoalexinas indicam que tais compostos desempenham um papel fundamental para a defesa contra patógenos (KEEN 1990).

O conhecimento da modulação dos mecanismos de biossíntese de fitoalexinas pode viabilizar o emprego de técnicas de engenharia genética visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças. Pelos radiculares de soja transformados com os genes *resveratrol sintase* e *resveratrol oximetil transferase* acumularam glicosídeos conjugados do composto estilbeno resveratrol e do composto relacionado pterostilbeno, que não ocorrem naturalmente em soja, e apresentaram menor necrose (0-7%) do que pelos radiculares não transformados (84%) (ZERNOVA et al., 2014). Embora plantas de milho não produzam 3-deoxiantocianidinas em resposta à infecção fúngica, a inserção do transgene do sorgo *yellow seed 1* (*yl*) resultou em indução de luteolidina em folhas desafiadas com *C. graminicola*, aumentando a resistência ao fungo (IBRAHEEM et al., 2015).

Em alguns casos, a habilidade de patógenos em causar doença em determinado hospedeiro depende de sua habilidade em detoxificar

fitoalexinas. Brassinina é um composto antifúngico produzido por plantas da família Brassicaceae em resposta à infecção microbiana. Mutantes de *Alternaria brassicicola* defectivos em um fator de transcrição (*Bdtf1*) requerido para a detoxificação de brassinina foram pouco agressivos, causando lesões 70% menores em diâmetro do que o tipo selvagem em três espécies de *Brassica*. Ensaio *in vitro* demonstraram que, diferentemente do tipo selvagem, os mutantes foram incapazes de germinar e o crescimento da hifa foi paralisado na concentração de 200 μM de brassinina; na concentração de 100 μM , o micélio do tipo selvagem converteu a fitoalexina em um derivado não tóxico, enquanto o mutante em *Bdtf1* falhou em efetuar tal conversão (SRIVASTAVA et al., 2013).

Diversos mecanismos têm sido implicados na resistência de fitopatógenos a fitoalexinas. Proteínas quinases envolvidas em mecanismos compensadores de sinalização da parede celular e uma proteína não dobrada de resposta, da rota de sinalização, ativada pelo retículo endoplasmático (RE) em resposta a estresse para preservar a capacidade de dobramento de proteínas do RE, foram demonstradas estar envolvidas na resistência de *A. brassicicola* à camalexina. Em *Botrytis cinerea*, a insensibilidade à fitoalexina tem sido correlacionada com a maquinaria antiapoptótica do fungo, uma vez que a camalexina ativa a morte celular apoptótica, bem como à ativação de um transportador de efluxo ABC. Além disso, a detoxificação da camalexina também pode ocorrer via metabolização como a produção de 5-hidroxicamalexina por *R. solani*, a glicosilação por *S. sclerotiorum* e a produção de ácido 3-indolcarboxílico (e outros intermediários) por *B. cinerea*. A patogenicidade de *Nectria haematococca* em ervilha foi correlacionada com a habilidade do fungo em detoxificar a pisatina através de sua demetilação catalisada pela enzima pisatina demetilase (AHUJA et al., 2012; PASCHOLATI 2014).

2.3 Proteínas relacionadas à patogênese

O termo “proteínas relacionadas à patogênese” (proteínas PR) foi cunhado na década 1980 para se referir às proteínas codificadas pelas plantas hospedeiras induzidas apenas em condições patológicas ou relacionadas

(ANTONIOW et al., 1980). As proteínas PR foram descobertas na década de 1970 em tabaco exibindo HR ao TMV e, em seguida, foram encontradas em pelo menos 13 famílias de plantas em resposta ao ataque por bactérias, fungos, insetos, nematoides, oomicetos, vírus e viroides (VAN LOON et al., 2006). Estudos subsequentes, entretanto, revelaram que o acúmulo de proteínas PR ocorria não apenas em condições patológicas, mas também como resultado de estresses abióticos (clorose e necrose induzida por toxinas, déficit hídrico, fermentos, metais pesados e salinidade) e pela colonização por bactérias e fungos benéficos. Proteínas constitutivas presentes em baixos níveis, porém detectáveis em tecidos saudáveis, mesmo que induzidas por condições patológicas, não foram consideradas proteínas PR (FERREIRA et al., 2007).

O baixo peso molecular (10-40 kDa), a natureza ácida, a elevada resistência à degradação proteolítica e ao baixo pH, bem como a localização predominantemente intercelular, foram características comuns inicialmente encontradas nas proteínas PR. Após a infecção patogênica, tais proteínas foram demonstradas acumular em folhas e outros órgãos vegetais, podendo compreender mais de 10% das proteínas solúveis totais (FERREIRA et al., 2007).

Proteínas presentes em plantas saudáveis, sintetizadas de maneira tecido-específica e controlada pelo estágio de desenvolvimento, foram incluídas na categoria de “proteínas semelhantes às PR”. Essas proteínas são predominantemente básicas e localizadas intracelularmente no vacúolo, não sendo induzidas por condições patológicas (VAN LOON et al., 1994). No entanto, a distinção entre as proteínas PR e proteínas semelhantes às PR é dificultada por algumas razões: a) algumas proteínas (quitinases e glucanases básicas) cuja síntese é controlada pelo estágio de desenvolvimento também são induzidas em resposta à infecção por patógenos no mesmo órgão; b) algumas proteínas (quitinases e glucanases ácidas e básicas) atuam constitutivamente em um órgão e são induzidas por patógenos em outro; c) algumas proteínas PR específicas ocorrem em tecidos saudáveis; d) algumas proteínas semelhantes às PR são induzidas por patógenos (VAN LOON 1999). O termo “proteínas induzíveis relacionadas à defesa” foi introduzido

por Van Loon et al. (2006) para acomodar proteínas predominantemente não detectáveis em tecidos sadios que são acumuladas após a infecção por um ou mais patógenos. Dessa forma, tanto as proteínas classificadas como PR quanto aquelas que ainda não foram classificadas, mas que satisfazem os critérios acima, foram incluídas na categoria de “proteínas induzíveis relacionadas à defesa”. Convém destacar que a indução de proteínas PR não é evidência de seu papel na defesa. A presença de proteínas PR ou a sua indução em tecidos distantes e não infectados como resultado de uma infecção primária nas células vizinhas confere um elevado nível de proteção, sendo pouco efetiva para conter a infecção inicial (VAN LOON et al., 1999; FERREIRA et al., 2007).

Dezessete famílias de proteínas PR, numeradas de acordo com a ordem de sua descoberta e agrupadas de acordo com seu peso molecular, funções bioquímicas e propriedades, foram descritas (Tabela 2). Embora a função de muitas proteínas PR ainda necessite ser elucidada, várias delas, tem sido demonstrado, possuem atividade antifúngica. Acredita-se que as proteínas PR-1 e PR-5 (proteínas semelhantes à taumatina e osmotinas) criem poros transmembranas (FERREIRA et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o efeito inibitório da PR-1, proteína marcadora da SAR, no patógeno, decorre da habilidade da proteína de se ligar a e sequestrar esteróis do patógeno (GAMIR et al., 2017). As proteínas PR-2 (β -1,3-glucanase) e PR-3, 4, 8 e 11 (quitinases) têm como alvos componentes da parede celular fúngica, degradando β -1,3-glucanas e quitina, respectivamente. As proteínas PR-6 (inibidoras de proteinase) têm como alvos nematoides e insetos e a PR-7 (uma endoproteínase) está envolvida na dissolução da parede celular microbiana. A proteína PR-8 também apresenta atividade de lisozima, podendo ser direcionada contra bactérias. A atividade de peroxidase da proteína PR-9 atua no fortalecimento celular, catalisando a lignificação, aumentando a resistência a múltiplos patógenos. A proteína PR-10 possui atividade de ribonuclease, sendo a única família especificamente envolvida na defesa contra vírus. No entanto, uma proteína antifúngica do trigo (PR-4) também foi demonstrada possuir atividade de ribonuclease. As famílias das proteínas PR-12 (defensinas), PR-13 (tioninas) e PR-14 (proteínas de

transferência de lipídeos) apresentam atividade antibacteriana e antifúngica. As proteínas PR-15 e PR-16 são típicas de monocotiledôneas e compreendem famílias das proteínas oxalato oxidases semelhantes à germina e proteínas semelhantes à oxalato oxidase com atividade de SOD, respectivamente. O H₂O₂ gerado como consequência da atividade de tais proteínas pode ser tóxico a diferentes agentes patogênicos ou pode contribuir indiretamente por estimular respostas de defesa da planta. A exata função molecular da proteína PR-17 permanece a ser definida, mas ela foi encontrada em cevada, tabaco e trigo, apresentando sequências que são similares ao sítio ativo de zinco-metaloproteinases. Uma nova e putativa família de proteínas (PR-18), com propriedade antimicrobiana e de geração de H₂O₂, induzida por fungos e SA, foi encontrada em girassol (VAN LOON et al., 2006; FERREIRA et al., 2007).

Tabela 2. Famílias e principais propriedades das proteínas induzíveis relacionadas à defesa (proteínas PR)¹.

Família	Membro tipo	Propriedades bioquímicas	Massa molecular (kDa)
PR-1	PR-1a (tabaco)	Sequestro de esterois ₂	15
PR-2	PR-2 (tabaco)	β-1,3-glucanase	30
PR-3	P, Q (tabaco)	Quitinase classes I, II, IV-VII	25-30
PR-4	R (tabaco)	Quitinase classes I, II	15-20
PR-5	S (tabaco)	Similar à taumatina	25
PR-6	Inibidor I (tomateiro)	Inibidor de proteinase	8
PR-7	P69 (tomateiro)	Endoproteinase	75
PR-8	Quitinase (pepino)	Quitinase classe III	28
PR-9	“Peroxidase formadora de lignina” (tabaco)	Peroxidase	35
PR-10	“PR-1” (salsa)	Similar à ribonuclease	17
PR-11	Quitinase “classe V” (tabaco)	Quitinase classe I	40
PR-12	RS-AFP3 (rabanete)	Defensina	5
PR-13	THI2.1 (Arabidopsis)	Tionina	5
PR-14	LTP4 (cevada)	Proteína de transferência de lipídeo	9
PR-15	OxOa (germina) (cevada)	Oxalato oxidase	20
PR-16	OxOLP (cevada)	Similar a oxalato oxidase	20
PR-17	PRp27 (tabaco)	Desconhecida	27

¹Adaptado de VAN LOON et al. (2006) e FERREIRA et al. (2007).

²Relatado por GAMIR et al. (2017).

É importante ressaltar que existe um sinergismo entre as proteínas PR. Ensaaios *in vitro* demonstraram que a β -1,3-glucanase classe II apresentou atividade antifúngica apenas quando foi coaplicada com quitinase e β -1,3-glucanase classe I (THEIS; STAHL 2004). Isso se torna particularmente importante para o emprego da engenharia genética visando ao controle de doenças, em que a elevada expressão constitutiva de combinações de proteínas PR em plantas poderia conferir resistência durável a múltiplos patógenos. Plantas de tomateiro expressando um transgene apenas da quitinase ou da β -1,3-glucanase foram suscetíveis a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, enquanto que a expressão combinada dos genes resultou em aumento na resistência (JONGEDIJK et al., 1955).

2.4 Reação de hipersensibilidade

A rápida morte celular, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), de células do hospedeiro que o patógeno tenta infectar e de algumas células adjacentes constitui uma das principais e mais bem caracterizadas respostas induzidas de resistência. Tal fenômeno foi descrito no século XX, quando foi observado que algumas variedades de crisântemo e trigo inoculadas com *Puccinia* spp. e resistentes à ferrugem exibiam uma morte celular localizada. De qualquer maneira, Stakman (1915) foi quem estabeleceu a definição de HR conhecida atualmente. Ao estudar diferentes *formae speciales* de *Puccinia graminis*, o autor verificou que, em alguns casos, plantas hospedeiras resistentes eram hipersensíveis ao fungo. Fenotipicamente, portanto, a HR pode ser definida como uma área de morte celular no ponto da tentativa de ingresso do patógeno que se correlaciona com a resistência (MUR et al., 2008).

Uma HR bem caracterizada e que pode ocupar vastas proporções do tecido é observada em *Arabidopsis* inoculada com elevadas concentrações de inóculo da bactéria *P. syringae* pv. *tomato*. Outro exemplo de HR macroscópica, caracterizada pela formação de lesões locais, é elicitada pelo TMV em cultivares de tabaco resistentes. Em outros casos, porém, lesões diminutas (“flecks”) ou mesmo uma HR microscópica ocorrem. Independentemente da sua extensão, acredita-se que a HR limite a

colonização do hospedeiro pelo patógeno, em que esse permanece mais ou menos confinado ao sítio de infecção, sendo inibido ou morto em tecidos expressando HR. Em interações com fungos biotróficos, como aqueles causadores de ferrugens e oídios, que formam uma íntima associação com o hospedeiro, a morte celular pode privar o patógeno da obtenção de nutrientes. No caso de vírus, a HR resulta na formação das chamadas lesões locais, em que as partículas virais, embora possam sobreviver por algum tempo, são incapazes de se mover célula a célula via plasmodesmas (MUR et al., 2008).

A morte celular programada é ubíqua a organismos procariotos e eucariotos; em mamíferos, a morte celular programada pode ser vista como um mecanismo de organogênese de tecidos e remoção de células infectadas ou potencialmente cancerosas. A morte celular programada de animais, chamada de apoptose, apresenta várias similaridades com a HR vegetal. Entre as características da morte celular programada que lembram a HR estão o encolhimento celular, a condensação de cromatina e o desarranjo da membrana plasmática. Além disso, uma rápida paralisação da mobilidade citoplasmática associada à despolimerização do citoesqueleto tem sido reportada em ambos os casos (MUR et al., 2008). As características citológicas peculiares da HR incluem o aumento na formação de grandes vesículas, oriundas do tonoplasto ou da plasmalema, antes do colapso celular, sendo que, na HR elicitada pelo TMV, tais vesículas contêm restos cloroplásticos com material nuclear fragmentado permanecendo dentro do núcleo colapsado (MITTLER et al., 1997).

A HR é frequentemente condicionada pela presença de um gene efector (neste contexto, chamado de gene avirulência, *Avr*) cujo produto é reconhecido direta ou indiretamente por um gene de resistência (*R*) cognato na planta, caracterizando, portanto, uma interação incompatível. No modelo mais simples, o gene *Avr* codifica a um ligante que é reconhecido pelo gene *R* correspondente, desencadeando, por conseguinte, a HR e resistência à doença. É importante destacar que moléculas (elicitores) do patógeno, por serem reconhecidas por receptores da planta, também são capazes de induzir HR (MOREL; DANGL 1997).

Diferentes sinais químicos estão envolvidos na execução da HR. Uma

rápida alcalinização do apoplasto via influxo de H^+ /efluxo de K^+ e influxo de Ca^{2+} foi verificada em células expressando HR. O sustentado acúmulo de Ca^{2+} citoplasmático em diferentes interações planta-patógeno envolvendo HR associado ao fato de que células tratadas com compostos que bloqueiam canais de Ca^{2+} ou mutantes em tais canais tiveram a HR abolida, suportam a ideia da importância do influxo de Ca^{2+} para o desencadeamento da HR (CLOUGH et al., 2000; ALI et al., 2007). As ROS constituem o sinal mais conhecido para orquestrar a HR. Estudos pioneiros, envolvendo *P. infestans* e TMV em tubérculos de batata e tabaco, respectivamente, demonstraram que a produção de ROS precedia a HR (DOKE 1983; DOKE; OHASHI 1988). Evidências adicionais do papel das ROS na HR foram fornecidas por observações que mostraram que o uso de enzimas que atuam na remoção de ROS atrasou a HR (DOKE; OHASHI, 1988) e plantas de tabaco cujo gene da APX foi silenciado foram hiper-reativas quando desafiadas com um isolado avirulento de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (MITTLER et al., 1999). A modificação do nível ou estado redox de *pools* antioxidativos interfere na morte celular, tendo sido demonstrado que a coaplicação de glutatona reduzida com a inoculação de patógenos bacterianos suprime a HR (MUR et al. 2005). Uma associação entre a peroxidação de lipídeos e a HR também tem sido verificada. Linhagens de tabaco que tiveram a expressão da lipoxigenase (LOX) suprimida exibiram reduzida morte celular quando inoculadas com uma raça avirulenta de *P. parasitica* var. *nicotianae* (RANCÉ et al., 1998). A LOX poderia atuar intensificando o dano à membrana bem como gerando produtos citotóxicos, intensificando a morte celular. Finalmente, o óxido nítrico (NO) tem emergido como um componente-chave no desencadeamento da HR. O NO potencializa a indução de HR mediada por ROS em células de soja inoculadas com *P. syringae* pv. *glycinea*. Além disso, inibidores da síntese de NO inibiram a HR em folhas de *Arabidopsis* em resposta a *Pseudomonas syringae* (DELLEDONE et al., 1998).

3 UMA VISÃO INTEGRADA DAS RESPOSTAS DE DEFESA

Diversos eventos celulares estão associados à ETI, incluindo o rápido influxo de íons cálcio, a explosão oxidativa, a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), reprogramação da expressão gênica, deposição de aposições de calose na parede celular nos sítios em que o patógeno tenta penetrar, síntese de fitoalexinas, proteínas PR, bem como a HR. Antes da transdução de sinais ocorrerem, no entanto, é preciso que a planta reconheça o patógeno, processo mediado pelos genes *R*. A maioria dos genes *R* clonados até o momento codifica para proteínas com domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NB-LRR) responsáveis pelo reconhecimento de proteínas efetoras do patógeno; a partir desse reconhecimento, tem início a subsequente cascata de sinalização. Dois modelos de reconhecimento dos efetores têm sido propostos: uma interação física direta entre o receptor imune e o efector, e uma interação indireta mediada por proteínas da planta às quais o receptor imune se associa, monitorando as modificações induzidas pelo efector. Uma interação física direta foi demonstrada ocorrer entre os efetores fúngicos AvrPita, AvrL567 e AvrM com as proteínas NB-LRRs Pi-ta, L e M, respectivamente. Experimentos de coimunoprecipitação *in planta* entre os alelos RPP1 de *Arabidopsis* e o efector ATR1 de *Hyaloperonospora arabidopsidis* demonstraram que, durante os eventos de reconhecimento direto, o domínio LRR confere especificidade de reconhecimento, enquanto o domínio NB funciona na ativação e sinalização subsequente. O reconhecimento indireto de proteínas “acessórias” podem ser alvos genuínos do efector (modelo “guarda”) ou proteínas “armadilha” que a planta evolui para mimetizar os alvos de efetores (modelo “decoy”). Alguns genes que conferem resistência a bactérias reconhecem os efetores bacterianos indiretamente. Os efetores AvrB e AvrRpm1 de *Pseudomonas* se associam com e induzem a fosforilação da proteína RIN4 de *Arabidopsis*. A proteína de R RPM1 reconhece a fosforilação de RIN4, então ativando a ETI (ELMORE et al., 2011).

As cascatas de sinalização mediadas por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) constituem um dos componentes de transdução de sinais ubíquos a organismos eucariotos. As MAPKs consistem em

um complexo modular em que uma MAPK quinase quinase (MAPKKK) fosforila uma MAPK quinase (MAPKK) que, por sua vez, fosforila uma MAPK. Tais vias regulam a atividade de vários substratos, como fatores de transcrição e proteínas quinases (DODDS; RATHJEN 2010). Evidências de que a superexpressão de algumas MAPKs (MKK4) aumenta a produção de ROS, enquanto outras MAPKs (MEKK1 e MEKK3) reguladas por H_2O_2 indicam que as ROS parecem atuar tanto *downstream* quanto *upstream* dessa cascata de fosforilação. Em *Nicotiana benthamiana*, a ativação transcricional de *Rboh* foi demonstrada ser dependente de MAPK, sugerindo um papel das cascatas de fosforilação de MAPKs e a produção de ROS. Deve-se ressaltar que uma ativação do sistema antioxidativo torna-se importante para que a morte celular não se propague para o restante da planta, de modo a comprometer sua sobrevivência (TORRES 2010).

O cálcio também apresenta um papel crucial na sinalização celular para a defesa. Um aumento no Ca^{2+} citosólico é uma das respostas mais rápidas após o reconhecimento do patógeno, e uso de inibidores do influxo de Ca^{2+} mostraram que o mesmo é requerido para a produção de ROS após a elicitação. Todas as proteínas Rboh vegetais apresentam dois “EF-hands” na porção N terminal, onde o Ca^{2+} pode se ligar e, então ativar as Rboh. No entanto, as ROS também podem ativar o influxo de Ca^{2+} , havendo uma regulação espaço-temporal, em que o Ca^{2+} pode atuar *downstream* ou *upstream* às ROS. Além disso, várias proteínas quinases são dependentes de Ca^{2+} para a sua atividade, e algumas delas foram demonstradas fosforilar a porção N-terminal de Rboh. Portanto, existe uma comunicação cruzada entre o cálcio e a fosforilação na regulação da produção de ROS pelas NADPH oxidases (TORRES 2010).

Algumas classes de GTPases também podem regular a atividade de NADPH oxidases. Uma delas (Rac1) foi demonstrada diminuir a expressão de um gene da metalotioneína em arroz, envolvido na remoção de ROS, então potencializando o acúmulo de ROS e a sua função de sinalização nas respostas de resistência. Proteínas Rac do arroz também foram demonstradas interagir com a extensão N-terminal das Rboh, regulando sua atividade de oxidase, de maneira dependente de cálcio (WONG et al., 2007).

Diferentes hormônios têm sido demonstrados participar na complexa interação entre a geração de ROS, HR e resistência. O SA é um hormônio conhecido por desempenhar um papel crucial na resistência a patógenos biotróficos, tanto local quanto sistemicamente. O ataque por patógenos bem como H_2O_2 desencadeiam a produção de SA. Por outro lado, o SA pode também suprimir o sistema antioxidativo da planta, levando a um acúmulo de ROS em resposta à infecção por patógenos. O NO também tem emergido como outra ROS que atua na resistência. A potencialização da morte celular induzida pelo reconhecimento do patógeno tem sido demonstrada ser dependente de uma regulação fina entre H_2O_2 e NO. As ROS e NO desencadeiam a morte celular de células adjacentes às aquelas infectadas e modulam mutuamente o seu acúmulo (TORRES 2010).

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005. 952p.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES A. M. Phytoalexins in defense against pathogens Trends Plant Science, v. 17, p. 1360-1385, 2012.
- ALI, R et al. Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. Plant Cell, v. 19, p. 1081-1095, 2007.
- ALVAREZ, M. E. et al. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell, v. 92, p. 1-20, 1998.
- ANTONIOW, J. F. et al. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. Journal of General Virology, v. 47, p. 79-87, 1980.
- ASHTAMKER, C. et al. Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. Plant

Physiology, v. 143, n. 4, p. 1817-1826, 2007.

BART, R. S. et al. Rice Snl6, a cinnamoyl-CoA reductase-like gene family member, is required for NH1-mediated immunity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. PLoS Genetics, v. 6, e1001123, 2010.

BASAVARAJU, P. et al. Infection induced oxidative crosslinking of hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs) is associated with restriction of *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. Journal of Plant Interaction, v. 4, p. 179-186, 2009.

BECKMAN, C. H.; ELGERSMA, D. M.; MACHARDY, W. E. The localization of Fusarial infections in the vascular tissue of single-dominant-gene resistant tomatoes. Phytopathology, v. 62, p. 1256-1260, 1972.

BHUIYAN, N. H. et al. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion. Journal of Experimental Botany, v. 60, 509-521, 2009.

BINDSCHEDLER, L. V. et al. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. Plant Journal, v. 47, p. 851-863, 2006.

BRADLEY, D. J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C. J. Elicitor- and wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell protein: a novel, rapid defence response. Cell, v. 70, p. 21-30, 1992.

BRISSON, L. F.; TENHAKEN, R.; LAMB, C. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell, v. 6, p. 1703-1712, 1994.

BUSHNELL, W. R. Incompatibility conditioned by the *Mla* gene in powdery mildew of barley: The halt in cytoplasmic streaming. Phytopathology, v. 71, n. 10, p. 1062-1066, 1981.

BUSHNELL, W. R.; BERGQUIST, S. E. Aggregation of host cytoplasm and the formation of papillae and haustoria in powdery mildew of barley.

Phytopathology, v. 65, p. 310-318, 1975.

CARTWRIGHT, P. Isolation and characterization of two phytoalexins from rice as momilactones A and B. *Phytochemistry*, v. 20, p. 535-537, 1981.

CHOWDHURY, J. et al. 2014. Differential accumulation of callose, arabinoxylan and cellulose in nonpenetrated versus penetrated papillae on leaves of barley infected by *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytologist*, v. 204, p. 650-660, 2014.

CLARK, T. A. et al. Epidermal cell cytoplasmic events and response gene transcript accumulation during *Erysiphe graminis* attack in isogenic barley lines differing at the *Ml-o* locus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 46, p. 1-16, 1995.

CLÉRIVET, A. et al. Tyloses and gels associated with cellulose accumulation in vessels are responses of plane tree seedlings (*Platanus × acerifolia*) to the vascular fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. *Trees Structure and Function*, v. 15, p. 25-31, 2000.

CLOUGH, S. J. et al. The *Arabidopsis dnd1* ‘defense, no death’ gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of National Academic Science of United States of America*, v. 97, p. 9323-9328, 2000.

DEEPAK, S. et al. Purification and characterization of proline/hydroxyproline-rich glycoprotein from pearl millet coleoptiles infected with downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Phytochemistry*, v. 68, p. 298-305, 2007a.

DEEPAK, S. et al. Hydroxyproline-rich glycoproteins and plant defence. *Journal of Phytopathology*, v. 158, p. 585-593, 2010.

DEEPAK, S. et al. Role of oxidative cross-link in hydroxyproline rich glycoprotein in pearl millet infected with downy mildew disease. *Planta*, v. 226, p. 323-333, 2007b.

DELLEDONNE, M. et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, v. 394, p. 585-588, 1998.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Review Genetics*, v. 11, p. 539-548, 2010.

DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 23, p. 345-357, 1983.

DOKE, N.; OHASHI, Y. Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 32, p. 163-175, 1988.

ELMORE, J. M.; LINA, Z. D.; COAKER, G. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 365-371, 2011.

ENRIQUE, R. et al. Novel demonstration of RNAi in citrus reveals importance of citrus callose synthase in defence against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, p. 394-407, 2011.

FERREIRA, R. B. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, p. 677-700, 2007.

GAMIR, J. et al. The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant Journal*, v. 89, p. 502-519, 2017.

GRIMAULT, V. et al. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 44, n. 2, p. 105-123, 1994.

GROßKINSKY, D. K.; VAN DER GRAAFF, E.; ROITSCH, T. Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end? *Plant Science*, v. 195, p. 54-70, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, v. 8, p. 1773-1791, 1996.

HANO, C. et al. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta*, v. 223, p. 975-989, 2006.

HEMETSBERGER, C. et al. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens*., v. 8, e1002684, 2012.

HIGAKI, T. et al. Dynamic intracellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research*, v. 124, p. 315-324, 2011.

HUCKELHOVEN, R. Cell wall - associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, v. 45, p. 101-127, 2007.

IBRAHEEM, F. et al. A sorghum MYB transcription factor induces 3-deoxyanthocyanidins and enhances resistance against leaf blights in maize. *Molecules*, v. 20, p. 2388-2404, 2015.

JONGEDIJK, E. et al. Synergistic activity of chitinases and beta-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, v. 85, p. 173-180, 1955.

KEEN, N. T. Phytoalexins and their elicitors. In: Hoagland, R. E. (ed.) *Microbe and Microbials Products as Herbicides*. Washington: American Chemical Society Symposium, 1990. pp.114-129.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 251-275, 1997.

LEACH, J. E.; CANTRELL, M. A.; SEQUEIRA, L. Hydroxyproline-rich bacterial agglutinin from potato. *Plant Physiology*, v. 70, p.1353-1358, 1982.

LEE, C. W. et al. Momilactones A and B in rice straw harvested at different growth stages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*., v. 63, p. 1318-1320, 1999.

LEE, I. J. et al. Comparative ultrastructure of nonwounded Mexican lime and Yuzu leaves infected with the citrus canker bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri*. Microscopy Research and Technique, v. 72, p. 507-516, 2009.

LÉON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. Plant Physiology, v. 108, p. 1673-1678.

LEVINE, A. et al. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell, v. 79, p. 583-593, 1994.

MAHER, E. A. et al. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. Proceedings of National Academic Science of United States of America, v. 91, p. 7802-7806, 1994.

MANDAL, S.; DAS, R. K.; MISHRA, S. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of tomato and *Ralstonia solanacearum*. Plant Physiology and Biochemistry, v. 49, p. 117-123, 2011.

MATIKA, D. E. F.; LOAKE, G. J. Redox regulation in plant immune function. Antioxidant and Redox Signaling, v. 21, n. 9, 1373-1388, 2014.

MEHDY, M.C. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. Physiologia Plantarum, v. 98, p. 365-374, 1996.

MELLON, J. E.; HELGESON, J. P. Interaction of a hydroxyproline rich glycoprotein from tobacco callus with potential pathogens. Plant Physiology, v. 70, p. 401-405, 1982.

MENDEN, B.; KOHLHOFF, M.; MOERSCHBACHER, B. M. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. Phytochemistry, v. 68, p. 513-520, 2007.

MIEDES, E. et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. Frontiers in Plant Science, v. 5, 358, 2014.

MITTLER, R. et al. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of National Academic Science of United States of America*, v. 96, p. 14165-14170, 1999.

MOLLENHAUER, H. H.; HOPKINS, D. L. Xylem morphology of Pierce's disease-infected grapevines with different levels of tolerance. *Physiological and Plant Pathology*, v. 9, p. 95-100, 1975.

MOREL, J. B.; DANGL, J. L. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, v. 4, 671-683, 1997.

MOULD, M. J. R.; HEATH, M. C. Ultrastructural evidence of differential changes in transcription, translation, and cortical microtubules during in planta penetration of cells resistant or susceptible to rust infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 225-236, 1999.

MUR, L. A. J.; KENTON, P.; DRAPER, J. In planta measurements of oxidative bursts elicited by avirulent and virulent bacterial pathogens suggests that H_2O_2 is insufficient to elicit cell death in tobacco. *Plant, Cell and Environment*, v. 28, p. 548-561, 2005.

MUR, L. A. J. et al. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 501-520, 2008.

PARKER, D. et al. Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant Journal*, v. 59, n. 5, 723-737, 2009.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A. (eds.) *Manual de Fitopatologia Volume I Princípios e Conceitos*. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. pp. 593-636.

RAGGI, V. Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in tobacco leaves protected against *Erysiphe cichoracearum* by potato virus Y infection.

Plant Pathology, v. 49, p. 179-186, 2000.

RAHMAN, M. A.; ABDULLAH, H.; VAN-HAECCKE, M. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. Journal of Phytopathology, p. 147, v. 129-140, 1999.

RANCÉ II FOURNIER, J.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T. The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. Proceedings of National Academic Science of United States of America, v. 95, p. 6554-6559, 1998.

RANJAN, A. et al. The pathogenic development of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean requires specific host NADPH oxidases. Molecular Plant Pathology, v. 19, p. 700-714, 2018.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira, v. 28, p. 123-130, 2003.

ROMERO, D. et al. Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon-powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. Journal of Plant Physiology, v. 165, p. 1895-1905.

SHERWOOD, R. T. Papilla formation in corn root-cap cells and leaves inoculated with *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology, v. 77, p. 930-934, 1987.

SRIVASTAVA, A.; CHO, I. K.; CHO, Y. The *Bdtfl* gene in *Alternaria brassicicola* is important in detoxifying brassinin and maintaining virulence on Brassica species. Molecular Plant Microbe Interaction, v. 26, p. 1429-1440, 2013.

STAKMAN, E. C. Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. Journal of Agricultural Research, v. 4, p. 193-199, 1915.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Revista Scientia Agrária*, v. 10, p. 18-46, 2011.

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 61, p. 437-455, 2004.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 397-403, 2005.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L.; JONES, J. D. Arabidopsis gp91phox homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of National Academic Science of United States of America.*, v. 99, p. 517-522, 2002.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, p. 245-264, 1994.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN LOON, L.C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: Datta, S.; K. Muthukrishnan, S. (eds.) New York: CRC Press, 1999. pp. 1-19.

VANCE, C. P. Lignification as mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 18, p. 259-288, 1980.

VERA-ESTRELLA, R.; BLUMWALD, E.; HIGGINS, V. J. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. *Plant Physiology*, v. 99, p. 1208-1215, 1992.

WAY, H. M.; BIRCH, R. G.; MANNERS, J. M. A comparison of individual and combined l-phenylalanine ammonia lyase and cationic peroxidase transgenes for engineering resistance in tobacco to necrotrophic pathogens. *Plant Biotechnology Report*, v. 5, p. 301-308, 2011.

- WAY, H. M. et al. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 60, p. 275-282, 2002.
- WILLIAMS, B. et al. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, v. 7, e1002107, 2011.
- WOJTASZEK P, TRETHOWAN J, BOLWELL GP. (1997) Reconstitution in vitro of the components and conditions required for the oxidative cross-linking of extracellular proteins in Frenchbean (*Phaseolus vulgaris* L.). *FEBS Letters*, v. 405, p. 95-98, 1997.
- WONG, H. L. et al. Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell*, v. 19, p. 4022-4034, 2007.
- WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M. et al. Lignin deficiency in transgenic flax resulted in plants with improved mechanical properties. *Journal of Biotechnology*, v. 128, p. 919-934, 2007.
- WU, G. et al. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell*, v. 7, p.1357-1368, 1995.
- XU, L. et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, p. 5607-5621, 2011.
- YADETA, K. A.; THOMMA, B. P. H. J. The xylem as battle ground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers on Plant Science*, v. 4, a. 97, 2013.
- YAENO, T.; MATSUDA, O.; IBA, K. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant Journal*, v. 40, p. 931-941, 2004.

YOSHIOKA, H. et al. *Nicotiana benthamiana* gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, v. 15, p. 706-718, 2003.

YUN, M. H. et al. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. *Plant Physiology*, v. 141, n. 1, p. 178-187, 2006.

ZERNOVA, O.V. et al. Regulation of plant immunity through modulation of phytoalexin synthesis. *Molecules*, v. 19, p. 7480-7496, 2014.

ZEYEN, R. J. et al. (eds.) *Powdery Mildews: a Comprehensive Treatise*. Saint Paul: APS Press, 2002. pp. 107-125.

ZHANG, S.; YANG, Q.; MA, R. *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* infection induced “defense lignin” accumulation and lignin biosynthetic gene expression in chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 49, p. 993-1002, 2007.

ZHANG, Z.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal*, v. 8, p. 139-145, 1995.

CAPÍTULO 6: RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A BACTÉRIAS

Jorge Luis Badel¹
Lúcio Mauro da Silva Guimarães²
Priscilla Aguiar Möller¹
Hélvio Gledson Maciel Ferraz¹
Ana Leticia Rocha Monteiro¹

¹UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Fitobacteriologia Molecular, Viçosa, MG, Brasil
²UFV - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Laboratório de Patologia Florestal, Viçosa, MG, Brasil

INTRODUÇÃO

Caixa 1. Abreviações

CC	<i>Coiled Coil</i>
EBE	Elemento de ligação do efetor
EPS	Polissacarídeo extracelular
EFR	<i>EF-Tu Receptor</i>
ETI	Imunidade desencadeada por efetores
FLS2	<i>Flagellin-Sensing 2</i>
HR	Resposta de hipersensibilidade
Indels	Inserções e deleções
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetição rica em leucina
MAMP	Padrão molecular associado a micróbios
NBS	Sítio de ligação de nucleotídeo
NPR1	<i>Non-expressor of PRI</i>
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PR	Relacionado a patogênese
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PTI	Imunidade desencadeada por PAMPs
QTL	Loco de carácter quantitativo
RLK	Quinase semelhante a receptor
RLP	Proteína semelhante a receptor
RPCP	Rizobactéria promotora de crescimento em plantas
RSA	Resistência sistêmica adquirida
RSI	Resistência sistêmica induzida
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SST3	Sistema de secreção de tipo III
TAL	Semelhante a ativador da transcrição
THG	Transferência horizontal de genes
TIR	<i>Toll/Interleukin 1 Receptor</i>
TVG	Transferência vertical de genes

Entre os diversos fatores que reduzem a produtividade das culturas e ocasionam grandes prejuízos aos sistemas agrícolas estão as doenças causadas por bactérias fitopatogênicas, cujo controle é dificultado devido à escassez de produtos registrados com atividade antibacteriana. Algumas doenças causadas por bactérias fitopatogênicas comprometem a segurança alimentar e a estabilidade econômica em diversos países. No Brasil, por exemplo, o cancro cítrico, a clorose variegada dos citros e o Huanglongbing representam ameaças constantes à citricultura. Estima-se que essas doenças foram responsáveis pela erradicação de aproximadamente

Caixa 2. Abreviações de Nomes Científicos

<i>Cmm</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
<i>Psg</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
<i>Psp</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<i>Pss</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>Psta</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>
<i>Xag</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>
<i>Xam</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>
<i>Xap</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>
<i>Xav</i>	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>Xca</i>	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>
<i>Xcv</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
<i>Xff</i>	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>
<i>Xoo</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
<i>Xoc</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
<i>Xtu</i>	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>

34 milhões de árvores entre os anos 2000 e 2009 e pela perda de 78 milhões de caixas de laranja por ano no parque citrícola de São Paulo e do Triângulo Mineiro (NEVES et al., 2010). Aliado a esse cenário, acrescenta-se a vigente demanda por um manejo agrícola sustentável, priorizando o respeito ao meio ambiente em detrimento ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas.

As plantas, assim como os animais, são capazes de reconhecer estímulos externos e responder a eles,

ativando mecanismos de defesa frente a agentes bióticos, os quais resultam na resistência à infecção. Neste capítulo serão abordados os mecanismos que as plantas utilizam para restringir ou evitar as infecções causadas por bactérias, com ênfase na identificação dos genes responsáveis e no (potencial) uso desses genes na agricultura. Por último, serão discutidos os mecanismos bacterianos que determinam a suplantação da resistência.

As abreviações dos termos, bem como dos nomes científicos de bactérias mencionados repetidamente ao longo do texto neste capítulo, podem ser acessados nas caixas 1 e 2, respectivamente.

1 MECANISMOS MOLECULARES DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

1.1 Genes envolvidos na imunidade desencadeada por PAMPs

O reconhecimento de bactérias fitopatogênicas pelo sistema imune das plantas pode acontecer mediante ativação de duas linhas de defesa. Na

imunidade desencadeada por PAMPs (PTI, *PAMP-Triggered Immunity*), moléculas amplamente conservadas e essenciais para a sobrevivência dos micróbios, denominadas padrões moleculares associados aos micróbios ou padrões moleculares associados aos patógenos (MAMPs ou PAMPs, *Microbe- ou Pathogen-Associated Molecular Patterns*), são reconhecidas por proteínas de membrana, conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões (PRR, *Pattern Recognition Receptors*). As plantas possuem PRRs que reconhecem diversos MAMPs/PAMPs bacterianos, tais como flagelina, fator de elongação EF-Tu, lipopolissacarídeos (LPS), poligalacturonatos, proteínas de choque frio, DNA plasmidial não metilado e peptídeos modificados (SEGONZAC; ZIPFEL 2011; TRDÁ et al., 2015).

Os PRRs possuem um domínio extracelular envolvido no reconhecimento mediante ligação do MAMP/PAMP, o qual inicia uma série de respostas que culminam na resistência da planta. Esses receptores podem ou não possuir um domínio de quinase intracelular, pelo qual são chamados quinases semelhantes a receptores (RLK, *Receptor-Like Kinase*) ou proteínas semelhantes a receptores (RLP, *Receptor-Like Protein*), respectivamente (Figura 1A). O domínio de quinase está envolvido na sinalização após reconhecimento do MAMP/PAMP, desencadeando cascatas de sinalização que incluem a participação de diversas proteínas quinases, culminando na indução de genes de defesa (Figura 1B) (SEGONZAC; ZIPFEL 2011; TRDÁ et al., 2015).

Pelo menos quatro classes de PRRs que reconhecem MAMPs/PAMPs bacterianos têm sido identificadas de acordo com as características estruturais do domínio extracelular (Figura 1A). Vários estudos demonstraram que PRRs com domínios extracelulares com repetições ricas em leucina (LRR, *Leucine Rich Repeat*), tais como FLS2 (*Flagellin-Sensing 2*) que reconhece a flagelina, EFR (*Elongation Factor Receptor*) que reconhece o fator de elongação EF-Tu de diversas espécies bacterianas e Xa21 que reconhece o peptídeo sulfonado RaxX (*Required for activation of Xa21 X*) secretado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), estão envolvidos na ligação de peptídeos menores (epítomos) derivados dos MAMPs/PAMPs (flg22, elf18 e RaxX21-sY para flagelina, EF-Tu e RaxX, respectivamente) (PRUITT et

al., 2015; SEGONZAC; ZIPFEL 2011; TRDÁ et al., 2015). As RLKs com domínios LRR (RLK-LRR) são os PRRs encontrados em maior proporção nos genomas de *Arabidopsis thaliana*, do tomate (*Solanum lycopersicum*), da soja (*Glycine max*) e do arroz (*Oryza sativa*) (LIU et al., 2015; SAKAMOTO et al., 2012; SHIU et al., 2004).

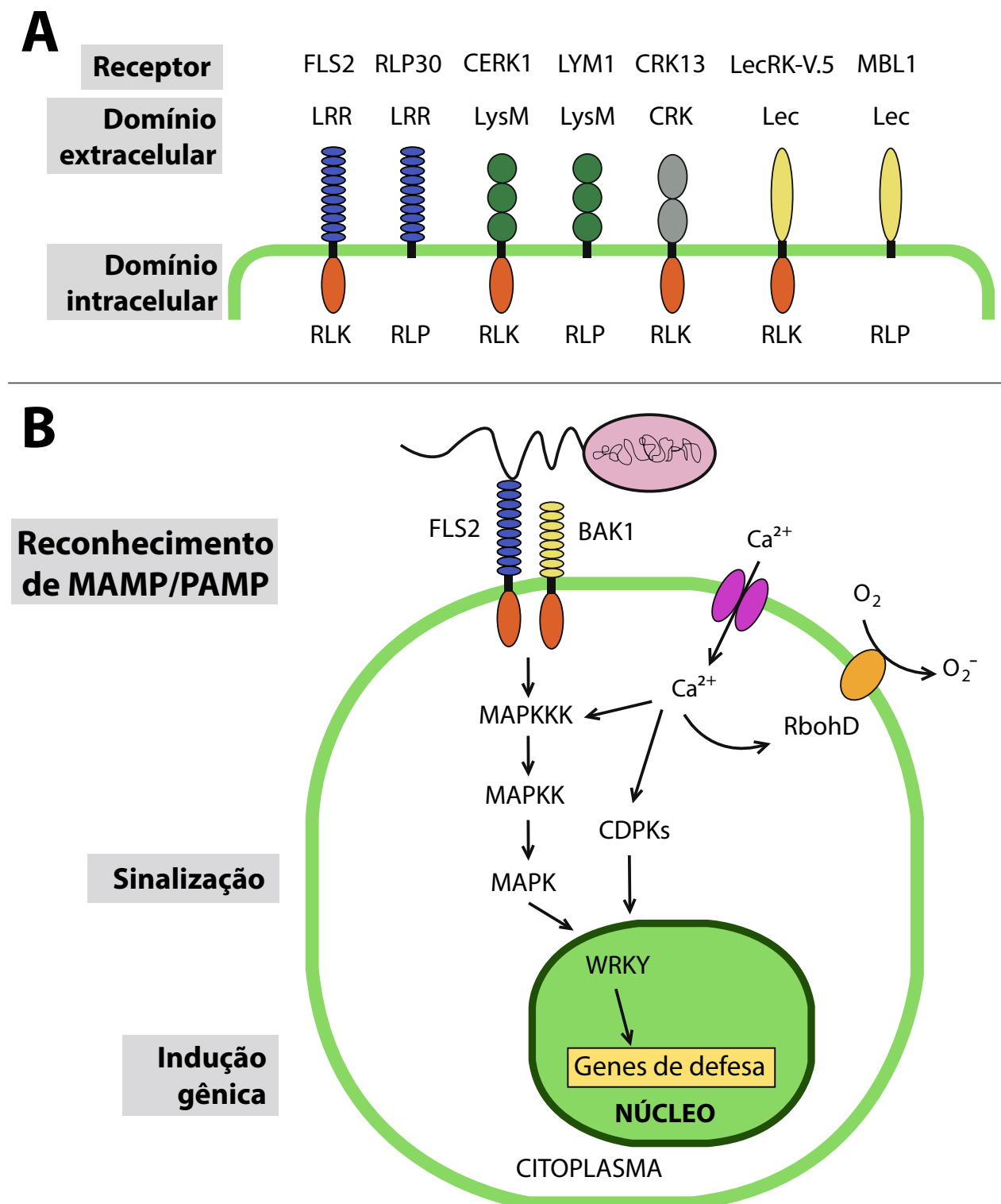


Figura 1 – Percepção de MAMPs/PAMPs por PRRs e ativação da PTL. (A) Esquema representando os domínios funcionais de PRRs que reconhecem MAMPs/PAMPs bacterianos. Na linha superior se mostram os nomes de sete PRRs apresentando diversidade estrutural. Quatro domínios extracelulares são representados: LRR (ovais azuis), LysM (círculos verdes), CRK (círculos cinza) e Lec (ovais amarelos).

CRK (ovais cinzas) e Lec (ovais amarelos), que reconhecem MAMPs/PAMPs de diferente natureza química. Os PRRs podem possuir ou não um domínio de quinase intracelular (ovais laranjas escuro), pelo qual são chamados RLK ou RLP (linha inferior), respectivamente. **(B)** Esquema diagramático simplificado do reconhecimento do flagelo bacteriano em *Arabidopsis*. A flagelina, proteína estrutural do flagelo, é reconhecida pelo PRR FLS2 (ovais azuis e laranja escuro), que após o reconhecimento forma um heterodímero com o co-receptor BAK1 (ovais amarelos e laranja escuro), desencadeando uma série de respostas que incluem o influxo de cálcio através de uma bomba de cálcio (ovais roxos), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase RbohD (*Respiratory burst oxidase homolog D*) (oval laranja claro), a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK, *Calcium-Dependent Protein Kinases*) e diversos fatores de transcrição, incluindo proteínas WRKY (possuem domínios triptofano-arginina-lisina-tirosina), que finalizam na ativação de genes de defesa. As linhas verde clara e verde escura representam a membrana plasmática e o envoltório nuclear da célula vegetal, respectivamente. Respostas similares têm sido relatadas na ETI, sendo nesse caso mais robustas e prolongadas.

Os poligalacturonatos são reconhecidos por PRRs que possuem domínios extracelulares ricos em lisina (LysM, *Lysin Motif*), os quais são estruturas globulares que possuem em torno de 40 aminoácidos presentes em proteínas que ligam N-acetilglucosamina e cumprem diferentes funções biológicas (BUIST et al., 2008). Por exemplo, foi demonstrado que as RLKs CERK1 (*Chitin Elicitor Receptor Kinase 1*) de *A. thaliana* e Bti9 (*AvrPtoB tomato-interacting protein 9*) de tomate, as quais possuem domínios LysM, fornecem proteção contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (WILLMANN et al., 2011; ZENG et al., 2012). Já o reconhecimento de LPS tem sido relatado como mediado por PRRs com domínio extracelular de lectina (*lectin domain*), no caso da interação entre *A. thaliana* e *Pst* (RANF et al., 2015). Os domínios de lectina estão envolvidos na ligação de diversos carboidratos (BOUWMEESTER; GOVERS 2009). Por último, RLKs com domínios ricos em cisteína (denominados CRK, *Cysteine-Rich Kinase*) contribuem para a resistência de *A. thaliana* contra *Pst*. No entanto, os MAMPs/PAMPs que eles reconhecem não têm sido identificados (ACHARYA et al., 2007; EDERLI et al., 2011). Exemplos de PRRs cuja contribuição para a resistência vegetal a bactérias fitopatogênicas já foi demonstrada são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de PRRs que contribuem para resistência da planta contra bactérias fitopatogênicas.

Planta/Gene	Tipo de receptor*	Domínio extracelular**	MAMP bacteriano reconhecido***	Espécie bacteriana	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>					
<i>BIR2</i>	RLK	LRR		<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Halter et al. (2014)
<i>CERK1/LYK1</i>	RLK	LysM	NAcGlu	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Gimenez-Ibanez et al. (2009) Wan et al. (2012); Willmann et al. (2011)
<i>CRK13</i>	RLK	CRK		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Acharya et al. (2007)
<i>CRK20</i>	RLK	CRK		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Ederli et al. (2011)
<i>EFR</i>	RLK	LRR	EF-Tu	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Nekrasov et al. (2009); Zipfel et al. (2006)
<i>FLS2</i>	RLK	LRR	Flagelina	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> ; <i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	De Torres et al. (2006); Ishiga et al. (2011); Nekrasov et al. (2009); Zipfel et al. (2004)
<i>LecRK-IV.4</i>	RLK	Lec		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Wang et al. (2014)
<i>LecRK-S.1</i>	RLK	Lec		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Wang et al. (2014)
<i>LecRK-S.4</i>	RLK	Lec		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Wang et al. (2014)
<i>LecRK-V.5</i>	RLK	Lec		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Arnaud et al. (2012) Desclos-Theveniau et al. (2012)
<i>LecRK-VI.2</i>	RLK	Lec		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>P. carotovorum</i> susp. <i>carotovorum</i>	Singh et al. (2012)
<i>LIK1</i>	RLK	LRR		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Le et al. (2014)
<i>LORE</i>	RLK	Lec	LPS	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Ranf et al. (2015)
<i>LYK3</i>	RLP	LysM		<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Paparella et al. (2014)
<i>LYK4</i>	RLP	LysM		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Wan et al. (2012)
<i>LYM1</i>	RLP	LysM	PGN	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Willmann et al. (2011)
<i>LYM3</i>	RLP	LysM	PGN	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Willmann et al. (2011)
<i>PSKR1</i>	RLK	LRR		<i>A. tumefaciens</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Loivamäki et al. (2010); Mosher et al. (2013)
<i>RLP30</i>	RLP	LRR		<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Wang et al. (2008); Zhang et al. (2013)
<i>SERK3/BAK1</i>	RLK	LRR		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Roux et al. (2011)
<i>Pimentão (Capsicum anuum)</i>					
<i>MBL1</i>	RLP	Lec		<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Hwang e Hwang (2011)
<i>Nicotiana benthamiana</i>					
<i>SERK3</i>	RLK	LRR		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Heese et al. (2007)
<i>FLS2</i>	RLK	LRR	Flagelina	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Hann e Rathjen (2007)
<i>Arroz (Oryza sativa)</i>					
<i>SERK2</i>	RLK	LRR		<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Chen et al. (2014)
<i>LYP4</i>	RLP	LysM	PGN	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ; <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Liu et al. (2012)
<i>LYP6</i>	RLP	LysM	PGN	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ; <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Liu et al. (2012)
<i>Xa21</i>	RLK	LRR	RaxX	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Pruitt et al. (2015)
<i>Tomate (Solanum lycopersicum)</i>					
<i>Bti9</i>	RLK	LysM		<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Zeng et al. (2012)

* RLK, Receptor-Like Kinase; RLP, Receptor-Like Protein.
** CRK, Cysteine-Rich Kinase; Lec, Lectin motif; LRR, Leucine-Rich Repeat; LysM, Lysine Motif.
*** EF-Tu, Fator de elongação EF-Tu; NAcGlu, N-Acetil-glucosamina; LPS, Lipopolissacarídeo; PGN, poligalacturonato; RaxX, Required for activation of Xa21 X.

Acredita-se que diversos PRRs contribuem quantitativamente para a resistência da planta. Sendo assim, a primeira linha de defesa (PTI) é considerada do tipo basal, fornecendo proteção contra uma ampla gama de bactérias fitopatogênicas. Nosso conhecimento sobre o uso potencial da PTI para desenvolver variedades resistentes contra bactérias fitopatogênicas tem sido adquirido principalmente através de estudos de expressão heteróloga de PRRs. Por exemplo, a expressão de *EFR* de *A. thaliana* em tomate, arroz e trigo (*Triticum aestivum*), causa aumento na resistência contra bactérias pertencentes aos gêneros *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (LACOMBE et al., 2010; LU et al., 2015; SCHOONBEEK et al., 2015). De igual maneira, a expressão de *FLS2* de *Nicotiana benthamiana* em plantas de citros causou diminuição na suscetibilidade a *Xanthomonas citri* (HAO et al., 2016a). Essas observações ressaltam a possibilidade de utilizar genes envolvidos na PTI (defesa basal) para obter variedades com resistência aumentada contra bactérias fitopatogênicas.

1.2 Genes envolvidos na imunidade desencadeada por efetores

Para vencer as respostas de defesa desencadeadas pela PTI, as bactérias secretam moléculas estruturalmente diversas no tecido vegetal. Por exemplo, *Pst* secreta a fitotoxina coronatina para suplantar as respostas desencadeadas pelo reconhecimento da flagelina. Dentre os mecanismos de suplantação resultantes da ação da coronatina encontram-se a reabertura dos estômatos e a indução de genes responsivos ao ácido jasmônico (MELOTTO et al., 2008). Muitas bactérias Gram-negativas também injetam proteínas diretamente no interior da célula vegetal utilizando o sistema de secreção de tipo III (SST3). Essas proteínas, chamadas efetores, cumprem o papel de suprimir as respostas de defesa da planta e contribuir para a aquisição de nutrientes (BLOCK; ALFANO 2011; BÜTTNER 2016; MACHO 2016). No entanto, as plantas desenvolveram genes de resistência que codificam proteínas que reconhecem direta ou indiretamente essas proteínas efetoras, induzindo a imunidade desencadeada por efetores (ETI, *Effector Triggered Immunity*) (Figura 2A, B). A ETI culmina na morte celular programada conhecida como

resposta de hipersensibilidade (HR, *Hypersensitive Response*), fornecendo resistência contra o intento de infecção (LEE; YEOM 2015; LI et al., 2015; SUKARTA et al., 2016). A clonagem de genes que conferem resistência possibilitou não somente avanços no conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência das plantas às bactérias, mas também o uso desses genes para criar novas variedades resistentes usando métodos de expressão heteróloga (transgenia).

O primeiro gene de resistência clonado foi *Pto*, no laboratório do Prof. Steve D. Tanksley na Universidade de Cornell (MARTIN et al., 1993). O gene *Pto* foi identificado na espécie silvestre *Solanum pimpinellifolium* e codifica para uma serina-treonina quinase associada à membrana vegetal que confere resistência em plantas de tomate, devido ao reconhecimento das proteínas efetoras AvrPto e AvrPtoB de *Pst* (MARTIN et al., 1993). Posteriormente, Song et al., 1995 clonaram o gene *Xa21* que determina resistência em plantas de arroz contra *Xoo* através do desencadeamento da PTI. Estudos posteriores demonstraram que a maioria dos genes que confere resistência qualitativa contra fitopatógenos, mediante o reconhecimento de efetores, codifica proteínas possuidoras de domínios de ligação de nucleotídeos (NBS, *Nucleotide Binding Sites*) no extremo N-terminal e domínios LRR no extremo C-terminal. Além desses, as proteínas de resistência possuem domínios TIR (*Toll/Interleukin 1 Receptor*) ou CC (*Coiled Coil*) no extremo N-terminal (Figura 2A) (LEE; YEOM 2015; LI et al., 2015; SUKARTA et al., 2016). Curiosamente, *Pto* não possui as características estruturais comumente encontradas nas proteínas de resistência envolvidas na ETI. No entanto, foi demonstrado que para cumprir a sua função em resistência, *Pto* precisa do gene *Prf*, o qual codifica uma proteína de tipo NBS-LRR (PEDLEY; MARTIN 2003).

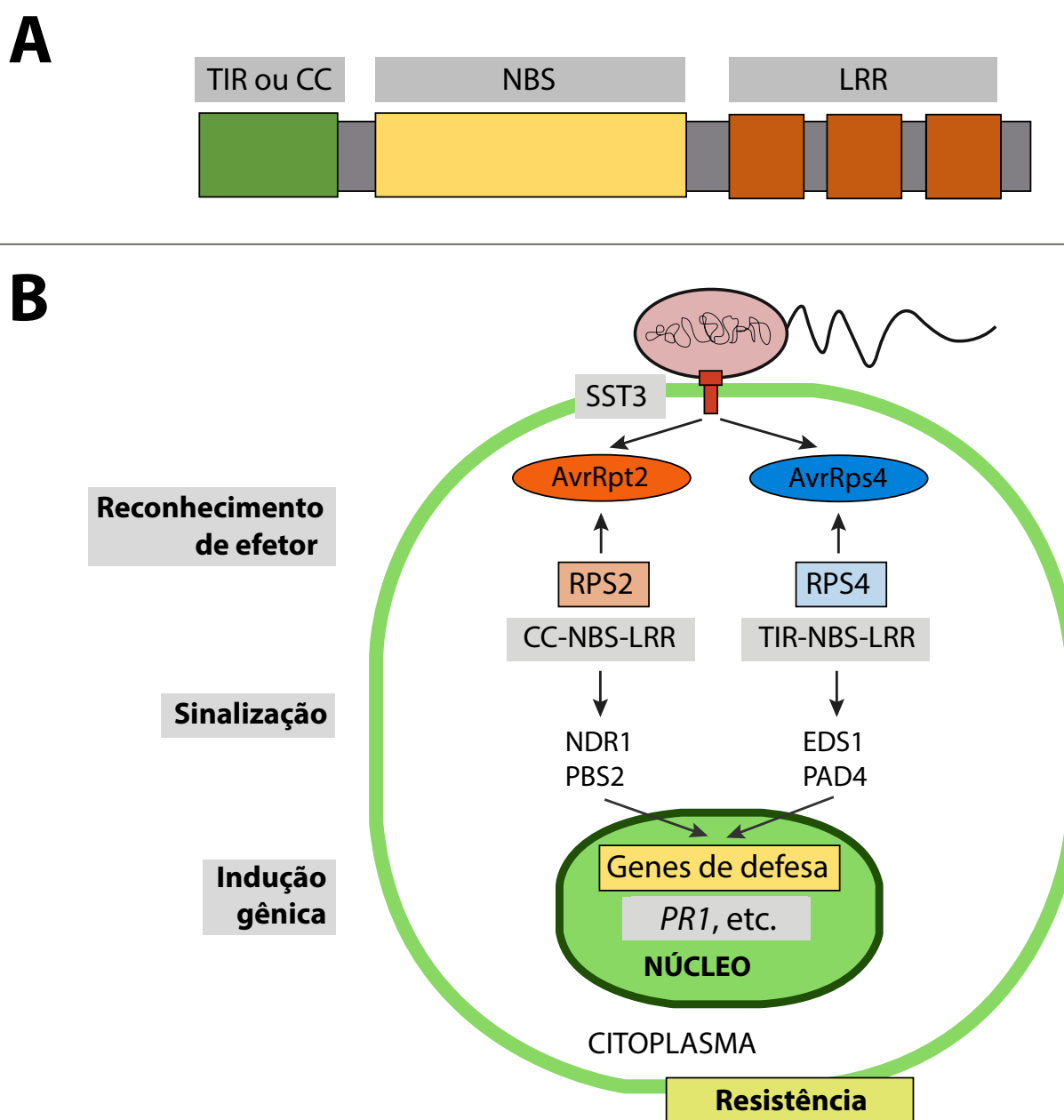


Figura 2 – Percepção de efetores citoplasmáticos por genes de resistência de tipo NBS-LRR e ativação da ETI. (A) Esquema representando a estrutura de genes de resistência que reconhecem efetores citoplasmáticos: os domínios funcionais TIR/CC, NBS e LRR são representados com retângulos verde, amarelo e laranja escuro, respectivamente. (B) Esquema diagramático simplificado representando o reconhecimento de efetores por proteínas de resistência (R), exemplificado pelas interações entre as proteínas AvrRpt2-RPS2 e AvrRps4-RPS4 em *Arabidopsis*. AvrRpt2 (oval laranja escuro) e AvrRps4 (oval azul escuro) são injetadas através do SST3 (retângulos vermelhos) no citoplasma da célula vegetal, no qual são reconhecidas pelas proteínas de resistência RPS2 (retângulo laranja claro) e RPS4 (retângulo azul claro), respectivamente. A sinalização desencadeada por RPS2 (proteína de tipo CC-NBS-LRR) envolve as proteínas NDR1 (*Non-race-specific Disease Resistance 1*) e PBS2 (*avrPphB Susceptible 2*), enquanto a sinalização desencadeada por RPS4 (proteína de tipo TIR-NBS-LRR) envolve as proteínas EDS1 e PAD4, em ambos os casos culminando na indução de genes de defesa e genes *PR*. As setas apontando para cima indicam o reconhecimento dos efetores. As linhas verde clara e verde escura representam a membrana plasmática e o envoltório nuclear da célula vegetal, respectivamente.

Acredita-se que o domínio LRR é responsável pelo reconhecimento da bactéria, seja mediante interação física direta com um efector ou através do reconhecimento de modificações resultantes da ação dos efetores. Por sua vez, o domínio NBS é envolvido na ativação da sinalização após o reconhecimento da bactéria usando hidrólise de ATP. Já os domínios CC e TIR são responsáveis pela interação com componentes da sinalização posterior à ativação causada pelo domínio NBS. Além da hidrólise de ATP, a ativação das proteínas NBS-LRR envolve mudanças na estrutura tridimensional que favorecem as interações intra e intermoleculares, as quais ajudam a modular a sinalização durante a resposta de defesa (BELKHADIR et al., 2004).

Além dos domínios NBS, LRR, CC e TIR, as proteínas de resistência podem possuir domínios que conferem funções adicionais. Por exemplo, a proteína RRS1 (*Resistance to Ralstonia solanacearum 1*) de *Arabidopsis* que confere resistência devido ao reconhecimento do efector Pop2 (DESLANDES et al., 2003), possui um domínio WRKY (triptofano – arginina – lisina – tirosina) no extremo C-terminal. O domínio WRKY é comumente presente em proteínas que funcionam como fatores de transcrição durante as respostas das plantas a estresse (JIANG et al., 2017). A proteína RRS1 forma um complexo heterodimérico com a proteína RPS4 (*Resistance to Pseudomonas syringae 4*), que medeia o reconhecimento de diversos fitopatógenos. Os genes *RRS1* e *RPS4* de *Arabidopsis* quando expressos em *N. benthamiana*, tomate, *Brassica rapa* e *B. napus*, conferem resistência contra diversos fungos fitopatogênicos (NARUSAKA et al., 2009, 2013, 2014). Essas observações indicam que é possível combinar alguns genes NBS-LRR para criar variedades com múltipla resistência.

1.3 Genes de resistência executores

A resistência das plantas contra algumas espécies de *Xanthomonas* e *Ralstonia* é baseada em outro tipo de genes de resistência. Essas espécies injetam no citoplasma da célula do hospedeiro proteínas efetoras que possuem sinais de localização no núcleo (NLS, *Nuclear Localization Signal*) e domínios de ativação da transcrição (AD, *Activation Domain*) nos

seus extremos C-terminais (Figura 3A). Essas proteínas efetoras quando no interior da célula vegetal se direcionam para o núcleo, no qual se ligam aos promotores de genes de suscetibilidade da planta, ativando a sua expressão e promovendo o parasitismo e a patogenicidade (Figura 3B). Desse modo, essas proteínas foram nomeadas efetores semelhantes a ativadores da transcrição (TAL, *Transcription Activator-Like*; também chamados TALE, *Transcription Activator-Like Effector*) (BOCH et al., 2014; ZHANG et al., 2015 b). Os efetores TAL ligam-se a sequências específicas nos promotores dos genes alvo conhecidas como elemento de ligação do efector (EBE, *Effector Binding Element*) ou ativado por efetores TAL (UPT, *UPregulated by TAL effectors*) (Figura 3B) (BOCH et al., 2014; BOGDANOVE et al., 2010; SCHANDRY et al., 2016; ZHANG et al., 2015b). Os efetores TAL possuem entre 33 e 35 sequências de aminoácidos repetitivas na sua porção central, as quais utilizam para reconhecer sequências específicas de nucleotídeos. Os resíduos de aminoácidos nas posições 12 e 13 das repetições, conhecidas como RVD (*Repeat Variable Di-residues*) por serem altamente variáveis, determinam o reconhecimento da sequência do promotor (Figura 3A) (DE LANGE et al., 2013; MOSCOU; BOGDANOVE 2009).

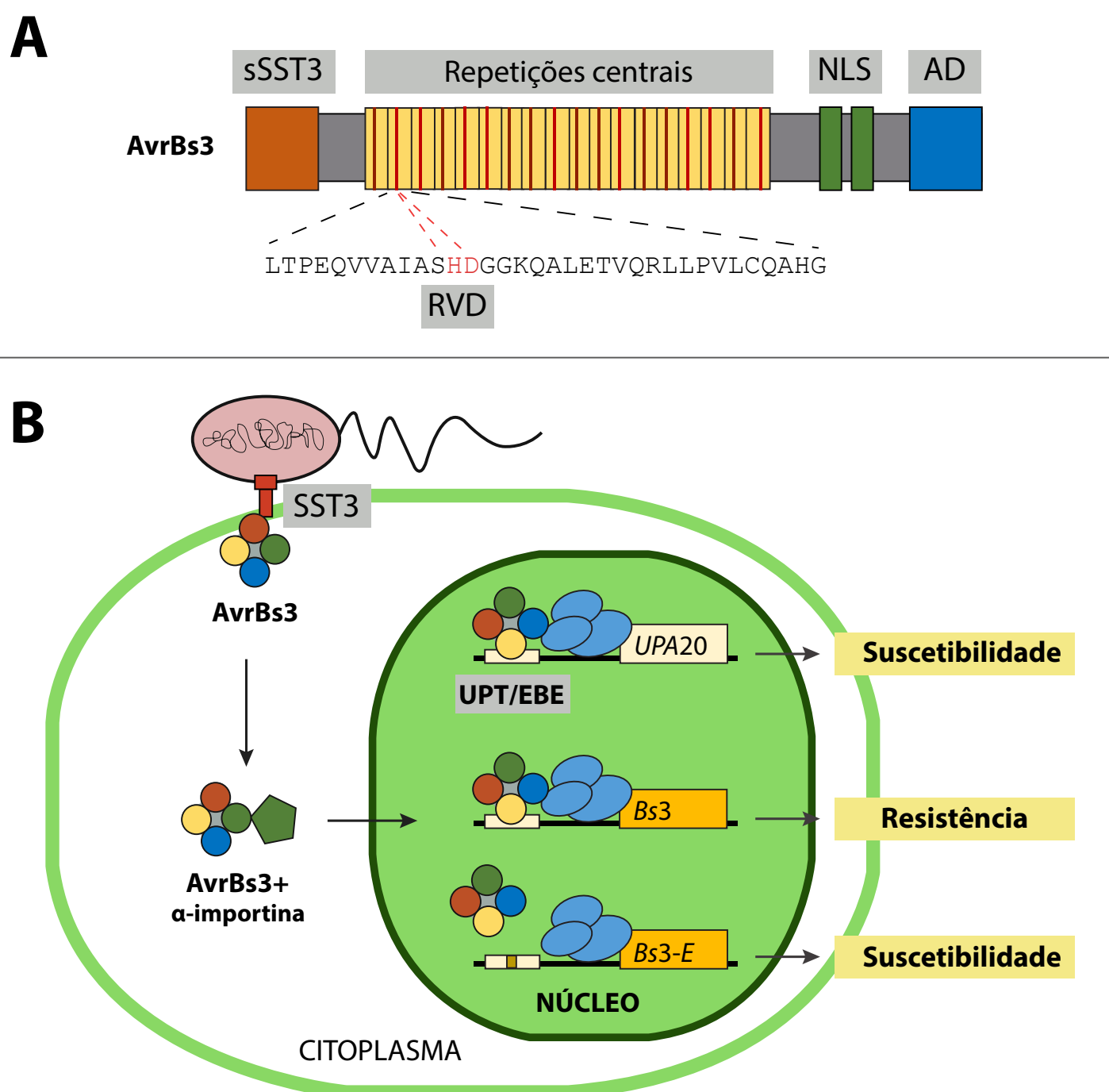


Figura 3 – Ativação de genes de resistência executores exemplificado pela interação AvrBs3-Bs3. (A) Esquema representando os domínios e motivos funcionais do efector TAL AvrBs3 de *Xanthomonas euvesicatoria*. O sinal de secreção pelo SST3 e o domínio de ativação da transcrição (AD) são representados com quadrados laranja escuro e azul, respectivamente. As repetições centrais e o sinal bipartida de localização no núcleo (NLS) são representados com retângulos amarelos e verdes, respectivamente. Cada repetição consiste de 35 aminoácidos (de sequência conservada, mas não idêntica), na qual os resíduos 12 e 13 (linhas verticais vermelhas no esquema e fonte vermelha na sequência) são altamente variáveis (chamadas RVD) e determinam o reconhecimento do promotor no gene alvo na planta. (B) Esquema diagramático simplificado representando a ativação da expressão gênica por AvrBs3, cujos domínios e motivos funcionais são representados usando círculos das mesmas cores que em (A). A bactéria injeta a proteína AvrBs3 através do SST3 (retângulos vermelhos) diretamente ao citoplasma da célula vegetal, na qual interage com a proteína α-importina (pentágono verde), direcionando-a para o núcleo onde se liga ao EBE/UPT (retângulo amarelo claro menor) no

promotor do gene alvo *UPA20* (retângulo amarelo escuro maior), para ativar a sua expressão usando o AD em associação com a RNA polimerase (ovais azuis), levando à suscetibilidade. Genótipos resistentes de pimentão possuem o gene de resistência executor *Bs3* (retângulo laranja superior) que é ativado por AvrBs3 desencadeando uma resposta de resistência. O alelo *Bs3-E* (retângulo laranja inferior) possui uma inserção de 13 pb (retângulo marrom) no EBE, fazendo que AvrBs3 não se ligue ao promotor, pelo qual a planta é suscetível. As linhas verde clara e verde escura representam a membrana plasmática e o envoltório nuclear da célula vegetal, respectivamente.

No entanto, alguns genótipos das plantas hospedeiras possuem genes que, ao serem ativados pelos efetores TAL, desencadeiam respostas de defesa que culminam na resistência contra a infecção. Tais genes de resistência têm sido nomeados executores ou terminadores (*executor* ou *terminator*) (Figura 3 B) (BOGDANOVE et al., 2010; TIAN et al., 2014; ZHANG et al., 2015b). Pelo fato desses genes de resistência serem ativados pelos efetores, a especificidade no reconhecimento do patógeno não é conferida pela sequência de aminoácidos da proteína de resistência, mas sim pela presença de um efector específico (GU et al., 2005; RÖMER et al., 2007, 2009).

Vários genes executores foram clonados, incluindo *Xa7*, *Xa10*, *Xa23* e *Xa27* de arroz e *Bs3* e *Bs4C-R* de pimentão (*Capsicum* spp.) (GU et al., 2005; RÖMER et al., 2007; STRAUSS et al., 2012; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2015a). Até a presente data, nenhum dos genes executores isolados codifica proteínas da classe NBS-LRR. As proteínas codificadas pelos genes executores não apresentam identidade entre elas, exceto pelas proteínas *Xa10* e *Xa23* de arroz, que conferem resistência contra *Xoo*. A maioria das proteínas codificadas por genes executores não apresenta similaridade com proteínas de função conhecida, mas se caracterizam por serem relativamente pequenas e possuírem múltiplos domínios transmembrana (BIMOLATA et al., 2013; GU et al., 2005; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2015a). A exceção é o gene *Bs3* que codifica uma proteína da família das flavina monoxigenases, da subclasse YUCCA (RÖMER et al., 2007, 2009). As flavina monoxigenases são enzimas que atuam na defesa contra patógenos e na síntese de auxina e glucosinolatos (MISHINA; ZEIER 2006; SCHLAICH 2007; ZHAO 2014).

Os genes executores apresentam polimorfismos na sequência dos seus promotores que determinam resistência ou suscetibilidade. Por exemplo,

estirpes de *Xanthomonas euvesicatoria* que possuem o efector AvrBs3 não conseguem induzir resistência em genótipos de pimentão que têm o gene *Bs3-E*, um alelo de *Bs3* que tem uma inserção de 13 pb no elemento de ligação do efector (EBE) (RÖMER et al., 2007; 2009). O promotor do gene *Bs3* é reconhecido pelos efetores AvrBs3 de *X. euvesicatoria* e AvrHah de *X. gardneri*, agentes causais de manchas bacterianas em pimentão e tomate (BONAS et al., 1989; SCHORNACK et al., 2008). De modo similar, a diferença entre o alelo *Bs4C-R* que confere resistência a *X. euvesicatoria* e o alelo *Bs4C-S* presente em genótipos suscetíveis é devido a um polimorfismo de dois nucleotídeos no EBE (STRAUSS et al., 2012). Observações semelhantes foram relatadas para *Xa10*, *Xa23* e *Xa27* (BIMOLATA et al., 2013; TIAN et al., 2014; WANG et al., 2015a). O mecanismo da resistência baseada na ativação de genes executores foi utilizado para gerar promotores com reconhecimento múltiplo para diversos efetores TAL, obtendo-se resistência contra diversos patógenos (RÖMER et al., 2009).

Na atualidade, inúmeros genes que conferem resistência contra bactérias fitopatogênicas foram isolados. As novas estratégias de mapeamento baseado em sequenciamento de nova geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) e ferramentas de Bioinformática, tais como genotipagem por sequenciamento (GBS, *Genotyping By Sequencing*) (HE et al., 2014) têm facilitado a identificação de locos associados com resistência a patógenos e a clonagem dos genes que conferem resistência. Informação sobre genes de resistência, como: as famílias às quais pertencem, suas sequências de nucleotídeos, suas características estruturais e outros aspectos, estão cada vez mais emergentes e acessíveis na literatura científica e nas bases de dados. A plataforma PRG-Wiki (*Plant Resistance Gene Wiki*) é um banco de dados alimentado pela comunidade científica, que contém informações sobre genes de resistência ou potencialmente envolvidos em resistência, que pode ser acessada livremente no endereço prgdb.crg.eu. O acesso livre a tal informação facilita estudos mais aprofundados sobre as interações planta-patógeno.

2 RESISTÊNCIA DE PLANTA NÃO HOSPEDEIRA A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A resistência manifestada por uma espécie vegetal contra todos os isolados de um mesmo patógeno é conhecida como resistência de planta não hospedeira (MYSORE; RYU 2004; NÜRNBERGER; LIPKA 2005). Esse tipo de resistência é geralmente conferido pela ação conjunta de vários genes que controlam diversas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da planta, e, portanto, é considerada mais durável que a resistência da planta hospedeira, mediada por interações do tipo gene-a-gene (MYSORE; RYU 2004; NIKS; MARCEL 2009; SENTHIL-KUMAR; MYSORE 2013). A resistência exibida pela planta não hospedeira pode resultar ou não na resposta de hipersensibilidade. Sendo assim, essa resistência é classificada em dois grupos: Tipo I, a qual não resulta em sintomas visíveis (também denominada de imunidade), e Tipo II, que é associada com o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade (MYSORE; RYU 2004).

A resistência de planta não hospedeira é considerada como uma alternativa importante para o desenvolvimento de cultivares com resistência durável, mas é difícil de ser usada nos programas de melhoramento (AYLIFFE; LAGUDAH 2004; ZHAO et al., 2005). Essa dificuldade se deve a vários fatores: (1) a natureza poligênica da resistência da planta não hospedeira, (2) a carência de genótipos suscetíveis na população da espécie não hospedeira, o que torna difícil identificar e mapear os genes que determinam a resistência, e (3) a dificuldade de cruzar plantas não hospedeiras com plantas hospedeiras, especialmente se essas espécies são evolutivamente distantes. Essa dificuldade limita a transferência da resistência presente nas plantas não hospedeiras para espécies cultivadas. Muitos cruzamentos interespecíficos geralmente estão associados com esterilidade dos híbridos, padrões de segregação anormais e outras características que limitam os estudos de genética clássica.

No entanto, a herança da resistência na planta não hospedeira pode ser estudada se cruzamentos interespecíficos entre espécies não hospedeiras e hospedeiras são possíveis, ou gerando variações na resistência da espécie

não hospedeira através de mutagênese ou silenciamento gênico (NIKS; MARCEL 2009). Outra possibilidade é utilizar espécies marginais, as quais são predominantemente não hospedeiras do patógeno, porém alguns genótipos raros possuem um nível baixo de suscetibilidade. Geralmente a resistência em espécies não hospedeiras marginais tem uma herança do tipo quantitativa (NIKS; MARCEL 2009). Os genes que conferem resistência identificados em espécies não hospedeiras podem ser posteriormente transferidos a plantas hospedeiras mediante transgenia.

Acredita-se que alguns dos mecanismos de resistência das plantas não hospedeiras são particularmente efetivos contra bactérias. Isto porque os modos de penetração, colonização do tecido e aquisição de nutrientes das bactérias são diferentes daqueles dos patógenos filamentosos (SENTHIL-KUMAR; MYSORE 2013). A grande maioria das bactérias penetra o tecido através de aberturas naturais ou ferimentos e coloniza os espaços intercelulares, onde estabelece a interação com as células do hospedeiro. Portanto, a resistência da planta não hospedeira deve limitar a penetração das bactérias utilizando tanto defesas estruturais pré-formadas, tais como as camadas cerosas, quanto induzíveis como, por exemplo, o fechamento estomático (MELOTTO et al., 2008), consequentemente limitando o crescimento populacional bacteriano no apoplasto. Além disso, a produção de compostos antimicrobianos pré-formados e induzidos, tais como as fitoanticipinas e fitoalexinas respectivamente, também contribuem para resistência da planta não hospedeira contra patógenos não adaptados (SENTHIL-KUMAR; MYSORE 2013).

Mecanismos relacionados com o reconhecimento de moléculas bacterianas, tais como MAMPs/PAMPs ou proteínas efetoras, também podem contribuir para a resistência de planta não hospedeira (LI et al., 2005; SOHN et al., 2012; THORDAL-CHRISTENSEN 2003). Uma vez que MAMPs/PAMPs são moléculas conservadas em diversas espécies bacterianas, é provável que elas induzam PTI tanto em plantas hospedeiras quanto em não hospedeiras. No entanto, os patógenos adaptados conseguem suprimir PTI e causar infecção (LI et al., 2005; TRUMAN et al., 2006). O suporte a essa linha de raciocínio é a observação de que estirpes estreitamente

relacionadas mostram patogenicidade diferencial para espécies vegetais. Por exemplo, a estirpe DC3000 de *Pst* infecta tomate (*Solanaceae*) e *A. thaliana* (*Brassicaceae*), enquanto a estirpe T1 só consegue infectar o tomate. As estirpes DC3000 e T1 possuem um repertório de efetores em comum, mas alguns outros efetores são específicos para cada estirpe, os quais poderiam determinar a gama de hospedeiros, mediante supressão de defesa em espécies vegetais específicas (ALMEIDA et al., 2009b; YAN et al., 2008). O envolvimento da PTI na resistência do tipo não hospedeira foi demonstrada em plantas de *N. benthamiana* e *Arabidopsis* nas quais o gene *FLS2* foi silenciado. Essas plantas mostraram suscetibilidade a diferentes patovares não adaptados de *P. syringae* (HANN; RATHJEN 2007).

Acredita-se que em alguns casos a resistência de planta não hospedeira é o resultado do reconhecimento de efetores do patógeno e, portanto, é semelhante à ETI que acontece nas plantas hospedeiras (SENTHILKUMAR; MYSORE 2013). Existem relatos de plantas não hospedeiras que reconhecem efetores de patógenos não adaptados. Por exemplo, os genes de resistência *Rpg2* e *Rpg4* em plantas de soja medeiam o reconhecimento dos efetores AvrA e AvrD de *Pst* (ASHFIELD et al., 1995; KEEN et al., 1991) e o gene *Rxo1* em plantas de milho (*Zea mays*) medeia o reconhecimento do efector AvrRxo1 de *Xoo* (ZHAO et al., 2004). Por outro lado, patógenos não adaptados podem causar doença em plantas não hospedeiras quando alguns dos seus genes efetores são mutados. Por exemplo, *Pst* DC3000 pode causar sintomas de doença em plantas de *N. benthamiana* se o efector *hopQ1-1* é mutado (WEI et al., 2007). Essas observações indicam que, pelo menos em alguns casos, a resistência exibida pela planta não hospedeira pode ser baseada em ETI.

Entre os compostos pré-formados com atividade antibacteriana produzidos pelas plantas não hospedeiras relatam-se as fitoanticipinas. Por exemplo, a fragarina produzida pelo morango (*Fragaria ananassa*) inibe o crescimento de diversas bactérias fitopatogênicas (FILIPPONE et al., 1999). Por sua vez, glucosinolatos produzidos pelas brássicas causam redução do crescimento de várias bactérias fitopatogênicas não adaptadas, incluindo *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* (*Psp*) (agente causal do crestamento bacteriano

aureolado do feijoeiro; *Phaseolus vulgaris*) e *P. savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) (agente causal do crestamento bacteriano da soja) (AIRES et al., 2009; BASKAR et al., 2012; FAN et al., 2011). Compostos cuja síntese é induzida pela presença do patógeno também são importantes para conter o crescimento bacteriano. Esses compostos podem participar na formação de barreiras físicas ou possuir atividade antibacteriana. As deposições de calose, lignina e suberina são frequentemente induzidas em plantas não hospedeiras em resposta a bactérias fitopatogênicas não adaptadas. Por exemplo, a formação de papila foi observada quando plantas de alface (*Lactuca sativa*) foram inoculadas com *Psp* (BESTWICK et al., 1995, 1997). Também tem sido relatado que a fitoalexina camalexina se acumula em plantas de *Arabidopsis* em resposta à inoculação com *P. syringae* pv. *syringae* (*Pss*) (TSUJI et al., 1992). Outros compostos, tais como o sulforafano, também se acumulam no apoplasto de plantas de *Arabidopsis* e inibem o crescimento de diversos patovares de *P. syringae* (BEDNAREK 2012a, 2012b). Essas observações são consistentes com a indução de genes que participam na síntese de fitoalexinas, como o gene que codifica para síntese de fenilalanina amônia-liase (PAL, *Phenylalanine Ammonia-Lyase*), que foi observada em plantas de *Arabidopsis* inoculadas com as bactérias não adaptadas *Psg* e *Psp* (MISHINA; ZEIER 2007).

As resistências contra a infecção bacteriana das plantas hospedeiras e não hospedeiras parecem compartilhar alguns mecanismos (GILL et al., 2015). Por exemplo, em ambos os tipos de resistência estão envolvidas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e a síntese de fitohormônios como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e ácido abscísico (ABA) (AN; MOU 2012; LI et al., 2012b; MISHINA; ZEIER 2007; VAN WEES; GLAZEBROOK 2003). Em *Arabidopsis* a resistência contra patógenos não adaptados depende da sinalização mediada pelo ácido salicílico (AN; MOU 2012; VAN WEES; GLAZEBROOK 2003) e da indução dos genes *PAD4* (*PhytoAlexin-Deficient 4*) e *PR1* (*Pathogenesis-Related 1*) (ROJAS et al., 2012). Os genes *NHO1* (*NONHOST 1*), que codifica para a síntese de uma glicerina quinase, *SGT1* (*Suppressor of the G2 allele of S-phase kinase-associated protein 1*) e *EDS1* (*Enhanced*

Disease Susceptibility 1) são requeridos tanto para a resistência de plantas hospedeiras quanto de não hospedeiras (AARTS et al., 1998; GLAZEBROOK 2001; HAM et al., 2007; KANG et al., 2003; LU et al., 2001; MOREAU et al., 2012; ROJAS et al., 2012). Em *Arabidopsis*, os genes *EDS1*, *WRKY46*, e *WRKY54* são importantes para restringir o crescimento de *Erwinia amylovora*, uma bactéria não adaptada (MOREAU et al., 2012). Em *N. benthamiana*, a MAP quinase NbMKK1 (TAKAHASHI et al., 2007) e o fator responsivo ao etileno NbCD1 (NASIR et al., 2005) também são importantes para responder a infecção de patógenos não adaptados. As MAP quinases (MAPK; *Mitogen-Activated Protein Kinases*) são enzimas que participam nos processos de sinalização mediante fosforilação de proteínas (HANN; RATHJEN 2007; SEGONZAC; ZIPFEL 2011). A similaridade entre os mecanismos moleculares envolvidos em ambos os tipos de resistência tem tornado possível a transferência de alguns genes que conferem resistência em plantas não hospedeiras para plantas hospedeiras (JOHNSTON et al., 2013; ZHAO et al., 2005). Por exemplo, o gene *Rxo1* foi transferido do milho para arroz utilizando transgenia e confere resistência a todas as raças de *X. oryzae* pv. *oryzicola* e também a *Burkholderia andropogonis* (ZHAO et al., 2004, 2005).

A participação de vários outros genes na resistência de planta não hospedeira contra bactérias tem sido estudada usando abordagens como silenciamento gênico mediado por vírus (VIGS, *Virus-Induced Gene Silencing*) e mutagênese aleatória usando etil metanosulfonato (EMS). Estudos realizados em *N. benthamiana* mostraram que os genes que codificam para esqualeno sintetase (*SQS*), glicolato sintase (*GOX*), ornitina aminotransferase (*dOAT*) e prolina desidrogenase (*ProDH*) estão envolvidos na resistência de planta não hospedeira contra diversas bactérias fitopatogênicas (ROJAS et al., 2012; SENTHIL-KUMAR; MYSORE 2013; WANG et al., 2010, 2012). Os genes que foram associados com a resistência de planta não hospedeira possuem diversas funções bioquímicas, incluindo percepção de PAMPs, reconhecimento de efetores, sinalização, fatores de transcrição e metabolismo, provavelmente refletindo a complexidade deste tipo de resistência (Tabela 2). Apesar de esses genes terem sido identificados

em plantas modelo, como *A. thaliana* e *N. benthamiana*, existem relatos evidenciando que podem conferir resistência contra patógenos de plantas cultivadas de importância econômica.

Tabela 2. Exemplos de genes associados com resistência de planta não hospedeira.

Planta/Gene	Nome em inglês	Espécie bacteriana	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>BAK1 (SERK3)</i>	<i>Brassinosteroid-associated kinase 1</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Roux et al. (2011)
<i>EDS1</i>	<i>Enhanced disease susceptibility 1</i>	<i>Erwinia amylovora</i> ; <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	An e Mou (2012); Moreau et al. (2012)
<i>EDS5</i>	<i>Enhanced disease susceptibility 5</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	An e Mou (2012)
<i>FLS2</i>	<i>Flagellin-sensing 2</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Ishiga et al. (2011)
<i>GOX</i>	<i>Glycolate oxidase</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Rojas et al. (2012)
<i>NHO1</i>	<i>Non-host resistance 1 (glycerol kinase)</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Kang et al. (2003); Lu et al. (2001)
<i>NPR1 (NIM1)</i>	<i>Nonexpressor of PR-genes 1</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Rojas et al. (2012)
<i>NUDT7</i>	<i>Nucleotide diphosphate hydrolase 7</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Ge et al. (2007)
<i>PAD4</i>	<i>Phytoalexin-deficient 4</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	An e Mou (2012)
<i>PMR4 (GLS5)</i>	<i>Powdery mildew resistant 4</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Ham et al. (2007)
<i>SID2</i>	<i>Isochorismate synthase 1</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Ham et al. (2007)
<i>SQS1</i>	<i>Squalene synthase 1</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	Wang et al. (2012)
<i>Nicotiana benthamiana</i>			
<i>ACE112</i>	<i>Avr/Cf-elicited 112</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ACE117</i>	<i>Avr/Cf-elicited 117 (hydrolase)</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Planta/Gene	Nome em inglês	Espécie bacteriana	Referência
<i>Nicotiana benthamiana</i>			
<i>ACE175</i>	<i>Avr/Cf-elicited 175</i> (peroxidase)	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ACE35</i>	<i>Avr/Cf-elicited 35</i> (calreticulin protein)	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ACE43</i>	<i>Avr/Cf-elicited 43</i> (ERF transcriptional factor)	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ACE80</i>	<i>Avr/Cf-elicited 80</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ACE95</i>	<i>Avr/Cf-elicited 95</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Li et al. (2012b)
<i>ARF1</i>	<i>ADP-ribosylation</i> <i>factor 1</i>	<i>P. cichorii</i>	Coemans et al. (2008)
<i>CD1</i>	<i>ERF protein</i> <i>cDNA 1</i>	<i>P. cichorii</i>	Nasir et al. (2005)
<i>FLS2</i>	<i>Flagellin-sensing 2</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Hann e Rathjen (2007)
<i>GOX</i>	<i>Glycolate</i> <i>oxidase</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Rojas et al. (2012)
<i>HSP90</i>	<i>Heat shock protein 90</i>	<i>P. cichorii</i>	Kanzaki et al. (2003)
<i>MKK1</i>	<i>Mitogen-activated</i> <i>protein kinase kinase 1</i>	<i>P. cichorii</i>	Takahashi et al. (2007)
<i>PAO</i>	<i>Polyamine oxidase</i>	<i>P. cichorii</i>	Yoda et al. (2009)
<i>ProDH1/</i> <i>ProDH2</i>	<i>Proline</i> <i>dehydrogenase</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Senthil-Kumar e Mysore (2012)
<i>SGLP</i>	<i>S-glycoprotein-</i> <i>like protein</i>	<i>P. cichorii</i>	Maimbo et al. (2010)
<i>SGT1</i>	<i>Suppressor of</i> <i>G2 allele of SKP1</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Peart et al. (2002)
<i>SIPK</i>	<i>Salicylic acid-induced</i> <i>protein kinase</i>	<i>P. cichorii</i>	Sharma et al. (2003)
<i>SQS</i>	<i>Squalene synthase</i>	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> ; <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> ; <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Wang et al. (2012)
<i>VDAC</i>	<i>Voltage-dependent</i> <i>anion channel</i>	<i>P. cichorii</i>	Tateda et al. (2009)
<i>WIPK</i>	<i>Wound-induced</i> <i>protein kinase</i>	<i>P. cichorii</i>	Sharma et al. (2003)
<i>ZIP60</i>	<i>Basic region</i> <i>Leucine zipper protein</i>	<i>P. cichorii</i>	Tateda et al. (2008)

3 RESISTÊNCIA IDENTIFICADA EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O melhoramento de plantas visando à resistência a doenças causadas por bactérias representa uma valiosa ferramenta para a agricultura, visto a dificuldade no manejo dessas doenças usando compostos antibacterianos. A associação de diferentes medidas de manejo é muito importante para atingir níveis da doença que não representem perdas econômicas consideráveis. Nessa associação de métodos, o uso de resistência genética é considerado mais desejável devido a seu baixo impacto ambiental. É essencial para o sucesso do melhoramento vegetal, o conhecimento dos fatores envolvidos nas interações planta-bactéria, para identificar alternativas potencialmente aplicáveis na geração de cultivares com resistência satisfatória.

A resistência genética de plantas hospedeiras a doenças pode ser classificada em dois tipos: qualitativa, a qual é governada por um gene (monogênica) de efeito principal; ou quantitativa, que geralmente é conferida por vários genes (poligênica) cujos efeitos são aditivos (GURURANI et al., 2012). O fenótipo da resistência qualitativa é do tipo “tudo ou nada” ou completa, onde os genótipos possuidores do gene de resistência não apresentam sintomas da doença, ao passo que a resistência quantitativa é parcial, ou seja, tem-se a doença em vários níveis (VALE et al., 2001). Geralmente, a resistência quantitativa é considerada durável e efetiva contra diversas raças ou variantes do patógeno, enquanto que a resistência qualitativa é raça-específica e frequentemente considerada pouco durável, particularmente em interações em que o patógeno possui alto potencial evolutivo (LOPES; BOITEUX 2012).

O conhecimento do tipo de resistência que atua contra um determinado patógeno é importante não só para o desenvolvimento de variedades resistentes nos programas de melhoramento, mas também para a implementação de estratégias de manejo em campo, visando aumentar e sustentar a durabilidade da resistência. O mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) tem dado a possibilidade de identificar locos ligados a genes associados a várias características quantitativas de interesse, inclusive genes

que conferem resistência a doenças de plantas (YOUNG 1996).

A seguir serão apresentados alguns exemplos de resistência que agem contra bactérias fitopatogênicas em culturas de importância econômica e os avanços na identificação dos genes da planta responsáveis pela resistência. A Tabela 3 apresenta exemplos de alguns marcadores moleculares ligados a QTLs associados à resistência contra bactérias fitopatogênicas em diversas culturas. Cabe salientar que existem relativamente poucos exemplos de genes de resistência a bactérias que foram isolados, clonados e estão efetivamente sendo utilizados comercialmente nas principais cultivares de plantas, sendo os principais exemplos referentes a genes qualitativos, que devido à sua natureza são mais fáceis de serem transferidos entre diferentes cultivares e/ou espécies.

3.1 Soja

Na soja as perdas econômicas devido à pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*), dependendo do local e das condições climáticas, podem-se tornar devastadoras (LAVIOLETTE et al., 1970). Inicialmente Hartwig e Lehman (1951) e Feaster (1951) propuseram que a resistência de soja a *Xag* pode ser conferida por apenas um gene recessivo, denominado *rxp*, identificado com base no cruzamento do genótipo CNS (resistente) com genótipos suscetíveis. Posteriormente, Manjaya e Pawar (1999), cruzando a cultivar P-4-2 (resistente) com a cultivar Monetta (suscetível) relataram a presença de genes recessivos duplicados, observando o padrão de segregação de 15 plantas suscetíveis para 1 resistente. Os autores relataram a presença de dois genes de resistência recessivos que conferem alto nível de resistência à pústula bacteriana. Van et al. (2004) criaram linhagens recombinantes a partir do cruzamento entre as cultivares Danbaekkong (resistente) e Suwom (suscetível) e utilizaram marcadores microssatélite (SSR; *Simple Sequence Repeat*) para identificar o marcador Sat372 ligado a um QTL associado a resistência no cromossomo 17, efetivo contra seis estirpes da bactéria coletadas no campo.

Tabela 3. Exemplos de QTLs associados à resistência a doenças causadas por bactérias fitopatogênicas em culturas de importância econômica.

Hospedeiro	Patógeno	Marcadores moleculares de QTL*	Referência
Damasco (<i>Prunus armeniaca</i>)	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	BPPCT037 e BPPCT038A - SSR	Socquet-Juglard et al. (2013)
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	SAP6 - SCAR	Miklas et al. (2003)
	<i>X. fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>	BMp10s244 - SSR	Zhu et al. (2016)
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	SSRY83 - SSR	Wydra et al. (2004)
Soja (<i>Glycine max</i>)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Sat372, Cr. 17 - SSR	Van et al. (2004)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>Ralstonia solanacearum</i>	TG153, Cr. 6 - RFLP	Carmeille et al. (2006)
	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	TOM49 - SSR, Rx3-L, e CosOH73, Cr. 5 - SNP ⁴	Yang et al. (2005b)
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	bsRr1-1, Cr. 1; bsRr1-2, Cr. 2; bsRr1-12a e bsRr1-12b, Cr. 12 - SMA	Thapa et al. (2015)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>X. translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Xwmc291 Cr. 3B e Xbarc3 Cr. 6A - SSR	Kandel et al. (2015)

* Cr., Cromossomo; SCAR, *Sequence Characterized Amplified Region*; RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*; SMA, *Single Marker Analysis*; SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*; SSR, *Simple Sequence Repeat* (microsatélite)

Outra doença bacteriana importante da cultura da soja é o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*). A herança da resistência a *Psg* tem sido objeto de numerosos estudos. Inicialmente, observou-se que distintos genótipos de soja expressavam diferentes graus de suscetibilidade para determinados isolados de *Psg* indicando a existência de várias raças fisiológicas. Isto foi observado pela primeira vez por Cross et al. (1966), que identificaram sete raças (1 a 7) com base nas respostas de sete genótipos diferenciais. Posteriormente, Fett e Sequera (1981) determinaram mais duas raças (8 e 9), Abo-Moch et al. (1995) identificaram a presença da raça 10, e duas outras raças (11 e 12) foram encontradas na China (GAO 1998). Apesar da descrição de várias

raças, há quase 20 anos, a raça 4 ainda é dominante na cultura da soja, sendo considerada a raça mais agressiva e disseminada no mundo (VIDIĆ et al., 2013).

Com base na distinção de diferentes raças verificou-se que as mesmas possuem diferentes genes de avirulência (*avr*), capazes de causar doença na soja apenas na ausência do gene de resistência correspondente. Inicialmente, Staskawicz et al. (1984) encontraram o gene de avirulência *avrA* na raça 6, que provoca uma resposta de hipersensibilidade em genótipos de soja com o gene de resistência *Rpg2*. Posteriormente os genes de avirulência *avrB* e *avrC* foram encontrados nas raças 0 e 1, e os correspondentes genes de resistência *Rpg1* e *Rpg3* (STASKAWICZ et al., 1987). Estudos recentes indicam a existência de outros três genes de avirulência, designados *avrE*, *avrF* e *avrG* nas raças 2, 3 e 8, respectivamente (FARHATULLAH et al., 2016). Segundo esses autores, os genes de resistência complementares são *Rpg5*, *Rpg6* e *Rpg7*, respectivamente. Para a raça 4, a mais agressiva, nenhum gene *avr* foi encontrado em isolados bacterianos que infectam soja. Por outro lado, o gene *avrD* foi encontrado na bactéria *Pst*, que infecta o tomateiro (KOBAYASHI et al., 1989, 1990). Quando este gene de avirulência (*avrD*) foi incorporado à raça 4 de *Psg*, verificou-se que genótipos de soja com o gene *Rpg4* exibiram resposta de hipersensibilidade (KEEN; BUZZELL 1991). Uma vez que não existe fonte de resistência à raça 4 em genótipos de soja, supõe-se que o gene *avrD* em *Psg* tenha sofrido mutação, evitando assim a resposta imune (KEITH et al., 1997). Assim, a natureza dominante da raça 4 no campo e a dificuldade em achar fontes de resistência no banco de germoplasma da soja, fazem com que o trabalho de melhoramento convencional da soja para resistência a *Psg* seja mais difícil.

3.2 Feijão

Na cultura do feijoeiro, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, estima-se que a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), agente etiológico do crestamento bacteriano comum, cause uma redução de 10,5 - 78 kg na produção para cada 1% de acréscimo na severidade da doença (ALLEN; LENNE 1998). A herança da resistência do feijoeiro a

Xap já foi relatada como sendo tanto do tipo qualitativa (CHATAIKA et al., 2011; SILVA et al., 1989; TRYPHONE et al., 2012; ZAPATA et al., 2011) como quantitativa (COYNE; SCHUSTER 1974; GILBERTSON; MAXWELL 1992; SINGH; MUÑOZ 1999). Em estudos na busca de fontes de resistência, Miklas et al. (2003) identificaram um marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) ligado a um QTL associado à resistência ao crestamento bacteriano proveniente da cultivar Montana No. 5. O padrão de segregação em progênies de cruzamentos entre os genótipos PR0313-58 x Rosada Nativa foi de 3 resistentes para 1 suscetível, sugerindo herança monogênica à estirpe *Xap* 3353 (ZAPATA et al., 2011). No entanto, nenhum gene de resistência qualitativa foi caracterizado até o momento. O crestamento bacteriano no feijoeiro pode ser causado também por *X. fuscans* subsp. *fuscans* (*Xff*), sendo essa espécie considerada uma variante mais agressiva de *Xap*, que foi reclassificada na categoria taxonômica de espécie por Schaad et al. (2005). Recentemente, Zhu et al. (2016) identificaram o marcador SSR BMp10s244 no cromossomo 10 e genes candidatos associados com resistência ao crestamento bacteriano na cultivar Longyundou 5 resistente a *Xff* estirpe XSC3-1.

3.3 Arroz

A bactéria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) é o agente etiológico do crestamento foliar bacteriano, uma doença devastadora principalmente nos países produtores da Ásia. O patossistema arroz-*Xoo* é um dos mais estudados, devido principalmente à importância mundial da cultura, às perdas da produção causadas pela doença e à alta variabilidade genética do patógeno (SONG; GOODMAN 2001). Esse patossistema é um importante exemplo de controle de bacterioses com o uso de resistência genética.

Até o momento 40 genes de resistência a *Xoo* foram identificados, designados pela série *Xa*. Dentre eles, 14 são recessivos (*xa5*, *xa8*, *xa13*, *xa15*, *xa19*, *xa20*, *xa24*, *xa25*, *xa26b*, *xa28*, *xa31*, *xa32*, *xa33* e *xa34*) e os demais dominantes (CHEN et al., 2011; KIM et al., 2015; ZHANG et al., 2015a). Dos genes descritos, nove (*Xa1*, *Xa3/Xa26*, *xa5*, *Xa10*, *xa13*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25* e *Xa27*) já foram clonados e caracterizados codificando cinco

tipos de proteínas, sugerindo múltiplos mecanismos de resistência a *Xoo* mediada pelos genes *R* (KIM et al., 2015). Os genes *R* estão distribuídos entre nove cromossomos do arroz e 12 dos genes *R* são agrupados intensamente no cromossomo 4 (*Xa1*, *Xa2*, *Xa12*, *Xa14*, *Xa30* e *Xa31*) e no cromossomo 11 (*Xa3/26*, *Xa4*, *Xa10*, *Xa21*, *Xa22* e *Xa23*) (KIM et al., 2015). Recentemente, Djedatin et al. (2016) identificaram cinco QTLs associados à resistência em diferentes cromossomos, três destes com especificidades diferentes para estirpes da África e da Ásia, e dois co-localizados com genes de resistência já identificados. Poucas informações são encontradas na literatura a respeito da durabilidade da resistência a *Xoo*, mas sabe-se que os genes *xa5* e *xa13* quando combinados em cultivares de arroz promovem nível de resistência mais alto que quando utilizados individualmente (IYER-PASCUZZI; McCOUCH 2007; SHANTI et al., 2001).

Os genes de resistência introgridos no arroz são em sua maioria derivados de cultivares de *O. sativa* e de espécies silvestres relacionadas, incluindo *O. longistaminata*, *O. rufipogon*, *O. minuta*, *O. officinalis* e *O. nivara* (BRAR; KHUSH 1997; CHEEMA et al., 2008; LEE et al., 2003). Além disso, alguns genes ou alelos *R* foram produzidos por mutantes de linhagens de arroz cultivadas (GAO et al., 2002; LEE et al., 2003; NAKAI et al., 1988). Dentre os genes de resistência identificados, o *Xa4* tem sido amplamente utilizado em programas de melhoramento em todo o mundo e tem desempenhado um importante papel no controle do cretamento bacteriano na Ásia desde a década de 1980 (ZHANG 1991). Outro importante gene é o *Xa21* derivado da espécie silvestre *O. longistaminata*, que tem sido amplamente utilizado em toda a Ásia desde a década de 1990 por possuir amplo espectro de resistência às raças de *Xoo* (TU et al., 1998; ZHAI et al., 2001).

Cultivares de arroz com resistência baseada em genes executores já têm sido utilizadas. Nas últimas décadas, o gene *Xa23*, identificado a partir da espécie *O. rufipogon*, tornou-se o gene mais popular para uso em programas de melhoramento do arroz na China (TU et al., 1998; ZHANG et al., 2015a). Além dele, o gene *Xa10* também tem sido utilizado em condições de campo fornecendo resistência efetiva contra *Xoo* (MISHRA et al., 2013;

VERA CRUZ et al., 2000). Outros genes executores foram incluídos em programas de melhoramento como, por exemplo, *Xa7* e *Xa27* (HUANG et al., 2012; LUO et al., 2012; LUO; YIN 2013; PEREZ et al., 2008). Ensaios em campo têm revelado que a resistência baseada em genes executores pode ser durável, como no caso do gene *Xa7* nas Filipinas (VERA CRUZ et al., 2000).

Contudo, a constante introdução de genes *R* que incitam respostas de defesa mediante o reconhecimento de proteínas de avirulência, frequentemente resulta em uma alteração na diversidade das populações de *Xoo* (KEEN 1990; LEACH; WHITE 1996). Esse processo leva à emergência de novas raças do patógeno que podem suplantam a resistência implantada (ZENG et al., 2002). Até o momento, 30 raças de *Xoo* já foram descritas no mundo (ELLUR et al., 2016). Assim, a busca de novos genes de resistência nos parentes silvestres de arroz e a piramidação de genes de resistência têm sido as estratégias mais utilizadas visando fornecer resistência durável contra *Xoo* (PRADHAN et al., 2016; ZHANG et al., 2006). Entretanto, realizar a piramidação de genes por meio de métodos de melhoramento convencionais é um processo difícil, devido aos efeitos de dominância e epistasia dos genes que governam a resistência à doença. Além disso, genes com reações semelhantes a duas ou mais raças são difíceis de identificar e transferir através de abordagens convencionais. Contudo, a disponibilidade de marcadores moleculares ligados a cada um dos genes de resistência torna possível a transferência e piramidação desses genes (SUH et al., 2013).

3.4 Mandioca

Na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*) um dos principais motivos de perda na produção é o crestamento bacteriano causado por *X. axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*). Em ataques severos, pode ocorrer a destruição da parte aérea da planta e decréscimo na produção de raízes (ALMEIDA et al., 2009a). A resistência de plantas de mandioca a *Xam* só tem sido relatada como do tipo poligênica, existindo introgressão de genes a partir da espécie silvestre *M. glaziovii* (HAHN 1978). Vários estudos foram realizados visando identificar acessos com resistência qualitativa, no entanto não se observou

resposta de hipersensibilidade em nenhuma das interações entre genótipos da planta e estirpes da bactéria (JORGE et al., 2001; LOPES; BOITEUX 2012; MIURA et al., 1990; VERDIER et al., 2004). Não obstante, vários QTLs associados à resistência foram identificados ao estudar populações derivadas do cruzamento entre a cultivar elite TMS30572 desenvolvida no IITA (*International Institute of Tropical Agriculture*) e a cultivar CM2177-2 desenvolvida no CIAT (*Centro Internacional de Agricultura Tropical*) (WYDRA et al., 2004). Posteriormente, Soto-Sedano et al. (2017) utilizando técnicas de bioinformática identificaram quatro genes nos intervalos dos QTLs nesse cruzamento. Entretanto, nenhum desses genes identificados tinha sido previamente associado à resistência contra patógenos.

3.5 Trigo

A queima das folhas causada por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a mancha basal da gluma causada por *P. syringae* pv. *atrofaciens* e a estria bacteriana causada por *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (*Xtu*) são as bacterioses mais frequentes e importantes na cultura do trigo (MARAITE et al., 2007). Estudos sobre a resistência genética em trigo têm sido direcionados principalmente a *Xtu*. No entanto, a herança da resistência de trigo a *Xtu* é quantitativa, dificultando o melhoramento para resistência (DUVEILLER et al., 1993; KANDEL et al., 2012; TILLMAN et al., 1999). Alguns marcadores moleculares ligados a QTLs associados à resistência a *Xtu* já foram relatados. Utilizando a abordagem identidade por descendência (IBD, *Identity By Descent*), os marcadores Xwmc522 no cromossomo 2A, e Xbarc134 no cromossomo 6B, foram identificados em estudos sob condições de casa de vegetação e campo. Os marcadores Xwmc291, localizado no cromossomo 3B, e Xbarc3 no cromossomo 6A, foram identificados apenas sob condições de casa de vegetação e o marcador Xgwm550 no cromossomo 1B apenas em condições de campo (KANDEL et al., 2015). Além das regiões citadas anteriormente, outras regiões genômicas potencialmente associadas à resistência contra *Xtu* foram detectadas nos cromossomos 1A, 4A, 4B e 7D (ADHIKARI et al., 2012).

3.6 Tomate

A murcha causada por *Ralstonia solanacearum* (sinônimos *Pseudomonas solanacearum* e *Burkholderia solanacearum*) (ELPHINSTONE 2005; YABUUCHI et al., 1995) é um dos maiores entraves na produção do tomateiro. A sobrevivência do patógeno no solo faz com que os métodos de manejo adotados, tais como o uso de produtos químicos e a rotação de cultura, sejam insuficientes, não só na produção de tomate como também na produção de outras solanáceas, razão pela qual a resistência genética tem sido a medida de controle mais desejável (ELPHINSTONE 2005). Já foram identificados QTLs nos cromossomos 3, 4, 6, 8, 10 e 11 associados à resistência contra a estirpe GMI 8217, em cruzamentos entre a cultivar altamente resistente Hawaii 7996 e a linhagem altamente suscetível WVa700 de *S. pimpinellifolium* (THOQUET et al., 1996a, 1996b). Também foi identificado um loco no cromossomo 12 na cultivar Hawaii 7996 associado com resistência específica à estirpe Pss4 (raça 1 biovar 3), endêmica no Taiwan (WANG et al., 2000). Já na cultivar L285 foram identificados QTLs nos cromossomos 6, 7 e 10 associados com a resistência à estirpe UW 364 (raça 1, biovar 4) (DANESH et al., 1994).

Além da murcha bacteriana, a mancha bacteriana causada por um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* causa perdas significativas na cultura de tomateiro. As espécies *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans* causam doença no tomateiro e em pimentão, enquanto *X. vesicatoria* é patogênica somente ao tomateiro (BART et al., 2012; KIZHEVA et al., 2013). Devido a diversas reclassificações taxonômicas, os nomes das espécies *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria* e *X. perforans* são sinônimos de *X. campestris* pv. *vesicatoria* e/ou *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. O grupo B de *X. campestris* pv. *vesicatoria* foi elevado ao nível de espécie como *X. vesicatoria* por Vauterin et al. (1995) e as espécies *X. euvesicatoria* e *X. perforans* foram propostas por Jones et al. (2004) para elevar os grupos A e C de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* à categoria de espécie.

Três raças fisiológicas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), conhecidas como T1, T2 e T3, que incitam doença em tomateiro, foram

inicialmente identificadas (JONES et al., 1995) e foi determinado que a herança da resistência a essas três raças é conferida por vários genes (BERRUETA et al., 2016; WANG et al., 1994). Atualmente as raças fisiológicas têm sido associadas com as quatro espécies: T1 é *X. euvesicatoria*; T2 é *X. vesicatoria* e possivelmente *X. gardneri*; e T3, T4 e T5 são *X. perforans* (SOUZA et al., 2008). Várias fontes de resistência às diferentes espécies/raças têm sido identificadas. Entretanto, para cada raça descrita novos genes de resistência devem ser acrescentados à cultivar, tornando o trabalho demorado e oneroso.

Os genes de resistência utilizados no controle da mancha bacteriana do tomateiro possuem características tanto de resistência quantitativa quanto qualitativa. Dois locos foram identificados associados com resistência quantitativa a múltiplas raças do patógeno, o QTL-11, identificado na linhagem Hawaii 7998; e o QTL-3, no acesso *S. lycopersicum* var. *cerasiformae* PI 114490 (HUTTON et al., 2010). Devido à natureza da resistência de amplo espectro desses genes, há um interesse considerável para introgridi-los em linhagens comerciais (SCOTT et al., 2006). Entretanto, em função do envolvimento de vários genes, a resistência quantitativa não é facilmente transferível para cultivares comerciais.

Em relação à resistência qualitativa, seis genes foram identificados: *rx1*, *rx2* e *rx3*, genes recessivos originados da linhagem Hawaii 7998 (*S. lycopersicum*) (YANG et al., 2005b); *Xv3*, encontrado na linhagem Hawaii 7981 e no acesso PI 128216 de *S. pimpinellifolium* (ASTUA-MONGE et al., 2000a); *RXopJ4* (= *Xv4*), originado do acesso LA716 de *S. pennelli* (ASTUA-MONGE et al., 2000b; SHARLACH et al., 2013); e *Bs4*, também originado de *S. lycopersicum* (SCHORNACK et al., 2004). Essas quatro fontes interagem geneticamente com os genes de avirulência *AvrRxv*, *AvrXv3*, *XopJ4* (= *AvrXv4*) e *AvrBs4* (STALL et al., 2009) respectivamente, para causar resposta de hipersensibilidade (Tabela 4). Recentemente, Zhao et al. (2015), testando o alelismo entre os genes *Xv3*, *Rx4* e *RxL_{AI58}*, usando as linhagens Hawaii 7981, PI 128216 e LA1589, demonstraram que esses três genes de resistência correspondem ao mesmo loco.

A transferência da resistência qualitativa é rotineiramente mais fácil em comparação à resistência quantitativa. Entretanto, como possuem

relação gene-a-gene, antes da introgressão de genes qualitativos deve-se ter conhecimento sobre qual espécie/raça do patógeno está presente e qual é a dominante nas áreas de plantio. Por exemplo, até a década de 1990 a raça T1 era o único agente etiológico da mancha bacteriana na Flórida (EUA). A partir de 1991 a raça T3 foi identificada e em 1994 já prevalecia nos plantios. No final da década de 1990, identificou-se a raça T4. Já em 2006, 77% dos isolados coletados eram da raça T4 e o restante da raça T3 (HORVATH et al., 2012). Portanto, esse conhecimento é fundamental para o pesquisador poder utilizar melhor os genes de resistência disponíveis de modo a proporcionar uma resistência mais durável.

Além das várias espécies de *Xanthomonas* que causam mancha foliar no tomateiro, a bactéria *Pst* também incita esse sintoma na cultura, sendo a doença denominada pinta bacteriana. Várias fontes de resistência contra essa bactéria têm sido identificadas. Em cruzamentos realizados sob condições de casa de vegetação com as cultivares VF-198 (suscetível) e Rehovot-13 (resistente), determinou-se que a resistência à *Pst* é conferida por um gene dominante que age em conjunto com genes de efeitos menores (FALLIK et al., 1983). Posteriormente, identificou-se *Pto*, um gene associado à resistência à *Pst* na espécie *S. pimpinellifolium*, o qual foi introgridido à espécie cultivada *S. lycopersicum* (PEDLEY; MARTIN 2003).

A pinta bacteriana tem sido controlada com sucesso utilizando o gene de resistência *Pto* há quase duas décadas (LIN; MARTIN 2005). Existem duas raças de *Pst*: 0 e 1 (MILIJASEVIC et al., 2009). A proteína codificada pelo gene *Pto* confere resistência contra a raça 0, reconhecendo um dos dois efetores do patógeno: AvrPto ou AvrPtoB (BAO et al., 2015). No entanto, as cultivares atuais de tomate não possuem resistência aos isolados da raça 1 de *Pst* que são cada vez mais comuns e que não possuem esses efetores (KUNKEAW et al., 2010). Genes que conferem resistência à raça 1 de *Pst* estão sendo identificados e introgrididos a partir de cruzamentos entre o tomateiro cultivado e acessos de *S. habrochaites* (LA2109 e LA1777) resistentes à bacteriose (BAO et al., 2015; THAPA et al., 2015).

Tabela 4. Principais genes de resistência a *Xantomonas axonopodis* identificados em tomateiro, pimentão e alface e seus respectivos efetores.

Patossistema/ Gene	Fonte	Espécie	Efector reconhecido	Referência
Tomate - <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>				
<i>rx1, rx2, rx3</i>	Hawaii 7998	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>avrRxv</i>	Wang et al. (1994); Whalen et al. (1993); Yu et al. (1995)
<i>Xv3</i>	PI128216 / Hawaii 7981	<i>S. pimpinellifolium</i> e <i>S. lycopersicum</i>	<i>avrXv3</i>	Jones et al. (1995); Minsavage et al. (1996); Wang et al. (2011)
<i>RXopJ4</i> (= <i>Xv4</i>)	PI716	<i>S. pennellii</i>	<i>xopJ4</i> (= <i>AvrXv4</i>)	Astua-Monge et al. (2000b); Potnis et al. (2011)
<i>Bs4</i>	ND	<i>S. lycopersicum</i>	<i>avrBs4</i>	Bonas et al. (1993); Schornack et al. (2004)
Pimentão - <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>				
<i>Bs1</i>	PI 163192	<i>Capsicum annuum</i>	<i>avrBs1</i>	Cook e Stall (1963); Dahlbeck e Stall (1978)
<i>Bs2</i>	PI 260435	<i>C. chacoense</i>	<i>avrBs2</i>	Cook e Guevara (1984); Minsavage et al. (1990); Tai et al. (1999)
<i>Bs3</i>	PI 271322	<i>C. annuum</i>	<i>avrBs3</i>	Bonas et al. (1989); Kim e Hartmann (1985); Römer et al. (2007)
<i>Bs4C</i>	PI 235047	<i>C. pubescens</i>	<i>avrBs4C</i>	Sahin e Miller (1998)
<i>bs5</i>	PI 163192 / PI 271322	<i>C. annuum</i>	ND*	Jones et al. (2002)
<i>bs6</i>	PI 163192 / PI 271322	<i>C. annuum</i>	ND	Vallejos et al. (2010)
<i>Bs7</i>	ND	ND	<i>avrBs7</i>	Potnis et al. (2012)
<i>BsT</i>	ND	<i>C. annuum</i>	<i>avrBsT</i>	Minsavage et al. (1990)
Alface - <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>				
<i>Xar1</i>	La Brillante	<i>Lactuca sativa</i>	ND	Hayes et al. (2014)

ND, não determinado.

3.7 Pimentão

Como mencionado anteriormente, além de infectar o tomateiro, *Xanthomonas* spp. são agentes etiológicos de mancha bacteriana nas culturas da pimenta e do pimentão. Estudos sobre o controle genético da resistência à mancha bacteriana têm sido realizados em vários países. Atualmente, as principais empresas fornecedoras de sementes melhoradas de pimentão já possuem em seus portfólios cultivares com genes de resistência à mancha bacteriana.

O primeiro gene identificado conferindo resistência à mancha bacteriana em pimentão foi o *Bs1*, encontrado no acesso PI 163192 (*C. annuum*) (COOK; STALL 1963). A resistência conferida por esse gene foi o primeiro relato de uma resposta de hipersensibilidade a um patógeno bacteriano (STALL et al., 2009). Posteriormente, outros cinco genes foram identificados (*Bs2*, *Bs3*, *Bs4*, *BsT* e *Bs7*), todos incitando resposta de hipersensibilidade (STALL et al., 2009). Entretanto, cada um dos genes dominantes individuais descritos acima pode ser suplantado por raças específicas do patógeno. Assim, uma estratégia utilizada visando contornar esse problema é a piramidação de genes, incorporando na mesma cultivar mais de um gene de resistência (NELSON 1978). Outra estratégia utilizada no controle da mancha bacteriana é o uso de genes de resistência quantitativa. Nesta linha de pesquisa, dois genes recessivos, *bs5* e *bs6*, que atuam de forma aditiva, foram identificados nos acessos PI 271322 e Pep13, respectivamente (JONES et al., 2002) (Tabela 4). Riva et al. (2004) também sugeriram a presença de pelo menos três genes recessivos controlando a resistência à mancha bacteriana oriunda do acesso UENF 1381.

3.8 Café

Na cultura do cafeeiro (*Coffea arabica*), duas doenças bacterianas são de importância econômica: a queima das folhas do cafeeiro causada por *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* e a mancha aureolada causada por *P. syringae* pv. *garcae*. A mancha aureolada na cultura do cafeeiro causa grandes perdas na produção e na indústria de café, devido ao rápido avanço da doença em

áreas com condições favoráveis para seu desenvolvimento (BELAN et al., 2014; RODRIGUES et al., 2013). Poucos estudos visando encontrar fontes de resistência a essas doenças têm sido realizados, alguns deles sem sucesso. Por exemplo, Zoccoli et al. (2011), avaliaram as cultivares Acaiá, CV 51, Topázio, MN, IAPAR 59 e Catuaí 99 quanto à resistência à mancha aureolada através da severidade em folhas novas e velhas, não identificando nenhum acesso com resistência. Mohan (1976) afirmou que a herança da resistência no cafeeiro à *P. syringae* pv. *garcae* é de natureza poligênica. Petek et al. (2006) realizaram cruzamentos entre a cultivar IAPAR 59 com descendentes de *C. arabica* S_H1 x IAC 81 e observaram respostas indicando que a herança da resistência é governada por mais de um gene, porém na literatura ainda não consta a identificação dos genes envolvidos. O mesmo grupo de pesquisadores relatou que a cultivar IAPAR 59 possui resistência suficiente para reduzir os danos causados pelo patógeno no estado do Paraná.

Os estudos quanto à resistência do cafeeiro a *X. fastidiosa* são poucos. Há relatos que existem cultivares de *C. arabica* com maiores níveis de infecção (Catuaí e Mundo Novo), particularmente em períodos chuvosos (QUEIROZ-VOLTAN et al., 2002). Também se sabe que alguns acessos de *C. liberica* var. *liberica*, *C. liberica* var. *dewevrei* e o híbrido interespecífico Piatã (*C. arabica* X *C. liberica* var. *dewevrei*) do Banco de germoplasma de cafeeiro do Instituto Agrônomo de Campinas, mostram menor infecção do que *C. arabica*, representando potenciais fontes de resistência quantitativa. Cabe salientar que *X. fastidiosa* não possui sistema de secreção de tipo III (VOJNOV et al., 2010), o qual secreta proteínas efetoras que têm sido identificadas como importantes eliciadoras da ETI, e, portanto, não é possível identificar resistência qualitativa baseada nesse mecanismo.

4 MELHORAMENTO MEDIANTE CISGENIA, TRANSGENIA E SUPEREXPRESSÃO GÊNICA

A prática tradicional de melhoramento de plantas para resistência a doenças ocorre desde a domesticação de espécies vegetais, contribuindo assim para a otimização da agricultura e para a sociedade (KUMAR; NABI

2015; LOPES; BOITEUX 2012). No entanto, a obtenção de variedades possuidoras de resistência frequentemente é difícil devido a fatores como incompatibilidade entre espécies cultivadas e as fontes de resistência, geralmente espécies silvestres, assim como pelo tempo requerido para transferir os genes que conferem resistência, mantendo as demais características agronômicas desejáveis.

Além do melhoramento convencional, técnicas de melhoramento como a cisgenia (expressão heteróloga de genes obtidos de uma planta da mesma família) e a transgenia (expressão heteróloga de genes obtidos de organismos não relacionados) são consideradas como importantes abordagens para desenvolver cultivares resistentes a doenças (PINTO 2009). A engenharia genética tem possibilitado a transferência de genes oriundos de fungos, insetos, animais e outras plantas na defesa de plantas a patógenos. Um dos primeiros relatos do sucesso da transgenia na resistência a doenças causadas por bactérias fitopatogênicas ocorreu no tabaco (*Nicotiana tabacum*). A expressão do gene da lisozima de humanos por meio de transformação mediada por *Agrobacterium* conferiu resistência efetiva contra *P. syringae* pv. *tabaci* (*Psta*), reduzindo os sintomas da doença e diminuindo o crescimento da bactéria *in planta* (NAKAJIMA et al., 1994).

Vários estudos confirmam aumento na resistência das plantas contra bactérias fitopatogênicas usando expressão heteróloga de genes *R*. Muitos genes *R* têm sido clonados e seus produtos apresentam características estruturais semelhantes, indicando que possivelmente podem atuar por rotas semelhantes (BALOL; SUBHASH 2011). No entanto, visando obter plantas transgênicas com maiores níveis de resistência às bactérias fitopatogênicas, tem se utilizado genes que cumprem diferentes funções na ativação dos mecanismos de defesa. Por exemplo, os genes *RRS1* e *RPS4* de *A. thaliana* foram expressos na couve japonesa (*Brassica rapa* var. *perviridis*), proporcionando um aumento da resistência a *R. solanacearum* nas plantas transgênicas, e indicando a possibilidade de desenvolvimento de novas abordagens na obtenção de resistência de plantas pertencentes à família *Brassicaceae* (NARUSAKA et al., 2014).

O fato de uma espécie bacteriana ser patogênica a mais de uma espécie

de planta pode ser utilizado para procurar fontes de resistência para serem incorporadas mediante transgenia na cultura desejada. Tai et al. (1999) transformaram plantas de tomate com o gene *Bs2* de pimentão obtendo plantas transgênicas que apresentaram um fenótipo de resistência governada por esse único gene. Posteriormente, Horvath et al. (2012) testaram plantas de tomate transgênicas contendo o gene *Bs2* e descreveram resistência efetiva em condições de campo, demonstrando a possibilidade de manejo da doença sem o uso de produtos químicos. O gene *Bs2* medeia o reconhecimento da proteína de avirulência AvrBs2, cujo gene é conservado entre estirpes de *Xanthomonas* spp. A proteína AvrBs2 é um fator de virulência determinante, pelo qual mutações no gene *avrBs2* que alteram a sua função, diminuem a chance de adaptabilidade (*fitness*) da bactéria (KEARNEY; STASKAWICZ 1990).

Por sua vez, alguns autores promoveram a superexpressão ou expressão heteróloga do gene *NPR1* (*Non-expressor of PR1*) de *A. thaliana* (*AtNPR1*) para estudar a resistência a patógenos. O gene *NPR1* é um regulador mestre que controla positivamente a sinalização através da via do ácido salicílico (CAO et al., 1994; MOU et al., 2003). Por exemplo, Silva et al. (2015) observaram que a superexpressão de *AtNPR1* em *A. thaliana* confere resistência de amplo espectro e sua expressão em morangueiro confere resistência a *Xanthomonas fragariae* e outros patógenos tais como *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*. Além disso, a expressão do gene *AtNPR1* nas cultivares de laranja doce Hamlin e Valencia (*Citrus sinensis*), conferiu resistência contra “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, agente causal do Huanglongbing. Acredita-se que a expressão heteróloga de *AtNPR1* induz a expressão de vários outros genes ligados à resistência a doenças nas plantas transgênicas (DUTT et al., 2015).

A superexpressão de genes envolvidos na resistência do arroz a *Xoo* também tem mostrado resultados promissores. Por exemplo, o fator de transcrição *OsMYC2* quando superexpresso em plantas de arroz resulta em fenótipos mais resistentes, devido à regulação positiva de *OsJAZ10* e de outros genes relacionados à defesa (UJI et al., 2016). A proteína OsJAZ10, assim como outras proteínas JAZ (*Jasmonate ZIM-domain*), atua como repressora

da transcrição de genes na via do ácido jasmônico (SANTNER; ESTELLE 2007). Já a superexpressão do gene *BSR1* (*Broad-Spectrum Resistance 1*), que codifica uma quinase citoplásmica semelhante a receptores em arroz, resultou em alta resistência a duas raças de *Xoo*, também conferindo resistência a *Burkholderia glumae* e outros patógenos como *Magnaporthe oryzae* e *Cochliobolus miyabeanus* (MAEDA et al., 2016; UJI et al., 2016).

Genes envolvidos no estresse oxidativo também têm sido utilizados para aumentar a resistência das plantas contra bactérias fitopatogênicas. Plantas de pimenta que expressam o gene da peroxidase *CaPO2* são naturalmente resistentes à bactéria *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*). Choi et al. (2007) observaram que plantas de pimenta com o gene *CaPO2* silenciado usando VIGS (*Virus-Induced Gene Silencing*) apresentaram alta suscetibilidade a *Xav*, assim como diminuição no acúmulo de peróxido de hidrogênio e no desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade quando desafiadas com uma estirpe avirulenta, provando assim a importante função do gene na resistência. A superexpressão desse gene em *A. thaliana* conferiu resistência a *Pst*, bem como favoreceu geração e acúmulo de peróxido de hidrogênio. Resultados semelhantes foram observados no mesmo patossistema quando o gene que codifica o fator de transcrição *CabZIP2*, da família bZIP de pimenta, foi superexpresso em plantas transgênicas (LIM et al., 2015).

Por outro lado, genes envolvidos na fisiologia vegetal também têm fornecido proteção contra infecção bacteriana quando expressos em plantas transgênicas. Por exemplo, a ferredoxina-I é um componente importante da maquinaria fotossintética, que transfere elétrons do fotossistema I (PSI) à enzima ferredoxina:NADP redutase para a redução do NADP (GREEN et al., 1991). A ferredoxina-I de pimenta doce (PFLP, *Pepper Ferredoxin-I Protein*) foi utilizada como alternativa na proteção de plantas transgênicas de tomate. A linha 24-18-7 da cultivar Cherry Cln1558a transformada com o gene da PLFP, apresentou resistência à infecção de *R. solanacearum* e à maceração de tecido causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (HUANG et al., 2007). Resultados semelhantes foram obtidos com plantas transgênicas de tabaco inoculadas com estirpes virulentas de *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *Psta* (HUANG et al., 2004), em

plantas transgênicas de arroz inoculadas com *Xoo* (TANG et al., 2001) e em plantas transgênicas de banana (*Musa* spp.) desafiadas com *X. campestris* pv. *musacearum* (sinônimo *X. vasicola* pv. *musacearum*) (NAMUKWAYA et al., 2012; TRIPATHI et al., 2010).

Quanto ao uso da cisgenia, recentemente a primeira linha de maçã cisgênica, nomeada C44.4.146, foi desenvolvida mediante expressão do cisgene *FB_MR5* da espécie *Malus x robusta* 5 na cultivar suscetível Gala Galaxy. A expressão do cisgene causou diminuição significativa dos sintomas do fogo bacteriano causado por *E. amylovora* (KOST et al., 2015), indicando assim o potencial do cisgene *FB_MR5* para desenvolver resistência. De igual maneira, Hao et al. (2016b) superexpressaram um gene que codifica tionina na cultivar Carrizo de citrange (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*). Quando inoculadas com *X. citri* 3213 e “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, as plantas transformadas apresentaram redução significativa dos sintomas. As tioninas produzidas pelas plantas são peptídeos ricos em cisteína que exibem atividade antimicrobiana (GUZMÁN-RODRÍGUEZ et al., 2015), possivelmente, devido à formação de poros nas membranas celulares dos patógenos (PELEGRINI; FRANCO 2005).

5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A informação genética da planta que confere resistência a doenças bacterianas também pode ser acessada mediante indução usando eliciadores. Trabalhos demonstrando a indução de resistência em plantas existem desde as primeiras décadas do século XX, sendo de grande importância os estudos desenvolvidos por Chester (1933) e Gauman (1946). No entanto, foram os trabalhos de Frank Ross na década de 1960 que deram maior visibilidade aos fenômenos de indução de resistência em plantas, contribuindo efetivamente para consolidar a indução de resistência como ciência (ROSS 1961, 1966).

A partir da década de 1990 com a descoberta de um análogo do ácido salicílico conhecido como acibenzolar-S-metil (ASM) ou benzotiadiazole (BTH) (disponível sob diferentes nomes comerciais em vários países),

houve grande avanço nos estudos com indução de resistência, sendo este um dos produtos mais utilizados e estudados atualmente. O termo resistência induzida (RI) compreende todos os tipos de respostas eliciadas na planta que promovem proteção subsequente contra doenças, englobando tanto respostas locais como sistêmicas, podendo ser induzida por agentes externos bióticos ou abióticos e atuando de forma não específica (contra amplo espectro de fitopatógenos).

A resistência induzida divide-se basicamente em dois tipos principais: resistência sistêmica adquirida (RSA) e resistência sistêmica induzida (RSI), que se diferenciam basicamente na natureza do agente eliciador e nas rotas regulatórias. A RSA se desenvolve local ou sistemicamente em resposta a um agente patogênico que provoca lesões necróticas, sejam essas resultantes de uma infecção bem-sucedida pelo patógeno ou de uma resposta de hipersensibilidade. Essa resistência é geralmente eficaz contra amplo espectro de patógenos, e de forma simplificada está associada com a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR, *Pathogenesis-Related*) sendo mediada pela rota do ácido salicílico (AS) (FU; DONG 2013). Por outro lado, a RSI se desenvolve sistemicamente em resposta à colonização do sistema radicular principalmente por rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) sem provocar necrose, sendo mediada por uma rota sensível ao ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) e, de forma geral, não relacionada ao acúmulo de PRs (PIETERSE et al., 2014). Atualmente, sabe-se que as rotas do AS e AJ/ET estão interligadas molecularmente, sendo que uma rota pode interferir na outra e consequentemente na indução de resistência por ela ativada, em um fenômeno conhecido como *crosstalk* (BOSTOCK 2005; KOORNNEEF; PIETERSE 2008). A RSA é mais efetiva contra patógenos biotróficos enquanto a RSI contra patógenos necrotróficos e insetos (BIERE; GOVERSE 2016; PIETERSE et al., 2014).

No entanto, é importante salientar que quando plantas são expostas a indutores de resistência e ficam protegidas da ação de patógenos não se pode necessariamente assumir que ocorreu a indução de resistência, uma vez que o agente indutor eventualmente pode ser capaz de atuar diretamente sobre o patógeno. Nesse sentido, Steiner e Schönbeck (1995) propuseram

critérios básicos para determinar se a resistência exibida pela planta foi de fato induzida ou se foi resultado de outros fatores que de algum modo contribuíram para a redução da incidência ou severidade da doença. Alguns desses critérios são: ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante, necessidade de tempo entre a exposição ao indutor e a manifestação da resistência e a ausência de relação entre o nível de expressão da resistência e incrementos na aplicação do agente indutor (STEINER; SCHÖNBECK 1995). Desse modo serão considerados nesta seção exemplos de indução de resistência contra bactérias fitopatogênicas com base nesses critérios, sendo relatados exemplos em que houve atividade antimicrobiana desde que também tenha ocorrido indução de resistência (ativação de respostas de defesa da planta).

5.1 Resistência sistêmica adquirida (RSA)

Na resistência sistêmica adquirida os indutores mais comumente estudados são compostos sintéticos capazes de induzir resistência mimetizando a ativação biológica realizada pelos patógenos, destacando-se o análogo do ácido salicílico acibenzolar-S-metil (ASM), considerado o mais potente ativador da RSA atualmente, pois fornece proteção contra amplo espectro de patógenos, induz a expressão dos mesmos marcadores moleculares e bioquímicos dos indutores biológicos, não apresenta atividade antimicrobiana direta e nem provoca fitotoxidez (OOSTENDORP et al., 2001).

Compostos biologicamente ativos extraídos do basidiocarpo ou micélio de fungos principalmente das espécies *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) têm sido estudados para controle de doenças bacterianas em plantas (DI PIERO; PASCHOLATI 2004; SILVA et al., 2007, 2008; TOILLIER et al., 2010). Extratos de folhas de plantas doentes também podem ser utilizados como indutores de resistência, conforme estudos de Calvalcanti et al. (2006a). Os autores observaram que um extrato aquoso tratado termicamente obtido de tecido necrótico seco proveniente de ramos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) infectados com *Crinipellis perniciosus*, reduziu a severidade de

X. vesicatoria em tomateiro, por meio da atividade das enzimas peroxidase (POX, *Peroxidase*) e fenilalanina amônia-liase (PAL), deposição de lignina em tecidos foliares e, em menor grau, atividade de quitinases (CHI, *Chitinase*), não ocorrendo inibição do crescimento do patógeno *in vitro*. Macroalgas marinhas também representam uma fonte ainda pouco explorada de eliciadores de resistência em plantas, com destaque aos polissacarídeos de algas (carragenanas, fucanas, laminaranas e ulvanas). A laminarina, por exemplo, é um polissacarídeo de reserva (β -1,3 glucano) extraído de algas marrons (*Laminaria digitata*), capaz de ativar respostas de defesa nas plantas (STADNIK; DE FREITAS 2014).

Casarrubias-Castillo et al. (2014), ao avaliarem o tratamento de plantas de *Amaranthus cruentus* com BTH, metil jasmonato (MeJA) e *Pss*, contra *Psta* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), concluíram que BTH e *Pss* induziram a expressão de genes que codificam para PRs e antioxidantes, enquanto que o MeJA induziu a expressão dos genes da arginase, lipoxigenase (*LOX2*) e amarandina 1. O MeJA não foi eficiente contra nenhum dos patógenos testados, BTH e *Pss* foram eficazes contra *Psta* e para *Cmm* somente *Pss* foi eficaz, uma vez que o BTH aumentou a suscetibilidade de *A. cruentus* a *Cmm*. Na Tabela 5 podem ser encontrados outros exemplos de RSA contra bactérias fitopatogênicas.

5.2 Resistência sistêmica induzida (RSI)

Esse tipo de resistência pode ser sistemicamente induzido pela presença de microrganismos benéficos que colonizam o sistema radicular das plantas, como fungos endofíticos, micorrizas e, em destaque, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), sendo efetiva contra amplo espectro de patógenos e também insetos herbívoros (PIETERSE et al., 2014). As RPCPs mais estudadas na RSI são do gênero *Pseudomonas* (principalmente *P. fluorescens*, *P. putida* e *P. aeruginosa*) e do gênero *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* e *B. sphaericus*) (DE VLEESSCHAUWER; HÖFTE 2009; KLOEPPER et al., 2004). As RPCPs podem desencadear RSI por meio dos flagelos, LPS, exopolissacarídeos (EPS), produção de sideróforos,

antibióticos, compostos orgânicos voláteis e moléculas envolvidas no processo de *quorum sensing*, entre outros (DE VLEESSCHAUWER; HÖFTE 2009; PIETERSE et al., 2014).

Existem vários trabalhos relatando RSI a fitobacterioses por meio de moléculas constituintes da própria célula bacteriana. Por exemplo, Romeiro e Kimura (1997) relataram que o EPS de *Xav* induziu a síntese de fitoalexinas em pimenta (*C. annuum*), bem como resistência à pústula bacteriana, o que também ocorreu pela prévia exposição das plantas ao LPS do patógeno e pela exposição das folhas à fração da parede celular da bactéria. Flagelos, LPS e pseudobactina purificados de *P. putida* WCS385 promoveram RSI em *Arabidopsis* contra *Pst* (MEZIANE et al., 2005). Já Halfeld-Vieira et al. (2006) verificaram a ocorrência de RSI em tomateiro contra *Pst* utilizando um isolado de *B. cereus* proveniente do filoplano de tomateiro sadio. Os autores observaram redução da severidade da doença, síntese de enzimas envolvidas em rotas de defesa (peroxidases) e relacionadas com a elevação do estado de indução, ausência de antibiose contra o patógeno desafiador, bem como proteção sistêmica da planta. Na Tabela 6 podem ser encontrados outros exemplos de RSI contra bactérias fitopatogênicas.

Tabela 5. Exemplos de Resistência sistêmica adquirida (RSA) em plantas contra bactérias fitopatogênicas.

Hospedeiro/ Bactéria alvo	Indutor*	Modo de ação**	Referências
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Genes de defesa induzíveis ao AS (<i>PR-1</i> , <i>WRKY6</i> e <i>WRKY53</i>); modificação de histonas	Luna et al. (2012)
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Ácido pipecólico	Síntese de camalexina, ácido pipecólico e AS	Návarová et al. (2012)
<i>Arroz (Oryza sativa)</i>			
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	ASM	Acúmulo de compostos fenólicos; QUI, GLU, PR5	Mohan Babu et al. (2003)
<i>Berinjela (Solanum melongena)</i>			
<i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	<i>Agaricus blazei</i> e ASM	PAL e PFO (somente <i>A. blazei</i>), POX	Silva et al. (2008)

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Hospedeiro/ Bactéria alvo	Indutor*	Modo de ação**	Referências
Feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)			
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Pycnopus</i> <i>sanguineus</i>	PPOX e PFO; atividade antimicrobiana	Toillier et al. (2010)
Laranja-doce (<i>Citrus sinensis</i>)			
<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	Ácido hexanóico	PRs e deposição de calose	Llorens et al. (2015)
Pessegueiro (<i>Prunus persica</i>)			
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Ácidos húmico e fúlvico	Atividade bacteriostática/bactericida	Giovanardi et al. (2016)
Nectarina (<i>Prunus persica</i> var. <i>nucipersica</i>)			
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	Ácidos húmico e fúlvico	Vários genes envolvidos na ativação de respostas de defesa	Giovanardi et al. (2016)
Pimentão (<i>Capsicum annuum</i>)			
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> (sin. <i>X. vesicatoria</i>)	PABA	Acúmulo de PRs (CaPR4, CaPR9)	Song et al. (2013)
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)			
<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Oligo-carragenanas (kappa, lambda e iota)	PAL; acúmulo de fenilpropanoides	Vera et al. (2012)
	Laminarina (<i>Laminaria digitata</i>)	PAL, ácido caféico O-metiltransferase e LOX; acúmulo de PRs e AS	Klarzynski et al. (2000)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)			
<i>X. vesicatoria</i>	<i>A. blazei</i>	GLU	Di Piero e Pascholati (2004)
	ASM e Ecolife®	POX e PFO; deposição de lignina em tecidos foliares; atividade antimicrobiana (p/Ecolife®)	Cavalcanti et al. (2006b)
<i>R. solanacearum</i>	<i>Lentinula edodes</i> e ASM	POX; QUI (p/ASM)	Silva et al. (2007)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	AJ, ET, ASM	POX, PFO, GLU e LOX	Andrade et al. (2013)
	Ácido hexanóico	Neutralização do efeito negativo da COR e da JA-Ile na via do AS; aumento na expressão de <i>JMT</i> e de <i>PR1</i> e <i>PR5</i> ; acúmulo de ácido 12-oxo-fítodienoico	Scalschi et al. (2013)
<i>X. perforans</i>	ASM, piraclostrobina e piraclostrobina + methiran	POX, PFO e GLU	Itako et al. (2012)

* AS, ácido salicílico; ASM, acibenzolar-S-metil; AJ, ácido jasmônico; Ecolife®, formulação aquosa comercial contendo polifenóis, flavonoides, fitoalexinas e ácidos orgânicos diluídos; ET, etileno; PABA, ácido para-aminobenzóico (vitamina Bx).

** COR, coronatina; GLU, glucanases; JA-Ile, jasmonil-isoleucina; JMT, ácido jasmônico carboxil metiltransferase; LOX, lipoxigenases; PAL, fenilalanina amônia-liase; PFO, polifenoloxidasas; POX, peroxidases; PR, proteína relacionadas à patogênese; QUI, quitinase; WRKY, proteína que possui um domínio triptofano-arginina-lisina-tirosina.

Tabela 6. Exemplos de resistência sistêmica induzida (RSI) em plantas contra bactérias fitopatogênicas.

Hospedeiro/ Bactéria alvo	Indutor*	Referências
Antúrio (<i>Anthurium andreanum</i>)		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B014	Li et al. (2012a)
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r; <i>P. fluorescens</i> SS101	Pieterse et al. (2000); Van de Mortel et al. (2012)
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	COV de <i>Paenibacillus polymyxa</i> E681	Park et al. (2013)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> e <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>Serratia marcescens</i> 90–166; <i>B. pumilus</i> SE34 e T4; <i>P. fluorescens</i> 89B61; <i>B. pasteurii</i> C9; <i>Enterobacter cloacae</i> JM-22	Ryu et al. (2003)
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	COV de <i>P. polymyxa</i> E681, de <i>B. subtilis</i> GB03 e de <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a	Park et al. (2013); Ryu et al. (2004)
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)		
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>B. pumilus</i> SE34; <i>B. subtilis</i> GB03	Chithrashree et al. (2011)
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. Dfs842	Da Silva et al. (2008)
Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)		
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	COV de <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a	Choi et al. (2014)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>B. thuringiensis</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a; <i>B. sphaericus</i> SE56; <i>B. pumilus</i> IN937b, SE34, SE49, T4 e INR7	Jetiyanon e Kloepper (2002); Hyakumachi et al. (2013)

* COV, composto orgânico volátil.

5.3 Priming da resistência

A indução de resistência em plantas a patógenos está diretamente associada com um processo de condicionamento denominado *priming*: estado fisiológico da planta que permite às células responder a níveis muito baixos de um estímulo, no qual a planta exposta previamente ao agente indutor torna-se sensibilizada (*primed*), podendo ativar as respostas de defesa de forma mais rápida e intensa quando submetida posteriormente ao ataque de patógenos, insetos herbívoros, ferimentos ou algum estresse abiótico (ARANEGA-BOU et al., 2014; CONRATH 2011; MAUCH-MANI et al., 2017). Segundo Balmer et al. (2015), esse estado de condicionamento da planta pode ser dividido em três processos principais: fase *priming* (Figura 4A), estado de pós-desafio (Figura 4B) e estado transgeneracional (Figura 4C). Estudos recentes têm revelado que mecanismos de controle epigenéticos como a metilação do DNA e modificações nas histonas, as quais estão intimamente associadas à reconfiguração da cromatina, são de grande importância na adaptação das plantas a diferentes estresses bióticos contribuindo ativamente para o *priming* (ESPINAS et al., 2016; LUNA et al., 2012; MAUCH-MANI et al., 2017; PASTOR et al., 2013).

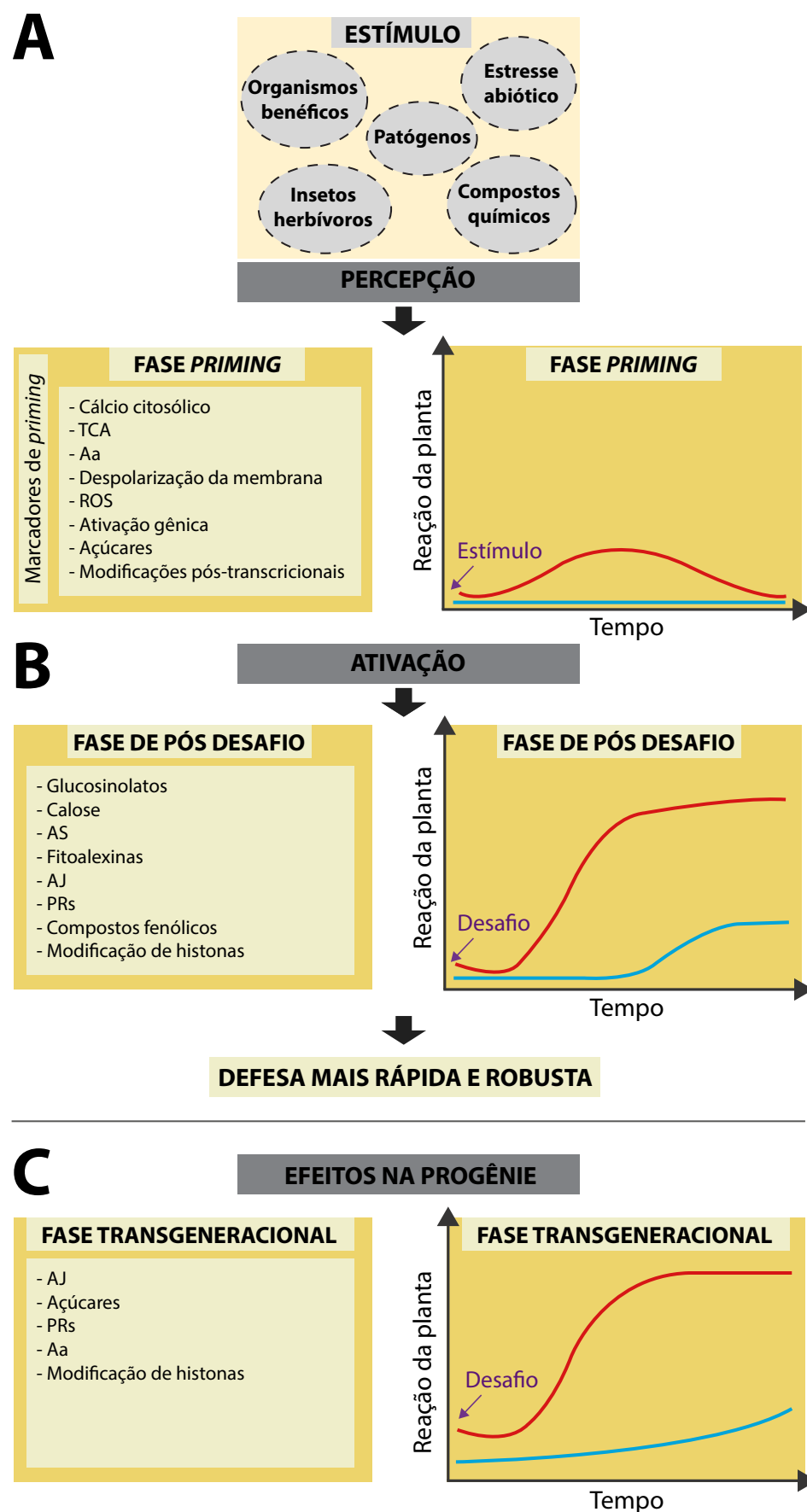


Figura 4 - O estado de *priming* em plantas. (A) O estado de *priming* é ativado pela percepção de diversos estímulos, incluindo fatores bióticos e abióticos, e dura até a próxima exposição da planta a um novo estresse (estímulo). Durante a fase de *priming* várias respostas, incluindo alterações nos níveis de vários metabólitos e hormônios, ativação gênica e modificações pós-transcricionais, são ativadas ligeiramente nas plantas sujeitas aos estímulos que desencadeiam o *priming*. (B) Frente a um novo estresse (desafio), as plantas em estado de pós-desafio (*primed*)

reagem ativando respostas associadas à defesa de maneira mais rápida e intensa que as plantas que não estão em estado de *priming*. (C) No estado transgeneracional, plantas geradas a partir de sementes obtidas de parentais que foram anteriormente condicionadas no estado de *priming* são capazes de ativar respostas associadas com defesa de forma mais intensa e mais rapidamente quando desafiadas por algum estresse. Aa, aminoácidos; TCA, intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. As linhas vermelhas e azuis representam respectivamente as respostas de plantas com e sem estado de *priming* frente a um desafio.

Existem várias maneiras de se induzir o *priming*: presença de insetos herbívoros, infecção por patógenos, colonização das raízes por microrganismos benéficos, tratamento com produtos químicos naturais ou sintéticos, percepção de certos compostos orgânicos voláteis e submissão a estresses abióticos como calor, temperatura e salinidade (Figura 4A) (MAUCH-MANI et al., 2017). Vários autores já relataram a indução do estado de *priming* contra bactérias fitopatogênicas. Baccelli e Mauch-Mani (2015) relataram a indução do estado de *priming* pelo ácido beta-aminobutírico (BABA), através da modulação da sinalização de defesa hormonal da planta, destacando a participação do ácido abscísico neste processo. Em *Arabidopsis*, a aplicação de BABA promoveu um incremento na resistência contra *Pst* DC3000, em que a expressão do gene *PR1* (dependente do ácido salicílico) ocorreu mais cedo em plantas tratadas com BABA (ZIMMERLI et al., 2000). Na Tabela 7 podem ser encontrados outros exemplos da ativação do estado de *priming* em plantas contra bactérias fitopatogênicas.

Slaughter et al. (2012) e Luna et al. (2012) trabalhando com *A. thaliana* e *Pst* demonstraram que o estado de *priming* é transferido para a progênie conferindo-lhe maior proteção contra o ataque de patógenos em comparação com os descendentes de plantas não sensibilizadas, o que também já foi relatado no patossistema feijoeiro - *Psp* por Martínez-Aguilar et al. (2016) quando as plantas eram expostas ao ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA).

Tabela 7. Exemplos de indução ao estado de *priming* em plantas contra bactérias fitopatogênicas.

Hospedeiro/ Bactéria alvo	Indutor*	Referências
<i>Arabidopsis thaliana</i>		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	Ácido azelaico; ácido pipecólico	Bernsdorff et al. (2015); Jung et al. (2009); Návarová et al. (2012)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Trichoderma asperelloides</i> T203; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000; <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>avrRpt2</i>); BTH; BABA; COV (3-pentanol);	Brotman et al. (2012); Kohler et al. (2002); Luna et al. (2012); Slaughter et al. (2012); Song et al. (2015); Tsai et al. (2011)
Copo-de-leite (<i>Zantedeschia aethiopica</i>)		
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	MeJA	Luzzatto-Knaan et al. (2014)
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)		
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	BABA e INA	Martínez-Aguilar et al. (2016)
Pimenta (<i>Capsicum annuum</i>)		
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	3-pentanol (COV de <i>B. amyloliquefaciens</i> IN937a)	Choi et al. (2014)
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)		
<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101; ácido pipecólico	Rico et al. (2010); Sheikh et al. (2014); Vogel-Adghough et al. (2013)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)		
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Ácido hexanóico	Scalschi et al. (2013)

* ABA, ácido abscísico; BABA, ácido beta-aminobutírico; BTH, benzotiadiazole; COV, composto orgânico volátil; INA, ácido 2,6-dicloroisonicotínico; MeJA, metil-jasmonato.

6 MECANISMOS MOLECULARES SUBJACENTES À VARIABILIDADE BACTERIANA

A durabilidade da resistência conferida pelos genes usados para controlar doenças bióticas depende da capacidade dos fitopatógenos de evoluir de maneira a evadir o reconhecimento por parte dos mecanismos de defesa da planta. A resistência conferida por alguns genes é suplantada rapidamente pelo patógeno, por isso é importante ter um conhecimento

completo acerca da interação planta-patógeno. Nesta seção serão abordados os mecanismos que contribuem para a variabilidade genética em bactérias; e, na seguinte, alguns casos de suplantação da resistência das plantas por bactérias, por meio dos mecanismos geradores de variabilidade.

Semelhante a outros organismos, as bactérias possuem diferenças genotípicas que as capacitam para sobreviver em diversos ambientes. A variação genotípica nas bactérias é em grande parte devido a mutações espontâneas, selecionadas pelo ambiente, ou devido à aquisição de material genético adicional. **Mutações** são alterações nas sequências de nucleotídeo contido no genoma de um organismo, que podem ser passadas de uma geração para outra. Por esse motivo, esse tipo de transmissão da informação é chamado transferência vertical de genes (TVG). Por sua vez, transferência horizontal de genes (THG) é o processo pelo qual materiais genéticos de dois organismos distintos são reunidos em uma mesma célula mediante transferência de uma célula doadora a uma receptora, podendo ou não acontecer recombinação. Por meio desse mecanismo, novas combinações de genes podem surgir, mesmo não ocorrendo mutação. As estirpes bacterianas oriundas do processo de THG podem possuir novas combinações gênicas, possibilitando a sua adaptação a mudanças no ambiente. Em geral, enquanto as mutações resultam em pequenas alterações genéticas, a THG, envolve alterações mais significativas. Genes completos, conjuntos de genes ou mesmo cromossomos inteiros podem ser transferidos de um organismo para outro. Apesar de não se reproduzirem sexualmente, os procariotos possuem mecanismos de troca genética que permitem tanto a transferência de genes quanto sua recombinação (MADIGAN et al., 2016).

6.1 Variabilidade gerada por mutação

Diferentes tipos de mutações acontecem no DNA das bactérias: substituições, inserções e deleções. Uma mutação pontual é aquela que acontece em um par de bases específico de um gene, seja na sequência codificadora ou em uma região reguladora. Quando uma substituição, também chamada polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), ocorre na região codificadora de um gene, esta pode ou não

causar alteração na sequência de aminoácidos da proteína produzida, que por sua vez pode ou não causar alteração fenotípica na célula bacteriana. Portanto, existem diferentes tipos de substituições dependendo do efeito na proteína produzida.

Uma **mutação silenciosa** é aquela que não modifica a sequência de aminoácidos da proteína produzida (devido ao fato do código genético ser degenerado) e, portanto, não altera o fenótipo da bactéria. Uma **mutação de sentido trocado** é aquela que causa alteração na sequência de aminoácidos da proteína, mas devido ao fato de alguns aminoácidos cumprirem funções semelhantes (por exemplo, serina e treonina providenciam grupos OH para fosforilação das proteínas), essa mutação pode ou não alterar o fenótipo da bactéria. A alteração nesse caso pode ocasionar perda total, diminuição ou aumento da função biológica da proteína. Por último, uma **mutação sem sentido** é a substituição de um par de bases que cria um códon de terminação, o qual provoca a interrupção abrupta da tradução, originando uma proteína incompleta e geralmente inativa.

As **deleções** são mutações em que um ou vários pares de bases do DNA são eliminados. As **inserções** ocorrem quando um ou vários pares de bases são adicionados a um gene. As deleções ou inserções que atingem um número de pares de bases que não é múltiplo de três em regiões codificadoras do DNA provocam alteração na fase de leitura. As deleções que atingem um número de pares de bases múltiplo de três causam a produção de proteínas menores, enquanto as inserções ocasionam a produção de proteínas maiores. As deleções podem cobrir uma grande extensão do DNA, ocasionando a perda de centenas ou milhares de pares de bases (MADIGAN et al., 2016). Quando ocorre a deleção de grande extensão de DNA, genes inteiros podem ser deletados, podendo ser letal ao organismo. A grande maioria das substituições, inserções e deleções de um ou poucos pares de bases ocorre devido a erros durante a replicação do DNA, enquanto as inserções e deleções de longos segmentos de DNA são falhas decorrentes dos processos de recombinação (MADIGAN et al., 2016).

6.2 Transferência horizontal de genes

Transferência horizontal de genes (THG) é um mecanismo não sexual de transmissão de material genético entre espécies, comum e importante em procariotos (KOONIN et al., 2001). A importância da THG foi reconhecida pela primeira vez quando se observou que isolados de *Shigella dysenteriae*, agente causal da disenteria em humanos, adquiriram resistência a múltiplos antibióticos (WATANABE 1963). A THG é considerada uma força importante na evolução bacteriana (BROWN 2003; OCHMAN et al., 2000), já que fornece algumas vantagens seletivas, como a resistência a antibióticos ou a metais pesados, as quais são consideradas características importantes para o estabelecimento de populações (EL YACOUBI et al., 2007; LACY et al., 1984; STALL; JONES 1985).

Em procariotos existem três mecanismos naturais pelos quais a informação genética pode ser transmitida entre células. A **transformação** genética é um processo pelo qual o DNA na forma livre, geralmente após a morte da bactéria doadora, é incorporado pela célula receptora, que pode então manifestar alterações genéticas (Figura 5). Uma única célula bacteriana é capaz de incorporar somente um ou poucos fragmentos de DNA. Dessa maneira, apenas uma pequena porção do material genético do doador é incorporada na célula receptora em cada evento de transformação. A grande maioria dos procariotos é pouco transformável, ou mesmo não transformável naturalmente. Cabe salientar que o estado de **competência** é quando uma célula é capaz de captar uma molécula de DNA e ser transformada.

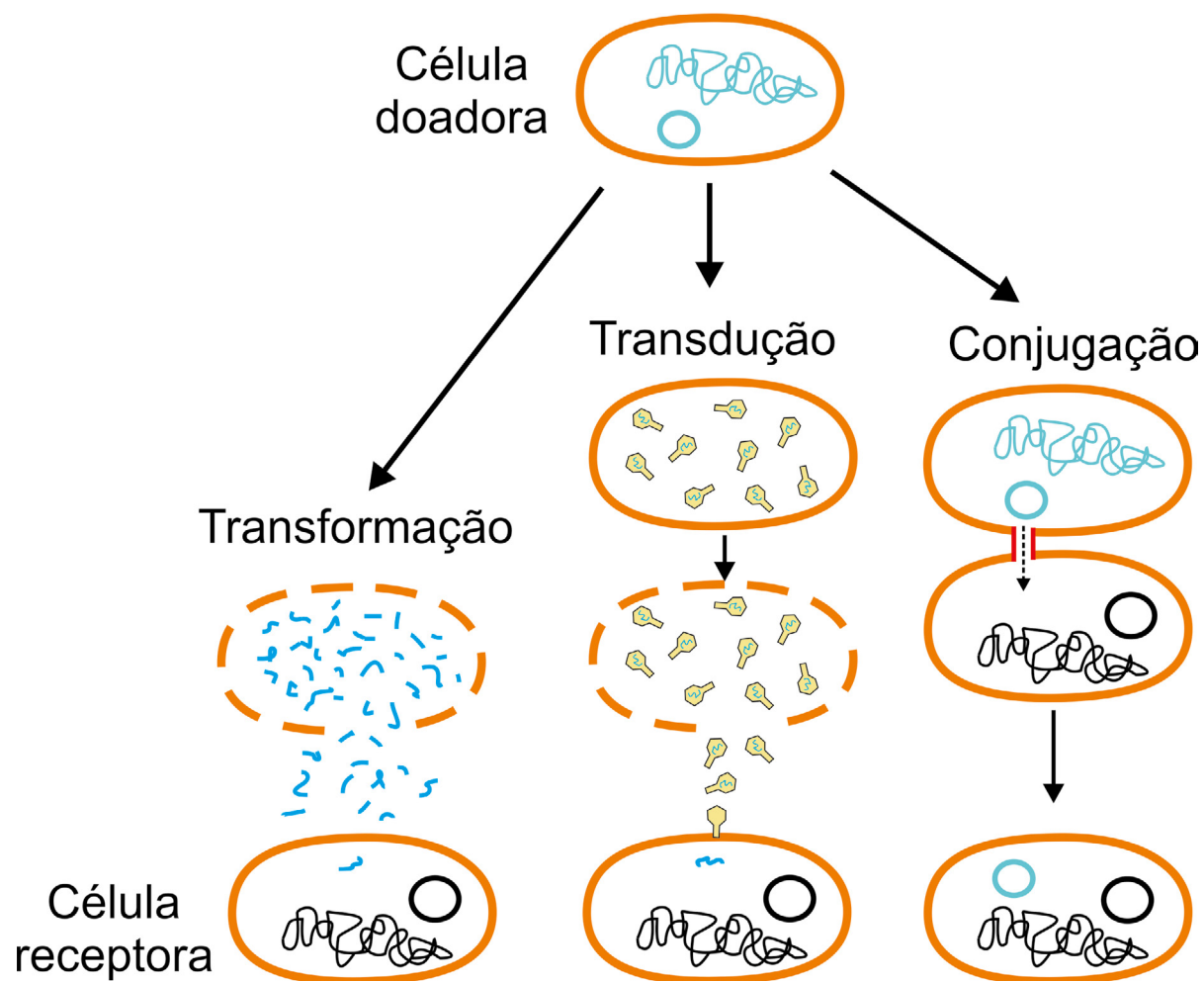


Figura 5 - Mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias. Na **transformação**, as células receptoras adquirem DNA presente no meio, provavelmente de células doadoras que sofreram lise, na **transdução** fagos transferem DNA de uma célula doadora para uma receptora, e na **conjugação** plasmídeos são transferidos da célula doadora para uma receptora, envolvendo a formação de um pilus, no caso de bactérias Gram-negativas. A seta pontilhada indica a transferência do plasmídeo da célula doadora. As células bacterianas são representadas com ovais de cor laranja, o DNA da célula doadora e receptora é representado por linhas azuis e pretas, respectivamente. Os círculos dentro da célula bacteriana representam plasmídeos.

No processo de **transdução**, a transferência do DNA de uma célula doadora para uma célula receptora é mediada por um vírus patogênico a bactérias, também conhecido por **fago** (Figura 5). Há duas maneiras pelas quais os genes do hospedeiro podem ser transferidos para o doador. Na primeira, **transdução generalizada**, a sequência de nucleotídeos de qualquer parte do DNA da célula doadora pode ser empacotada em partículas virais, substituindo o DNA viral na partícula madura, e transferida para a célula receptora. Na **transdução especializada**, somente uma região específica do DNA bacteriano é incorporado na partícula viral madura juntamente

com uma parte do material genético do vírus. A transdução especializada ocorre somente com fagos do tipo temperado. Em geral, tanto na transdução especializada como na generalizada, as partículas virais são defectivas, pois os genes bacterianos substituem alguns genes do fago necessários para a partícula. Como a probabilidade de transformação com o fago defectivo é um evento raro, poucas são as células receptoras que recebem o material genético da bactéria doadora na transdução generalizada. Embora o DNA da célula doadora não possa replicar-se na célula receptora, pode ocorrer a recombinação genética com uma região homóloga, podendo gerar variabilidade.

Em procariotos não ocorre acasalamento entre dois indivíduos compatíveis, pelo menos não como o fazem os mamíferos. O método de recombinação genética que mais se assemelha ao sexo em procariotos é a **conjugação** (Figura 5). Sabe-se que a conjugação de plasmídeos (moléculas de DNA que se replicam independentemente do cromossomo) é um importante agente de transferência horizontal de DNA entre bactérias (SØRENSEN et al., 2005; VAN ELSAS; BAILEY 2002) e há crescente evidência que plasmídeos conjugativos carregam genes de funções desconhecidas que conferem vantagem seletiva a bactérias associadas a plantas (TAUCH et al., 2002). Durante a conjugação uma célula bacteriana doadora transfere uma cópia de seu plasmídeo para uma célula receptora, que não possui tal plasmídeo. Os genes que controlam a conjugação estão contidos em uma região do plasmídeo chamada *tra*. A maioria dos genes da região *tra* codifica proteínas que constituem um sistema de secreção de tipo 4 (SST4) e participa da formação do **pilus de conjugação** (MADIGAN et al., 2016). O pilus permite que ocorra o pareamento específico entre uma célula doadora e uma receptora. Em bactérias Gram-negativas, parece ser necessária a formação do pilus para que ocorra o evento conjugativo. A transferência genética pelo mecanismo de conjugação é extremamente eficiente. Em condições adequadas, virtualmente todas as células receptoras que entrarem em contato com as doadoras recebem o plasmídeo. Os plasmídeos conjugativos têm a capacidade de se disseminar em uma população, tornando-se dessa maneira um eficiente mecanismo de geração de variabilidade (MADIGAN et al., 2016).

O advento de técnicas de NGS tem possibilitado a identificação rápida de SNPs e *indels* (inserções e deleções) e regiões adquiridas mediante THG (algumas delas constituindo ilhas de patogenicidade) em estirpes individuais de diversas espécies que permitem não somente aprofundar o conhecimento acerca da diversidade genética bacteriana, mas também da associação de genes específicos com fenótipos de interesse (OCHMAN et al., 2000; PANOFF; CHUITON 2004). Há muitos estudos de bioinformática indicando que a THG ocorreu em algum ponto da história das espécies bacterianas (DE LA CRUZ; DAVIES 2000; OCHMAN et al., 2000).

7 MECANISMOS BACTERIANOS DE SUPLANTAÇÃO DA RESISTÊNCIA VEGETAL

Como visto na seção anterior, são vários os mecanismos de geração de variabilidade em bactérias. O conhecimento de tais mecanismos é de suma importância para entender como as bactérias suplantam a resistência das plantas. Nós utilizaremos o verbo **suplantar** em vez de **quebrar** para nos referir à “quebra da resistência”, pois quando uma cultivar antes resistente a determinado patógeno passa a comportar-se como suscetível, não ocorre perda de função das proteínas de resistência, ou seja, a atividade destas mantém-se intacta. A “suplantação da resistência” ocorre quando há mutações (SNPs ou *indels*) na região codificadora ou em regiões reguladoras de genes que codificam fatores do patógeno (efetores ou MAMPs/PAMPs), levando ao não reconhecimento por parte das proteínas de resistência da planta. A “suplantação da resistência” também poderia acontecer como resultado do ganho de genes que codificam efetores que contribuem com a virulência, suprimindo as respostas de defesa da planta. A “suplantação da resistência” refere-se então a uma alteração ocorrida na população do patógeno e não propriamente a um fenômeno ocorrido no hospedeiro.

7.1 Suplantação da resistência mediada por modificações em MAMPs/PAMPs

Na literatura científica são mais comuns os relatos de suplantação da resistência por modificações nas proteínas efetoras. Entretanto, nos últimos anos a manipulação da resistência mediada por MAMPs/PAMPs tem sido extensivamente estudada, surgindo novas estratégias para o controle de doenças das plantas. Como descrito anteriormente, flagelinas bacterianas são MAMPs/PAMPs reconhecidas por PRRs de membrana da família FLS2. O gene *FLS2* se encontra presente em múltiplas espécies de plantas pertencentes a diversas famílias botânicas. O reconhecimento mediado por FLS2 em muitas espécies de plantas é devido à presença de um epítipo de 22 aminoácidos da flagelina, conhecido como flg22 (SEGONZAC; ZIPFEL 2011; TRDÁ et al., 2015). Wang et al. (2015b) demonstraram que a expressão heteróloga de *FLS2* de arroz (*OsFLS2*) em *Arabidopsis* é capaz de causar a detecção do peptídeo flg22 e a flagelina purificada *in vitro* de *Acidovorax avenae*. Entretanto, a proteína OsFLS2 não é capaz de reconhecer as flagelinas purificadas de *Xoo* e *X. oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). Os autores concluíram que o sistema de reconhecimento da flagelina mediado pela proteína OsFLS2 pode ser evadido por *Xoo* e *Xoc*, possibilitando a infecção da planta de arroz. Para os patovares de *X. oryzae* foi provado que essa evasão é originada por múltiplas mutações no peptídeo flg22. A caracterização de PRRs, como FLS2 em diversas famílias botânicas, surge então como uma alternativa para identificar novas estratégias para desenvolver plantas resistentes a patógenos.

7.2 Suplantação da resistência mediada por modificações nos efetores

Na literatura, é mais comum encontrar exemplos de suplantação da resistência qualitativa, talvez por serem os fenótipos contrastantes de fácil visualização (presença ou ausência de doença). No caso de *Xav*, agente causal da mancha bacteriana no tomateiro e na cultura do pimentão, a presença do gene de avirulência *avrBs2* na bactéria desencadeia resistência

e induz a resposta de hipersensibilidade em plantas de pimentão portadoras do correspondente gene de resistência *Bs2* (GASSMANN et al., 2000). O gene *Bs2* codifica uma proteína da classe NBS-LRR (TAI et al., 1999), que tem sido amplamente empregada no campo por fornecer um alto nível de resistência por muitos anos, sugerindo que a perda de *avrBs2* implica em um custo adaptativo para o patógeno (KEARNEY; STASKAWICZ 1990). Experimentos têm demonstrado que mutações, espontâneas ou induzidas, em *avrBs2* têm resultado em perda da avirulência em plantas portadoras do gene *Bs2* e também em redução na taxa de crescimento bacteriano em plantas suscetíveis (GASSMANN et al., 2000; KEARNEY; STASKAWICZ 1990). Sendo assim, os autores verificaram que o gene *avrBs2* é muito importante para a adaptabilidade (*fitness*) do patógeno em plantas suscetíveis, não portadoras do gene *Bs2* (GASSMANN et al., 2000).

Mutantes espontâneos da bactéria foram verificados em plantas de pimentão portadoras do gene *Bs2*, uma vez que genótipos que antes eram resistentes passaram a comportar-se como suscetíveis (GASSMANN et al., 2000). Em populações de campo de *Xav* foram observados SNPs, resultando na troca de apenas um aminoácido e *indels* de cinco nucleotídeos na região repetitiva central do gene *avrBs2*. Os *indels* causaram a perda da capacidade em induzir resistência e em causar a resposta de hipersensibilidade em plantas portadoras do gene *Bs2*. Os mutantes também perderam adaptabilidade em genótipos suscetíveis. Já os SNPs, com a troca de apenas um aminoácido, causaram perdas mínimas na função de virulência do gene *avrBs2* em plantas de pimentão suscetíveis. Tais mutantes também tiveram um nível mínimo ou intermediário em induzir resistência em plantas portadoras do gene *Bs2*. Os resultados revelaram que a pressão de seleção exercida pelo gene *Bs2* sobre o gene *avrBs2*, está promovendo a evolução da proteína de avirulência para não ser detectada pela proteína codificada pelo gene *Bs2*, e ao mesmo tempo para o gene *avrBs2* manter sua função na adaptabilidade do patógeno (GASSMANN et al., 2000).

No caso da resistência conferida por genes de resistência executores, estirpes bacterianas capazes de causar doença em plantas que possuem esse tipo de genes têm sido relatadas. Essas estirpes suplantam a resistência da

planta mediante vários mecanismos, incluindo perda do gene de avirulência, deleção de algumas repetições na porção central da proteína de avirulência, ou injetando efetores TAL adicionais que têm como alvo os mesmos genes de suscetibilidade das proteínas de avirulência que se ligam aos EBE dos genes de resistência (ANTONY et al., 2010; RÖMER et al., 2007; STREUBEL et al., 2013; VERA CRUZ et al., 2000; YANG et al., 2005a; YU et al., 2011; ZHOU et al., 2015)

As bactérias também podem suplantar a defesa das plantas adquirindo novo material genético através de THG. Esse mecanismo já foi relatado em patovares da espécie *Xanthomonas citri*. *X. citri* pv. *citri* (*Xcc*) tem uma ampla gama de hospedeiros e distribuição mundial. Para que *Xcc* cause os sintomas de cancro em citros é requerido o gene *pthA* (*pathogenicity A*). Um distinto grupo filogenético, *X. citri* pv. *aurantifolii* (*Xca*), tem uma gama de hospedeiros mais restrita, é encontrado somente na América do Sul e causa sintomas idênticos a *Xcc* em citros. Foi detectado um gene homólogo a *pthA* em *Xca*, denominado *pthB* (EL YACOUBI et al., 2007). O gene *pthB* está contido em um plasmídeo conjugativo denominado pXcB, que contém genes para produção de um sistema de secreção de tipo IV (SST4) e é requerido para que *Xca* cause os sintomas de cancro cítrico. Foi verificada uma alta taxa de transferência *in planta* do plasmídeo pXcB quando uma estirpe selvagem de *Xca* foi coinoculada com uma estirpe de *Xcc* mutante para *pthA*, portanto não patogênica (EL YACOUBI et al., 2007). A patogenicidade do mutante de *Xcc* foi restabelecida e os sintomas de cancro foram verificados. Cabe salientar que *X. citri* pv. *citri* e *X. citri* pv. *aurantifolii* foram reclassificados respectivamente como *X. citri* subsp. *citri* e *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* por Schaad et al. (2005). A transferência horizontal de genes permite entender por que grupos filogeneticamente distintos podem incitar sintomas semelhantes.

7.3 Suplantação da resistência da planta não hospedeira

A suplantação da resistência da planta não hospedeira está associada com a expansão da gama de hospedeiros de determinada espécie bacteriana. Essa expansão pode resultar da adaptação do patógeno ao novo hospedeiro

como resultado da ação de diversos processos evolutivos, incluindo troca de hospedeiro (*host shift*) e salto de hospedeiro (*host jump*) (DE VIENNE et al., 2013; SCHULZE-LEFERT; PANSTRUGA, 2011). Troca de hospedeiro ocorre quando o patógeno adquire a capacidade de infectar uma nova espécie filogeneticamente relacionada com a espécie hospedeira original. Essa adaptação pode estar associada ou não à perda da aptidão (*fitness*) de infectar a espécie hospedeira original (MILGROOM 2015; STUKENBROCK; MCDONALD 2008; VAN BAARLEN et al., 2007). Por exemplo, a capacidade de *Erwinia psidii* de causar queima dos ponteiros na goiabeira e seca dos ponteiros e murcha bacteriana em eucalipto, ambos os hospedeiros pertencentes à família Myrtacea, sugere que uma troca de hospedeiro aconteceu nessa espécie bacteriana recentemente (ARRIEL et al., 2014; COUTINHO et al., 2011).

Salto de hospedeiro acontece quando o patógeno se adapta a uma espécie evolutivamente distante da espécie hospedeira (MILGROOM 2015; STUKENBROCK; MCDONALD 2008; VAN BAARLEN et al., 2007). Várias espécies bacterianas têm adquirido a capacidade de infectar organismos pertencentes a grupos taxonomicamente distantes. A ampla gama de hospedeiros de bactérias biotróficas, tais como *P. syringae* e *X. axonopodis*, indica que elas sofreram troca e/ou salto de hospedeiro no passado. Este fato se reflete na classificação infraespecífica a nível de patovar. Recentemente, Coutinho et al. (2015) relataram que *X. vasicola*, que já causava doença em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), milho e algumas palmáceas, se adaptou para infectar também *Eucalyptus grandis* na África do Sul. *Ralstonia solanacearum* também se adaptou recentemente para causar doença em plantas cultivadas de eucalipto no Brasil (DIANESE et al., 1990; DIANESE; TAKATSU 1985; MARQUES et al., 2013). No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes à adaptação dessas espécies bacterianas ao eucalipto não têm sido determinados. A capacidade de espécies como *Pectobacterium carotovorum* e *Dickeya dadantii* de infectar tanto plantas como insetos (BASSET et al., 2000; COSTECHAREYRE et al., 2012), e de *Burkholderia cepacia*, *Agrobacterium radiobacter* e *P. aeruginosa* de causar doença tanto em plantas como em humanos (VAN BAARLEN et al.,

2007) indica que elas tiveram salto de hospedeiro no passado.

Entre os mecanismos envolvidos na adaptação a novos hospedeiros relata-se a recombinação intraespecífica e a THG (DE LA CRUZ; DAVIES 2000). Uma alta taxa de recombinação tem sido associada com a adaptação de *Xylella fastidiosa* a diferentes espécies de plantas. Essa adaptação se reflete no aumento no número de subespécies que têm sido identificadas recentemente. Inicialmente, somente três subespécies eram reconhecidas (em seus respectivos hospedeiros): subsp. *fastidiosa* (videira, *Vitis vinifera*; alfafa, *Medicago sativa*; amendoeira, *Prunus dulcis*; ácer, *Acer* spp.), subsp. *pauca* (citros, *Citrus* spp.; cafeeiro, *Coffea arabica*) e subsp. *multiplex* (pêssego, *Prunus pérsica*; elmo, *Ulmus* spp.; ameixeira, *Prunus* spp.; sicômoro, *Platanus* spp.; amendoeira, *Prunus dulcis*) (SCHAAD et al., 2004). Em 2010, duas novas subespécies foram reconhecidas: subsp. *sandyi* (*Nerium oleander*) e subsp. *tashke* (*Chitalpa tashkentensis*) (JANSE; OBRADOVIC 2010). Já no ano 2014, *X. fastidiosa* subsp. *morus* foi relatada como agente causal da queima foliar da amoreira vermelha (*Morus rubra*) (NUNNEY et al., 2014).

A adaptação das bactérias a novas espécies de hospedeiros pode acontecer como consequência da aquisição de fatores de patogenicidade. Por exemplo, a capacidade de muitas espécies bacterianas de causar doença depende da atividade do sistema de secreção de tipo III (SST3), codificado pelos genes *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity/hypersensitive response and conserved*), adquiridos mediante transferência horizontal (ALFANO et al., 2000; COLLMER et al., 2000; KAY; BONAS 2009). Igualmente, *Pantoea agglomerans* tem evoluído para causar doença em diversos hospedeiros, incluindo *Gypsophila* spp. e beterraba (*Beta vulgaris*). *P. agglomerans* causa tumores nesses hospedeiros devido à aquisição de um plasmídeo que contém genes que determinam a patogenicidade e a especificidade de hospedeiro (BARASH; MANULIS-SASSON 2009).

REFERÊNCIAS

- AARTS, N. et al. Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 17, p. 10306-10311, 1998.
- ABO-MOCH, F.; MAVRIDIS, A.; RUDOLPH, K. Determination of races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* occurring in Europe. *Journal of Phytopathology*, v. 143, p. 1-5, 1995.
- ACHARYA, B. R. et al. Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal*, v. 50, p. 488-499, 2007.
- ADHIKARI, T. B. et al. Association mapping of Quantitative Trait Loci in spring wheat landraces conferring resistance to bacterial leaf streak and spot blotch. *The Plant Genome Journal*, v. 5, p. 1-16, 2012.
- AIRES, A. et al. Initial *in vitro* evaluations of the antibacterial activities of glucosinolate enzymatic hydrolysis products against plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 106, n. 6, p. 2096-2105, 2009.
- ALFANO, J. R. et al. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 9, p. 4856-4861, 2000.
- ALLEN, D.; LENNE, J. Diseases as constraints to production of legumes in agriculture. In: *Pathology of Food and Pasture Legumes*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 1998. p. 1-61.
- ALMEIDA et al. Avaliação preliminar de impacto social de cultivar de mandioca resistente à bacteriose: o caso da Formosa no Estado da Bahia.

Revista Raízes e Amidos Tropicais, v. 5, p. 1020-1025, 2009a.

ALMEIDA, N. F. et al. A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 22, n. 1, p. 52–62, 2009b.

AN, C.; MOU, Z. Non-host defense response in a novel *Arabidopsis-Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathosystem. *PLoS ONE*, v. 7, p. e31130, 2012.

ANDRADE, C. C. L. et al. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. *Tropical Plant Pathology*, v. 38, p. 28-34, 2013.

ANTONY, G. et al. Rice *xa13* recessive resistance to bacterial blight is defeated by induction of the disease susceptibility gene *Os-11N3*. *The Plant Cell*, v. 22, p. 3864–3876, 2010.

ARANEGA-BOU, P. et al. Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 488, 2014.

ARNAUD, D.; DESCLOS-THEVENIAU, M.; ZIMMERLI, L. Disease resistance to *Pectobacterium carotovorum* is negatively modulated by the *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, p. 1070–1072, 2012.

ARRIEL, D. A. A. et al. Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *Forest Pathology*, v. 44, p. 255–265, 2014.

ASHFIELD, T. et al. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the *RPG1* locus. *Genetics*, v. 141, p. 1597-1604, 1995.

ASTUA-MONGE, G. et al. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, p. 911-921, 2000a.

- ASTUA-MONGE, G. et al. *Xv4-vrxv4* : A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, p. 1346–1355, 2000b.
- AYLIFFE, M. A.; LAGUDAH, E. S. Molecular genetics of disease resistance in cereals. *Annals of Botany*, v. 94, p. 765-773, 2004.
- BACCELLI, I.; MAUCH-MANI, B. Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Molecular Biology*, v. 91, p. 1–9, 2015.
- BALMER, A. et al. The “prime-ome”: towards a holistic approach to priming. *Trends in Plant Science*, v. 20, p. 443-452, 2015.
- BALOL, B.; SUBHASH, B. R. Strategies for developing bacterial disease resistant plants. *Current Biotica*, v. 4, p. 492-502, 2011.
- BAO, Z. et al. Identification of a candidate gene in *Solanum habrochaites* for resistance to a race 1 strain of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *The Plant Genome*, v. 3, p. 1-15, 2015.
- BARASH, I.; MANULIS-SASSON, S. Recent evolution of bacterial pathogens: the gall-forming *Pantoea agglomerans* case. *Annual Review of Phytopathology*, v. 47, p. 133-152, 2009.
- BART, R. et al. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 13038-13043, 2012.
- BASKAR, V. et al. Engineering glucosinolates in plants: current knowledge and potential uses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, p. 1694-1717, 2012.
- BASSET, A. et al. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 3376-3381, 2000.

BEDNAREK, P. Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, p. 407-414, 2012a.

BEDNAREK, P. Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity. *ChemBioChem*, v. 13, p. 1846-1859, 2012b.

BELAN, L. et al. Diagrammatic scale for assessment of bacterial blight in coffee leaves. *Journal of Phytopathology*, v. 162, p. 801-810, 2014.

BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J. L. Plant disease resistance protein signaling: NBS - LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 391-399, 2004.

BERNSDORFF, F. et al. Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and independent pathways. *The Plant Cell*, v. 28, p. 102-129, 2015.

BERRUETA, M. C. et al. New sources of partial resistance to bacterial spot race T2 in processing tomatoes. *Horticultura Brasileira*, v. 34, p. 326-332, 2016.

BESTWICK, C. S. et al. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *The Plant Cell*, v. 9, p. 209-221, 1997.

BESTWICK, C. S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J. W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology*, v. 108, p. 503-516, 1995.

BIERE, A.; GOVERSE, A. Plant-mediated systemic interactions between pathogens, parasitic nematodes, and herbivores above- and belowground. *Annual Review of Phytopathology*, v. 54 p.499-527, 2016.

BIMOLATA, W. et al. Analysis of nucleotide diversity among alleles of the major bacterial blight resistance gene *Xa27* in cultivars of rice (*Oryza*

sativa) and its wild relatives. *Planta*, v. 238, p. 293-305, 2013.

BLOCK, A.; ALFANO, J. R. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, p. 39-46, 2011.

BOCH, J.; BONAS, U.; LAHAYE, T. TAL effectors - pathogen strategies and plant resistance engineering. *New Phytologist*, v. 204, p. 823-832, 2014.

BOGDANOVE, A. J.; SCHORNACK, S.; LAHAYE, T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 394-401, 2010.

BONAS, U.; CONRADIS-STRAUCH, J.; BALBO, I. Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Molecular and General Genetics*, v. 238, p. 261-269, 1993.

BONAS, U.; STALL, R. E.; STASKAWICZ, B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular and General Genetics*, v. 218, p. 127-136, 1989.

BOSTOCK, R. M. Signal crosstalk and induced resistance: striding the line between cost and benefit. *Annual Review of Phytopathology*, v. 43, p. 545-580, 2005.

BOUWMEESTER, K.; GOVERS, F. *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, p. 4383-4396, 2009.

BRAR, D. S.; KHUSH, G. S. Alien introgression in rice. *Plant Molecular Biology*, v. 35, p. 35-47, 1997.

BROTMAN, Y. et al. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, v. 158, p. 139-146, 2012.

BROWN, J. R. Ancient horizontal gene transfer. *Nature Reviews Genetics*,

v. 4, p. 121–132, 2003.

BUIST, G. et al. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular Microbiology*, v. 68, p. 838-847, 2008.

BÜTTNER, D. Behind the lines—actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 40, p. 894-937, 2016.

CAO, H. et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, v. 6, p. 1583-1592, 1994.

CARMEILLE, A. et al. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, p. 110–121, 2006.

CASARRUBIAS-CASTILLO, K.; MARTINEZ-GALLARDO, N. A.; DELANO-FRIER, J. P. Treatment of *Amaranthus cruentus* with chemical and biological inducers of resistance has contrasting effects on fitness and protection against compatible Gram positive and Gram negative bacterial pathogens. *Journal of Plant Physiology*, v. 171, p. 927-939, 2014.

CAVALCANTI, F. R. et al. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis perniciosus*. *Biological Control*, v. 39, p. 408-417, 2006a.

CAVALCANTI, F. R. et al. Acibenzolar-S-Metil e Ecolife® na indução de respostas de defesa do tomateiro contra a mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*). *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 372-380, 2006b.

CHATAIKA, B. Y. E.; BOKOSI, J. M.; CHIRWA, R. M. Inheritance of resistance to common bacterial blight in common bean. *African Crop Science Journal*, v. 19, p. 313-323, 2011.

CHEEMA, K. K. et al. A novel bacterial blight resistance gene from *Oryza nivara* mapped to 38 kb region on chromosome 4L and transferred to *Oryza sativa* L. *Genetics Research Cambridge*, v. 90, p. 397-407, 2008.

- CHEN, S. et al. Genetic analysis and molecular mapping of a novel recessive gene *xa34(t)* for resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Theoretical and Applied Genetics, v. 122, p. 1331-1338, 2011.
- CHEN, X. et al. An XA21-associated kinase (OsSERK2) regulates immunity mediated by the XA21 and XA3 immune receptors. Molecular Plant, v. 7, p. 874-892, 2014.
- CHESTER, K. S. The problem of acquired physiological immunity in plants. The Quarterly Review of Biology, v. 8, p. 275-324, 1933.
- CHITHRASHREE, A. C. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biological Control, v. 59, p. 114-122, 2011.
- CHOI, H. K. et al. Field evaluation of the bacterial volatile derivative 3-pentanol in priming for induced resistance in pepper. Journal of Chemical Ecology, v. 40, p. 882-892, 2014.
- CHOI, H. W. et al. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response. Plant Physiology, v. 145, p. 890-904, 2007.
- COEMANS, B. et al. High-throughput *in planta* expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (*ARF1*) involved in non-host resistance and *R* gene-mediated resistance. Molecular Plant Pathology, v. 9, p. 25-36, 2008.
- COLLMER, A. et al. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 8770-8777, 2000.
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. Trends in Plant Science, v. 16, p. 524-531, 2011.
- COOK, A. A.; GUEVARA, Y. G. Hypersensitivity in *Capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. Plant Disease, v. 68, p.

329-330, 1984.

COOK, A. A.; STALL, R. E. Inheritance of resistance in pepper to bacterial spot. *Phytopathology*, v. 53, p. 1060-1062, 1963.

COSTECHAREYRE, D. et al. *Dickeya dadantii*, a plant pathogenic bacterium producing cyt-like entomotoxins, causes septicemia in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS ONE*, v. 7, p. e30702, 2012.

COUTINHO, T. A. et al. A new shoot and stem disease of eucalyptus species caused by *Erwinia psidii*. *Australasian Plant Pathology*, v. 40, p. 55-60, 2011.

COUTINHO, T. A. et al. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathology*, v. 64, p. 576-581, 2015.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Inheritance and linkage relationships of reaction to *Xanthomonas phaseoli* (E. F. Smith) Dowson (common blight), stage of plant development and plant habit in *Phaseolus vulgaris* L. *Euphytica*, v. 23, p. 195-204, 1974.

CROSS, J. E. et al. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans *Pseudomonas glycinea*. *Plant Disease Reporter*, v. 50, p. 557-560, 1966.

DA SILVA, E. G. et al. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. *Revista Ceres*, v. 55, p. 377-383, 2008.

DAHLBECK, D.; STALL, R. E. Mutations for change of race in cultures of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 69, p. 634-636, 1978.

DANESH, D. et al. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 7, p. 464-471, 1994.

DE LA CRUZ, F.; DAVIES, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology*, v. 8, p. 128-133, 2000.

DE LANGE, O. et al. Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease. *New Phytologist*, v. 199, p. 773-786, 2013.

DE TORRES, M. et al. *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, v. 47, p. 368-382, 2006.

DE VIENNE, D. M. et al. Cospeciation vs host-shift speciation: methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist*, v. 198, p. 347-385, 2013.

DE VLEESSCHAUWER, D.; HÖFTE, M. Rhizobacteria-induced systemic resistance. In: *Advances in Botanical Research*. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2009. v. 51p. 223-281.

DESCLOS-THEVENIAU, M. et al. The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PLoS Pathogens*, v. 8, p. e1002513, 2012.

DESLANDES, L. et al. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 8024-8029, 2003.

DIANESE, J. C.; DRISTIG, M. C. G.; CRUZ, A. P. Susceptibility to wilt associated with *Pseudomonas solanacearum* among six species of *Eucalyptus* growing in equatorial Brazil. *Australasian Plant Pathology*, v. 19, p. 71-76, 1990.

DIANESE, J. C.; TAKATSU, A. *Pseudomonas solanacearum* biovar 1 isolada de eucalipto em Monte Dourado, Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v. 10, p. 362, 1985.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. *Summa Phytopathologica*, v. 30, p. 57-62, 2004.

- DJEDATIN, G. et al. Identification of novel major and minor QTLs associated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (African strains) resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, v. 9, p. 18, 2016.
- DUTT, M. et al. Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis NPR1* gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PLoS ONE*, v. 10, p. e0137134, 2015.
- DUVEILLER, E.; VAN GINKEL, M.; THIJSSEN, M. Genetic analysis of resistance to bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in bread wheat. *Euphytica*, v. 66, p. 35-43, 1993.
- EDERLI, L. et al. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 infection. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 1784-1794, 2011.
- EL YACOUBI, B. et al. *In planta* horizontal transfer of a major pathogenicity effector gene. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 1612-1621, 2007.
- ELLUR, R. K. et al. Marker-aided incorporation of *Xa38*, a novel bacterial blight resistance gene, in PB1121 and comparison of its resistance spectrum with *xa13* + *Xa21*. *Scientific Reports*, v. 6, p. 29188, 2016.
- ELPHINSTONE, J. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. C. (Eds.). *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. Saint Paul, MN: APS Press, 2005. p. 9-28.
- ESPINAS, N. A.; SAZE, H.; SAIJO, Y. Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1201, 2016.
- FALLIK, B. E. et al. Inheritance and sources of resistance to bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Annals of Applied Biology*, v. 102, p. 365-371, 1983.

- FAN, J. et al. *Pseudomonas sax* genes overcome non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science*, v. 331, p. 1185-1188, 2011.
- FARHATULLAH et al. Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Pakistan Journal of Botany*, v. 43, p. 7-13, 2016.
- FEASTER, C. V. Bacterial pustule disease in soybeans: artificial inoculation, varietal resistance, and inheritance of resistance. [Columbia, Missouri: University of Missouri, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station], 1951. 26 p.
- FETT, W.; SEQUERA, L. Further characterization of physiological races of *Pseudomonas glycinea*. *Canadian Journal of Botany*, v. 59, p. 283-287, 1981.
- FILIPPONE, M. P. et al. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters*, v. 459, p. 115-118, 1999.
- FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Phytopathology*, v. 64, p. 839-863, 2013.
- GAO, D. Y. et al. Identification of a resistance gene to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in a somaclonal mutant HX-3 of indica rice. *Yi Chuan Xue Bao*, v. 29, p. 138-143, 2002.
- GAO, J. Physiological specialization of the bacterial blight pathogen of soybeans *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Journal of Jiling Agricultural University*, v. 20, p. 10-12, 1998.
- GASSMANN, W. et al. Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 7053-7059, 2000.
- GAUMAN, E. Pelanzliche infektionslehre. [Basel: Birkhäuser Basel.], 1946. 611 p.

GE, X. et al. AtNUDT7, a negative regulator of basal immunity in *Arabidopsis*, modulates two distinct defense response pathways and is involved in maintaining redox homeostasis. *Plant Physiology*, v. 145, p. 204-15, 2007.

GILBERTSON, R. L.; MAXWELL, D. P. Common bacterial blight of bean. In: CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHAY, A. N. (Eds.). *Plant diseases of international importance*, v. 2. [Inglewood Cliffs, NJ: Prentice Hall], 1992. p. 18-39.

GILL, U. S.; LEE, S.; MYSORE, K. S. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. *Phytopathology*, v. 105, p. 580-587, 2015.

GIMENEZ-IBANEZ, S.; NTOUKAKIS, V.; RATHJEN, J. P. The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, v. 4, p. 539-541, 2009.

GIOVANARDI, D. et al. Elicitation of resistance to bacterial canker of stone fruits by humic and fulvic acids (glucohumates): a cDNA-AFLP-dHPLC approach. *Scientia Horticulturae*, v. 212, p. 183-192, 2016.

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 4, p. 301-308, 2001.

GREEN, L. S. et al. Ferredoxin and Ferredoxin-NADP Reductase from photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of tomato. *Plant Physiology*, v. 96, p. 1207-1213, 1991.

GU, K. et al. *R* gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, v. 435, p. 1122-1125, 2005.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 78, p. 51-65, 2012.

GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J. J. et al. Plant antimicrobial peptides as potential

- anticancer agents. BioMed Research International, Article ID 735087, 2015.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. et al. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 41, p. 1247-1252, 2006.
- HALTER, T. et al. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. Current Biology, v. 24, p. 134-143, 2014.
- HAM, J. H. et al. Layered basal defenses underlie non-host resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. The Plant Journal, v. 51, p. 604–616, 2007.
- HAHN, S. K. Breeding of cassava for resistance to cassava mosaic disease and bacterial blight in Africa. In: MARAITE H., MEYER J. A. (Eds.). Diseases of Tropical Food Crops. Proceedings of an International Symposium. Louvain-la-Neuve, Belgium: Université Catholique de Louvain, 1978, p. 211-219.
- HANN, D. R.; RATHJEN, J. P. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. The Plant Journal, v. 49, p. 607-618, 2007.
- HAO, G. et al. Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 29, p. 132-142, 2016a.
- HAO, G. et al. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and Huanglongbing (HLB). Frontiers in Plant Science, v. 7, p. 1-11, 2016b.
- HARTWIG, E. E.; LEHMAN, S. G. Inheritance of resistance to the bacterial pustule disease in soybeans. Agronomy Journal, v. 43, p. 226-229, 1951.
- HAYES, R. J. et al. The inheritance of resistance to bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* in three lettuce cultivars. Horticulture Research, v. 1, p. 14066, 2014.

- HE, J. et al. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 484, 2014.
- HEESE, A. et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, p. 12217-12222, 2007.
- HORVATH, D. M. et al. Transgenic resistance confers effective field level control of bacterial spot disease in tomato. *PLoS ONE*, v. 7, p. e42036, 2012.
- HUANG, B. et al. Introgression of bacterial blight resistance genes *Xa7*, *Xa21*, *Xa22* and *Xa23* into hybrid rice restorer lines by molecular marker-assisted selection. *Euphytica*, v. 187, p. 449-459, 2012.
- HUANG, H.-E. et al. A hypersensitive response was induced by virulent bacteria in transgenic tobacco plants overexpressing a plant ferredoxin-like protein (PFLP). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 64, p. 103-110, 2004.
- HUANG, H.-E. et al. Resistance enhancement of transgenic tomato to bacterial pathogens by the heterologous expression of sweet pepper ferredoxin-I protein. *Phytopathology*, v. 97, p. 900-906, 2007.
- HUTTON, S. F. et al. Identification of QTL associated with resistance to bacterial spot race T4 in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 121, p. 1275-1287, 2010.
- HWANG, I. S.; HWANG, B. K. The pepper mannose-binding lectin gene CaMBL1 is required to regulate cell death and defense responses. *Plant Physiology*, v. 155, p. 447-463, 2011.
- HYAKUMACHI, M. et al. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. *Microbes and Environments*, v. 28, p. 128-134, 2013.
- ISHIGA, Y. et al. *Arabidopsis* seedling flood-inoculation technique: a rapid

and reliable assay for studying plant-bacterial interactions. *Plant Methods*, v. 7, p. 32, 2011.

ITAKO, A. T. et al. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. *Idesia (Chile)*, v. 30, p. 85-92, 2012.

IYER-PASCUZZI, A. S.; MCCOUCH, S. R. Recessive resistance genes and the *Oryza sativa* – *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, p. 731-739, 2007.

JANSE, J. D.; OBRADOVIC, A. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology*, v. 92, p. S1.35-S1.48, 2010.

JETIYANON, K.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, v. 24, p. 285-291, 2002.

JIANG, J. et al. WRKY transcription factors in plant response to stress. *Journal of Integrative Biology*, v. 59, p. 86-101, 2017.

JOHNSTON, P. A. et al. *Rph22*: mapping of a novel leaf rust resistance gene introgressed from the non-host *Hordeum bulbosum* L. into cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 126, p. 1613-1625, 2013.

JONES, J. B. et al. A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Disease*, v. 79, p. 395–398, 1995.

JONES, J. B. et al. A non-hypersensitive resistance in pepper to the bacterial spot pathogen is associated with two recessive genes. *Phytopathology*, v. 92, p. 273-277, 2002.

JONES, J. B. et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, p. 755-762, 2004.

JORGE, M. et al. QTL analysis of field resistance to *Xanthomonas*

- axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. Theoretical and Applied Genetics, v. 102, p. 564-571, 2001.
- JUNG, H. W. et al. Priming in systemic plant immunity. Science, v. 324, p. 89-91, 2009.
- KANDEL, Y. R. et al. Evaluation of spring wheat germplasm for resistance to bacterial leaf streak caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Plant Disease, v. 96, p. 1743-1748, 2012.
- KANDEL, Y. R. et al. Mapping quantitative resistance loci for bacterial leaf streak disease in hard red spring wheat using an identity by descent mapping approach. Euphytica, v. 201, p. 53-65, 2015.
- KANG, L. et al. Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, p. 3519-3524, 2003.
- KANZAKI, H. et al. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. Molecular Plant Pathology, v. 4, p. 383-391, 2003.
- KAY, S.; BONAS, U. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. Current Opinion in Microbiology, v. 12, p. 37-43, 2009.
- KEARNEY, B.; STASKAWICZ, B. J. Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. Nature, v. 346, p. 385-386, 1990.
- KEEN, N. et al. Avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its interaction with resistance gene *Rpg4* in soybean. In: HENNECHE, H.; VERMA, D. P. (Eds.). Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Volume 1. Amsterdam, The Netherlands: Springer, 1991. p. 37-44.
- KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annual Review of Genetics, v. 24, p. 447-463, 1990.

KEEN, N. T.; BUZZELL, R. I. New disease resistance genes in soybean against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 81, p. 133-138, 1991.

KEITH, L. W. et al. Comparison of *avrD* alleles from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 10, p. 416-422, 1997.

KIM, S.-M. et al. Identification and fine-mapping of a new resistance gene, *Xa40*, conferring resistance to bacterial blight races in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, v. 128, p. 1933-1943, 2015.

KIM, S.-S.; HARTMANN, R. W. Inheritance of a gene (*Bs3*) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Disease*, v. 69, p. 233-235, 1985.

KIZHEVA, Y. et al. Identification of *Xanthomonas* strains from tomato and pepper and their sensitivity to antibiotics and copper. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 19, p. 80-82, 2013.

KLARZYNSKI, O. et al. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, v. 124, p. 1027-1037, 2000.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C.-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, v. 94, p. 1259-1266, 2004.

KOBAYASHI, D. Y.; TAMAKI, S. J.; KEEN, N. T. Cloned avirulence genes from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. v. 86, p. 157-161, 1989.

KOBAYASHI, D. Y.; TAMAKI, S. J.; KEEN, N. T. Molecular characterization of avirulence gene D from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 3, p. 94-102, 1990.

KOHLER, A.; SCHWINDLING, S.; CONRATH, U. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPR1/NIM1* gene in

Arabidopsis. Plant Physiology, v. 128, n. 3, p. 1046-1056, 2002.

KOONIN, E. V.; MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L. Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. Annual Review of Microbiology, v. 55, p. 709-42, 2001.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. Plant Physiology, v. 146, p. 839-844, 2008.

KOST, T. D. et al. Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. PLoS ONE, v. 10, p. e0143980, 2015.

KUMAR, D.; NABI, S. Breeding for disease resistance. Agrobios News Letter, v. XIV, p. 83-84, 2015.

KUNKEAW, S.; TAN, S.; COAKER, G. Molecular and evolutionary analyses of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 23, p. 415-424, 2010.

LACOMBE, S. et al. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature Biotechnology, v. 28, p. 365-370, 2010.

LACY, G. H.; STROMBERG, V. K.; CANNON, N. P. *Erwinia amylovora* mutants and *in planta*-derived transconjugants resistant to oxytetracycline. Canadian Journal of Plant Pathology, v. 6, p. 33-39, 1984.

LAVIOLETTE, F. A. et al. Effect of bacterial pustule on yield of soybeans. Crop Science, v. 10, p. 150-151, 1970.

LE, M. H. et al. LIK1, a CERK1-interacting kinase, regulates plant immune responses in *Arabidopsis*. PLoS ONE, v. 9, p. e102245, 2014.

LEACH, J. E.; WHITE, F. F. Bacterial avirulence genes. Annual Review of Phytopathology, v. 34, p. 153-179, 1996.

LEE, H.-A.; YEOM, S.-I. Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner. Briefings in Functional Genomics, v. 14, p. 233-242,

2015.

LEE, K. S. et al. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. *Phytopathology*, v. 93, p. 147-152, 2003.

LI, S.-B. et al. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* - induced blight of Anthurium. *Biological Control*, v. 63, p. 9-16, 2012a.

LI, W. et al. Identification of genes required for nonhost resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* reveals novel signaling components. *PLoS ONE*, v. 7, p. e42796, 2012b.

LI, X. et al. Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 12990-12995, 2005.

LI, X.; KAPOUS, P.; ZHANG, Y. NLRs in plants. *Current Opinion in Immunology*, v. 32, p. 114-121, 2015.

LIM, C. W. et al. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor CabZIP2 in enhanced disease resistance to bacterial pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 28, p. 825-833, 2015.

LIN, N.; MARTIN, G. B. An *avrPto/avrPtoB* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 does not elicit *Pto*-mediated resistance and is less virulent on tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 18, p. 43-51, 2005.

LIU, B. et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. *The Plant Cell*, v. 24, p. 3406-3419, 2012.

LIU, J. et al. Soybean kinome: functional classification and gene expression patterns. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 1919-1934, 2015.

- LLORENS, E. et al. Induced resistance in sweet orange against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by hexanoic acid. *Crop Protection*, v. 74, p. 77-84, 2015.
- LOIVAMÄKI, M. et al. A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, v. 139, p. 348-357, 2010.
- LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Melhoramento para resistência a doenças bacterianas. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ, N. (Eds.). Melhoramento de Plantas para Condições de Estresses Bióticos. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. p. 61-88.
- LU, F. et al. Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 57, p. 641-652, 2015.
- LU, M.; TANG, X.; ZHOU, J.-M. *Arabidopsis NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *The Plant Cell*, v. 13, p. 437-447, 2001.
- LUNA, E. et al. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, v. 158, p. 844-853, 2012.
- LUO, Y. et al. Marker-assisted breeding of *Xa4*, *Xa21* and *Xa27* in the restorer lines of hybrid rice for broad-spectrum and enhanced disease resistance to bacterial blight. *Molecular Breeding*, v. 30, p. 1601-1610, 2012.
- LUO, Y.; YIN, Z. Marker-assisted breeding of Thai fragrance rice for semi-dwarf phenotype, submergence tolerance and disease resistance to rice blast and bacterial blight. *Molecular Breeding*, v. 32, p. 709-721, 2013.
- LUZZATTO-KNAAN, T. et al. Priming of protein expression in the defence response of *Zantedeschia aethiopica* to *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant Pathology*, v. 15, p. 364-378, 2014.
- MACHO, A. P. Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist*, v. 210, p. 51-57, 2016.

- MADIGAN, M. T. et al. Genética de bactérias e arqueias. In: MADIGAN, M. T. et al. (Eds.). Microbiologia de Brock. Porto Alegre: ArtMed, 2016. p. 291-314.
- MAEDA, S. et al. Overexpression of *BSR1* confers broad-spectrum resistance against two bacterial diseases and two major fungal diseases in rice. *Breeding Science*, v. 66, p. 396-406, 2016.
- MAIMBO, M. et al. S-glycoprotein-like protein regulates defense responses in *Nicotiana* plants against *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology*, v. 152, p. 2023-2035, 2010.
- MANJAYA, J. G.; PAWAR, S. E. New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance. *Euphytica*, v. 106, p. 205-208, 1999.
- MARAITE, H.; BRAGARD, C.; DUVEILLER, E. The status of resistance to bacterial diseases of wheat. In: BUCK, H. T.; NISI, J. E.; SALOMÓN, N. (Eds.). Wheat Production in Stressed Environments: Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November - 2 December 2005, Mar del Plata, Argentina. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 37-49.
- MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; BLUM, L. E. B. Virulência de estirpes (biovar 1 e 2T) de *Ralstonia solanacearum* a *Eucalyptus* spp. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, p. 1952-1957, 2013.
- MARTIN, G. B. et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, v. 262, p. 1432-1436, 1993.
- MARTÍNEZ-AGUILAR, K. et al. Use of BABA and INA as activators of a primed state in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 653, 2016.
- MAUCH-MANI, B. et al. Defense priming: an adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 68, p. 16.1-16.28, 2017.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of*

Phytopathology, v. 46, p. 101-122, 2008.

MEZIANE, H. et al. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. Molecular Plant Pathology, v. 6, p. 177-185, 2005.

MIKLAS, P. N. et al. A major QTL for common bacterial blight resistance derives from the common bean great northern landrace cultivar Montana No. 5. Euphytica, v. 131, p. 137-146, 2003.

MILGROOM, M. G. Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution. Saint Paul, MN, USA: American Phytopathological Society, 2015. 399 p.

MILIJASEVIC, S. et al. Races and hosts of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Serbia. Archives of Biological Sciences, Belgrade, v. 61, p. 93-102, 2009.

MINSAVAGE, G. V. et al. Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* - pepper interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 3, p. 41-47, 1990.

MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; STALL, R. E. Cloning and sequencing of an avirulence gene (*avrXv3*) isolated from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tomato race 3. Phytopathology, v. 86, p. S15, 1996.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. The *Arabidopsis* Flavin-Dependent Monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. Plant Physiology, v. 141, p. 1666-1675, 2006.

MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Bacterial non-host resistance: interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. Physiologia Plantarum, v. 131, p. 448-461, 2007.

MISHRA, D. et al. Pathotype and genetic diversity amongst Indian isolates of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. PLoS ONE, v. 8, p. e81996, 2013.

MIURA, L. et al. Seleção de germoplasma de mandioca resistente a

Xanthomonas campestris pv. *manihotis* em Santa Catarina. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, v. 25, p. 1209-1214, 1990.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* Amaral et al. em cafeeiros. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976. p. 56.

MOHAN BABU, R. et al. Induction of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) resistance in rice by treatment with acibenzolar-S-methyl. Annals of Applied Biology, v. 143, p. 333–340, 2003.

MOREAU, M. et al. EDS1 contributes to nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* against *Erwinia amylovora*. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 25, p. 421-430, 2012.

MOSCOU, M. J.; BOGDANOVE, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science, v. 326, p. 1501, 2009.

MOSHER, S. et al. The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of *Arabidopsis* to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. The Plant Journal, v. 73, p. 469-482, 2013.

MOU, Z.; FAN, W.; DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. Cell, v. 113, p. 935-944, 2003.

MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? Trends in Plant Science, v. 9, p. 97-104, 2004.

NAKAI, H. et al. Genetic studies of an induced rice mutant resistant to multiple races of bacterial leaf blight. Rice Genetics Newsletter, v. 5, p. 101-103, 1988.

NAKAJIMA, H. et al. Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme. Plant Cell Reports, v. 16, p. 674-679, 1994.

- NAMUKWAYA, B. et al. Transgenic banana expressing *Pflp* gene confers enhanced resistance to *Xanthomonas* wilt disease. *Transgenic Research*, v. 21, p. 855-865, 2012.
- NARUSAKA, M. et al. *RRS1* and *RPS4* provide a dual resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant Journal*, v. 60, p. 218-226, 2009.
- NARUSAKA, M. et al. Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. *PLoS ONE*, v. 8, p. e55954, 2013.
- NARUSAKA, M. et al. *Arabidopsis* dual resistance proteins, both *RPS4* and *RRS1*, are required for resistance to bacterial wilt in transgenic *Brassica* crops. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, p. e29130, 2014.
- NASIR, K. H. B. et al. High-throughput *in planta* expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance. *The Plant Journal*, v. 43, p. 491-505, 2005.
- NÁVAROVÁ, H. et al. Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *The Plant Cell*, v. 24, p. 5123-5141, 2012.
- NEKRASOV, V. et al. Control of the pattern-recognition receptor EFR by an ER protein complex in plant immunity. *The EMBO Journal*, v. 28, p. 3428-3438, 2009.
- NELSON, R. R. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, v. 16, p. 359-378, 1978.
- NEVES, M. F. et al. O retrato da citricultura brasileira. Riberão Preto, SP, Brasil: Markestrat, Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. 137 p.
- NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? *New Phytologist*, v. 182, p. 817-828, 2009.

- NUNNEY, L. et al. Large scale intersubspecific recombination in the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 3025-3033, 2014.
- NÜRNBERGER, T.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, v. 6, p. 335-345, 2005.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE, J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, v. 405, p. 299-304, 2000.
- OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, v. 107, p. 19-28, 2001.
- PANOFF, J.; CHUITON, C. Horizontal gene transfer: a universal phenomenon. *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 10, p. 939-943, 2004.
- PAPARELLA, C. et al. The *Arabidopsis* LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE3 regulates the cross talk between immunity and abscisic acid responses. *Plant Physiology*, v. 165, p. 262-276, 2014.
- PARK, H. B. et al. One shot-two pathogens blocked: exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signaling & Behavior*, v. 8, p. e24619, 2013.
- PASTOR, V. et al. Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, v. 94, p. 46-56, 2013.
- PEART, J. R. et al. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, p. 10865-10869, 2002.
- PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. Molecular basis of *Pto*-mediated resistance

to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology*, v. 41, p. 215-243, 2003.

PELEGRINI, P. B.; FRANCO, O. L. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, p. 2239-2253, 2005.

PEREZ, L. M. et al. Introgression of *Xa4*, *Xa7* and *Xa21* for resistance to bacterial blight in thermosensitive genetic male sterile rice (*Oryza sativa* L.) for the development of two-line hybrids. *Euphytica*, v. 164, p. 627-636, 2008.

PETEK, M. R. et al. Seleção de progênies de *Coffea arabica* com resistência simultânea à mancha aureolada e à ferrugem alaranjada. *Bragantia*, v. 65, p. 65-73, 2006.

PIETERSE, C. M. J. et al. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 57, p. 123-134, 2000.

PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, v. 52, p. 347-375, 2014.

PINTO, R. J. Introdução ao Melhoramento Genético de Plantas. 2º ed. Maringá, Paraná: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2009. 351 p.

POTNIS, N. et al. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics*, v. 12, p. 146, 2011.

POTNIS, N. et al. Avirulence proteins AvrBs7 from *Xanthomonas gardneri* and AvrBs1.1 from *Xanthomonas euvesicatoria* contribute to a novel gene-for-gene interaction in pepper. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, p. 307-320, 2012.

- PRADHAN, S. K. et al. Incorporation of bacterial blight resistance genes into lowland rice cultivar through marker-assisted backcross breeding. *Phytopathology*, v. 106, p. 710-718, 2016.
- PRUITT, R. N. et al. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Science Advances*, v. 1, p. e1500245, 2015.
- QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; CABRAL, L. P.; FILHO, O. P. Severidade do sintoma da bactéria *Xylella fastidiosa* em cultivares de cafeeiro. *Bragantia*, v. 63, p. 395-404, 2002.
- RANF, S. et al. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology*, v. 16, p. 426-433, 2015.
- RICO, A. et al. Agroinfiltration reduces ABA levels and suppresses *Pseudomonas syringae*-elicited salicylic acid production in *Nicotiana tabacum*. *PLoS ONE*, v. 5, p. e8977, 2010.
- RIVA, E. M. et al. Inheritance of bacterial spot disease in *Capsicum annuum* L. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 4, p. 490-494, 2004.
- RODRIGUES, L. M. R. et al. Mancha Aureolada do Cafeeiro Causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Campinas, SP, Brasil: Instituto Agronômico de Campinas, 2013. 24 p.
- ROJAS, C. M. et al. Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 24, p. 336-352, 2012.
- ROMEIRO, R. S.; KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathology*, v. 145, p. 495-498, 1997.
- RÖMER, P. et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. v. 318, p. 645-648, 2007.

- RÖMER, P.; RECHT, S.; LAHAYE, T. A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, p. 20526-20531, 2009.
- ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, v. 14, p. 340-358, 1961.
- ROSS, A. F. Systemic effects of local lesion formation. In: BEEMSTER, G; FIJKSTRA, J. (Eds.). *Viruses of Plants*, 1966. p. 127-150.
- ROUX, M. et al. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell*, v. 23, p. 2440-2455, 2011.
- RYU, C.-M. et al. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*, v. 160, p. 413-420, 2003.
- RYU, C.-M. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1017-1026, 2004.
- SAHIN, F.; MILLER, S. A. Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant Disease*, v. 82, p. 794-799, 1998.
- SAKAMOTO, T. et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology*, v. 12, p. 229, 2012.
- SANTNER, A.; ESTELLE, M. The JAZ proteins link jasmonate perception with transcriptional changes. *The Plant Cell*, v. 19, p. 3839-3842, 2007.
- SCALSCHI, L. et al. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology*, v. 14, p. 342-355, 2013.

SCHAAD, N. W. et al. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Systematic and Applied Microbiology, v. 27, p. 290-300, 2004.

SCHAAD, N. W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Systematic and Applied Microbiology, v. 28, p. 494–518, 2005.

SCHANDRY, N. et al. TALE-like effectors are an ancestral feature of the *Ralstonia solanacearum* species complex and converge in DNA targeting specificity. Frontiers in Plant Science, v. 7, p. 1225, 2016.

SCHLAICH, N. L. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. Trends in Plant Science, v. 12, p. 412–418, 2007.

SCHOONBEEK, H. et al. *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. New Phytologist, v. 206, p. 606-613, 2015.

SCHORNACK, S. et al. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. The Plant Journal, v. 37, p. 46-60, 2004.

SCHORNACK, S. et al. Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. New Phytologist, v. 179, p. 546-556, 2008.

- SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science*, v. 16, p. 117-125, 2011.
- SCOTT, J. W. et al. Resistance to bacterial spot race T4 and breeding for durable and broad resistance to other races. *Reports of the Tomato Genetics Cooperative*, v. 56, p. 33-36, 2006.
- SEGONZAC, C. Æ.; ZIPFEL, C. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, p. 54-61, 2011.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Ornithine-delta-aminotransferase and proline dehydrogenase genes play a role in non-host disease resistance by regulating pyrroline-5-carboxylate metabolism-induced hypersensitive response. *Plant, Cell and Environment*, v. 35, p. 1329-1343, 2012.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annual Review of Phytopathology*, v. 51, p. 19.1-19.21, 2013.
- SHANTI, M. L. et al. Identification of resistance genes effective against rice bacterial blight pathogen in Eastern India. *Plant Disease*, v. 85, p. 506-512, 2001.
- SHARLACH, M. et al. Fine genetic mapping of *RXopJ4*, a bacterial spot disease resistance locus from *Solanum pennellii* LA716. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 126, p. 601–609, 2013.
- SHARMA, P. C. et al. Virus-induced silencing of *WIPK* and *SIPK* genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 269, p. 583-591, 2003.
- SHEIKH, A. H. et al. Agroinfiltration by cytokinin-producing *Agrobacterium* sp. strain GV3101 primes defense responses in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, p. 1175-1185, 2014.

- SHIU, S. et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *The Plant Cell*, v. 16, p. 1220-1234, 2004.
- SILVA, K. J. P. et al. The *Arabidopsis* *NPR1* gene confers broad-spectrum disease resistance in strawberry. *Transgenic Research*, v. 24, p. 693–704, 2015.
- SILVA, L. O.; SINGH, S. P.; PASTOR-CORRALES, M. A. Inheritance of resistance to bacterial blight in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 78, p. 619-624, 1989.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, p. 189-196, 2007.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em plantas de berinjela por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*: aspectos bioquímicos e biomassa vegetal. *Summa Phytopathologica*, v. 34, p. 137-143, 2008.
- SINGH, P. et al. The lectin receptor kinase-VI.2 is required for priming and positively regulates *Arabidopsis* Pattern-Triggered Immunity. *The Plant Cell*, v. 24, p. 1256-1270, 2012.
- SINGH, S. P.; MUÑOZ, C. G. Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Science*, v. 39, p. 80-89, 1999.
- SLAUGHTER, A. et al. Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, v. 158, p. 835-843, 2012.
- SOCQUET-JUGLARD, D. et al. Identification of a major QTL for *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* resistance in apricot. *Tree Genetics & Genomes*, v. 9, p. 409-421, 2013.
- SOHN, K. H. et al. HopAS1 recognition significantly contributes to *Arabidopsis* nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pathogens. *New*

Phytologist, v. 193, p. 58-66, 2012.

SONG, F.; GOODMAN, R. M. Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 59, p. 1-11, 2001.

SONG, G. C.; CHOI, H. K.; RYU, C.-M. Gaseous 3-pentanol primes plant immunity against a bacterial speck pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* via salicylic acid and jasmonic acid-dependent signaling pathways in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 821, 2015.

SONG, G. C.; CHOI, H. K.; RYU, C. M. The folate precursor para-aminobenzoic acid elicits induced resistance against *Cucumber Mosaic Virus* and *Xanthomonas axonopodis*. *Annals of Botany*, v. 111, p. 925-934, 2013.

SONG, W.-Y. et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science*, v. 270, p. 1804-1806, 1995.

SØRENSEN, S. J. et al. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nature Reviews of Microbiology*, v. 3, p. 700-710, 2005.

SOTO-SEDANO, J. et al. QTL identification for cassava bacterial blight resistance under natural infection conditions. *Acta Biológica Colombiana*, v. 22, p. 19–26, 2017.

SOUZA, M. F. M. DE et al. Resistance to *Xanthomonas* spp. in tomato: diallel analysis and gene effects estimative in a breeding programme carried out in Brazil. *Journal of Phytopathology*, v. 156, p. 660-667, 2008.

STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology*, v. 39, p. 111-118, 2014.

STALL, R. E.; C., L. D.; JONES, J. B. Linkage of copper resistance and avirulence loci on a self-transmissible plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant Pathology*, v. 76, p. 240-243, 1985.

STALL, R. E.; JONES, J. B.; MINSAVAGE, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annual*

Review of Phytopathology, v. 47, p. 265-284, 2009.

STASKAWICZ, B. et al. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Journal of Bacteriology, v. 169, n. 12, p. 5789-5794, 1987.

STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 81, p. 6024-6028, 1984.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Eds.). Induced Resistance to Disease in Plants. [s.l.]: Kluwer Academic Press, 1995. p. 86-110.

STRAUSS, T. et al. RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, p. 19480-19485, 2012.

STREUBEL, J. et al. Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. New Phytologist, v. 200, p. 808-819, 2013.

STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. Annual Review of Phytopathology, v. 46, p. 75-100, 2008.

SUH, J. et al. Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice. Rice, v. 6, p. 5, 2013.

SUKARTA, O. C. A.; SLOOTWEG, E. J.; GOVERSE, A. Structure-informed insights for NLR functioning in plant immunity. Seminars in Cell and Developmental Biology, v. 56, p. 134-149, 2016.

TAI, T. H. et al. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to

bacterial spot disease in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, p. 14153-14158, 1999.

TAKAHASHI, Y. et al. A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. The Plant Journal, v. 49, p. 1030-1040, 2007.

TANG, K. et al. Transgenic rice plants expressing the ferredoxin-like protein (AP1) from sweet pepper show enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Science, v. 160, p. 1035-1042, 2001.

TATEDA, C. et al. NtbZIP60, an endoplasmic reticulum-localized transcription factor, plays a role in the defense response against bacterial pathogens in *Nicotiana tabacum*. Journal of Plant Research, v. 121, p. 603-611, 2008.

TATEDA, C. et al. Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against *Pseudomonas cichorii* and in Bax-induced cell death. Plant Cell Reports, v. 28, p. 41-51, 2009.

TAUCH, A. et al. The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. Microbiology, v. 148, p. 1637-1653, 2002.

THAPA, S. P. et al. Identification of QTLs controlling resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 strains from the wild tomato, *Solanum habrochaites* LA1777. Theoretical and Applied Genetics, v. 128, p. 681-692, 2015.

THOQUET, P. et al. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 9, p. 826-836, 1996a.

THOQUET, P. et al. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. Molecular Plant-Microbe Interactions, v. 9, p.

837-842, 1996b.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 6, p. 351-357, 2003.

TIAN, D. et al. The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. *The Plant Cell*, v. 26, p. 497-515, 2014.

TILLMAN, B. L. et al. Yield loss caused by bacterial streak in winter wheat. *Plant Disease*, v. 83, p. 609-614, 1999.

TOILLIER, S. L. et al. Controle do cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 77, p. 99-110, 2010.

TRDÁ, L. et al. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 219, 2015.

TRIPATHI, L. et al. Expression of sweet pepper *Hrap* gene in banana enhances resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, n. 6, p. 721-731, 2010.

TRUMAN, W.; DE ZABALA, M. T.; GRANT, M. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, v. 46, p. 14-33, 2006.

TRYPHONE, G. M. et al. Introgression of common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) resistance to common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) adapted to Tanzania facilitated by marker assisted selection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 2, p. 285-290, 2012.

TSAI, C. H. et al. Priming for enhanced defence responses by specific inhibition of the *Arabidopsis* response to coronatine. *The Plant Journal*, v.

65, p. 469-479, 2011.

TSUJI, J. et al. Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiology, v. 98, p. 1304-1309, 1992.

TU, J. et al. Transgenic rice variety “IR72” with *Xa21* is resistant to bacterial blight. Theoretical and Applied Genetics, v. 9, p. 31-36, 1998.

UJI, Y. et al. Overexpression of *OsMYC2* results in the up-regulation of early JA-responsive genes and bacterial blight resistance in rice. Plant & Cell Physiology, v. 57, p. 1814-1827, 2016.

VALE, F. X. R. DO; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. Fitopatologia Brasileira, v. 26, p. 577-589, 2001.

VALLEJOS, C. E. et al. Characterization of two recessive genes controlling resistance to all races of bacterial spot in peppers. Theoretical and Applied Genetics, v. 121, p. 37-46, 2010.

VAN, K. et al. SSR mapping of genes conditioning soybean resistance to six isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Korean Journal of Genetics, v. 26, p. 47-54, 2004.

VAN BAARLEN, P. et al. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? FEMS Microbiology Reviews, v. 31, p. 239-277, 2007.

VAN DE MORTEL, J. E. et al. Metabolic and transcriptomic changes induced in *Arabidopsis* by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. Plant Physiology, v. 160, p. 2173-2188, 2012.

VAN ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J. The ecology of transfer of mobile genetic elements. FEMS Microbiology Ecology, v. 42, p. 187-197, 2002.

VAN WEES, S. C. M.; GLAZEBROOK, J. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. The Plant Journal, v. 33, p. 733-742,

2003.

VAUTERIN, L. et al. Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology, v. 45, p. 472-489, 1995.

VERA, J. et al. Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 79, p. 31-39, 2012.

VERA CRUZ, C. M. et al. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, p. 13500-13505, 2000.

VERDIER, V. et al. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. Plant Molecular Biology, v. 56, p. 573-584, 2004.

VIDIĆ, M. et al. Review of soybean resistance to pathogens. Ratarstvo i povrtarstvo, v. 50, p. 52-61, 2013.

VOGEL-ADGHOUGH, D. et al. Pipecolic acid enhances resistance to bacterial infection and primes salicylic acid and nicotine accumulation in tobacco. Plant Signaling & Behavior, v. 8, p. e26366, 2013.

VOJNOV, A. A. et al. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 467-477, 2010.

WAN, J. et al. LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in *Arabidopsis*. Plant Physiology, v. 160, p. 396-406, 2012.

WANG, C. et al. XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. Molecular Plant, v. 8, p. 290-302, 2015a.

WANG, G. et al. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in *Arabidopsis*. Plant Physiology, v. 147, p. 503-517,

2008.

WANG, H. et al. Molecular mapping of hypersensitive resistance from tomato “Hawaii 7981” to *Xanthomonas perforans* race T3. *Phytopathology*, v. 101, p. 1217-1223, 2011.

WANG, J.-F. et al. Several genes in *Lycopersicon esculentum* control hypersensitivity to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology*, v. 84, p. 702-706, 1994.

WANG, J.-F. et al. Resistance of tomato line Hawaii 7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 13, p. 6-13, 2000.

WANG, K. et al. SGT1 positively regulates the process of plant cell death during both compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 597-611, 2010.

WANG, K. et al. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiology*, v. 158, p. 1789-1802, 2012.

WANG, S. et al. Rice OsFLS2-mediated perception of bacterial flagellins is evaded by *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* and *oryzicola*. *Molecular Plant*, v. 8, p. 1024-1037, 2015b.

WANG, Y. et al. Phenotypic analyses of *Arabidopsis* T-DNA insertion lines and expression profiling reveal that multiple L-type lectin receptor kinases are involved in plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, p. 1390-1402, 2014.

WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriology Reviews*, v. 27, p. 87-115, 1963.

WEI, C.-F. et al. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*, v. 51, p. 32-46, 2007.

- WHALEN, M. C. et al. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 6, p. 616-627, 1993.
- WILLMANN, R. et al. *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 19824-19829, 2011.
- WYDRA, K. et al. Identification of pathotypes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Africa and detection of Quantitative Trait Loci and markers for resistance to bacterial blight of cassava. *Phytopathology*, v. 94, p. 1084-1093, 2004.
- YABUUCHI, E. et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbiology and Immunology*, v. 39, p. 897-904, 1995.
- YAN, S. et al. Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, p. 3171-3181, 2008.
- YANG, B.; SUGIO, A.; WHITE, F. F. Avoidance of host recognition by alterations in the repetitive and C-terminal regions of AvrXa7, a type III effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 18, p. 142–149, 2005a.
- YANG, W. et al. Resistance in *Lycopersicon esculentum* intraspecific crosses to race T1 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* causing bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, v. 95, p. 519–527, 2005b.
- YODA, H. et al. Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, v. 70, p. 103-112, 2009.

- YOUNG, N. D. QTL mapping and quantitative resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 34, p. 479-501, 1996.
- YU, Y. et al. Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice Nodulin-3 *Os11N3* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24, p. 1102-1113, 2011.
- YU, Z. H. et al. Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *Genetics*, v. 141, p. 675-682, 1995.
- ZAPATA, M.; BEAVER, J. S.; PORCH, T. G. Dominant gene for common bean resistance to common bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *Euphytica*, v. 179, p. 373-382, 2011.
- ZENG, L. et al. A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *The Plant Journal*, v. 69, p. 92-103, 2012.
- ZENG, L. X.; HUANG, S. H.; WU, S. Z. Resistance of IRBB21 (*Xa21*) to five races of bacterial blight in Guangdong. *Journal of Plant Protection*, v. 29, p. 97-100, 2002.
- ZHAI, W. et al. Breeding bacterial blight-resistant hybrid rice with the cloned bacterial blight resistance gene *Xa21*. *Molecular Breeding*, v. 8, p. 285-293, 2001.
- ZHANG, F. et al. *Xa39*, a novel dominant gene conferring broad-spectrum resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Plant Pathology*, v. 64, p. 568-575, 2015a.
- ZHANG, J. et al. Pyramiding of *Xa7* and *Xa21* for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breeding*, v. 125, p. 600-605, 2006.
- ZHANG, J.; YIN, Z.; WHITE, F. TAL effectors and executor *R* genes. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 641, 2015b.

ZHANG, Q. Genetic evaluation and utilization of resistance to rice bacterial blight in China. *Scientia Agricultura Sinica*, v. 24, p. 26-36, 1991.

ZHANG, W. et al. *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and receptor-like kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED mediate innate immunity to necrotrophic fungi. *The Plant Cell*, v. 25, p. 4227-4241, 2013.

ZHAO, B. et al. The *avrRxo1* gene from the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* confers a nonhost defense reaction on maize with resistance gene *Rxo1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 17, p. 771-779, 2004.

ZHAO, B. et al. A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 15383-15388, 2005.

ZHAO, B. et al. Allelic tests and sequence analysis of three genes for resistance to *Xanthomonas perforans* race T3 in tomato. *Horticultural Plant Journal*, v. 1, p. 41-47, 2015.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis. *The Arabidopsis Book*, p. e0173, 2014.

ZHOU, J. et al. Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *The Plant Journal*, v. 82, p. 632-643, 2015.

ZHU, J. et al. QTL and candidate genes associated with common bacterial blight resistance in the common bean cultivar Longyundou 5 from China. *The Crop Journal*, v. 4, p. 344-352, 2016.

ZIMMERLI, L. et al. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by beta-aminobutyric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 12920-12925, 2000.

ZIPFEL, C. et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, v. 428, p. 764-767, 2004.

ZIPFEL, C. et al. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, v. 125, p. 749-760, 2006.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. *Bragantia*, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.

CAPÍTULO 7: RESISTÊNCIA GENÉTICA DE PLANTAS A VÍRUS

Marcelo Eiras¹

Érico de Campos Dianese²

Rita de Cássia Pereira-Carvalho³

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa de Sanidade Vegetal, Laboratório de Fitovirologia e Fisiopatologia, São Paulo, SP, Brasil.

²UFG - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia, Setor de Fitossanidade, Goiânia, GO, Brasil.

³UNB - Universidade de Brasília, Departamento de Fitopatologia, Brasília, DF, Brasil.

INTRODUÇÃO

As plantas, ao longo da evolução, desenvolveram mecanismos de defesa coordenados e sofisticados contra as infecções virais. Os vírus, por sua vez, adquiriram a capacidade de contra-atacar, na tentativa de burlar, reduzir ou suprimir a ação dos sistemas de defesa das plantas. Para desvendar os detalhes dessas batalhas, que ocorrem em nível molecular, nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisa têm se debruçado para entender os diferentes aspectos das interações vírus-hospedeiro associados aos mecanismos de defesa em plantas. A genômica tem auxiliado nesse entendimento, uma vez que dezenas de espécies de plantas, além da grande maioria dos vírus conhecidos, tiveram seus genomas totalmente sequenciados. Assim, por um lado, investe-se no entendimento da resistência da hospedeira, e alguns genes (dominantes e recessivos) associados à resistência contra vírus têm sido clonados e utilizados por programas de melhoramento genético clássico ou via transgenia. Por outro lado, fatores de avirulência (efetores ou elicitores) codificados pelos vírus têm sido identificados e caracterizados. Esforços também têm sido feitos para identificar e caracterizar o papel das moléculas associadas aos mecanismos de silenciamento de RNA como resposta de defesa a infecções virais em plantas. Recentemente, técnicas robustas e

rápidas de modificação de DNA e edição de genomas têm sido utilizadas para auxiliar no entendimento dos mecanismos de resistência contra patógenos, o que deverá permitir um enorme avanço do conhecimento nos próximos anos. Porém, não se pode subestimar a plasticidade e variabilidade genética dos vírus, principalmente aqueles constituídos de RNA, o que demanda um constante trabalho de monitoramento das populações virais e busca incessante por genes de resistência efetivos e duráveis. Neste capítulo, são apresentados e discutidos os mecanismos genéticos de resistência que a planta lança mão para se defender do ataque dos vírus, os genes de resistência dominantes e recessivos e as estratégias de controle envolvendo resistência genética via melhoramento clássico, transgenia e sistemas de edição de genomas. São apresentados e discutidos também os mecanismos de variabilidade genética viral, os fatores de avirulência e de supressão de silenciamento gênico utilizados pelos vírus, para garantir sua sobrevivência e sucesso nas constantes batalhas para superar os mecanismos de defesa da planta.

1 VÍRUS DE PLANTAS: CONCEITOS E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Os vírus de plantas não possuem estrutura celular, não crescem em meios de cultura artificiais e são, portanto, considerados parasitas obrigatórios, pois se replicam exclusivamente em células vivas, utilizando a maquinaria celular para completar as etapas de seu ciclo infeccioso. São constituídos por um único tipo de ácido nucleico (RNA ou DNA), que é envolto por uma cobertura proteica, denominada capsídeo, proteína da cápside ou capa proteica (CP). Alguns vírus apresentam um envoltório lipídico envolvendo os capsídeos. Este envoltório (ou envelope) é formado por lipídeos provenientes das membranas da própria célula hospedeira, adquiridos durante a maturação da partícula viral, e glicoproteínas codificadas pelo genoma viral. O genoma viral somado à CP, estruturados na forma de partículas funcionais, formam o(s) nucleocapsídeo(s). Vírion é a denominação que se dá à partícula viral madura.

Definir um vírus não é uma tarefa fácil, uma vez que há vírus que infectam praticamente todos os tipos de células conhecidas, de procariontes a eucariontes superiores, como plantas e animais, apresentando morfologia, estrutura genômica, ciclo infeccioso e propriedades físico-químicas, biológicas e moleculares bastante diversas. Na literatura mundial podem ser encontradas muitas definições para esses parasitas. Porém, o professor Roger Hull, na quarta (e também na quinta) edição do livro “*Plant Virology*”, apresentou uma definição abrangente e ao mesmo tempo precisa de vírus, com o cuidado de procurar diferenciá-los, excluindo as propriedades e características comuns compartilhadas com outros parasitas obrigatórios: *“um vírus é um conjunto de um ou mais moldes de moléculas de ácido nucleico, normalmente protegidos por uma capa ou capas de proteína ou lipoproteína, que é capaz de organizar a sua própria replicação somente no interior de células hospedeiras adequadas. Em geral, pode ser transmitido horizontalmente entre hospedeiros. Dentro de tais células, a replicação do vírus é (1) dependente da maquinaria de síntese proteica do hospedeiro, (2) organizada a partir de um conjunto de materiais necessários, ao invés de fissão binária, (3) localizada em locais que não são separados dos conteúdos da célula hospedeira por uma membrana de dupla camada lipídica, e (4) continuamente dá origem a variantes por meio de diversos tipos de alterações no ácido nucleico viral”* (HULL 2002; 2014). Vale ressaltar que essa última característica, que confere aos vírus uma constante variabilidade genética, será abordada em detalhe mais adiante e está diretamente relacionada às estratégias de controle por meio do melhoramento genético, visando à obtenção de plantas com resistência a vírus, que é tema deste capítulo.

De acordo com a classificação proposta pelo biólogo americano David Baltimore, levando-se em consideração o tipo de ácido nucleico e a estratégia de replicação viral, seis das sete classes são encontradas em vírus de plantas: (i) RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva, em que as partículas virais contêm RNAs que podem se comportar diretamente como RNA mensageiro, como, por exemplo, os membros das famílias *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Closteroviridae*, *Potyviridae*, *Tymoviridae* e *Virgaviridae*; (ii) ssRNA de polaridade negativa

(os vírions contêm moléculas de RNA complementares ao RNA mensageiro) – *Rhabdoviridae* e *Tospoviridae*; (iii) RNA de fita dupla (dsRNA) – *Reoviridae*; (iv) retrovírus com genoma de ssRNA de polaridade positiva – *Pseudoviridae*; (v) pararetrovírus com genoma de dsDNA – *Caulimoviridae*; e (vi) ssDNA – *Geminiviridae*. Além disso, podem apresentar genoma não segmentado (*Potyvirus*), ou segmentado e encapsidado na mesma partícula (*Orthotospovirus*), ou segmentado e encapsidado em partículas distintas (*Bromoviridae* e *Begomovirus*). Porém, a grande maioria dos vírus de plantas tem genoma constituído por uma ou mais moléculas de ssRNA de polaridade positiva, que podem ser imediatamente reconhecidas pela maquinaria de tradução celular. Além disso, os vírus de plantas possuem genoma bastante compacto, com poucas ORF (*Open Reading Frame*), que codificam as proteínas básicas e necessárias para cumprir as etapas de seu ciclo infeccioso. Tais proteínas podem ser estruturais, que compõem os vírions propriamente ditos, e não estruturais, que somente participam dos processos infecciosos, mas não fazem parte da constituição dos vírions: (i) polimerase viral (necessária para a replicação do genoma do vírus); (ii) proteína de movimento, MP (necessária para o movimento do vírus célula a célula), (iii) proteína relacionada com transmissão por vetores (para aqueles vírus que têm vetores); (iv) proteína do capsídeo (CP); (v) proteína supressora de silenciamento (importante na resposta viral de defesa aos mecanismos de silenciamento gênico celular – ver detalhes mais adiante). Além disso, muitas das proteínas codificadas pelos vírus podem ter múltiplas funções, o que, de alguma forma, garante a manutenção de seus genomas mínimos e o sucesso dos vírus no ambiente. Obviamente que os diferentes vírus, de acordo com o tipo de ácido nucleico, apresentam diferentes estratégias de replicação e expressão de suas proteínas, interagindo com diferentes fatores do hospedeiro [ver HULL (2014) para maiores detalhes sobre estratégias de replicação e de expressão de proteínas dos vírus de plantas].

Diferentemente dos vírus que infectam células animais (que se acoplam a receptores específicos na membrana plasmática), os vírus de plantas necessitam de agentes externos para estabelecerem o contato necessário com o protoplasma da célula hospedeira. Isto se deve à presença

de barreiras físicas como a cutícula e principalmente a parede celular, as quais precisam ser vencidas (por meio de vetores ou contato direto entre tecidos como enxertia) ou rompidas (por meio de ferimentos) para permitir a entrada dos vírus no interior da célula. Vale lembrar que uma planta será considerada hospedeira de determinado vírus apenas quando este puder infectar e se replicar no interior de suas células. Os vírus, uma vez no interior da célula hospedeira, devem cumprir as seguintes etapas do ciclo infeccioso: (i) perda da CP (decapsidação) e liberação do ácido nucleico viral; (ii) tradução da polimerase viral (no caso dos vírus de polaridade negativa, a polimerase viral é encapsidada, faz parte do vírion e está presente para a replicação das primeiras moléculas de RNA de polaridade positiva); (iii) replicação do genoma viral (processo dependente da polimerase viral) e consequente acúmulo de moléculas de RNA *senso* (polaridade positiva) e *anti-senso* (polaridade negativa); (iv) tradução das outras proteínas virais, principalmente a CP e a MP; (v) movimento célula-célula (denominado de movimento a curtas distâncias), mediado pela MP e, em alguns casos, também dependente da CP, além da participação de outros fatores celulares (proteínas e citoesqueleto) – a passagem das partículas virais célula a célula se dá através dos plasmodesmas (estruturas tubulares que conectam o protoplasma de uma célula a outra). A MP (e em alguns casos também a CP) promove o aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas permitindo a passagem das partículas virais ou de complexos ribonucleoproteicos; (vi) após o acúmulo de ácidos nucleicos e proteínas estruturais do vírus, ocorrerá a montagem das partículas virais no citoplasma ou núcleo das células hospedeiras (o sítio de montagem depende da estrutura genômica e estratégia de replicação do vírus); (vii) movimento via floema (sistêmico ou a longas distâncias) – as partículas virais se movendo célula a célula atingem as células do floema por onde serão transportadas para os demais tecidos da planta. As etapas descritas acima dependem de interações específicas vírus-hospedeiro (RNA-proteína, RNA-RNA, proteína-proteína). Após o acúmulo nos diferentes tecidos da planta, as partículas virais poderão ser transmitidas por: (i) vetores (insetos, ácaros, fungos e nematoides); (ii) pólen e/ou sementes; (iii) órgãos de propagação vegetativa como bulbos, rizomas, tubérculos e estolões; (iv) práticas agrícolas como enxertia, desbaste e poda.

1.1 Sintomas: evidências da infecção viral

Os vírus, ao infectarem uma determinada planta hospedeira, podem induzir os chamados sintomas da doença, que são alterações ou anormalidades visíveis ou não em um ou mais tecidos das plantas. A expressão dos sintomas, ou resposta da planta à infecção, depende de diversos fatores, tais como: (i) isolado do vírus (que pode ter diferentes níveis de virulência); (ii) variedade da espécie hospedeira (presença ou não de genes de resistência – ver detalhes mais adiante); (iii) estágio de desenvolvimento e fisiologia da planta hospedeira; (iv) duração da infecção; (v) presença de outros vírus ou outros patógenos; e (vi) condições do ambiente. Um mesmo vírus pode infectar diferentes espécies de plantas hospedeiras, induzindo sintomas específicos em cada uma. O sintoma, portanto, é um reflexo da resposta da hospedeira à infecção. Os vírus através do floema, onde são transportados para todos os tecidos da planta (e em alguns casos pelo xilema), ocasionam a infecção denominada sistêmica. Porém, regiões meristemáticas de caules e raízes podem permanecer livres de vírus. Há casos em que os vírus ficam limitados a poucas células, circundadas ao ponto de entrada, por meio da indução de defesa da planta, induzindo uma resposta local necrótica, que normalmente está relacionada com uma reação de hipersensibilidade, HR (ver detalhes mais adiante).

Os vírus podem induzir sintomas externos e/ou internos. Os sintomas externos, normalmente, consistem de alterações na forma e coloração de folhas, flores, sementes, frutos, caules e raízes, além de problemas no desenvolvimento e crescimento da planta. Os principais sintomas induzidos por vírus nas folhas são: mosaico, mosqueado, bolhas, amarelecimento, epinastia, encarquilhamento, anéis cloróticos e/ou necróticos, clareamento e necrose de nervuras, manchas cloróticas e/ou necróticas, pontos cloróticos e/ou necróticos. Sintomas como redução de crescimento (nanismo), caneluras no caule e necrose também podem ser observados em infecções virais. As alterações ultraestruturais, observadas no interior das células (chamados sintomas internos), também são induzidas pelos vírus de plantas, e podem ser observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Consistem, fundamentalmente, de alterações induzidas pela presença do vírus na célula,

como corpos de inclusão, cristais, anormalidades nas organelas, malformação dos cloroplastos, formação de vesículas, entre outros.

1.2 Viroses de importância econômica

Estima-se que as viroses, dentre os fatores bióticos de estresse, sejam responsáveis por 10 a 15% das perdas anuais de rendimento global das culturas (MAHY; Van REGENMORTEL 2009). Os vírus de plantas são adaptados aos seus hospedeiros e, portanto, em muitas espécies as infecções são latentes, ou seja, transcorrem sem a expressão de sintomas visíveis, o que auxilia na manutenção do vírus no campo e também pode contribuir com a sua dispersão (via material de propagação vegetativa ou pelos vetores). Entretanto, essas infecções latentes, aliadas à dificuldade de diagnóstico, contribuem para que as perdas sejam subestimadas e muitas vezes negligenciadas. Mesmo os vírus não induzindo sintomas perceptíveis, ainda assim podem causar alterações importantes no metabolismo das plantas hospedeiras, levando a reduções da eficiência fotossintética e na síntese e distribuição de fotoassimilados, redução da síntese proteica, alterações na síntese e distribuição de hormônios, entre outros fatores que, isoladamente ou em conjunto, podem reduzir o rendimento da produção. Porém, os problemas mais importantes no campo são aqueles causados por vírus que induzem sintomas que se manifestam nas folhas, frutos, raízes e na planta como um todo, traduzidos em doença, com consequentes perdas econômicas, caso estratégias de controle não sejam adotadas (as medidas de controle de vírus de plantas serão abordadas mais adiante).

As viroses podem levar a perdas variáveis, que dependem da genética da hospedeira, condições ambientais e estirpe viral. Em arroz, na Indonésia (1969-1971), por exemplo, perdas de 100% foram causadas pelas espécies *Rice tungro spherical virus*, RTSV (gênero *Waikavirus*, família *Secoviridae*) e *Rice tungro baciliform virus*, RTBV (gênero *Tungrovirus*, família *Caulimoviridae*). Pode-se citar também as diferentes espécies classificadas no gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), responsáveis por graves epidemias, ocasionando perdas de 100% em tomateiro e feijoeiro nas Américas, incluindo o Brasil. Na África, também há relatos de cerca

de 100% de perdas em cultivos de mandioca infectada pelo begomovírus *African cassava mosaic virus* (ACMV). No final da década de 1930, *Citrus tristeza virus*, CTV (gênero *Closterovirus*, família *Closteroviridae*) foi responsável por perdas de até 100% em cultivos de citros nas Américas (com destaque para o Brasil, Argentina e Uruguai), Ásia e Europa, causando a morte de milhões de árvores e enormes prejuízos aos citricultores. Em batata, no Brasil, o *Potato virus Y*, PVY (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*) pode ocasionar perdas que variam de 10-100% em função do cultivar e da interação desta espécie com outras espécies virais, como, por exemplo, o *Potato leafroll virus*, PLRV (gênero *Polerovirus*, família *Luteoviridae*). Ainda com relação ao PVY, perdas de 50-100% em tomateiro já foram relatadas na Austrália, Canadá, Espanha e Índia. O mosaico da cana-de-açúcar, induzido pelo *Sugarcane mosaic virus*, SCMV (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*), é um bom exemplo da busca constante por variedades resistentes. Na década de 1920, uma epidemia de SCMV ameaçou os cultivos de cana-de-açúcar no Brasil, o que reduziu a produção de açúcar e álcool em mais de 90%. O problema foi contornado com a introdução de materiais resistentes em substituição às variedades suscetíveis ao vírus [para mais detalhes sobre a importância dos vírus de plantas, ver HULL (2014); PEREIRA-CARVALHO (2015); SCHOLTHOF et al. (2011)].

2 VARIABILIDADE, EVOLUÇÃO E ORIGEM DOS VÍRUS DE PLANTAS

2.1 Espécies, estirpes, quase-espécie, patotipos e sorotipos

A classificação taxonômica, estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV – www.ictvdb.org), inclui diferentes *taxa* para agrupar as mais de 3.700 espécies de vírus conhecidas, número este que inclui vírus que infectam vertebrados, invertebrados, algas, protozoários, fungos, bactérias, archaea e plantas. Os vírus podem ser agrupados em Ordens (maior nível hierárquico

aprovado pelo ICTV), Famílias, Subfamílias, Gêneros e Espécies (menor nível hierárquico aprovado pelo ICTV), de acordo com propriedades comuns verificadas entre os isolados virais, tais como: morfologia da partícula, composição e organização genômica, estratégia de replicação, homologia de sequência, transmissão por vetor, gama de hospedeiros, distribuição geográfica, entre outras. De acordo com os critérios estabelecidos pelo ICTV (KING et al., 2012), uma **espécie** de vírus pode ser definida como: “*uma classe politética (classificação baseada em um grande número de características) de vírus que constituem uma linhagem replicativa que ocupa um nicho ecológico particular*”.

Uma espécie de vírus não é composta por uma população única, e sim formada por um conjunto de moléculas similares, não idênticas, que se denominam **quase-espécie** (*quasi-species*) (EIGEN 1993). O conceito de quase-espécie é muito importante para que se entendam os mecanismos de variabilidade e evolução dos vírus, principalmente aqueles constituídos de RNA. A maioria dos vírus de plantas é constituída de RNA e, portanto, apresenta replicação mediada por enzimas do tipo RNA polimerase dependente de RNA (codificadas pelo próprio vírus). Essas enzimas não possuem mecanismos de correção de incorporação errônea (*proofreading*) de nucleotídeos e, com isso, há um grande número de mutações incorporadas ao genoma, que gera uma população de moléculas de ácidos nucleicos similares, mas não idênticas. O termo quase-espécie descreve um tipo de estrutura populacional, na qual genomas relacionados são submetidos a um contínuo processo de variabilidade genética, competição e seleção. Esse processo permite que uma população viral se adapte a ambientes que estão em constante mudança e, com isso, desenvolva resistência. Em animais e humanos, por exemplo, a variabilidade genética das populações de vírus possibilita que desenvolvam resistência a medicamentos e vacinas. Em plantas, a variabilidade genética das populações virais pode resultar em estirpes (ou patotipos) com capacidade de suplantar a resistência de determinados genes (MORENO-PÉREZ et al., 2016).

A estabilidade de uma quase-espécie depende da complexidade dos genomas, fidelidade da replicação e da predominância de uma sequência

principal (*master sequence*). O termo quase-espécie, do ponto de vista biológico, é definido pela expressão fenotípica de uma população representada por uma sequência principal. Para exemplificar, podem ser mencionados os experimentos realizados com membros do gênero *Tobamovirus*. Estes vírus parecem apresentar elevada estabilidade populacional, embora haja variabilidade dentro das diferentes populações. Essa característica reflete um modelo de quase-espécie, apesar de sempre apresentar uma sequência predominante, mesmo em diferentes regiões geográficas ou quando avaliadas por um longo período de tempo [para maiores detalhes, ver GIBBS (1999); ELENA et al. (2014)].

De maneira simplificada, uma espécie viral também pode ser definida como: “*um conjunto de estirpes com propriedades similares*”. Mas o que é uma **estirpe** viral? A definição de estirpe (em inglês, *strain*) deve ser abordada de maneira pragmática e uma série de critérios deve ser levada em consideração: (i) estrutural – baseado nas propriedades das partículas virais (mobilidade eletroforética, densidade e estabilidade) e em seus componentes genômicos (heterogeneidade do genoma, identidade de nucleotídeos de determinadas ORF, presença de ORF adicionais, proteínas estruturais, etc.); (ii) sorológicos – baseados no grau de relacionamento sorológico; (iii) biológicos – baseados nas inter-relações vírus-hospedeiro e vírus-vetor, nos sintomas macroscópicos, efeitos citológicos, proteção cruzada, entre outros (HULL 2014). Dados de sequência podem ser importantes para a caracterização de uma estirpe, haja vista que uma simples mutação pode representar uma alteração fenotípica importante, como no círculo de hospedeiros, na severidade dos sintomas ou na capacidade de transmissão pelo vetor. Ao contrário, grandes alterações no genoma podem não representar mudanças no fenótipo. Na prática, as diferenças nos caracteres fenotípicos como gama de hospedeiros, sintomas e as relações vírus-vetor devem ser incluídos como critérios empregados para delimitar as estirpes. Um exemplo que evidencia a importância do conhecimento de estirpes está relacionado com eventos de **proteção cruzada** (*cross-protection*), os quais envolvem estirpes de uma espécie viral, onde uma menos virulenta (*mild-strain*) inoculada em uma planta susceptível protege a planta da infecção

pela estirpe severa (esse mecanismo de proteção está relacionado com silenciamento gênico, que será comentado em detalhes mais adiante).

Outras definições importantes, comumente utilizadas na diferenciação de vírus de plantas, envolvem os termos patotipo e sorotipo, que se referem a populações de uma determinada espécie de vírus, que apresentam pequenas diferenças, mas que não são suficientes para compor uma espécie nova. **Patotipos** são designados quando as diferenças estão associadas à patogenicidade, que pode corresponder à capacidade de superação de resistência conferida por algum gene de resistência em um determinado genótipo. A “patotipagem” tem sido utilizada em diversos patossistemas, como por exemplo, para diferenciar isolados de *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*) (WALSH; JENNER 1999) e *Lettuce mosaic virus* (LMV, *Potyvirus*) (PINK et al., 1992). Já os **sorotipos** referem-se a isolados de vírus pertencentes a uma mesma espécie, que podem ser diferenciados por meio de reações sorológicas com anticorpos monoclonais específicos para determinado(s) epítipo(s), que pode(m) estar presente(s) em um isolado e ausente(s) em outro.

Um erro comumente observado é o de relacionar um simples **isolado** viral como sendo uma estirpe. Conforme já comentado, uma estirpe pode ser diferenciada de outras em função de propriedades intrínsecas, como um determinado tipo de sintoma em um hospedeiro específico. Ao contrário, isolados virais não apresentam diferenças perceptíveis ou determinadas, e uma vez que diferenças biológicas, sorológicas e/ou moleculares são observadas e caracterizadas, o isolado viral pode passar a representar uma estirpe, um sorotipo ou um patotipo.

2.2 Mecanismos que geram variabilidade

Os vírus apresentam grande diversidade genética, tanto que dois isolados de uma mesma espécie de vírus apresentam, normalmente, mais divergência de nucleotídeos que humanos e chimpanzés (ROOSSINCK 1997; 2008; ROOSSINCK et al., 2015). Quando se pensa em variabilidade genética, a primeira ideia que surge é a de **mutação**. As mutações são eventos aleatórios que podem ser gerados por diversos fatores, tais como:

(i) compostos químicos mutagênicos; (ii) irradiação com luz ultravioleta; (iii) aumento de temperatura; (iv) erros durante o processo de replicação. Mutações naturais, geradas devido à incorporação errônea de nucleotídeos pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), constituem na mais importante fonte de variabilidade genética viral (GAGO et al., 2009). As mutações mais relevantes são aquelas que resultam em alteração no códon de leitura, causando mudanças na sequência de aminoácidos, o que muitas vezes leva à alteração da estrutura da proteína. Na literatura, há diversos exemplos de mudanças de um único aminoácido que ocasionam consequências biológicas importantes, tais como alterações na severidade dos sintomas e no reconhecimento (molecular) do vírus pelo vetor. A mutação, além de uma simples troca de nucleotídeo, pode ser também uma simples deleção ou incorporação, podendo alterar a fase de leitura de uma ORF. Porém, mutações em porções não traduzidas do genoma também podem ser importantes por alterar a estrutura secundária do RNA ou influenciar na capacidade de ligação do RNA a proteínas ou a outros ácidos nucleicos.

Outro mecanismo que gera variabilidade genética é a **recombinação**, que pode ocorrer tanto em genomas de DNA como RNA. A recombinação pode ser definida como a formação de quimeras de ácidos nucleicos provenientes de uma mesma molécula ou de diferentes moléculas parentais. Nos genomas de DNA há duas formas básicas de recombinação: (i) homóloga, que ocorre em sítios com elevada identidade e; (ii) não homóloga, que ocorre em sítios com baixa ou nenhuma identidade de sequência. Os mecanismos de recombinação, assim como as mutações, podem ocorrer durante os processos de replicação viral. Os **rearranjos** (também conhecidos como pseudorrecombinações) de pequenas porções do genoma, normalmente observados em vírus que apresentam mais de um componente genômico (por exemplo, em membros da família *Bromoviridae*), são também responsáveis por gerar variabilidade. Há, contudo, mecanismos de restrição da variabilidade, os quais atuam de modo a preservar a identidade do vírus. Portanto, muitas das mutações, rearranjos e recombinações são deletérias e devido à pressão de seleção não se fixam na população. Da mesma forma, alterações no genoma que geram menor efeito adaptativo muitas vezes podem permanecer na população.

2.3 Origem e evolução dos vírus de plantas

Uma das dificuldades para estudar a origem e evolução de vírus é a ausência de fósseis. Há, entretanto, especulações: (i) a primeira delas, e atualmente a mais aceita no meio científico, coloca os vírus como descendentes primitivos de uma suposta era pré-celular; (ii) uma segunda hipótese aponta para os vírus como originários de constituintes da própria célula; e (iii) na hipótese menos provável, presume-se que os vírus sejam derivados de células degeneradas que eventualmente parasitavam células normais (FORTERRE 2006). No universo dos vírus de plantas, há diferentes tipos de ácidos nucleicos, com diferentes estratégias de replicação e expressão de proteínas e tipos de organização genômica. Portanto, pode-se deduzir que, provavelmente, estes genomas tiveram diferentes origens evolutivas dos seus processos replicativos, embora não se saiba se foram originários de uma mesma molécula ancestral. Algumas evidências baseadas na similaridade das polimerases sugerem uma origem comum, embora pudessem ser resultantes de uma evolução convergente. A origem dos genes virais pode ser abordada de duas formas: (i) uma origem comum devido a um “*big bang*” molecular ou; (ii) um contínuo surgimento de novas ORFs, a partir da mudança de novas fases de leitura ou em regiões não codificantes. Com relação às replicases de RNA, ainda há divergência de opiniões sobre as origens de seus “motivos” (com diferentes funções) serem mono ou polifiléticas. Porém, com a solidificação da ideia da existência de um “Mundo de RNA” (GILBERT 1986), sugere-se que as RNA polimerases sejam moléculas muito antigas. No caso das replicases de DNA presentes nos geminivírus, é provável que pelo menos uma das funções da proteína seja originária do hospedeiro. Para as proteínas de movimento (MP), por exemplo, acredita-se que o motivo funcional de aumento do limite de exclusão dos plasmodesmas também tenha sido adquirido da planta hospedeira, o que indica que os hospedeiros atuais dos vírus podem dar uma pista do seu passado evolutivo (FORTERRE 2006; KOONIN 2009).

A existência de vírus de ssRNA de polaridade positiva (+) em algas do gênero *Chara* sugere uma origem antiga para este grupo de vírus. Já outro vírus de ssRNA (+) do gênero *Nepovirus*, que infecta *Cycas revoluta* (uma

gimnosperma primitiva), não permite que sejam tiradas conclusões sobre sua evolução, por também infectar angiospermas modernas. Os vírus que infectam algas do tipo *Chlorella* também não parecem ser primitivos, uma vez que apresentam genomas enormes (350 kbp) e complexos. Moléculas de ssDNA do *Abutilon mosaic virus* (AbMV, *Begomovirus*) foram encontradas em cloroplastos de plantas de *Abutilon*, o que sugere uma provável origem do vírus nesta organela. Além disso, especula-se que os vírus de ssDNA tenham se originado de plasmídeos. Essa ideia fundamenta-se também na teoria de que cloroplastos sejam organelas que evoluíram de cianobactérias por simbiose (MARGULIS 1993).

A ausência de fósseis faz com que toda a abordagem evolutiva seja realizada com os vírus atuais e seus hospedeiros conhecidos. As especulações sobre o passado evolutivo dos vírus de plantas são baseadas em dados moleculares (*molecular fossil information*), como análises de sequência, mutações e recombinações, organização genômica e filogenia. Nas reconstruções filogenéticas, as análises devem se basear em dados fenotípicos combinados a métodos cladísticos, em que os processos evolutivos são considerados e possíveis ancestrais são determinados. Outro ponto que merece ser destacado refere-se à abundância relativa das diferentes classes de vírus em procariontes e eucariontes. Em procariontes, a grande maioria dos vírus possui genomas constituídos de dsDNA, com poucos vírus de ssDNA, e uma minoria absoluta de vírus constituídos de RNA. Ao contrário, nos eucariontes, incluindo as plantas superiores, os vírus de RNA representam a maior fração da diversidade do viroma, embora os vírus ssDNA e dsDNA também ocorram, mas em frequências muito menores (KOONIN et al., 2015). Portanto, muitos dos estudos sobre evolução de vírus de plantas baseiam-se nos vírus de ssRNA(+), que, além de serem maioria, permitem que muitas das conclusões sejam extrapoladas para vírus de ssRNA(-) e dsRNA. Além disso, outros aspectos podem ser citados: (i) os vírus de RNA evoluem rapidamente; (ii) as RdRp dos vírus de ssRNA(+) apresentam “motivos” conservados, sendo, portanto, juntamente com a CP os melhores genes empregados em análises filogenéticas e taxonomia.

Há também evidências de que vírus, suas plantas hospedeiras e seus

vetores têm coevoluído. Os vírus da ordem *Bunyavirales*, por exemplo, apresentam representantes que infectam vertebrados, invertebrados e plantas. Os vírus de plantas dessa ordem pertencem ao gênero *Orthotospovirus* e são transmitidos por tripses em um tipo de relação (vírus-vetor) caracterizada como circulativa propagativa (o vírus circula e se replica no corpo do vetor). Postula-se que esses vírus eram patógenos de insetos e que, posteriormente, adquiriram a capacidade de infectar plantas (fato que também parece ter ocorrido para os vírus das famílias *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*) (HULL 2014). Além disso, os orthotospovírus têm uma ORF adicional que codifica a MP, fundamental para o movimento célula a célula e consequente infecção sistêmica dos tecidos vegetais. Demonstrou-se também que uma espécie de orthotospovírus (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) pode se replicar em células humanas, o que reforça a hipótese de que estes vírus evoluíram a partir de um ancestral comum, que infectava animais (MEDEIROS et al., 2005).

Os vírus mais estudados são aqueles que causam doenças em plantas de importância econômica, tendo, portanto, uma história evolutiva relativamente curta, rápida e complexa. O isolamento geográfico também tem sido estudado, como no caso dos *Begomovirus* do Novo e Velho Mundo, e provavelmente tem desempenhado um importante papel na evolução desses vírus. Em uma abordagem fitopatológica, a doença deve ser consequência da evolução de seu agente causal, mas pode também resultar de um vírus que não sofreu alterações como, por exemplo, no caso em que uma nova doença é resultado de infecção por um vírus antigo, em uma região geográfica nova ou em cultivos com características agrônômicas distintas. Há vários exemplos na literatura evidenciando que os vírus continuam evoluindo, porém as taxas de evolução são difíceis de avaliar com segurança. Muitas variáveis estão envolvidas como mudanças nos sistemas agrícolas, incluindo aumento de monoculturas, sobreposição de cultivos e introdução de novas espécies, além do aumento do intercâmbio de espécies vegetais com introdução de novos vírus e vetores em regiões novas. Com isso, a pressão de seleção sobre os vírus de plantas está em constante mudança, aparecendo novas possibilidades de combinações, que podem levar a novos eventos de recombinação e

constante mudança do cenário evolutivo [para maiores detalhes sobre origem e evolução de vírus, ver GIBBS (1999); GARCÍA-ARENAL et al. (2001); ELENA et al. (2006); FRAILE; GARCÍA-ARENAL (2010); KOONIN et al. (2015)].

3 PROGRAMAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO E BANCOS DE GERMOPLASMA

A base para qualquer programa de melhoramento genético de plantas é a variabilidade genética. Essa variabilidade genética pode ser obtida em um banco de germoplasma montado a partir de material de diferentes origens ou pode ser obtida a partir de mutações, que podem ser naturais ou induzidas. A hibridação, que é a utilização de cruzamentos controlados entre indivíduos, a fim de se gerar uma população com características desejáveis dos parentais, tem a capacidade de mobilizar a variabilidade genética (possibilitando a “manipulação” de caracteres), mas não pode ser considerada a principal fonte de variabilidade dentro de um programa de melhoramento. De acordo com Gepts (2002), um programa de melhoramento genético segue, normalmente, três passos: (i) montagem e geração de nova diversidade genética; (ii) seleção e teste de recombinantes superiores; e (iii) liberação, distribuição e comercialização de novos cultivares. Só é possível alcançar esses três estágios por meio de cruzamentos sexuais ou engenharia genética.

Para se estabelecer um novo programa de melhoramento genético, alguns pontos têm que ser levantados para um adequado planejamento e sucesso na obtenção dos resultados: (i) definição dos objetivos: avaliar as necessidades atuais do produtor, do consumidor, do sistema de abastecimento e da sociedade, e quais serão as necessidades futuras; (ii) levantamento dos resultados obtidos: interação com outros programas de melhoramento relacionados, revisão de literatura, além do contato direto com outros melhoristas; (iii) material genético: cultivares, variedades botânicas, linhagens e espécies selvagens; (iv) modo de reprodução: vegetativa (assexual); autógamas; alógamas e intermediárias; (v) estudo da herança: análise da base genética e da influência do ambiente; e (vi) escolha

do método de melhoramento genético.

Após o estabelecimento da base para o programa de melhoramento, a manutenção dos ganhos genéticos obtidos com programas anteriores deve ser observada e manipulada com foco nas necessidades atuais, visando ao futuro. Atualmente, a busca por ganhos genéticos se enquadra na busca por características agronômicas interessantes, tolerância a estresses abióticos, características de mercado e resistência a pragas e doenças. Sempre que se leva em consideração o melhoramento genético para resistência a doenças, a influência dos fatores ambientais deve ser levada em consideração, visto que corresponde a um dos alicerces do triângulo da doença, formado pelo ambiente, a hospedeira e o patógeno. A temperatura do solo e do ar, umidade relativa, luminosidade, composição do solo, poluentes, práticas culturais e diversos fatores bióticos (simbiontes, antagonistas, complexo de patógenos, etc.) têm a capacidade de influenciar tanto o desenvolvimento e os níveis de suscetibilidade da hospedeira, quanto a capacidade infectiva dos vírus e a formação de sítios de alimentação (essenciais para a transmissão de vírus que interagem com vetores) e todo o modelo de interação planta/patógeno.

Além dos fatores ambientais, características intrínsecas ao patógeno interferem diretamente nos resultados obtidos no melhoramento genético. As altas taxas de variabilidade genética, que ocorrem nas populações virais, acabam por propiciar eventos de “quebra” de resistência genética, o que é desastroso quando se leva em consideração os vários anos de trabalho e investimento na obtenção de uma variedade com bons níveis de resistência e características agronômicas desejáveis. Essa “corrida armamentista” dos vírus contra os melhoristas apresenta, na maior parte das vezes, vantagens para os patógenos, que superam uma resistência estabelecida e forçam os pesquisadores a desenvolver ou detectar novos genes capazes de evitar os danos causados.

De acordo com Hayes et al. (1955), citado em Veira (1972), “*os princípios fundamentais do melhoramento visando à resistência a doenças são essencialmente os mesmos que se aplicam a outros caracteres. Há, porém, uma importante diferença: para resistência às doenças, lidam-se com duas séries de fatores hereditários: na planta hospedeira e no patógeno*”.

Então, para que um programa de melhoramento visando à resistência a doenças tenha sucesso, é preciso conhecer a biologia e a genética do patógeno, identificando-o taxonomicamente, verificando sua variabilidade e capacidade de multiplicação em condições naturais ou controladas e sua epidemiologia. Em relação à planta hospedeira, é importante saber suas características agrônômicas, métodos de cultivo e variabilidade genética. De posse dessas informações, analisa-se a influência de fatores ambientais, buscando efeitos na expressão da resistência e da virulência e a interação patógeno/planta, para que métodos adequados de inoculação, padronização de inóculo, condução das plantas, quantificação e avaliação da doença possam ser aplicados da maneira correta.

Para o controle de vírus (ver detalhes mais adiante), a utilização de resistência genética é considerada a forma mais efetiva e econômica, sendo que, na natureza, a resistência é uma condição normal da planta e a suscetibilidade uma exceção. Esses fatores de resistência são manipulados e transferidos como qualquer outra característica fenotípica, sendo controlados por fatores genéticos diferentes em distintas variedades da planta hospedeira. Ao mesmo tempo em que, dependendo de sua característica, podem ser facilmente transferidos, distintos fatores de resistência podem ser incorporados em um mesmo genótipo de planta, construindo-se o que é conhecido como uma **pirâmide de genes** (mais de um gene de resistência a um mesmo patógeno ou a patógenos diferentes). A **resistência monogênica**, que é um exemplo de fator facilmente transferido, é normalmente mais estável que a poligênica (regida por mais de um gene) em condições ambientais muito variáveis, mas, em geral, são pouco duráveis, devido à pressão de seleção que exercem sobre a população do patógeno. Já a **resistência poligênica** tem como vantagem a redução da probabilidade de aparecimento de novos isolados/raças/espécies mais agressivas e virulentas, pois a pressão de seleção é muito menor, visto que o patógeno ainda consegue interagir com a hospedeira na presença deste tipo de resistência.

Para se criar um programa de melhoramento para resistência genética a vírus, é necessário estabelecer uma coleção de germoplasma da cultura alvo. Essa coleção deve ser composta por sementes de diversos materiais,

de diferentes origens e fontes, armazenadas em condições ideais (como câmaras frias com controle de umidade) e que oferecerão ao melhorista potenciais fontes de variabilidade genética. A partir do momento que essa fonte é identificada, é realizada a seleção desse material e a introdução de novos acessos da espécie cultivada e das espécies selvagens do mesmo “pool” gênico, seguido de hibridações entre as espécies e entre os gêneros, indução de mutações ou transgenia. Após a seleção do material, estudos da herança da resistência são realizados, por meio de análises das gerações seguintes (via inoculação desse material com isolados do patógeno ao qual devem ser resistentes). Esses estudos de herança definem qual estratégia ou método de incorporação de resistência é considerado o mais eficaz. Assim que o fator de resistência é identificado e a forma de incorporação é definida, ele é então incorporado a acessos ou linhagens elite. Para que as análises das incorporações desse fator sejam realizadas de forma adequada, deve-se verificar se os métodos de submissão à infecção são uniformes, se os fatores ambientais estão sendo considerados e se diferentes isolados do patógeno estão disponíveis.

- Termos utilizados no melhoramento genético para resistência a doenças (SIMMONDS 1983):

- Resistência não específica controlada por gene maior: um locus controlando a resistência a uma gama de variantes do patógeno (pode ou não se aproximar da imunidade).
- Resistência vertical (específica): geralmente controlada por um locus, conferindo resistência a uma ou poucas variantes de um patógeno.
- Resistência horizontal (geral): normalmente poligênica, considerada do tipo parcial ou redutora da taxa de progresso da doença. Eficaz contra diversas variantes do patógeno.
- Resistência por interação: composta por multilinhas e misturas varietais.

Diversas coleções de germoplasma existem e estão distribuídas pelo mundo, colaborando com diferentes programas de melhoramento interessados em desenvolver variedades com características agronômicas de interesse. Essas coleções disponibilizam materiais para pesquisa, mediante acordos internacionais que visem à conservação e caracterização do material em estudo e sua correta manipulação. Exemplos desses centros seriam o CIAT, na Colômbia (feijão e mandioca), o IRRI, nas Filipinas (arroz) e o AVRDC (tomate, pimenta e hortaliças). Além de centros de coleções de germoplasma, há Centros que mantêm coleções de fitopatógenos, como o ATCC (*American Type Culture Collection*), nos EUA, e o Instituto Pasteur, na Austrália.

Para ser possível a detecção e o monitoramento de uma dada característica fenotípica, como a resistência genética a vírus, por exemplo, os estudos voltados aos marcadores genéticos são parte essencial de um programa de melhoramento. Esses marcadores são características fenotípicas, segmentos de ácidos nucleicos que codificam, ou não, proteínas ou as próprias proteínas, que têm a capacidade de revelar diferenças entre indivíduos. Essas diferenças podem ser monitoradas e a herança avaliada por meio de técnicas analíticas, que englobam o uso de marcadores moleculares em laboratório complementado pela observação da expressão do fenótipo no campo (marcadores morfológicos).

Para um marcador ser considerado para utilização em melhoramento, ele deve ser mais eficiente e/ou mais barato do que qualquer outro tipo de análise para uma dada característica fenotípica, deve estar ligado a características de interesse, deve ser reproduzível, de detecção rápida e simples (se possível). Os marcadores, que terão a função de “encontrar” diferenças entre os indivíduos, se focalizarão em polimorfismos de DNA, que podem, ou não, resultar em diferenças no fenótipo. Esses polimorfismos, que podem ser denominados como erros hereditários ou mutações, ocorrem em baixas frequências no ambiente natural, devido a mecanismos celulares que reparam esses erros. Porém, as mutações ocorrem (aleatoriamente) e o fazem devido a erros nos processos de duplicação, reparo e recombinação do DNA, que acabam por ser transmitidos adiante se o indivíduo onde essas mudanças

ocorreram reter sua capacidade reprodutiva. Os agentes responsáveis por essas mutações, ou agentes mutagênicos, podem ser elementos químicos ou físicos com capacidade de modificar estruturalmente o DNA, ou têm a capacidade de alterar enzimas relacionadas com o metabolismo do genoma da célula.

As mutações podem causar ou não modificações ao fenótipo. Se afetarem o sítio ativo, por exemplo, uma ORF, os efeitos serão perceptíveis caso haja alteração em algum aminoácido. Porém, caso a mutação resulte na síntese de um mesmo aminoácido, não altere o sítio ativo de uma proteína, ou seja, compensada por uma duplicação gênica, então ela será considerada uma mutação silenciosa ou que não causa alterações fenotípicas. Essas mutações podem ocorrer de maneira pontual, por meio da substituição ou deleção de apenas um nucleotídeo, podem ser induzidas pela influência de mutagênicos químicos, pelo deslocamento do quadro de leitura na direção 5' ou 3' em um mRNA, resultando na alteração da sequência de aminoácidos da proteína a ser sintetizada, pela inserção e deleção de segmentos pequenos ou grandes de DNA ou alterações estruturais nos cromossomos, como perdas de segmentos, duplicações, inversões (quando segmentos giram 180° e são inseridos na ordem inversa) e translocações (segmentos cromossômicos destacados do sítio original fundidos em outro cromossomo).

Segue a relação dos diferentes tipos de marcadores moleculares:

- *Southern Blot*:

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

- PCR com *primers* randômicos:

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

- PCR com *primers* específicos:

Microsatélites (SSR): *Simple Sequence Repeats*

PCR Heterólogo: *primers* em regiões conservadas

Retrotransposons: *primers* para uma região da enzima transcriptase reversa

- PCR com análise de restrição enzimática:

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*

- Sequenciamento de amplicons de RAPD ou AFLP:

STS: *Sequence Tagged Site Markers*

CAP: *Cleaved Amplified Polymorphism*

SCAR: *Sequence Characterized Amplified Region*

- Informação de sequenciamento e PCR:

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

- Padrão de Expressão de Genes:

Macro e Microarrays

4 CONTROLE DE VIROSES DE PLANTAS

Diferentes estratégias/táticas de controle são propostas e adotadas na tentativa de controlar vírus de plantas. Entretanto, em função da íntima relação dos vírus com a célula hospedeira (parasitismo obrigatório), maior efetividade e sucesso no controle são observados quando se utilizam medidas preventivas. Assim, o desenvolvimento de cultivares resistentes (seja via melhoramento clássico ou por meio da obtenção de plantas transgênicas) surge como a opção mais adequada e eficiente. De qualquer forma, a eficiência da(s) estratégia(s) de controle e as tomadas de decisões requerem conhecimento da etiologia da doença, ciclo do patógeno e relações patógeno-hospedeiro, conhecimento das condições ambientais favoráveis ou não à doença, genética do patógeno e da hospedeira e das condições para a implantação das estratégias disponíveis. Esta análise e conhecimento de diversos fatores perfazem os vértices que compõem o Triângulo da Doença: hospedeira, patógeno e ambiente. Porém, vale lembrar que para a maioria dos vírus deve-se levar em consideração um fator adicional: os vetores. Responsáveis pela transmissão dos vírus a curtas e longas distâncias, os vetores de vírus de plantas influenciam na epidemiologia e, conseqüentemente, nas estratégias de manejo e controle.

Whetzel et al. (1925) e Whetzel (1929) definiram controle como “*a prevenção dos prejuízos de uma doença*” e propuseram uma série de princípios de controle, conhecidos como Princípios de Whetzel: Exclusão, Erradicação, Proteção, Imunização e Terapia. Apresentados a seguir, esses princípios são correlacionados aos vértices correspondentes ao patógeno

e ao hospedeiro no Triângulo da Doença. Anos mais tarde, Marchionatto (1949), citado por Bergamin-Filho & Amorim (1996), contemplando o vértice correspondente ao ambiente no Triângulo da Doença, propôs outros dois princípios de controle: Regulação e Evasão.

4.1 Exclusão

No intuito de controlar e prevenir a entrada e estabelecimento de patógenos em área isenta algumas medidas podem ser adotadas:

4.1.1 Medidas quarentenárias

Com base em legislação fitossanitária é possível proibir, certificar, inspecionar e interceptar, quando necessário, parte ou todo material vegetal. Métodos de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade são fundamentais para o sucesso dessas medidas (EIRAS; GALLETI 2012). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento baseia-se em uma lista de pragas quarentenárias, que engloba plantas daninhas, artrópodos, bactérias, fungos, nematoides, vírus e viroides, os quais recebem classificação **A1** (ausente no país) ou **A2** (presente no país, porém com distribuição restrita), publicada em Instrução Normativa (Nº 41, publicada em 1 de julho de 2008. Considerar o Art. 1º da Instrução Normativa Nº 59, de 18 de dezembro de 2013, quanto à exclusão de algumas pragas da Lista de Pragas Quarentenárias A1). A facilidade de trânsito nacional e internacional dificulta, na prática, a execução desta medida.

4.1.2 Uso de material de propagação sadio

A transmissão de vírus pelas sementes verdadeiras é uma forma efetiva de introduzir vírus em áreas isentas. Acredita-se que 20% dos vírus de plantas possam ser transmitidos desta forma. De acordo com Hull (2009), as porcentagens variam de 1 a 100% dependendo da espécie viral e da hospedeira envolvida. *Arabidopsis mosaic virus*, ArMV (gênero *Nepovirus*), por exemplo, pode ser transmitido através das sementes de 20 espécies

botânicas classificadas em 14 famílias com taxa de transmissão de até 100% (BATISTA; MARINHO 2002). Há que se considerar que a transmissão de vírus por sementes é uma característica intrínseca à espécie viral e a hospedeira envolvida. Uma mesma espécie viral pode ser transmitida através das sementes com eficiência em uma espécie botânica e não ser transmitida em outra. Diferenças na composição química e balanço hormonal poderiam explicar este fato. Segundo Hull (2009), basicamente dois tipos de transmissão de vírus por sementes podem ocorrer: (i) vírus aderidos na parte externa da semente, entram em contato com o protoplasma das células durante ferimentos que ocorrem na germinação da plântula (ex., *Tobacco mosaic virus*, TMV); (ii) vírus presentes no embrião das sementes (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV). Outros trabalhos citam também que o *Bean common mosaic virus* (BCMV) em feijoeiro e LMV em alface estão presentes no embrião das sementes. Além das sementes verdadeiras, material de propagação vegetativa, como dentes de alho, manivas de mandioca, rizomas de bananeira, tubérculos e ramas de batatas, também podem ser citados.

4.1.3 Controle de vetores

Embora existam na literatura inúmeras medidas direcionadas ao controle de organismos vetores, a eficiência dessas medidas pode não ser a desejada para se alcançar sucesso no controle dos vírus transmitidos. O dano do organismo (inseto, ácaro ou nematoide) como praga depende da sua densidade, do tempo de alimentação, do estágio de desenvolvimento das plantas quando ocorre a infestação e da qualidade da planta como alimento. No caso de vetores de vírus de plantas não há que se considerar estes fatores, visto que apenas um indivíduo pode transmitir o vírus, principalmente, no caso de afídeos que transmitem vírus de modo não persistente (por picadas de prova), em que curtos períodos de permanência do inseto na planta são suficientes, tanto para a aquisição quanto para a transmissão do vírus. Algumas medidas de controle direcionadas aos vetores são: uso de produtos químicos como nematicidas, inseticidas e acaricidas; controle biológico; cultivos protegidos em casa de vegetação e telado; plantas resistentes ao vetor

e eliminação de plantas hospedeiras do vetor (PEREIRA-CARVALHO; COSTA 2015).

4.2 Erradicação

No intuito de eliminar o patógeno de uma determinada área, as medidas adotadas podem adquirir um caráter absoluto. Em caráter relativo considera-se a ideia e prática de diminuir a fonte de inóculo. Várias estratégias podem ser adotadas como vistorias periódicas e prática de *roguing*, eliminação de restos culturais e eliminação de hospedeiros alternativos. Estas práticas em conjunto com outras medidas podem ser bastante eficientes. No Brasil, talvez um dos exemplos mais conhecidos da eficiência da erradicação para controle de vírus refere-se ao controle do *Papaya ringspot virus* (PRSV-P) no Espírito Santo e Bahia e, mais recentemente, adotada também para controle do vírus da meleira (*Papaya meleira virus*, PMeV).

4.3 Proteção

Medidas incluídas neste princípio de controle visam a prevenir o contato do patógeno com a hospedeira e/ou tornar o inóculo não infectivo no sítio de infecção. Para vírus de plantas a prevenção do contato com o patógeno pode ser feita principalmente por meio do controle de vetores (já apresentado anteriormente) e por meio dos plantios protegidos.

4.4 Terapia

Visa a restabelecer a sanidade de uma planta com a qual o patógeno já estabeleceu uma relação. As estratégias de controle classificadas neste método envolvem tratamento térmico em sementes e bulbos e incluem termoterapia e cultura de meristemas. Estas estratégias vêm sendo usadas para diversas espécies florestais e também para o *Potato virus S* (PVS) em batata e para o *Alfalfa mosaic virus* (AMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV) em fumo. Estas estratégias são indicadas para espécies de propagação vegetativa e que acumulam vírus com o passar das gerações. Como exemplo, podem ser

citadas: alho, batata, batata-doce, citros, morango, plantas ornamentais como orquídea, bromélia e hortênsia.

4.5 Imunização

Entende-se por imunização um conjunto de estratégias de controle que visam à obtenção de plantas resistentes a vírus. Basicamente, três tipos de imunização podem ser considerados:

4.5.1 Imunização genética

A imunização genética compreende o desenvolvimento de materiais vegetais resistentes, seja por meio de melhoramento clássico, envolvendo cruzamento entre espécies botânicas, ou por meio da transformação genética com a produção de plantas transgênicas (discutidas em detalhes mais adiante). Os tipos de resistência associados às interações patógeno-hospedeiro podem ser subdivididos em: “resistência de hospedeiro” (*host resistance*) e “resistência de não hospedeiro” (*non-host resistance*, NHR). Embora ambos sejam resultado do sistema de resposta imune que opera nas plantas, esses tipos de resistência são diferentes, uma vez que o primeiro é baseado na adaptação do patógeno a uma determinada espécie hospedeira (*host*), e o segundo está relacionado à perda dessa adaptação a outras espécies (*non-host*). Para os casos de planta hospedeira, os termos suscetível e resistente podem ser empregados, de acordo com a resposta da planta ao patógeno (vírus). O termo suscetível é usado para os casos em que o vírus infecta a planta, se replica e se movimenta célula a célula e sistemicamente. O termo resistente é utilizado para referir-se à restrição nos processos de replicação e movimento do vírus na planta. Por outro lado, quando se considera a resposta da planta à doença, os termos sensível (plantas exibindo sintomas graves) e tolerante (plantas com sintomas leves ou imperceptíveis) são adotados (COOPER; JONES 1983). Do ponto de vista agrônômico, plantas tolerantes exibem sintomas mais brandos, entretanto não há interferência no rendimento, quando comparadas com plantas consideradas resistentes. As plantas podem apresentar diferentes respostas de resistência, incluindo resistência extrema

(*extreme resistance*, ER), sem a expressão de qualquer sintoma [infecção subliminar por meio da capacidade de replicação em protoplastos (células de plantas sem a parede celular, que são cultivadas em meio artificial), mas sem a habilidade de movimento célula a célula], e reação de hipersensibilidade (*hypersensitive response*, HR) (replicação e movimento a curtas distâncias, ficando o vírus restrito a poucas células) [para maiores informações sobre NHR, consultar as revisões de Fraser (1990), Uma et al. (2011) e Gill et al. (2015)].

Programas de melhoramento buscam incorporar genes de resistência em materiais elite visando a agregar fatores para se obter uma resistência ampla, durável e estável. Por resistência ampla entende-se uma resistência efetiva a diferentes estirpes de uma mesma espécie e a mais de uma espécie do patógeno (seja do mesmo gênero ou de gêneros distintos, inclusive de grupos diferentes de patógenos). Diferentes estratégias podem ser utilizadas como a piramidização de genes ou o desenvolvimento de multilinhas. A durabilidade da resistência está intrinsicamente ligada aos mecanismos de variabilidade da espécie viral em questão e ao tipo de resistência, se conferida por um, poucos ou vários genes. Para vírus de plantas os principais mecanismos geradores de variabilidade, conforme mencionado anteriormente, são as mutações, recombinações e pseudorecombinações (para genomas multipartidos). Recomenda-se que, durante os testes de busca de fontes de resistência (normalmente em espécies selvagens do mesmo gênero da planta cultivada que se quer melhorar), levantamentos locais, regionais e nacionais sejam realizados no intuito de se conhecer a variabilidade/diversidade da espécie viral. Assim, diversas estirpes/variantes virais podem ser utilizadas (sob diferentes condições, principalmente de temperatura) para desafiar os materiais candidatos. Genes de resistência presentes em acessos selvagens selecionados mediante inoculações do patógeno (mecânica, por vetores ou biobalística) e confirmação da ausência ou do acúmulo do vírus (por testes sorológicos ou moleculares) são introgrididos na espécie cultivada por meio de cruzamentos controlados. Testes para determinação do tipo de herança, número de genes e possíveis efeitos epistáticos são realizados e os fenótipos, bem como suas proporções fenotípicas são anotadas para as gerações F_1 ,

F_2 , RC_{PR} (retrocruzamento com parental resistente) e RC_{PS} (retrocruzamento com parental suscetível). Em estudos mais avançados, linhagens quase-isogênicas são produzidas e o(s) mecanismo(s) de ação do(s) gene(s) de resistência são determinados.

4.5.2 Imunização biológica

Entende-se por imunização biológica o uso de estirpes ou variantes atenuados virais no intuito de desencadear/ativar o sistema de defesa da planta hospedeira. Também conhecida como proteção cruzada ou pré-imunização, imunização biológica refere-se ao processo em que uma planta é infectada por uma estirpe viral atenuada ficando protegida contra a infecção ou expressão de sintoma da estirpe severa. Um dos exemplos de sucesso de pré-imunização no Brasil e no mundo refere-se ao controle do agente causal da Tristeza do Citrus. De acordo com Moreno et al. (2008), no Brasil, existem atualmente mais de 90 milhões de pés de laranja-pera pre-imunizadas plantadas. Além disso, podem ser citados, ainda, como sucesso de pré-imunização exemplos para o controle de: *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) em Cucurbitáceas em Israel; *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) em tomateiro no Japão; *Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) na Europa; e *Papaya ringspot virus* (PRSV, *Potyvirus*) no Havaí, EUA.

4.5.3 Imunização química

Na imunização química, utilizam-se substâncias ou agentes que possam estimular respostas e rotas de defesa da planta sem envolver alterações no genoma da planta. As plantas têm mecanismos de defesa que podem ser induzidos quando as mesmas são expostas a agentes externos. De acordo com Hammerschmidt et al. (2001), a indução de resistência em plantas pode ser definida como a ativação de resistência a doenças, induzida sistemicamente e de forma não específica por agentes bióticos ou abióticos, elicitando genes que codificam diversas respostas de defesa. Ross (1961) demonstrou que, após a infecção localizada com TMV, plantas de fumo adquiriam resistência

sistêmica frente a outros patógenos. Durante muitos anos a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) foi considerada sinônimo de Resistência Sistêmica Induzida (RSI), visto que induzem fenótipos semelhantes e são efetivas contra um amplo espectro de patógenos de plantas. Sabe-se que a RSA pode ser ativada tanto por fatores bióticos quanto abióticos. A rota de defesa na planta relaciona-se com a produção de ácido salicílico, ocorrem modificações de parede celular e produção de fitoalexinas com consequente aumento da expressão de um determinado grupo de genes que codificam proteínas PR (proteínas relacionadas à patogênese) (WARD et al., 1991; Van LOON; Van STRIEN 1999). Por outro lado, na RSI apenas fatores bióticos (como microrganismos não patogênicos) funcionam como elicitores, e a rota de defesa relaciona-se com a produção de ácido jasmônico e etileno, não havendo a produção de Proteínas PR (PIETERSE et al., 1998; Van LOON et al., 1998).

4.6 Evasão

Evasão é definida como um conjunto de estratégias que visam à ‘fuga’ dirigida contra o patógeno e/ou ambiente favorável ao desenvolvimento da doença. As principais medidas são: escolher áreas geográficas e o local de plantio distantes de elevadas pressões de inóculo do(s) patógeno(s), retardar a data de plantio e/ou utilizar variedade(s) precoce(s), evitando as épocas mais adequadas para o(s) patógeno(s) ou seus vetores.

4.7 Regulação

A Regulação consiste em alterar os fatores ambientais envolvidos ou aqueles que favoreçam o aparecimento da doença. As principais medidas são: modificação de práticas culturais (irrigação, drenagem, espaçamento, podas, entre outros), controle de vetores, modificação do ambiente (umidade, temperatura, gás carbônico, entre outros) e nutrição (calagem e adubação).

5 IMUNIDADE EM PLANTAS CONTRA VÍRUS E RESISTÊNCIA GENÉTICA

Devido à ausência de células especializadas em defesa, a imunidade em plantas depende da capacidade de suas células em detectar a presença do(s) patógeno(s) e ativar, rapidamente, mecanismos para se defender desse(s) ataque(s). Disparada nas fases iniciais do reconhecimento (ou detecção) do patógeno, a defesa basal consiste na primeira linha de defesa das plantas. Proteínas do hospedeiro reconhecem estruturas ou proteínas do patógeno, sendo esse reconhecimento denominado de “padrões moleculares associados a microrganismos (não patogênicos)” [*microbe-associated molecular patterns* (MAMPs)], “padrões moleculares associados a patógenos” [*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)] ou sinais endógenos derivados de um ferimento ou ataque de um determinado patógeno, denominados “padrões moleculares associados a danos” [*damage-associated molecular patterns* (DAMPs)]. Esses mecanismos operam por meio de “receptores de reconhecimento de padrões” (*pattern recognition receptors*, PRRs), localizados na membrana plasmática ou no interior das células (MACHO; ZIEPFEL 2014). PRRs em plantas são representados por receptores de membrana do tipo quinases (*receptor-like kinases*, RLK) e receptores do tipo proteínas (*receptor-like proteins*, RLP), que para serem funcionais necessitam da formação de um complexo com correceptores como, por exemplo, BAK1 [*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1* (BRI1)-*associated kinase 1*] (LIEBRAND et al., 2014). Quando reconhecem estruturas específicas do patógeno, os PRRs sinalizam para que uma cascata de transdução de sinais seja disparada na célula, induzindo uma resposta extremamente rápida, denominada “imunidade disparada por PAMP” (*PAMP triggered immunity*, PTI) (JONES; DANGL 2006; MANDADI; SCHOLTHOF 2013). Pelo fato dos vírus de plantas precisarem atravessar a parede celular, seja por inoculação mecânica ou por meio de seus vetores, para poderem entrar nas células, normalmente, não há reconhecimento pelos receptores de membrana, ao contrário de fungos, bactérias e vírus animais. Entretanto, comprovou-se, recentemente, que plantas também utilizam PTI para limitar a infecção

viral, por meio do envolvimento de um receptor do tipo quinase (BAK1) no reconhecimento de PAMP por PRR (KORNER et al., 2013). Além disso, um mecanismo novo de defesa de plantas contra espécies do gênero *Begomovirus* (vírus de ssDNA) foi recentemente descoberto (ZORZATTO et al., 2015). Os autores comprovaram a participação de um receptor de membrana da família RLK [*Nuclear shuttle protein* (NSP)-*interacting kinase 1*, NIK1], similar aos receptores do tipo quinases envolvidos em PTI. Esse mecanismo, quando ativado, leva a uma repressão dos mecanismos de tradução da célula, interrompendo o ciclo infeccioso do vírus. Vale ressaltar que, embora NIK1 e BAK1 sejam estruturalmente similares, os mecanismos de defesa envolvidos em cada caso são completamente distintos [ver para maiores detalhes as excelentes revisões de Nicaise (2015), Calil & Fontes (2017) e Gouveia et al. (2017)].

O sucesso de um patógeno vai depender também da sua capacidade de suprimir a resposta da planta via PTI, codificando elicitores (proteínas efetoras) que possam interferir no reconhecimento pelos PRR. Além disso, para o seu estabelecimento na planta, o patógeno necessitará codificar “efetores que desencadeiam suscetibilidade” (*effector triggered susceptibility*, ETS). Esses efetores são moléculas associadas a um microrganismo (normalmente um patógeno), que podem alterar as respostas bioquímicas e fisiológicas de seu hospedeiro. O hospedeiro, por sua vez, se defende dos ETS por meio de um processo denominado “imunidade ativada aos efetores” (*effector-triggered immunity*, ETI). Esses mecanismos moleculares sofisticados de reconhecimento patógeno-hospedeiro, um verdadeiro vaivém de ataque/defesa/contra-ataque/defesa, segue um modelo intrigante e ao mesmo tempo fascinante denominado por Jones & Dangl (2006) de zig-zag. Para incrementar o combate aos vírus, os mecanismos de imunidade inata (PTI-ETI) são complementados por mecanismos de defesa da planta, baseados em silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) (ver detalhes mais adiante). Dessa forma, as plantas se defendem, tanto contra proteínas (efetores) quanto contra os ácidos nucleicos (dsRNA) virais. Interessante mencionar que esses mecanismos apresentam sobreposição, uma vez que um fator associado a PTGS, a RNA polimerase dependente de RNA 6 (RDR6), parece modular

as vias de PTI e ETI (BOCCARA et al., 2014).

As interações vírus-hospedeiro levam a distúrbios em muitos processos metabólicos celulares, o que pode resultar em alteração ou até mesmo interrupção na síntese e redistribuição de fitohormônios, no perfil de metabólitos e na síntese de proteínas e de RNAs. Esses distúrbios são traduzidos, em maior ou menor grau, em doença, com consequente resposta mediada pela síntese hormonal. Os hormônios desempenham um papel crucial nos processos relacionados ao desenvolvimento das plantas, e têm também participação importante nas respostas de defesa das plantas contra as infecções virais. O ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), brassinosteroides (BR), etileno (ET) e o ácido abscísico (ABA) estão associados a essas interações (ALAZEM; LIN 2015). Além dos hormônios, as plantas também empregam a via de ubiquitina-proteassoma (*ubiquitin proteasome system*, UPS) como estratégia de defesa contra vírus (ALCAIDE-LORIDAN; JUPIN 2012). UPS está associada com a regulação celular, incluindo o ciclo celular, transcrição e transdução de sinais. Vale mencionar, porém, que se por um lado as plantas utilizam UPS para se defender das infecções virais, os vírus também são capazes de sequestrar ou subverter UPS do hospedeiro para incrementar sua capacidade de infecção (CHENON et al., 2012).

As plantas, independentemente do tipo de resistência envolvida, respondem às infecções virais lançando mão de mecanismos moleculares complexos e, para muitos patossistemas, ainda não totalmente elucidados. Essas interações são controladas por genes, e esses genes, utilizados como fonte de resistência genética contra vírus, podem ser incluídos em duas categorias: (i) genes de resistência dominantes (genes *R*); e (ii) genes de resistência recessivos. A seguir, as principais características e diferentes aspectos do emprego desses genes para resistência de plantas a vírus serão apresentados e discutidos.

5. 1 Resistência associada a genes dominantes

Os trabalhos de Flor (1971) introduziram os conceitos da teoria gene-a-gene que, por definição, baseia-se na ocorrência de genes de resistência

(genes *R*) em hospedeiros e elicitores ou componentes de avirulência (*Avr*) em patógenos, induzindo HR, que representam uma das possíveis interações negativas em um patossistema. Em relação à interação entre vírus e plantas, genes que codificam a replicase, proteína de movimento e a proteína do capsídeo já foram identificados como genes *Avr*. Heath (1987; 1991) postulou que uma interação gene-a-gene evoluiu como uma resposta à pressão de seleção sobre o hospedeiro após o estabelecimento de compatibilidade básica por meio da produção de fatores de patogenicidade pelo patógeno em questão. Essa pressão resulta na evolução de resistência baseada em hipersensibilidade, que é ativada por um produto do gene *Avr* depois da interação com um receptor derivado de um gene *R*. O mecanismo que explica mais precisamente as interações gene-a-gene se baseia no reconhecimento do gene *Avr* do patógeno por produtos do gene *R*, por meio da interação direta com a proteína derivada daquele gene, ou pela interação com algum outro componente originário do mesmo. Para superar este mecanismo de reconhecimento, alterações em aminoácidos que não chegam a afetar significativamente o mecanismo de patogenicidade podem ocorrer. Essa superação da resistência caracterizada por esse mecanismo de reconhecimento já foi comprovada em diversas espécies de plantas de importância econômica e a caracterização e o mapeamento de novos genes *R*, principalmente para espécies cultivadas de solanáceas, foi realizado de maneira extensiva.

Os genes *R* são, normalmente, ativados em associação ao disparo concomitante da morte celular programada, que leva à indução de lesões necróticas (HR) ou, em algumas situações, induz ER, sem a expressão de qualquer sintoma. Os efetores codificados pelo vírus podem ser reconhecidos indiretamente por proteínas *R* do hospedeiro, ou também denominada Teoria de “Guarda” (DANGL; JONES 2001). Os genes *R*, nesse caso, fazem parte de um sistema de monitoramento, que percebe a presença do patógeno ou de seu efector, sem que haja interação física entre os produtos de *R* com o respectivo efector. É importante lembrar que os vírus de plantas têm genomas compactos e codificam pouquíssimas proteínas, as quais assumem múltiplas funções. No caso do TMV, por exemplo, cada um dos produtos da

expressão de suas ORFs poderá atuar como determinante de Avr em uma determinada hospedeira.

A resistência mais amplamente utilizada nos plantios comerciais é dominante e monogênica. Essa resistência é caracterizada pela ocorrência constante de HR no sítio de entrada do patógeno, macroscopicamente observada como o surgimento de lesões locais necróticas seguida de abscisão foliar. As células mortas no sítio de infecção podem restringir o movimento do patógeno ou servem como reservatório de compostos antimicrobianos como fitoalexinas sintetizadas por células que circundam a lesão. Ocorre também a deposição de calose, lignina, glicoproteínas e acúmulo de outras proteínas relacionadas com a patogênese, como 1,3- β -glucanases e quitinases, resultando na limitação do movimento do vírus a curtas e a longas distâncias. As HR ativadas por uma reação incompatível entre patógeno e hospedeiro têm características comuns aos processos apoptóticos em células animais (XIE; CHEN 2000). Algumas reações como a fosforilação proteica e geração de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*, ROS), que ocorrem em células animais em processos de apoptose, também foram verificadas em HR em plantas. As ROS possuem atividade antimicrobiana e são capazes de reduzir a viabilidade do patógeno.

Nas últimas décadas, genes de resistência e seus correspondentes de avirulência virais foram clonados, por exemplo, os genes *RTM1/RTM2* e *HRT* em *Arabidopsis*, que conferem resistência a TMV e *Turnip crinckle virus* (TCV), respectivamente, e os genes *Tm22* e *Sw-5* em tomate, que conferem resistência a ToMV e TSWV, respectivamente. Dentre as famílias de genes de resistência que induzem HR a mais numerosa é a denominada NBS-LRR. Os genes de resistência classificados nesta família possuem características comuns, de acordo com os domínios das proteínas sintetizadas. O domínio NBS (*nucleotide binding site*) corresponde a um sítio de ligação de nucleotídeos, e o domínio LRR (*leucine rich repeat*) está envolvido na regulação de atividade sinalizadora das proteínas de resistência, localizando-se na região C-terminal. Ainda ocorrem os domínios TIR ou CC (*coiled-coil*) na região N-terminal. Além dessas, outras estruturas foram identificadas em proteínas codificadas por genes de resistência dominantes de *Arabidopsis*

thaliana como: (i) uma proteína do tipo lecitina, da família das jacalinas, codificada pelo gene *RTM1*; (ii) uma proteína do tipo *heat-shock* codificada pelo gene *RTM2*; e (iii) uma proteína com um domínio CC no terminal carboxílico similar a meprin e TRAF. Identificou-se também, em tomateiro, o gene *Tm1*, que codifica uma proteína com estrutura do tipo TIM-barrel, e que confere resistência a TMV e ToMV (Tabela 1).

Pesquisas para compreender a interação entre genes de resistência a TSWV e seu respectivo componente de avirulência foram realizadas em alguns membros dessa classe de genes, como *Sw-5* e *Tsw*, originários de *Solanum peruvianum* e *Capsicum chinense* e que também expressam HR em resposta a infecções por orthotospovírus. No caso do gene *Tsw*, o seu correspondente de avirulência é o gene NSs, que sintetiza uma proteína não estrutural envolvida com a supressão de silenciamento gênico (De RONDE et al., 2013). Para o gene *Sw-5*, Hoffmann et al. (2001) verificaram que o gene de avirulência desta interação está localizado no componente M, e Peiró et al. (2014) observaram que o gene que codifica a proteína de movimento (NSm) é o determinante de avirulência desta interação gene-a-gene. Estudos para analisar a expressão dessa resistência em uma plataforma transgênica foram conduzidos por Hallwass et al. (2014), utilizando plantas transgênicas de tabaco contendo a cópia funcional do gene *Sw-5*, e observaram que o gene NSm de um isolado indutor da reação de resistência levou à indução de HR, enquanto o mesmo gene de um isolado capaz de superar a resistência não a causou.

A compreensão dessas interações pode levar ao desenvolvimento de novas fontes de resistência, algo considerado de extrema importância e premente, pois a ocorrência de isolados capazes de suprimir sua função já foi confirmada em cultivos de tomate em diferentes países. Além disso, pode contribuir para o entendimento dos processos de geração dos isolados capazes de superar essa resistência no campo. A capacidade de multiplicação no inseto vetor e a composição de seu genoma tripartido podem potencialmente conferir aos vírus da família *Tospoviridae* a geração de novos isolados, a partir de eventos de rearranjos (*reassortment*) de segmentos inteiros de seu genoma. Considerando esse potencial de adaptação, a possível manipulação

da resistência para a criação de alternativas duráveis e específicas depende essencialmente do entendimento das interações patógeno-hospedeiro.

Para a observação dessas interações, novas ferramentas devem ser desenvolvidas. Lau et al. (2006) avaliaram a capacidade de reconhecimento de fatores do patógeno em plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas com o gene *Sw-5*. Esse modelo biológico mostrou-se funcional, apresentando o mesmo espectro de resistência do locus *Sw-5* em tomateiro com reações de hipersensibilidade que contiveram os inóculos de três espécies de orthotospovírus [*Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) e *Chrysanthemum stem necrosis virus* (CSNV)], de forma variável, nos sítios de infecção, apesar de ter se verificado a existência de polimorfismos que podem ter levado a diferentes níveis de resistência. Spassova et al. (2001) demonstraram a eficiência da plataforma transgênica baseada em *Sw-5* ao transformar plantas de *Nicotiana tabacum* com este locus. A partir dessa plataforma, demonstrou-se que a cópia *Sw-5b* do locus era suficiente para conferir resistência a orthotospovírus, e que *Sw-5a* parece contribuir para o aumento do grau de resistência, apesar de não ser em uma intensidade significativa.

5.2 Resistência associada a genes recessivos

De acordo com Fraser (1990), a resistência recessiva parece ser mais comum para vírus do que para outros patógenos, para os quais os genes dominantes estão envolvidos. Dois mecanismos de resistência recessiva são propostos: (i) passivo, em que a planta é resistente pela ausência de um fator específico do hospedeiro, o qual é requerido para que o vírus possa completar o ciclo de infecção (FRASER 1990; ROBAGLIA; CARANTA 2006); e (ii) ativo, em que pode existir algum fator que, ao reconhecer moléculas virais, ativa uma ou mais respostas de defesa da planta. Estudos indicam que a hipótese de mecanismo passivo seria mais comum para a resistência recessiva aos potyvírus (DIAZ-PENDÓN et al., 2004; ROBAGLIA; CARANTA 2006).

Tabela 1 – Genes dominantes (R) associados à resistência de plantas a vírus.

Gênero do vírus	Vírus	Gene R	Espécie de planta	Proteína R	Fator de avirulência (Avr)
Begomovirus	BDMV	PvVTT1	Phaseolus vulgaris	TIR-NB-LRR	Proteína de transporte nuclear
	MYMIV	CYR1	Vigna mungo	CC-NB-LRR	Capa proteica
	TYLCV	Ty1/Ty3	Solanum chilense	RdRp	(-)
Carmovirus	TCV	HRT	Arabidopsis thaliana	CC-NB-LRR	Capa proteica
Closterovirus	CTV	Ctv	Poncirus trifoliata	CC-NB-LRR	ND
Cucumovirus	CMV	RCY1	A. thaliana	CC-NB-LRR	Capa proteica
	CMV	RT4-4	P. vulgaris	TIR-NB-LRR	Replicase/helicase
	CMV	Vat	Cucumis melo	CC-NB-LRR	ND
Potexvirus	PVX	Rx	S. tuberosum	CC-NB-LRR	Capa proteica
	PVX	Rx2	S. tuberosum	CC-NB-LRR	Capa proteica
	PVX	JAX1	A. thaliana	Tipo Jacalina	ND
Potyvirus	BCMV	I	P. vulgaris	TIR-NB-LRR	ND
	LMV, PPV, TEV	RTM1	A. thaliana	Tipo Jacalina	Capa proteica
	LMV, PPV, TEV	RTM2	A. thaliana	Small Heat-shock	Capa proteica
	LMV, PPV, TEV	RTM3	A. thaliana	Meprin/TRAF/CC	Capa proteica
	PRSV	Pvr1, Pvr2	C. melo	TIR-NB-LRR	ND
	PVY	Y-1	S. tuberosum	TIR-NB-LRR	ND
	SMV	Rsv1	Glycine max	CC-NB-LRR	P3 + HC-Pro
	TuMV	TurB01-05	Brassica spp.	TIR-NB-LRR	CI e P3
	WMV, ZYMV	Vat	C. melo	CC-NB-LRR	ND
Tobamovirus	TMV	N	Nicotiana glutinosa	TIR-NB-LRR	Replicase/helicase

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Gênero do vírus	Vírus	Gene <i>R</i>	Espécie de planta	Proteína <i>R</i>	Fator de avirulência (<i>Avr</i>)
	TMV, ToMV	<i>Tm2</i> , <i>Tm22</i>	<i>S. lycopersicum</i>	CC-NB-LRR	Proteína de movimento
	TMV, ToMV	<i>Tm1</i>	<i>S. hirsutum</i>	TIM-Barrel-like	Replicase/helicase
	PMMoV, TMV, ToMV	<i>L1 - L4</i>	<i>Capsicum annuum</i>	CC-NB-LRR	Capa proteica
<i>Orthospovirus</i>	CSNV, GRSV, INSV, TCSV, TSWV	<i>Sw5b</i>	<i>S. peruvianum</i>	CC-NB-LRR	Proteína de movimento

Siglas e abreviaturas: ND – não determinado; (-) – não há fator de avirulência (resistência mediada por RNAi); BDMV – *Bean dwarf mosaic virus*; CMV – *Cucumber mosaic virus*; CSNV – *Chrysanthemum stem necrosis virus*; CTV – *Citrus tristeza virus*; GRSV – *Groundnut ringspot virus*; INSV – *Impatiens necrotic spot virus*; LMV – *Lettuce mosaic virus*; MYMIV – *Mungbean yellow mosaic India virus*; PRSV – *Papaya ringspot virus*; PMMoV – *Pepper mild mottle virus*; PPV – *Plum pox virus*; PVX – *Potato virus X*; PVY – *Potato virus Y*; SMV – *Soybean mosaic virus*; TCSV – *Tomato chlorotic spot virus*; TCV – *Turnip crinckle virus*; TEV – *Tobacco etch virus*; TMV – *Tobacco mosaic virus*; ToMV – *Tomato mosaic virus*; TSWV – *Tomato spotted wilt virus*; TYLCV – *Tomato yellow leaf curl virus*; WMV – *Watermelon mosaic virus*; ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*. Fonte: BOISSOT et al. (2016); DOGIMONT et al. (2014); GALVEZ et al. (2014); REVERS; NICAISE (2014); De RONDE et al. (2014); TURINA et al. (2016); WALSH; JENNER (2002).

Os vírus de plantas, a cada passo da infecção (replicação, movimento, tradução de proteínas, montagem das partículas e transmissão por vetores), interagem com fatores do hospedeiro, e muitas dessas interações moleculares ocorrem entre proteínas. Quando não há condições de estabelecer qualquer uma dessas interações, o processo infeccioso é interrompido, o que representa o primeiro nível de resistência genética, imediatamente após o contato do vírus com a planta (em nível intracelular). Essa resistência é obrigatoriamente recessiva, pois em um heterozigoto a presença de uma cópia simples do alelo que expressa a proteína de interação compatível ao vírus permitirá que a infecção se complete. Portanto, teoricamente, a resistência recessiva tem maior durabilidade.

Os genes recessivos associados aos mecanismos de defesa contra vírus em plantas têm sido correlacionados aos fatores de início da tradução

em eucariontes (*eukaryotic initiation factors*, eIFs), principalmente das proteínas das famílias eIF4E e eIF4G, que fazem parte do complexo eIF4F. Esses genes têm sido identificados como determinantes imprescindíveis para que alguns vírus de plantas, principalmente os potyvírus, tenham sucesso no processo infeccioso. Para que se inicie a tradução das proteínas dos eucariontes, o complexo eIF4F recruta os ribossomos ao terminal 5' dos RNAs mensageiros (mRNAs) presentes na célula. A proteína eIF4E media a ligação ao m⁷G *cap* do terminal 5' do mRNA, enquanto a proteína eIF4G interage com outros componentes do complexo da maquinaria de tradução celular, incluindo a proteína de ligação à cauda de poliadeninas [*poly(A)-binding protein*, PABP] presente no terminal 3' do mRNA, eIF4E, eIF3 e eIF4A [para uma revisão, ver Truniger & Aranda (2009) e Sanfaçon (2015)].

Recentemente, diversos grupos de pesquisa têm demonstrado que um grande número de genes recessivos de plantas, correspondentes a alelos dos genes *eIF4E* ou sua isoforma *eIF(iso)4E*, estão associados com resistência a vírus. As diferentes espécies de vírus variam na habilidade de usar suas isoformas e diferem nas suas habilidades em interagir com eIF4E. Mutações nesses fatores podem conferir resistência recessiva. Além disso, o nocaute desses genes, por meio da interrupção total ou parcial de sua expressão, revelou resistência à infecção viral, sendo constatada uma total dependência desses fatores para o sucesso dos potyvírus. Os *Potyvirus* têm genoma constituído por um único ssRNA, com uma cauda de poli-A no terminal 3' e uma proteína (*virus-protein genome linked*, VPg) que se liga covalentemente ao terminal 5'. A VPg é um dos determinantes virais envolvidos na interação de compatibilidade entre o vírus e a planta. Demonstrou-se que a VPg se une à eIF4E e também à sua isoforma eIF(iso)4E, indicando que a formação do complexo VPg-eIF4E é fundamental para o sucesso da infecção viral. Outros fatores também foram confirmados como essenciais para a replicação viral, como o fator de início da tradução eIF4B, os fatores de elongação 1A e 1B (eEF1A, eEF1B) e as proteínas de ligação à cauda de poliadeninas (PABP2, PABP4 e PABP8).

Genes de resistência recessiva já foram descritos para o controle dos potyvírus BCMV em feijoeiro, LMV em alface, *Pea seed-borne mosaic*

virus (PSbMV) em ervilha, PVY, e espécies de *Begomovirus* em tomateiro. Em feijoeiro, resistência ampla ao BCMV e a outras espécies de potyvírus é conferida pela presença dos alelos *bc-u* e *bc-3* e ausência do alelo *I* (HART; GRIFFITHS 2013). Somente o alelo *bc-3* apresenta mecanismo de resistência conhecido. Este gene codifica o fator eIF4E mutado (NADERPOUR et al. 2010), entretanto já existem casos da superação da resistência conferida por *bc-3* (FENG et al., 2015). A resistência recessiva, conferida por meio da mutação de genes recessivos, como, por exemplo, *eIF4E* e *eIF4G*, e suas isoformas, foi identificada em espécies de importância econômica (pimentão, alface e tomate selvagem), sendo que muitos deles estão associados à resistência a *Potyvirus*. Lellis et al. (2002) foram os primeiros a descrever resistência recessiva mediada por eIF4E em mutantes de *Arabidopsis thaliana* ao *Tobacco etch virus* (TEV, *Potyvirus*). Anos mais tarde, resistência recessiva mediada por eIF4E foi observada para outros patossistemas [para uma revisão, ver Truniger & Aranda (2009) e Sanfaçon (2015)]. Os exemplos de fatores de tradução, caracterizados como determinantes de resistência a vírus estão resumidos na Tabela 2.

Em alguns casos, QTL (*quantitative trait loci*) vêm sendo relacionados à resistência em alguns materiais. Como exemplo, pode-se citar a linha TY172, com resistência ao begomovírus monopartido *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que é conferida por um QTL maior e por, pelo menos, quatro QTL menores, sendo o maior detectado no cromossomo 4 de tomateiro, e denominado *Ty-5* (ANBINDER et al. 2009). Estudos de herança e mapeamento com diferentes linhagens derivadas do híbrido ‘Tyking’ com resistência aos diferentes isolados de TYLCV da Flórida indicaram, de fato, a natureza recessiva do locus de resistência, denominado *ty-5* (HUTTON et al., 2012).

6 RESISTÊNCIA TRANSGÊNICA

A transgenia se baseia em técnicas de engenharia genética para gerar organismos geneticamente modificados (OGM), contendo material genético originário de outro(s) organismo(s). A intenção é obter um indivíduo com

novas características que, dependendo do índice de sucesso dessa nova característica, pode mudar a forma com a qual este organismo interage com outros à sua volta. No caso de plantas geneticamente modificadas, ou denominadas plantas transgênicas, na prática, a transformação pode incluir: (i) o desligamento de genes, ou o aumento, redução ou simplesmente a alteração dos níveis de expressão; (ii) produção de matérias-primas (anticorpos, enzimas, fármacos e vacinas); (iii) o aumento do valor nutricional dos alimentos (aminoácidos e vitaminas); (iv) tolerância a herbicidas; (v) resistência à seca; (vi) resistência a solos com baixa fertilidade; e (vii) resistência a pragas e patógenos, incluindo resistência a vírus, tema deste capítulo.

Tabela 2 – Genes recessivos e fatores de tradução associados à resistência de plantas a vírus.

Gênero do vírus	Vírus	Gene	Espécie de planta	Fator de tradução	Fator <i>Avr</i>
<i>Bymovirus</i>	BaMMV, BaYMV	<i>rym4/5</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	eIF4E	VPg
<i>Carmovirus</i>	MNSV	<i>Nsv</i>	<i>Cucumis melo</i>	eIF4E	3'-UTR
	TCV	<i>At3g60240</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF4G	(-)
<i>Cucumovirus</i>	CMV	<i>At3g60240 (cum1/cum2)</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF4G	(-)
<i>Ipomovirus</i>	CVYV	<i>Silenciamento (RNAi)</i>	<i>C. melo</i>	eIF4E	(-)
<i>Potyvirus</i>	BCMV, CIYVV	<i>bc-1, bc-3</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	eIF4E	VPg, P1/HC-Pro
<i>Potyvirus</i>	BCMV, CIYVV	<i>bc-1, bc-3</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	eIF4E	VPg, P1/HC-Pro
	BYMV, PSbMV	<i>sbm1/4 (wlv)</i>	<i>Pisum sativum</i>	eIF4E	VPg

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Gênero do vírus	Vírus	Gene	Espécie de planta	Fator de tradução	Fator <i>Avr</i>
	LMV, PPV, TEV, TuMV	<i>At5g35620</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4E	VPg
	LMV	<i>mol1, mol12</i>	<i>Lactuca sativa</i>	eIF4E	VPg, CI, NIa
	MWMV, ZYMV	Silenciamento (RNAi)	<i>C. melo</i>	eIF4E	(-)
	PPV	Silenciamento (RNAi)	<i>Prunus domestica</i>	eIF(iso)4E	(-)
	PVY, TEV	<i>pvr1, pvr2</i>	<i>Capsicum spp.</i>	eIF4E	VPg
	PVY, TEV	<i>pot-1</i>	<i>S. lycopersicum</i>	eIF4E	VPg
	TuMV	<i>retr01</i>	<i>Brassica rapa</i>	eIF(iso)4E	VPg
	TuMV	<i>At5g57870, At2g24050</i>	<i>A. thaliana</i>	eIF(iso)4G1, eIF(iso)4G2	VPg
<i>Sobemovirus</i>	RYMV	<i>rym1</i>	<i>Oryza sativa</i>	eIF(iso)4G	VPg
<i>Tobamovirus</i>	TMV	Silenciamento (RNAi)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	eEF1A, eEF1B	(-)
<i>Tombusvirus</i>	TBSV	Silenciamento (RNAi)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	eEF1A, eEF1B	(-)
<i>Waikavirus</i>	RTSV	<i>tsv1</i>	<i>O. sativa</i>	eIF(iso)4G	ND

Siglas e abreviaturas: ND – não determinado; (-) – não há fator de avirulência (resistência mediada por RNAi); BaMMV – *Barley mild mosaic virus*; BaYMV – *Barley yellow mosaic virus*; BYMV – *Bean yellow mosaic virus*; ChiVMV – *Chilli veinal mottle virus*; CMV – *Cucumber mosaic virus*; CTV – *Citrus tristeza virus*; CIYVV – *Clover yellow vein virus*; CVYV – *Cucumber vein yellowing virus*; ERV – *Euphorbia ringspot virus*; LMV – *Lettuce mosaic virus*; MNSV – *Melon necrotic spot virus*; MWMV – *Moroccan watermelon mosaic virus*; PSbMV – *Pea seed-borne mosaic virus*; PepMoV – *Pepino mosaic virus*; PepSMV – *Pepper severe mosaic virus*; PepYMV – *Pepper yellow mosaic virus*; PPV – *Plum pox virus*; PVMV – *Pepper veinal mottle virus*; PVV – *Potato virus V*; PVX – *Potato virus X*; PVY – *Potato virus Y*; RTSV – *Rice tungro spherical virus*; RYMV – *Rice yellow mottle virus*; TCSV – *Tomato chlorotic spot virus*; TCV – *Turnip crinckle virus*; TEV – *Tobacco etch virus*; TMV – *Tobacco mosaic virus*; TBSV – *Tomato bushy stunt virus*; ToMV – *Tomato mosaic virus*; TSWV – *Tomato spotted wilt virus*; TuMV – *Turnip mosaic virus*; , ZYMV – *Zucchini yellow mosaic virus*. Fonte: CARANTA; DOGIMONT (2008); GALVEZ et al. (2014); REVERS; NICAISE (2014); SANFAÇON (2015).

No caso da transgenia para a resistência a vírus, a intenção é detectar genes com resistência a esses patógenos em plantas, ou até mesmo em animais, como os insetos, e transferi-los para indivíduos economicamente importantes, mas suscetíveis a eles. Como toda a técnica que se baseia na manipulação de organismos que interagem entre si de maneira complexa, apresenta vantagens e desvantagens. Dentre as desvantagens estão a necessidade do uso de técnicas moleculares para a clonagem do gene de interesse, que podem deixar o processo mais caro do que por melhoramento clássico, além de estudos de impacto ambiental baseados na legislação vigente, que podem fazer com que o tempo para a obtenção do material se prolongue consideravelmente, influenciando também no custo final. Já dentre as vantagens está a velocidade na obtenção do material final, pois a transferência de genes é muito mais rápida via técnicas de transgenia do que por meio do melhoramento clássico. Outra vantagem seria a alteração de características relacionadas ao metabolismo das plantas, que pode ser modificado a ponto de gerar um produto com maiores vantagens do ponto de vista nutricional ou voltado para a saúde do consumidor.

6.1 Histórico da transgenia para geração de plantas tecnologicamente superiores

Em 1994, a empresa americana Calgene registrou a primeira variedade comercial transgênica do mercado, um tomate denominado *Flavr-Savr*, com um investimento de aproximadamente US\$ 500.000.000,00. Esse tomate apresentava melhor sabor e tempo de prateleira superior comparado a outras variedades disponíveis, entretanto sua aceitação no mercado foi pequena. Apesar do baixo índice de aceitação inicial, os cultivos de plantas transgênicas, principalmente de plantas expressando a toxina Bt de *Bacillus thuringiensis* (que torna a planta resistente a um grande número de pragas) e resistentes a herbicidas (que facilitam o manejo de plantas daninhas), ocupam uma área de mais de 60 milhões de hectares, distribuídos em 23 países, como Brasil, Argentina, EUA, China e Índia. Isso significa que, mesmo sem aceitação imediata e com a pressão e a desconfiança de ambientalistas e a população em geral, os plantios com transgênicos seguem em franca

expansão. Dados de 2005, levantados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, mostram que as plantas transgênicas correspondem a cerca de 79% do total da área plantada de algodão, 52% de milho e 87% de soja. Em 2008, o plantio de arroz transgênico contendo o gene *Bt* iniciou na China, e é provável que esse arroz venha a ser o mais plantado nesse país e na Ásia como um todo. Em relação ao controle de vírus de plantas, a primeira variedade transgênica desenvolvida comercialmente foi a abóbora CZW-3, resistente ao CMV, WMV e ZYMV. Essa variedade tem sido cultivada nos Estados Unidos e Canadá desde 1995. O sucesso com o cultivo de plantas transgênicas, principalmente nos EUA e China, aponta para os benefícios da tecnologia, que parecem superar os riscos ao meio ambiente e à saúde animal e humana (TEPFER 2002; FUCHS 2008; PRINS et al. 2008).

Powell Abel et al. (1986) obtiveram as primeiras plantas transgênicas resistentes a vírus. No trabalho, liderado pelo grupo do Prof. R.N. Beachy (Universidade de Washington, St. Louis, EUA), em colaboração com a empresa Monsanto, os autores transformaram plantas de *Nicotiana tabacum* expressando a CP do TMV, que, quando inoculadas com o próprio vírus, apresentaram resistência parcial, traduzida no retardo da expressão de sintomas. Com isso, demonstrou-se pela primeira vez, na prática, a teoria de “Resistência Derivada do Patógeno” (discutida mais adiante), apontada anos antes por outros pesquisadores (HAMILTON 1980; SEQUEIRA 1984; SANFORD; JOHNSTON 1985), a qual foi denominada resistência mediada pela CP. Demonstrou-se, porém, anos mais tarde, que plantas transgênicas que expressavam um domínio da replicase viral também eram resistentes ao vírus, sendo então denominada resistência mediada pela replicase viral. Posteriormente, demonstrou-se que porções genômicas que codificam outras proteínas virais (proteínas de movimento, proteases, entre outras), além de diversas classes de RNA (satélites, defectivos interferentes, RNA não codificantes, RNA antissenso, RNA de dupla fita, ribozimas, RNA com repetições invertidas e micro RNA artificiais) eram capazes de conferir resistência em plantas. Portanto, constatou-se que plantas transgênicas transformadas com qualquer sequência viral poderiam expressar algum nível de resistência quando desafiadas pelo próprio vírus. O mais

surpreendente, porém, é que a resistência, em muitos casos, estava associada ao requerimento dos transcritos transgênicos (RNA) e não à expressão da proteína. Atualmente, sabe-se que isso está associado aos mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional, PTGS (assunto que será discutido mais adiante). Além disso, plantas transgênicas expressando sequências não virais [RNAses, proteínas antivirais, anticorpos expressos em plantas (*plantibodies*), fatores de transcrição e elicitores] também se mostraram resistentes a vírus (CILLO; PALUKAITIS 2014; GALVEZ et al., 2014).

6.2 Como gerar plantas transgênicas resistentes a vírus?

A geração de plantas transgênicas segue uma série de etapas. Primeiramente é preciso realizar a clonagem do gene (ou fragmento de DNA) de interesse, por meio de técnicas moleculares, desde a amplificação via PCR (ou RT-PCR, no caso de vírus de RNA) até a “inserção” deste gene na planta alvo, através de um vetor de expressão, por exemplo. O objetivo final é a introdução e a expressão de genes exógenos, utilizando vetores ou plasmídeos. Originários de *Agrobacterium tumefaciens*, esses plasmídeos contêm o gene de interesse e podem ser introduzidos na planta por meio de um procedimento conhecido como agroinoculação. A região do T-DNA do plasmídeo Ti, que originalmente causaria uma galha na região onde fosse introduzido, seria responsável por transferir o gene de interesse ao genoma da planta alvo. Outra forma de transferência de genes seria através de uma técnica conhecida como bombardeamento de DNA, ou biobalística, que consiste na introdução do plasmídeo ou de partes de DNA com o auxílio de um equipamento que bombardeia as plantas com estes DNAs, incorporando-os ao(s) cromossomo(s) das células atingidas. Outros exemplos seriam as técnicas que se utilizam de eletroporação, sonicação, microinjeção, entre outras.

A forma mais comum de transformação genética de plantas é utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, como descrito anteriormente, devido a todo o conhecimento acumulado, resultante de décadas de estudos sobre o funcionamento desta bactéria e de seu ciclo infectivo e principalmente pela facilidade de trabalho. Estirpes voltadas especificamente ao uso em

transformações genéticas foram desenvolvidas, assim como plasmídeos mais eficientes. A identificação de genes das inúmeras hospedeiras com funções relacionadas à transformação também foi muito importante para a popularização da técnica. Ao final do processo, para a comprovação da transformação das células vegetais, é importante o uso de marcadores de seleção como, por exemplo, antibióticos ou herbicidas, que são aplicados ao meio onde essas células se desenvolvem após a transformação. Os plasmídeos contêm genes de resistência aos antibióticos (ou aos herbicidas) aplicados ao meio, permitindo que somente as células transformadas se desenvolvam adequadamente.

De maneira didática, as formas de geração de plantas transgênicas resistentes a vírus de plantas se baseiam em três estratégias:

(i) Expressão de genes de resistência de outras plantas (resistência derivada da hospedeira) – Um gene, denominado transgene, originário de uma planta resistente ao vírus, é o responsável pela resistência. As variedades resistentes são facilmente obtidas, mas com a desvantagem dessa resistência poder ser mais facilmente superada pelo patógeno devido à pressão de seleção, que força o patógeno a mutar para não ser eliminado.

(ii) Expressão de genes do próprio vírus, mecanismo denominado “resistência derivada do patógeno” - *Pathogen-Derived Resistance*, PDR (SANFORD; JOHNSTON 1985; LOMONOSSOF 1995) – Um gene do próprio vírus sofre superexpressão, gerando uma quantidade muito maior de proteína viral que interferirá no ciclo infectivo. Um exemplo é do uso da proteína do capsídeo, que interfere diretamente no estágio de decapsidação. Devido à presença de grandes quantidades da proteína capsidial no meio celular, o vírus introduzido não é decapsidado ou é imediatamente reencapsidado, evitando a expressão de seu genoma.

(iii) Expressão de outros genes com capacidade antiviral – peptídeos, interferons e inibidores.

6.3 Exemplos de sucesso com aplicações em campo

Foram selecionados alguns exemplos de culturas em que se obtiveram sucesso via transgenia para resistência a vírus (modificado de PEREIRA-CARVALHO; COSTA 2015): (i) Abóbora CZW-3 (cultivar Asgrow) com resistência ao CMV, ZYMV e WMV – primeira variedade resistente a vírus expressando capas proteicas, cultivada nos EUA e Canadá desde 1995; (ii) Mamão (cultivar Sunset) resistente ao PRSV, cultivado nos EUA desde 1996; (iii) Ameixeira variedade C5 resistente ao PPV, cultivada nos EUA desde 1997; (iv) Batata resistente ao PLRV, cultivada nos EUA desde 2000, e resistente ao PVY, também cultivada nos EUA, desde 1999; (v) Feijão resistente ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV, *Begomovirus*), desenvolvido por pesquisadores da EMBRAPA, apresentando altos níveis de resistência, utilizando-se a região AC1 do genoma viral (BONFIM et al., 2007; ARAGÃO; FARIA 2009; FARIA; ARAGÃO 2013).

6.4 Mecanismos de ação da resistência transgênica a vírus

Diversas são as possibilidades no campo da transgenia. As plantas podem receber genes que têm a capacidade de proporcionar resistência a qualquer patógeno existente, principalmente devido à grande facilidade de transferência apresentada pelas técnicas de transformação vistas anteriormente. Essa resistência apresenta a capacidade de interferir em diferentes estágios do ciclo infeccioso dos vírus como, por exemplo, interagir com o movimento do vírus na planta. Nessa interação, o produto do gene de resistência pode interferir no movimento a curta distância (célula a célula) ou outros fatores, prejudicando o movimento sistêmico (pelos vasos do floema). Outros pontos de interferência seriam: (i) na decapsidação, primeiro passo da infecção viral, em que o vírus perde o capsídeo para permitir a expressão de seu genoma [em plantas modificadas para interferir nesse processo, promotores fortes, como o 35S do *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimovirus*) produzem grande quantidade da proteína do capsídeo, evitando a decapsidação do vírus ou imediatamente reencapsidando-o]; (ii) RNA antissenso – uma quantidade de RNA antissenso, complementar ao RNA viral, está presente

no meio celular, impedindo a tradução por meio da complementaridade RNA-RNA; (iii) na replicação, em que a capacidade de interferência com fatores celulares permitem a ação de enzimas virais responsáveis pela replicação (polimerases), levando ao bloqueio de mecanismos de regulação da replicação; (iv) ribozimas – enzimas (moléculas de RNA) com capacidade de clivar moléculas de RNA *in cis* (auto-clivagem) ou em *trans*; (v) RNAs satélites ou interferentes, que impedem a replicação do vírus; (vi) inibindo genes ligados diretamente à patogenicidade; (vii) silenciamento gênico pós-transcricional, que será discutido a seguir.

7 VÍRUS DE PLANTAS: ALVOS E INDUTORES DE SILENCIAMENTO GÊNICO

O silenciamento gênico é um fenômeno conservado, que regula a expressão gênica e o desenvolvimento em eucariontes por meio do reconhecimento específico de sequências de transcritos de RNA (BAULCOMBE 2000; 2004; PUMPLIN; VOINNET 2013). Esse mecanismo é importante na manutenção da integridade do genoma da planta contra infecções, principalmente de origem viral. Porém, os vírus, além de alvos, são também indutores de silenciamento, que podem estar associados à indução de sintomas nas plantas. Há três processos básicos de silenciamento: (i) silenciamento gênico pós-transcricional (*Post-transcriptional gene silencing*, PTGS), que ocorre no citoplasma das células, e é mediado por pequenos RNAs de interferência (*small interfering RNA*, siRNA) (LLAVE 2010); (ii) silenciamento mediado por micro RNA (miRNA), que são codificados pela própria planta (BARTEL 2004; KAMTHAN et al., 2015); e (iii) silenciamento gênico transcricional (*transcriptional gene silencing*, TGS), mediado por siRNA, associados à metilação do DNA genômico da planta (VAUCHERET; FAGARD 2001). Nesta oportunidade, serão discutidos somente os mecanismos associados a PTGS.

O **PTGS** é um sistema de defesa contra patógenos bastante sofisticado, que também é ativo na regulação da expressão de genes da própria planta. O fenômeno, também denominado **co-supressão**, foi primeiramente observado

em plantas de petúnia transformadas com o gene (chalcona sintase, *chs*) responsável pela coloração roxa das flores, cuja intenção era promover aumento dessa coloração por meio da superexpressão de *chs*. Plantas de petúnia transgênicas foram geradas contendo *chs* sob o controle do promotor constitutivo 35S (proveniente do CaMV). No entanto, o resultado obtido foi totalmente inesperado, com a inativação do gene, gerando predominantemente flores brancas e flores variegadas sem a presença de flores totalmente roxas (NAPOLI et al., 1990).

PTGS promove a degradação de ssRNA, incluindo mRNAs, e é ativado pela presença de dsRNA (derivados de ssRNA) que alcançam níveis elevados na célula, servindo de molde para as enzimas RNA polimerase dependentes de RNA (RdRp 1 a 6). Os dsRNAs são então clivados em fragmentos de 21 a 25 nucleotídeos (siRNA) e, por estarem sempre associados a sistemas exibindo PTGS, são considerados os marcadores desse processo. As enzimas que atuam sobre os dsRNAs são RNAses tipo III, denominadas *Dicer* (DCL1 a 4), sendo que os siRNAs gerados atuam como moldes para a degradação de mRNAs homólogos em um complexo de silenciamento ribonucleoproteico denominado RISC (*RNA induced silencing complex*), com a participação de proteínas argonautas (AGO) [para uma revisão ver Vaucheret (2008), Pumplin & Voinnet (2013), Carbonell & Carrington (2015)].

Os vírus de RNA, durante o processo de replicação, produzem intermediários de dsRNA. Essas moléculas são alvos dos mecanismos de PTGS, que geram pequenos RNAs derivados do genoma viral (*virus-derived small RNA*, vsRNA), disparados por um processo denominado *virus-induced gene silencing* (VIGS). Ao serem processados por RISC, os vsRNAs levam a uma degradação específica de alvos (homólogos) de mRNAs e geram um sinal que é disseminado célula a célula através dos plasmodesmas e também via floema, o que garante uma distribuição sistêmica do processo. Portanto, VIGS, baseada no conceito de PDR, tem sido utilizada como uma ferramenta de silenciamento de genes virais. Dessas estratégias a que tem gerado resultados mais eficientes de silenciamento tem sido o emprego de hpRNAs separados por um intron com sequências invertidas, formando, após a transcrição do transgene, uma estrutura de RNA em grampo (*hairpin*).

Essa tecnologia tem possibilitado a obtenção de plantas transgênicas com excelentes níveis de resistência contra vírus de RNA e DNA (BÉCLIN et al., 2002; GALVEZ et al., 2014; SMITH et al., 2000; VANDERSCHUREN et al., 2009).

O silenciamento, como um sistema de defesa das plantas, apresenta elevada especificidade e resposta massiva no combate à invasão de moléculas (RNAs) exógenas, que poderia, guardadas as devidas proporções, ser comparado ao sistema imunológico de animais. Entretanto, muitos vírus contra-atacam por meio da expressão de proteínas supressoras de silenciamento, inibindo os processos descritos acima e garantindo o sucesso da infecção. Diversos genes virais já foram caracterizados, apresentando essa capacidade, dentre eles HC-Pro dos *Potyvirus* e p22 dos *Crinivirus* (BURGYAN; HAVELDA 2011; WIECZOREK; OBREPALSKA-STEPLOWSKA 2015). Para contornar o contra-ataque dos vírus, uma das estratégias tem sido utilizar miRNAs artificiais (amiRNA) contra os supressores de silenciamento viral. Essa estratégia tem sido utilizada para a obtenção de plantas transgênicas resistentes a uma série de vírus de RNA e DNA [para uma revisão, ver Galvez et al. (2014); Kamthan et al. (2015)].

8 EDIÇÃO DE GENOMAS, ALTERNATIVAS “NÃO TRANSGÊNICAS” PARA O CONTROLE DE VÍRUS DE PLANTAS

Associadas (ou não) à transgenia, as tecnologias que envolvem RNA de interferência têm possibilitado um avanço considerável nas alternativas de obtenção de plantas com resistência a vírus. Além disso, o controle de vírus via plantas transgênicas, e a possibilidade de modular a expressão de genes, facilitou a obtenção e manutenção de caracteres agronômicos superiores em muitos patossistemas. Porém, pouquíssimas dessas plantas resistentes têm sido introduzidas no campo. Além disso, o trabalho dos geneticistas na busca por genes de resistência e sua incorporação para obter plantas resistentes, seja pelos métodos convencionais ou via transgenia, muitas vezes se perde por questões de durabilidade da resistência em campo. Mesmo com os avanços

tecnológicos no campo da transgenia, os vírus continuam a causar prejuízos importantes aos agricultores, tornando necessária a busca constante por novas alternativas de controle. E, com isso, novas tecnologias surgem a todo o momento e devem ser exploradas quanto à possibilidade de obtenção de uma resistência efetiva e durável.

Tecnologias envolvendo modificação/edição de genoma (GES – *genome editing systems*) têm chamado a atenção nos últimos anos [ver para uma revisão Romay & Bragard (2017)]. Baseada no conceito de genética reversa, a indução de alterações locais no genoma via mutagênese (TILLING, *targeting induced local lesions in genome*) surgiu como alternativa ao emprego de plantas transgênicas, com a geração e identificação de variações adicionais em genes existentes, em vez de se introduzir novos genes (ou transgenes) no genoma da planta (HENIKOFF et al., 2004). Com o objetivo de alterar genes recessivos em plantas, TILLING tem sido utilizado, principalmente, visando à resistência a *Potyvirus* (GAUFFIER et al., 2016).

Recentemente, porém, o sistema de “repetições palindrômicas curtas e regularmente espaçadas” associado à proteína Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR-Cas), uma nova tecnologia (não transgênica) de edição de genomas, tem causado uma verdadeira revolução na biologia, principalmente pela eficiência, facilidade e reprodutibilidade. Esse mecanismo de defesa, na natureza, opera em bactérias de modo coordenado e específico contra a invasão de DNA, normalmente associado a infecções por bacteriófagos. A transcrição de CRISPR tem como produto um pequeno RNA (sgRNA), que serve de guia da nuclease Cas-9 na formação de um complexo ribonucleoproteico de reconhecimento de sequências específicas de DNA, promovendo o corte baseado em complementariedade, gerando uma alteração no DNA-alvo [detalhes sobre CRISPR-Cas podem ser obtidos em Belhaj et al. (2015)].

CRISPR-Cas, apesar de ser uma tecnologia nova, já está sendo utilizada com sucesso na obtenção de plantas resistentes a espécies de *Geminiviridae* (*Begomovirus*, *Curtovirus* e *Mastrevirus*) e *Potyviridae* (*Ipomovirus* e *Potyvirus*) (HADIDI et al., 2016; ZAIDI et al., 2016). No caso dos geminivírus, que têm genoma constituído de DNA, o alvo pode ser

o próprio DNA viral. Ali et al. (2016), utilizando plantas de *N. benthamiana* expressando o sistema CRISPR-Cas, obtiveram resistência de amplo espectro a diferentes espécies de *Begomovirus*, incluindo infecções múltiplas, com consequente redução do título viral, redução ou total ausência dos sintomas da doença. No caso dos vírus de RNA, a utilização da tecnologia CRISPR-Cas pode ter como alvo algum gene da planta hospedeira que codifica um fator associado com resistência como, por exemplo, o fator de início da tradução em eucariontes eIF4E, com resultados promissores obtidos em plantas de *Arabidopsis thaliana* para TuMV (PYOTT et al., 2016), CVYV, PRSV-W e ZYMV (CHANDRASEKARAN et al., 2016). Esses resultados iniciais, obtidos com essa poderosa ferramenta biotecnológica, apontam para um futuro promissor, o que deverá muito em breve responder por avanços importantes do conhecimento, com novas alternativas de controle das doenças causadas por vírus de plantas.

REFERÊNCIAS

- ALCAIDE-LORIDAN, C.; JUPIN, I. Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiology*, v.160, p. 72-82, 2012.
- ALI, Z. et al. CRISPR/Cas9-Mediated Immunity to Geminiviruses: Differential Interference and Evasion. *Scientific Reports*, v. 6, p. 26912, 2016.
- ANBINDER, I. et al. Molecular dissection of *Tomato leafcurl virus* resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 119, p. 519-530, 2009.
- ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. First transgenic geminivirus resistant plant in the field. *Nature Biotechnology*, v. 27, p. 1086-1088, 2009.
- ARAMBURU, J.; MARTÍ, M. The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology*, v.

52, p. 407, 2003.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, p. 281-297, 2004.

BATISTA, M. F.; MARINHO, V. L. A. Vírus e viróides transmitidos por sementes. EMBRAPA. Brasília, 76p. 2002.

BAULCOMBE, D. C. RNA silencing in plants. *Nature*, v. 431, p. 356-363, 2004.

BAULCOMBE, D. C. Unwinding RNA silencing. *Science*, v. 290, p. 1108-1109, 2000.

BÉCLIN, C. et al. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Current Biology*, v. 12, p. 684-688, 2002.

BELHAJ, K. et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 32, p. 76-84, 2015.

BERGAMIN-FILHO, A.; AMORIM, L. Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico. São Paulo: Ceres. 299p. 1996.

BOCCARA, M. et al. The *Arabidopsis miR472-RDR6* silencing pathway modulates PAMP- and effector-triggered immunity through the post-transcriptional control of disease resistance genes. *PLoS Pathogens*, v. 10, p. e1003883, 2014.

BOISSOT, N.; SCHOENY, A.; VANLERBERGHE-MASUTTI, F. Vat, an amazing gene conferring resistance to aphids and viruses they carry: from molecular structure to field effects. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1420, 2016.

BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 2, p. 717-726, 2007.

BURGYÁN, J.; HAVELDA, Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends*

in Plant Science, v. 16, p. 265-272, 2011.

CALIL, I. P.; FONTES, E. P. B. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, v. 119, p. 711-723, 2017.

CARANTA, C.; DOGIMONT, C. Plant resistance to viruses: natural resistance associated with recessive genes. In: Mahy, B.W.J. & Van Regenmortel, M.H.V. (Eds.). *Encyclopedia of Virology*, 3th Edition, Amsterdam: Academic Press. p.177-186, 2008.

CARBONELL, A.; CARRINGTON, J. C. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 27, p. 111-117, 2015.

CHANDRASEKARAN, J. et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular Plant Pathology*, v. 17, p. 1140-1153, 2016.

CHENON M. et al. A viral deubiquitylating enzyme targets viral RNA-dependent RNA polymerase and affects viral infectivity. *EMBO Journal*, v. 31, p. 741-745, 2012.

CILLO, F.; PALUKAITIS, P. Transgenic Resistance. *Advances in Virus Research*, v. 90, p. 35-146, 2014.

COOPER, J. I.; JONES, A. T. Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*, v. 73, p. 127-128, 1983.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrates defense responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826-833, 2001.

DE RONDE, D.; BUTTERBACH, P.; KORMELINK, R. Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 307, 2014.

DE RONDE, D. et al. *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Molecular Plant Pathology*, v. 14, p. 405-415, 2013.

DIAZ-PENDON, J. A. et al. Advances in understanding recessive resistance

to plant viroses. *Molecular Plant Pathology*, v. 5, p. 223-233, 2004.

DING, S. W. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, p. 632-644, 2010.

DOGIMONT, C. et al. The *Vat* locus encodes for a CC-NBS-LRR protein that confers resistance to *Aphis gossypii* infestation and *A. gossypii*-mediated virus resistance. *The Plant Journal*, v. 80, p. 993-1004, 2014.

EIGEN, M. Viral quasispecies. *Scientific American*, v. 269, p. 42-49, 1993.

EIRAS, M.; GALLETI, S. R. Técnicas de diagnóstico de fitopatógenos. Instituto Biológico. São Paulo: Devir. 190 p., 2012.

ELENA, S. F.; et al. Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses. *EMBO reports*, v. 7, p. 168-173, 2006.

ELENA, S. F.; FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. Evolution and emergence of plant viruses. *Advances in Virus Research*, v. 88, p. 161-191, 2014.

FENG, X.; MYERS, J. R.; KARASEV, A. V. *Bean common mosaic virus* Isolate Exhibits a Novel Pathogenicity Profile in Common Bean, Overcoming the *bc-3* Resistance Allele Coding for the Mutated eIF4E Translation Initiation Factor. *Phytopathology*, v. 105, p. 1487-1495, 2015.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, v. 9, p. 275-296, 1971.

FORTERRE, P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Research*, v. 117, p. 5-16, 2006.

FRAILE, A.; GARCÍA-ARENAL, F. The coevolution of plants and viruses: resistance and pathogenicity. *Advances in Virus Research*, v. 76, p. 1-32, 2010.

FRASER, R. S. S. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 28, p. 179-200, 1990.

- FUCHS, M. Plant resistance to viruses: engineered resistance. In: Mahy BWJ & Van Regenmortel MHV (Eds.), Encyclopedia of Virology, 3th Edition, Amsterdam: Academic Press. p. 156-164, 2008.
- GAGO, S. et al. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. Science, v. 323, p. 1308, 2009.
- GALVEZ, L. C. et al. Engineered plant virus resistance. Plant Science, v. 228, p. 11-25, 2014.
- GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J. M. Variability and genetic structure of plant virus populations. Annual Review of Phytopathology, v. 39, p. 157-186, 2001.
- GAUFFIER, C. et al. A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by *eIF4E* gene redundancy. The Plant Journal, v. 85, p. 17-29, 2016.
- GEPTS, P. A comparison between crop domestication, classical breeding, and genetic engineering. Crop Science, v. 42, p. 1780-1790, 2002.
- GIBBS, A. Evolution and origins of tobamoviruses. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 354, p. 593-602, 1999.
- GILBERT, W. The RNA world. Nature, v. 319, p. 618, 1986.
- GILL, U. S.; LEE, S.; MYSORE, K. S. Host versus nonhost resistance: distinct wars with similar arsenals. Phytopathology, v. 105, p. 580-587, 2015.
- GOUVEIA, B. C. et al. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 2139, 2017.
- HADIDI, A. et al. Next generation sequencing and genome editing in plant virology. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1325, 2016.
- HALLWASS, M. et al. The *Tomato spotted wilt virus* cell-to-cell movement

protein (NSm) triggers a hypersensitive response in *Sw-5*-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional *Sw-5b* resistance gene copy. *Molecular Plant Pathology*, v. 15, p. 871-880, 2014.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. O.; VAN LOO, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases. *European Journal Plant of Pathology*, v. 107, p. 1-6, 2001.

HART, J. P.; GRIFFITHS, P. D. A series of *eIF4E* alleles at the *Bc-3* locus are associated with recessive resistance to *Clover yellow vein virus* in common bean. *Theoretical Applied Biology*, v. 126, p. 2849-2863, 2013.

HEATH, M. C. Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 9, p. 389-397, 1987.

HEATH, M. C. The role of gene-for-gene interactions in the determinations of host species specificity. *Phytopathology*, v. 81, p. 127-130, 1991.

HENIKOFF, S.; TILL, B. J.; COMAI, L. Tilling. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiology*, v. 135, p. 630-636, 2004.

HULL, R. *Comparative Plant Virology* 2nd Ed., Elsevier Academic Press, San Diego, CA. 2009.

HULL, R. *Matthews' Plant Virology*. 4th Ed., Academic Press, San Diego, CA. 2002.

HULL, R. *Plant Virology*. 5th Ed., Academic Press, San Diego, CA. 2014.

HUTTON, S. F.; SCOTT, J. W.; SCHUSTER, D. J. Recessive resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* from the tomato cultivar Tyking is located in the same region as *Ty-5* on chromosome 4. *HortScience*, v. 47, p. 324-327, 2012.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323-329, 2006.

- KAMTHAN A. et al. Small RNAs in plants: development and application for Crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 208, 2015.
- KING, A. M. Q. et al. *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier: Amsterdam. p. 1327. 2012.
- KOONIN, E. V. On the origin of cells and viruses: primordial virus world scenario. *Annals of New York Academy of Science*, v. 1178, p. 47-64, 2009.
- KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M. Origin and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. *Virology*, v. 479-480, p. 2-25, 2015.
- KORNER, C. J. et al. The immunity regulator *BAK1* contributes to resistance against diverse RNA viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 26, p. 1271-1280, 2013.
- LAU, D. et al. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *Sw-5* de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 31, p. 247-253, 2006.
- LELLIS, A. D. et al. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso) 4E during potyvirus infection. *Current Biological*, v. 12, p. 1046-1051, 2002.
- LIEDBRAND, T. W. H.; VAN DER BURG, H. A.; JOOSTEN, M. H. A. J. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends in Plant Science*, v. 19, p. 123-132, 2014.
- LLAVE, C. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science*, v. 15, p.701-707, 2010.
- LOMONOSSOFF, G. P. Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 33, p. 323-343, 1995.
- MACHO, A. P.; ZIEPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, v. 54, p. 263-272, 2014.

MAHY, B. W. J.; VAN REGENMORTEL, M. H. V. Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology. Cambridge, MA: Academic Press. 2009.

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. G. Plant immune response against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell*, v. 25, p. 1489-1505, 2013.

MARGULIS, L. Symbiosis in cell evolution. 2nd ed. New York: W.H. Freeman, p. 452. 1993.

MEDEIROS, R. B. et al. Expression of a viral polymerase-bound host factor turns human cell lines permissive to a plant- and insect-infecting virus. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America*, v. 102, p. 1175-1180, 2005.

MORENO, P, et al. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 251-268, 2008.

MORENO-PERÉZ, M. G. et al. Mutations that determine resistance breaking in a plant RNA virus have pleiotropic effects on its fitness that depend on the host environment and on the type, single or mixed, of infection. *Journal of Virology*, v. 90, p. 9128-9137, 2016.

NADERPOUR, M. et al. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 255-263, 2010.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, v. 2, p. 279-289, 1990.

NICAISE, V. Lost in translation: an antiviral plant defense mechanism revealed. *Cell Host Microbe*, v. 17, p. 417-419, 2015.

PEIRÓ, A. et al. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato *Sw-5* gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology*, v. 15, p. 802-813, 2014.

- PEREIRA-CARVALHO, R. C.; COSTA, C. L. Controle de viroses de plantas. In: Medeiros RB, Resende RO, Pereira-Carvalho RC, Dianese EC, Costa LC, Sgro J-Y (Eds.) *Virologia Vegetal: Conceitos, fundamentos, classificação e controle*. Brasília: Editora UnB, 2015. cap. 16. P. 593-650.
- PIETERSE, C. M. J. et al. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 10, p. 1571-1580, 1998.
- PINK, D. A. C.; KOSTOVA, D.; WALKEY, D. G. A. Differentiation of pathotypes of *Lettuce mosaic virus*. *Plant Pathology*, v. 41, p. 5-12, 1992.
- POWELL-ABEL, P. et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, v. 232, p. 738-743, 1986.
- PRINS, M. et al. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 9, p. 73-83, 2008.
- PUMPLIN, N.; VOINNET, O. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, p. 745-760, 2013.
- PYOTT, D. E.; SHEEHAN, E.; MOLNAR, A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants. *Molecular Plant Pathology*, v. 17, p. 1276-1288, 2016.
- REVERS, F.; NICAISE, V. Plant resistance to infection by viruses. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. p. 1-10. 2014.
- ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science*, v. 11, p. 40-45, 2006.
- ROMAY, G.; BRAGARD, C. Antiviral defenses in plants through genome editing. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p.47, 2017.
- ROOSSINCK, M. J. Plant virus evolution. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2008.

- ROOSSINCK, M. J. Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, v. 35, p. 191-209, 1997.
- ROOSSINCK, M. J.; MARTIN, D. P.; ROUMAGNAC, P. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology*, v. 105, p. 716-727, 2015.
- ROSS, A. F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, v. 14, p. 340-358, 1961.
- SANFAÇON, H. Plant translation factors and virus resistance. *Viruses*, v. 7, p. 3392-3419, 2015.
- SANFORD, J. C.; JOHNSTON, A. S. The concept of parasite-derived resistance – Deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, v. 113, p. 395-405, 1985.
- SCHOLTHOF, K. B. G. et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v. 12, p. 938-954, 2011.
- SEQUEIRA, L. Cross protection and inducer resistance: their potential for plant disease control. *Trends in Biotechnology*, v. 2, p. 25-29, 1984.
- SMITH, N. A. et al. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, v. 407, p. 319-320, 2000.
- SPASSOVA, M. I. et al. The tomato gene *SW5* is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*, v. 7, p. 151-161, 2001.
- TEPFER, M. Risk and assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 467-491, 2002.
- TRUNIGER, V.; ARANDA, M. A. Recessive resistance to plant viruses. *Advances in Virus Research*, v. 75, p. 119-159, 2009.
- TURINA, M.; KORMELINK, R.; RESENDE, R. O. Resistance to tospovirus

in vegetable crops: epidemiological and molecular aspects. *Annual Review of Phytopathology*, v. 54, p. 347-371, 2016.

UMA, B.; RANI, T. S.; PODILE, A. R. Warriors at the gate never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of Plant Physiology*, v. 168, p. 2141-2152, 2011.

VANDERSCHUREN, H. et al. Dose-dependent RNAi-mediated geminivirus resistance in the tropical root crop cassava. *Plant Molecular Biology*, v. 70, p. 265-72, 2009.

Van LOON, L. C.; Van STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55, p. 85-97, 1999.

Van LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, p. 453-483, 1998.

VAUCHERET, H.; FAGAR, M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, v. 17, p. 29-35, 2001.

VAUCHERET, H. Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, v. 13, p. 350-358, 2008.

VIEIRA, C. Melhoramento de plantas visando resistência às doenças. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 43 p. 1972.

WALSH, J. A.; JENNER, C. E. *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology*, v. 3, p. 289-300, 2002.

WARD, E. R. et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, v. 3, p. 1085-1094, 1991.

WHETZEL, H. H. The terminology of plant pathology. *Proceedings of the International Congress of Plant Science*, v. 2, p. 1204-1215, 1929.

WHETZEL, H. H. et al. *Laboratory Outlines in Plant Pathology*. Philadelphia:

W.B. Saunders. 231 p. 1925.

WIECZOREK, P.; OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Suppress to survive – implication of plant viruses in PTGS. *Plant Molecular Biology Report*, v. 33, p.335-346, 2015.

XIE, Z.; CHEN, Z. Hairpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant-Microbe interactions*, v. 13, p. 183-190, 2000.

ZAIDI, S. S. A. et al. Engineering Plant Immunity: Using CRISPR/Cas9 to Generate Virus Resistance. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1673, 2016.

ZORZATTO, C. et al. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature*, v. 520, p. 679-682, 2015.

João L. Nunes Maciel¹
Anderson L. Durante Danelli²

¹EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS, Brasil.

²UNIGUAÇU, Faculdades Integradas do Vale do Iguaçu, União da Vitória, PR, Brasil.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças bióticas em plantas de lavouras pode reduzir drasticamente a qualidade e a quantidade dos alimentos produzidos (GURURANI et al., 2012). O emprego da resistência genética é considerado o método preferencial para controlar tais doenças por ser uma estratégia de maior durabilidade e não onerar os custos de produção, entretanto em muitas culturas agrícolas não há disponibilidade de cultivares com bom nível de resistência a determinadas doenças. Nesse sentido, existe consenso de que a chance de sucesso na obtenção de cultivares com resistência a doenças bióticas será tanto maior quanto maior for o conhecimento dos aspectos relativos à interação patógeno-hospedeiro do patossistema envolvido (VALENT 1990; LIU et al., 2007; SINGH et al., 2015; THOMÉ et al., 1999). A melhor compreensão de aspectos relacionados a essa interação pode ajudar no processo de geração de cultivares, permitindo identificar quais são as melhores opções em relação ao tipo de resistência com maior potencial de efetividade, às fontes ou genes de resistência viáveis e/ou disponíveis, e à estratégia de melhoramento a ser adotada (RIBEIRO DO VALE et al., 2001; BENT; MACKAY 2007).

Na natureza, as plantas e os fungos passam por mudanças genéticas que ocorrem nos dois organismos de forma isolada ou concomitantes, gerando o evento de adaptação biológica conhecido universalmente como evolução

(McDONALD et al., 1996). Em especial, os fungos têm a capacidade de exercer uma elevada influência no processo evolutivo de seus hospedeiros (PYROZINSKI; HAWKSWORTH 1988). As plantas, por sua vez, especializaram seus genes, que identificam os sinais do ataque de patógenos e estimulam as reações em cascata dos compostos bioquímicos responsáveis por retardar a infecção, aperfeiçoando o sistema de defesa (GURURANI et al., 2012).

Durante a interação entre um patógeno e um hospedeiro, as plantas podem apresentar vários mecanismos de defesa. Algumas possuem características estruturais ou químicas que dificultam o estabelecimento dos patógenos, como a pilosidade, a cerosidade, a cutícula e a espessura da parede celular das células da epiderme, constituindo os mecanismos de defesa pré-formados, passivos ou constitutivos (MOERSCHBACHER; MENDGEN 2000). Existem, também, os mecanismos de defesa pós-formados, ativos ou induzíveis, cuja indução ocorre por meio de um sistema de reconhecimento de patógenos, através de padrões moleculares localizados na membrana celular ou no interior da célula (BENT; MACKAY 2007). A defesa da planta é governada pelos chamados genes de resistência (*R*), os quais são responsáveis por ativar a defesa dos hospedeiros, para evitar ou retardar a invasão dos fitopatógenos (HAMMOND-KOSACK; KANYUKA 2007; HOGENHOUT et al., 2009).

Este capítulo procura descrever o atual nível de conhecimento sobre a resistência genética de plantas a fungos, abordando temas como: tipos de resistência; bases genéticas que governam a resistência; genes *R* conhecidos e que são utilizados em programas de melhoramento das principais culturas agrícolas desenvolvidas no mundo, com especial enfoque para a brusone do arroz e do trigo; e a estrutura e o funcionamento dos genes *R*.

1 TIPOS DE RESISTÊNCIA

A resistência é a capacidade de uma planta (hospedeiro) evitar ou retardar a entrada ou desenvolvimento de um patógeno em seus tecidos com ações morfológicas ou bioquímicas (PARLEVLIET, 1997; AGRIOS 2005),

podendo ser caracterizada pelo número de genes que governam as reações de defesa das plantas ao ataque de patógenos. Um (monogênica), poucos (oligogênica) ou vários genes (poligênica) podem ser responsáveis por evitar o estabelecimento de relações entre hospedeiros e patógenos. Conforme as suas características, a resistência das plantas às doenças fúngicas podem ser classificadas de forma diferente.

1.1 RESISTÊNCIA VERTICAL OU QUALITATIVA

Na resistência vertical (RV), todas as ações de resistência podem ser conferidas por um único gene (monogênica), ou poucos genes (oligogênica) de efeito maior. Nesse tipo de resistência não é possível quantificar graus intermediários de resistência, ocorrendo somente reações de resistência ou de suscetibilidade (TRIGIANO et al., 2010). As plantas podem não apresentar sintomas ou pequenas lesões necróticas denominadas de lesões de hipersensibilidade (morte de células localizadas próximas à região de penetração do patógeno) (DE WIT 1997) ou, ainda, sintomas que caracterizam o hospedeiro como suscetível. Por não apresentar níveis de resistência intermediária é chamada de resistência qualitativa (CAMARGO 2011; TRIGIANO et al., 2010).

Um exemplo de RV encontra-se na Figura 1. O genótipo de trigo BRS Buriti, quando inoculado com diferentes patotipos de *Pyricularia oryzae* Triticum (patotipo Triticum), apresenta resistência às raças 2, 3 e 4, mas é suscetível às raças 1 e 5 (Figura 1), ocorrendo uma interação entre o genótipo e algumas raças do patógeno, demonstrando o que se denomina de resistência raça-específica (VAN DER PLANK 1963). Devido a sua efetividade ser somente para algumas raças de patógenos, sua principal contribuição é na redução e/ou atraso do início da epidemia, atuando diretamente na diminuição do inóculo inicial (MATIELLO et al., 1997).

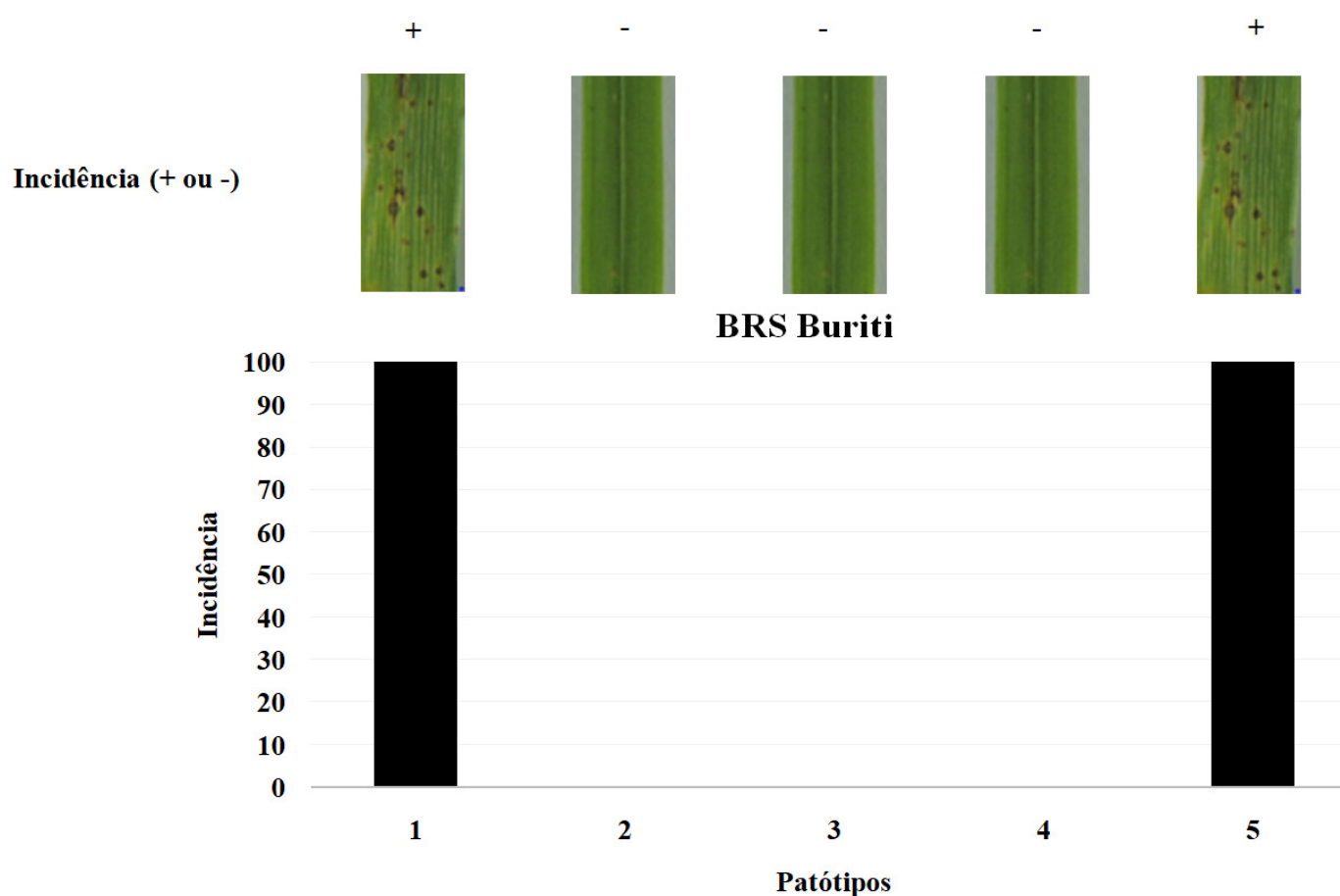


Figura 1- Nível de resistência do genótipo de trigo BRS Buriti a diferentes isolados de *Pyricularia oryzae* Triticum. (Fonte: DANELLI 2015)

A RV ou resistência qualitativa é estruturada na teoria *gene-a-gene*, a qual foi desenvolvida por meio de vários trabalhos com a ferrugem do linho, causada pelo fungo *Melampsora lini* (FLOR 1955). Tais estudos relataram a existência de uma interação entre a resistência das plantas de linho e a virulência do patógeno, sendo evidenciado que, para cada gene responsável por uma reação de resistência no hospedeiro, existe um gene complementar no patógeno, que é responsável por uma reação de avirulência (MATIELLO et al., 1997; ABAD et al., 2003; RIBEIRO DO VALE et al., 2001).

No trabalho desenvolvido por Flor foi observado que a diversidade de resposta entre os genótipos resistentes e suscetíveis de linho a determinada raça era condicionada à presença de um gene dominante (gene *R*). Além disso, relacionado ao patógeno, foi descrita a presença de outro gene dominante, nesse caso um avirulento (*Avr*), responsável pelas diferenças entre as raças virulentas e avirulentas (Figura 2).

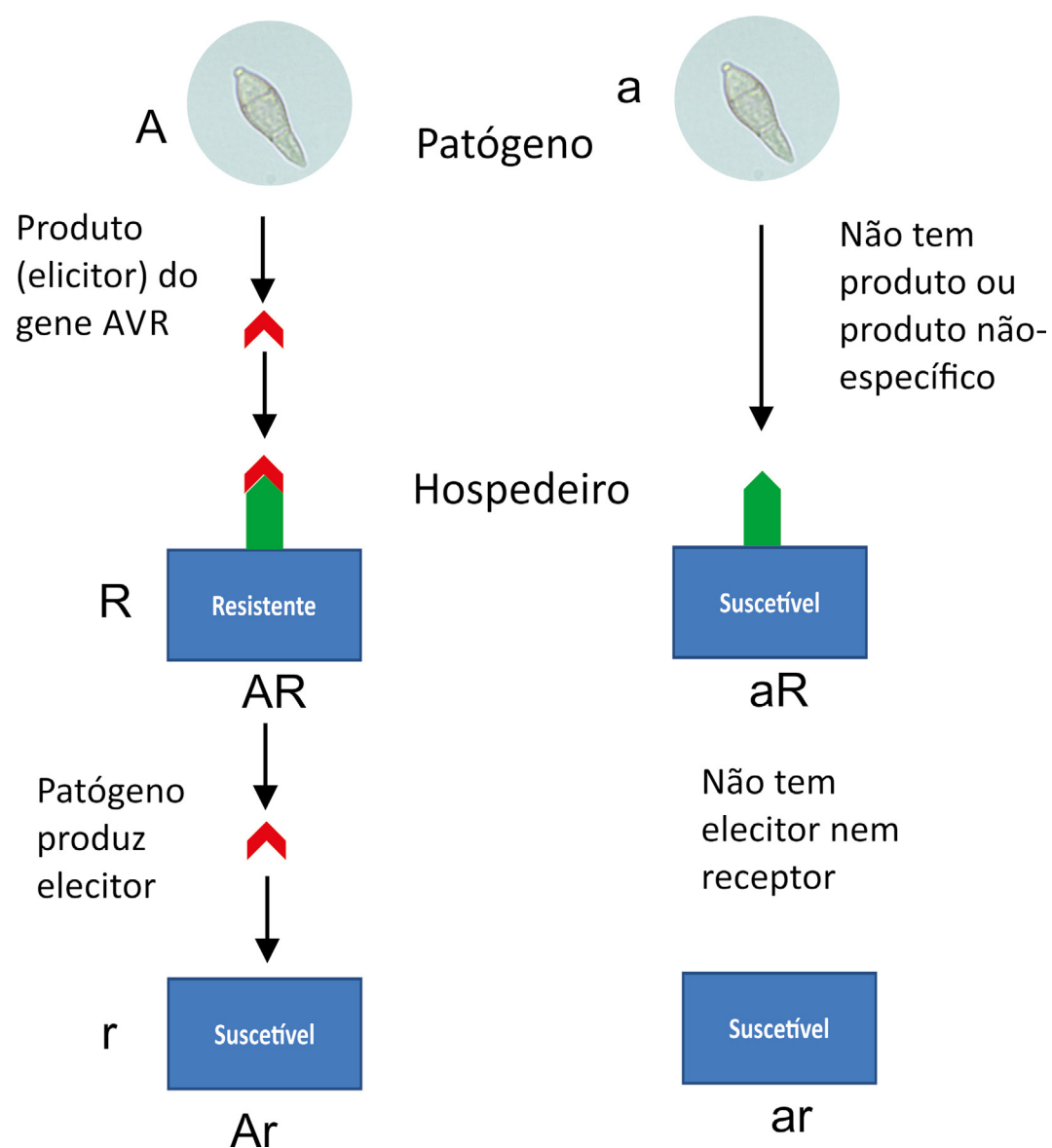


Figura 2 - Teoria *gene-a-gene* para o patossistema *Oryza sativa*-*Pyricularia oryzae* *Oryza*.
Fonte: Adaptado de Araujo (2008).

A resistência em plantas de linho expostas ao patógeno ocorria unicamente se o produto específico do gene *R* adequava-se com o produto do gene *Avr*, compatível no patógeno (LANNA FILHO; RESENDE 2009; RIBEIRO DO VALE et al., 2001).

O gene *R* da planta hospedeira é um receptor específico, responsável por reconhecer o sinal emitido pela proteína do gene *Avr* (patógeno), ou seja, a molécula elicitora (moléculas com a capacidade de instigar o sistema de defesa das plantas ao ataque de patógenos) (SMITH 1996). Havendo o reconhecimento da molécula elicitora, ocorre a expressão de genes responsáveis pela reação de hipersensibilidade. Entretanto, se o gene *Avr* estiver ausente, a reação é de suscetibilidade. Sem a presença de um gene *R* no hospedeiro e um *Avr* no patógeno, sempre vai ocorrer reação suscetível

(Figura 2) (BENT; MACKEY 2007).

A RV é caracterizada como pouco durável, sendo que esse é o principal entrave para seu uso, pois os patógenos apresentam uma grande habilidade, devido sua ampla variabilidade genética, em burlar o reconhecimento pelos genes *R* (MATIELLO et al., 1997; RIBEIRO DO VALE et al., 2001). Segundo McDonald et al. (1996), com a inserção de cultivares com apenas um gene de resistência qualitativa, em meio a uma população patogênica, é habitual ocorrer uma redução na frequência do gene *Avr* correspondente, e com isso acaba por ocorrer a perda da efetividade do gene *R*.

1.2 Resistência horizontal ou quantitativa

Na resistência horizontal (RH), o sistema de defesa da planta é governado por vários genes (poligênica) de efeito menor. Nesse tipo de resistência, ocorre um grau intermediário de resistência, ou seja, é possível quantificar o nível de resistência, podendo existir reações de máxima suscetibilidade até máxima resistência (Figura 3). Devido a essa possibilidade de mensurar o nível de resistência é caracterizada como resistência quantitativa (VAN DER PLANK 1975; CAMARGO 2011; RIBEIRO DO VALE et al., 2001).

Como é possível observar na Figura 3, o genótipo BRS 229 apresentou diferentes níveis de resistência a raças de *P. oryzae* Triticum. Para as raças 2, 3 e 4, o nível de resistência foi maior, chegando a 100% para a raça 3; entretanto, para as raças 1 e 5, o nível de resistência foi menor. Devido a essas características, a resistência é raça não específica, pois é efetiva para um amplo espectro de raças patogênicas e, normalmente, é durável, pois são vários genes atuando em conjunto, o que é mais difícil de ser superado (RIBEIRO DO VALE et al., 2001). A contribuição epidemiológica da RH é na redução do progresso da doença, ou seja, o aumento da doença é mais lento quando comparado com uma cultivar suscetível ou com menor resistência.

A RH, quando comparada à RV, apresenta um maior número de genes envolvido nas reações de defesa da planta, o que reduz as chances do patógeno em superar esse tipo de resistência. Estas condições conferem à RH maior estabilidade e durabilidade (PARLEVLIET; ZADOKS 1977).

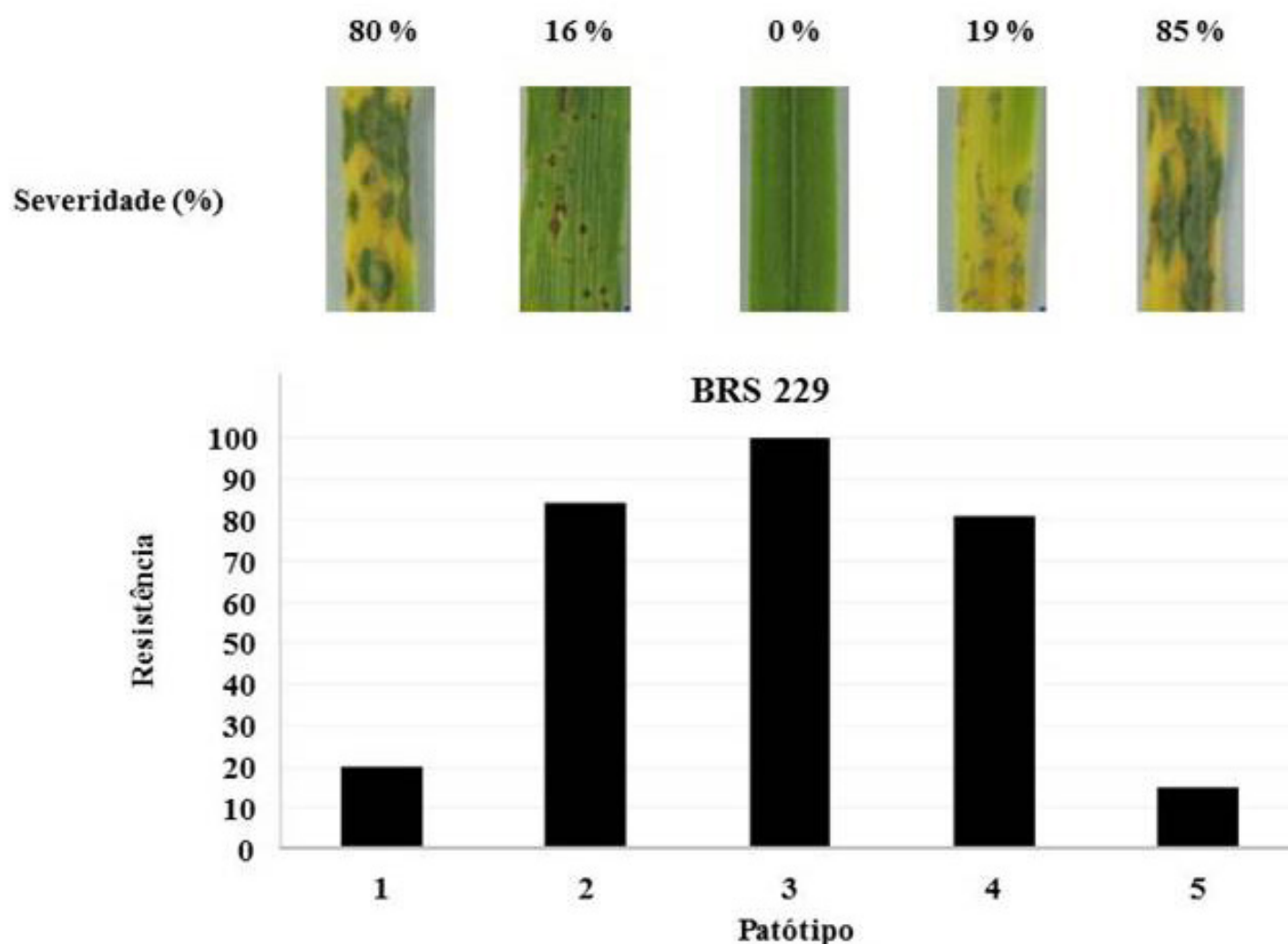


Figura 3 - Nível de resistência do genótipo BRS 229 a diferentes isolados de *Pyricularia oryzae* Triticum. (Fonte: DANELLI 2015)

1.3 Resistência não hospedeira

As plantas se defendem contra potenciais agentes fitopatogênicos, sendo consideradas, portanto, como imunes ao ataque dos mesmos. A resistência de todos os genótipos de uma determinada espécie vegetal contra todos os indivíduos da espécie do microrganismo é conhecida como resistência não hospedeira (RNH), sendo uma resistência mais durável (HEATH 2000; MYSORE; RYU 2004; NIKS; MARCEL 2009; SENTHIL-KUMAR; MYSORE 2013). RNH se refere à condição, por exemplo, das plantas de macieiras que não são afetadas por patógenos do tomateiro, do trigo ou de citrus (AGRIOS 2005). Similarmente, o fungo que causa oídio em trigo (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) não afetará a cevada, sendo que o contrário também é válido, o agente causal do oídio na cevada (*B. graminis*

f.sp. *hordei*) não se desenvolverá no trigo.

Apesar de sua extrema importância para as populações de plantas naturais, bem como suas possibilidades de uso na agricultura moderna, a RNH está apenas começando a ser melhor compreendida e permanece pouco explorada como estratégia de controle de doenças bióticas de culturas agrícolas (ELLIS 2006; SCHWEIZER 2007).

Apesar das dificuldades enfrentadas, alguns avanços importantes já foram relatados em relação ao conhecimento sobre a RNH, o que pode auxiliar no incremento da adoção dessa característica biológica para obtenção de cultivares resistentes a doenças. Nesse sentido, destacam-se resultados obtidos a partir do estudo com mutantes de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) que levou à identificação de vários genes que contribuem para a RNH contra o fungo do oídio da cevada *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (COLLINS et al., 2003; LIPKA et al., 2005; STEIN et al., 2006). Esses resultados levaram à hipótese de uma resistência denominada de “multicamada” não hospedeira em plantas, com duas linhas de defesa: a primeira seria a parede celular; e a segunda a rápida morte da célula invadida. O ataque de fungos não patogênicos a *Arabidopsis* é, normalmente, interrompido no estágio pré-invasivo de penetração. Essa resistência à penetração está associada à formação de peróxido de hidrogênio e papilas (material rico em calose) na parede celular. Caso haja o rompimento desta primeira camada de defesa, o crescimento do fungo é interrompido por uma reação hipersensível nas células atacadas e alta produção de peróxido de hidrogênio, causando a morte celular destas células do hospedeiro (SCHWEIZER 2007).

1.4 Resistência durável

De acordo com Johnson (1979), resistência durável de plantas contra doenças é a resistência que permanece eficaz por um período prolongado em uma cultivar de uso generalizado. Entretanto, esse conceito não é completamente exato devido à ausência de meios que permitam medir ou prever a durabilidade da resistência apresentada por uma determinada cultivar (LEACH et al., 2001). De fato, as afirmativas “permanece eficaz”, “período prolongado” e “uso generalizado” estão sujeitas a uma série

de interpretações (LO IACANO et al., 2013). Conforme mencionado por Leach et al. (2001), embora muitos genes *R* de plantas a doenças bióticas tenham sido identificados e, até, clonados, estabelecer exatamente quais são os fatores que tornam uma resistência efetiva e duradoura ainda é uma tarefa desafiadora. Uma exceção a esta condição pode ser atribuída ao paradigma poligênico versus monogênico, segundo o qual existe a pressuposição de que a resistência poligênica, devido à ação aditiva de muitos genes (conhecida como resistência poligênica, quantitativa e horizontal; YOUNG 1996; StCLAIR 2010), seja mais durável do que a resistência devido à ação de um único gene (conhecida como sendo monogênica, qualitativa, resistência vertical; VAN DER PLANK 1982; BOYD 2005; EVERSMEYER; KRAMER 2000). Esta condição influencia a escolha dos métodos adotados em programas de melhoramento de plantas para a obtenção de cultivares resistentes a doenças, destacando-se a opção, quase que absoluta, por procedimentos destinados a obter resistência quantitativa a doenças causadas por fungos biotróficos e hemibiotróficos, como as ferrugens em cereais e requeima da batata, respectivamente (LANDEO 2002). Ainda é importante considerar que, mesmo que exista consenso a respeito das características diferenciadoras da resistência poligênica e monogênica, vários autores já demonstraram que a erosão da resistência poligênica pode proporcionar uma condição de pouca duração à mesma (JOHNSON 1984; ROUSE et al., 1980; LO IACONO et al., 2012) e, por outro lado, que a ação de um único gene pode conferir uma resistência bastante duradoura às plantas que possuem o referido gene (JOHNSON 1984; STUTHMAN et al., 2007).

Estratégias de manejo das fontes de resistência podem aumentar a durabilidade da resistência (DJIAN-CAPORALINO et al., 2014). As características do gene ou genes *R* e o *background* genético da planta em que o referido gene é introgridido são determinantes para a longevidade da resistência no ambiente agrícola (BRUN et al., 2010; PALLOIX et al., 2009). Como alternativa à implantação de um único gene, combinações de vários alelos em uma cultivar, estratégia conhecida por piramidação de genes, podem fazer com que o patógeno tenha que aumentar o número de mutações requeridas para exercer a sua capacidade de virulência, o que também pode

dificultar a seleção de raças adaptadas do patógeno capazes de suplantar a resistência (NELSON 1972; GALLUN; KHUSH 1980; LIU et al., 2000). Nesses casos, a durabilidade da resistência depende do tempo necessário para que novas mutações ou recombinações possam gerar a combinação correspondente de fatores de virulência na população de patógenos e para que esse patotipo se estabeleça na população. A piramidação de genes tem sido aplicada com relativo sucesso na combinação de múltiplos genes para a resistência qualitativa a doenças: o crestamento bacteriano (HUANG et al., 2004) e a brusone (HITTALMANI et al., 2000) em arroz, e ao oídio em trigo (LIU et al., 2000). A utilização sequencial (ou alternada) de genes *R* distintos em rotação (se for demonstrada uma especificidade de virulência) e a mistura de linhagens que possuem um ou mais genes *R* também podem diminuir a emergência de populações virulentas devido à diminuição da pressão de seleção para mutações em genes de avirulência (WOLFE; BARRET 1980; MUNDT et al., 2002; ZHU et al., 2000). Nessas condições, evita-se a potencial suplantação da resistência quando um único gene de resistência é implantado em uma grande área. No entanto, as três alternativas descritas acima para aumentar a durabilidade dos genes *R* têm sido pouco utilizadas devido às dificuldades que são inerentes a tais estratégias (DJIAN-CAPORALINO et al., 2014). Entre tais dificuldades, destaca-se o longo período para introgressão de genes *R* específicos em cultivares elite, exigindo um grande número cruzamentos genéticos entre plantas, além da dificuldade de se conduzir experimentos de campo comprobatórios da base teórica que sustenta as estratégias da piramidação e rotação de genes, e mistura de linhagens.

2 GENES DE RESISTÊNCIA A DOENÇAS FÚNGICAS

A seleção de genes de interesse por meio de técnicas genômicas e de bioinformática tem possibilitado a caracterização das diversas funções gênicas que podem afetar na virulência, na formação de conídios e no crescimento vegetativo dos patógenos (XUE et al., 2012; GURURANI et al., 2012). Na cultura do arroz, por exemplo, há o conhecimento de genes

R para brusone, causada por *P. oryzae* Oryza (patotipo Oryza), os quais são usados em programas de melhoramento para desenvolvimento de cultivares resistentes (XUE et al., 2012). Nessa cultura, o patógeno é extremamente agressivo, sendo essencial para esse patossistema a utilização de cultivares resistentes, mesmo que o fungo apresente uma grande variabilidade genética e a durabilidade dessa resistência normalmente seja breve (OU; AYAD 1968; HAN et al., 2001; CRUZ et al., 2010).

São conhecidos aproximadamente 100 genes *R* à brusone do arroz e, aproximadamente, 350 *Quantitative Trait Loci* (QTL), os quais têm sido são usados em programas de melhoramento (SINGH et al., 2015; BALLINI et al., 2008; SHARMA et al., 2012; LIU et al., 2010). Os genes *Pi-k*, *Pi-ks*, *Pi-kp*, *Pi-kh*, *Pi-km*, *Pi-ta*, *Pi-ta2*, *Pi-z* e *Pi-zt*, *Pi-i*, *Pi-a* *Pi-b*, *Pi-m* e *Pi-t* foram encontrados no Japão conferindo RV à doença, estando localizados em oito *loci* (McCOUCH et al., 1994).

Na cultura da soja, a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma ameaça à produção mundial (KENDRICK et al., 2011). Nesse patossistema são conhecidos alguns genes *R* dominantes e independentes como: *Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3* e *Rpp4* (BROMFIELD; HARTWIG 1980; McLEAN; BITH 1980; HARTWIG 1986; HARTMAN et al., 2005), além desses se conhece o gene *rpp5* que é um gene recessivo (GARCIA et al., 2008; KENDRICK et al., 2011) e, em 2012, foi relatado o gene *Rpp6*, o qual confere resistência total à ferrugem da soja (LI et al., 2012). As podridões radiculares e da haste da soja também apresentam importância econômica e são de difícil controle, em especial às causadas pelo oomiceto *Phytophthora sojae*. Os genes *RpsUN1* e *RpsUN2* foram localizados em regiões do genoma da cultivar Williams 82 conferindo resistência a *P. sojae* (*Rps*), sendo que os locais onde foram encontrados esses dois genes são ricos em genes NBS-LRR (LIN et al., 2013).

Para a ferrugem da folha do trigo, causada pelo fungo *Puccinia triticina*, aproximadamente 60 genes *R* foram relatados, entre os quais se destacam os seguintes: *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr13*, *Lr14b*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr46* e *Lr47* (DEMICHELIS et al., 2008; GERMÁN 2009; IMBABY et al., 2014). O gene *Lr34*, além de conferir

resistência à ferrugem da folha (KRATTINGER et al., 2009), também proporciona resistência à ferrugem linear (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), oídio e ferrugem do colmo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) (DYCK 1987; SINGH 1992; SPIELMEYER et al., 2005).

Em milho, para a ferrugem comum da folha, causada por *Puccinia sorghi*, é conhecido o *locus Rpl* NB-LRR, o qual confere resistência raça-específica à doença (CHAVAN et al., 2015). Em feijão, os genes *Ur-1*, *Ur-2*, *Ur-22*, *Ur-3*, *Ur-3+*, *Ur-4*, *Ur-5*, *Ur-6*, *Ur-6+*, *Ur-7*, *Ur-8*, *Ur-9*, *Ur-10*, *Ur-11*, *Ur-12*, *Ur-13* e *Ur-14* conferem resistência à ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* (SOUZA et al., 2011).

Na Tabela 1 estão listados alguns genes *R* identificados e usados em programas de melhoramento de plantas com vistas à resistência a doenças fúngicas.

O mapeamento e a clonagem de genes *R* facilita o desenvolvimento de cultivares com resistência em diversos patossistemas. A incorporação de genes *R* em programas de melhoramento visa ao desenvolvimento de genótipos com resistência durável às doenças, entretanto a durabilidade dessa resistência é variável, dependendo muitas vezes da variabilidade do patógeno.

Tabela 1 - Genes de resistência a doenças fúngicas e utilizados em programas de melhoramento.

Gene	Cultura	Patógeno	Referência
<i>Rmd</i>	Soja	<i>Erysiphe diffusa</i> (Oídio)	Buzzell & Haas (1978)
<i>CcRpp1</i>	Soja	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> (Ferrugem)	Kawashima et al. (2016)
<i>Qcr1</i> e <i>Qcr4</i>	Beterraba	<i>Cercospora beticola</i> (Cercosporiose)	Taguchi et al. (2011)
<i>Co-1 (A)</i>	Feijão	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Antracnose)	McRostie (1919)
<i>Fop-1</i>	Feijão	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i> (Murcha de Fusarium)	Ribeiro & Hagedorn (1979)
<i>Hm1</i>	Milho	<i>Bipolaris maydis</i> (Helmintosporiose)	Johal & Briggs (1992)

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Gene	Cultura	Patógeno	Referência
<i>Cf-2</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i> (Cladosporiose)	Dixon et al. (1996)
<i>RPI-BLB2</i>	Batata	<i>Phytophthora infestans</i> (Requeima)	Van der Vossen et al. (2005)
<i>RPG1</i>	Cevada	<i>Puccinia graminis</i> (Ferrugem do colmo)	Brueggeman et al. (2002)
<i>Yr1</i>	Trigo	<i>Puccinia striiformis</i> (Ferrugem linear)	Lupton & Macer (1962)
<i>AtNPR1</i>	Trigo	<i>Fusarium graminearum</i> (Giberela)	Makandar et al. (2006)
<i>Stb</i>	Trigo	<i>Septoria tritici</i> (Mancha salpicada)	Rosielle & Brown (1979)
<i>TaWRKY45</i>	Trigo	<i>Fusarium graminearum</i> (Giberela)	Bahrini et al. (2011)

3 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Na natureza, as plantas estão sob constante exposição às condições adversas, tais como o ataque de fitopatógenos que podem influenciar negativamente o desenvolvimento natural das culturas (DANGL; JONES 2001; SHANG et al., 2009). A sobrevivência só é possível devido ao sistema de defesa apresentado pelas plantas que se caracteriza por ser extremamente complexo e dinâmico, que atua impedindo ou suprimindo o ataque do patógeno. Na maioria dos casos, a maquinaria de defesa das plantas envolve sinais e estímulos governados por genes *R* (BENT; MACKAY 2007).

Os genes *R* são encontrados em *clusters* distribuídos no genoma de várias espécies de plantas e governam a defesa contra o ataque de patógenos como vírus, bactérias, nematoides e fungos (YANG et al., 2006; KANAZIN et al., 1996; SUDAPAK et al., 1993). Possuem elevado padrão polimórfico, com capacidade de identificar o produto dos genes de avirulência (*Avr*)

secretados por diversos patógenos (FLOR 1955). Por parte dos patógenos, durante o processo inicial de infecção, ocorre a produção de substâncias e/ou moléculas produzidas por genes *Avr* denominadas de moléculas efetoras (proteínas) que auxiliam no seu processo de penetração no hospedeiro e estabelecimento das relações parasitárias. Essas moléculas têm a capacidade de desarmar ou ludibriar o sistema de defesa da planta, interferindo no seu processo fisiológico e facilitando o processo de patogênese (HAMMOND-KOSACK; KANYUKA 2007). Tais efetores são identificados pela planta diretamente pelos seus receptores, proteínas de resistência (proteínas R), que são os produtos dos genes *R* (ORBACH et al., 2000). Segundo algumas hipóteses, qualquer substância desconhecida sintetizada por um organismo estranho como, por exemplo, um fungo, poderia atuar como uma molécula elicitadora (NIMCHUK et al., 2003).

A ação de proteínas R pode induzir ao acúmulo de ácido salicílico (SA), à expressão de proteínas relacionadas à patogênese, e à morte de células localizadas próximas ao local de infecção, ou seja, à reação de hipersensibilidade. As proteínas R apresentam unidades estruturais, funcionais e evolutivas denominadas de domínios, as quais são categorizadas em classes (HAMMOND-KOSACK; JONES 1997). Os domínios mais representativos são os que apresentam regiões de ligação a nucleotídeos (NBS), os com regiões com repetições ricas em leucina (LRR), e com N-terminal apresentando variações que podem ser TIR (*Toll/Interleucina-1*) ou CC (*Coiled-coil*) (Figura 4) (McHALE et al., 2006; ELMORE et al., 2011; GURURANI et al., 2012). Os domínios facilitam a identificação e a caracterização dos genes *R* em diversos hospedeiros (SHARMA et al., 2009).

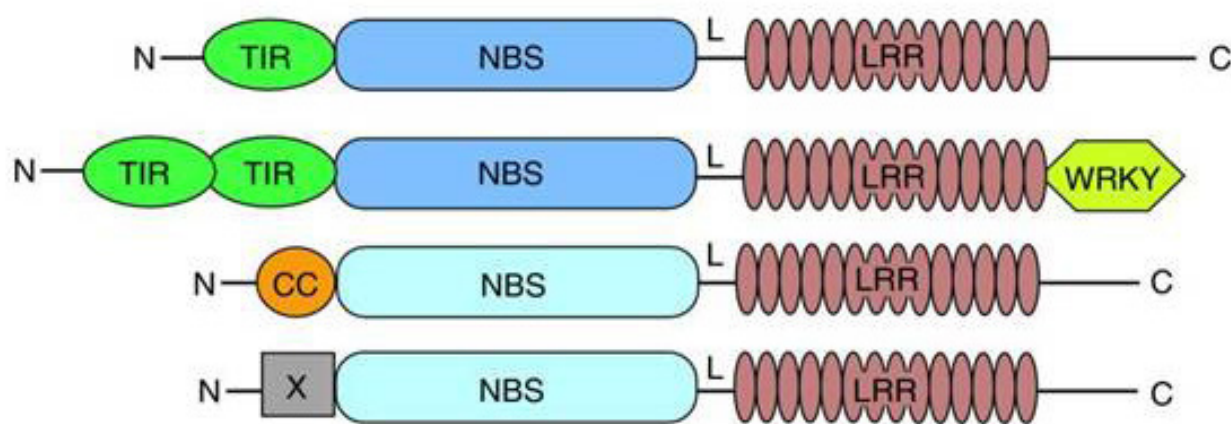


Figura 4 - Principais domínios das proteínas NBS-LRR de genes de resistência a doenças em plantas. Fonte: Adaptado de McHale et al. (2006).

O domínio conservado NBS-LRR apresenta a maior frequência, podendo apresentar de 860 a 1.900 aminoácidos (McHALE et al., 2006), sendo que esta classe de genes é a parte central do sistema de defesa das plantas (NIMCHUK et al., 2003).

Em trigo foram encontrados 43 *loci* (*Pm1-Pm43*) de resistência ao oídio (HE et al., 2009), sendo que o *Pm3* o único que foi clonado e pertence ao domínio NBS-LRR (YAHIAOUI et al., 2004). No gênero *Arabidopsis*, são relatadas 150 sequências correlacionadas com genes NBS-LRR (DANGL; JONES 2001). Em tomate, o gene *I2* também faz parte dessa classe de proteínas e é responsável por governar reações de resistência a *Fusarium oxysporum* (GURURANI et al., 2012).

4 GENES RESISTÊNCIA E VARIABILIDADE DO AGENTE CAUSAL EM BRUSONE DO ARROZ E DO TRIGO

Por se tratar de um patossistema modelo em estudos de interação planta-patógeno, a brusone do arroz, causada por *P. oryzae* Oryza, será tratada com maior profundidade. A brusone do trigo inclui-se nessa abordagem diferenciada, considerando que também é causada pelo fungo *P. oryzae*, embora o patotipo seja diferente (*Triticum*) e por caracterizar-se como uma das doenças mais importantes da agricultura brasileira (MOREIRA et al., 2015).

No Brasil, o desenvolvimento de genótipos de trigo resistentes à brusone tem se tornado prioridade em programas de melhoramento de trigo (CRUZ et al., 2010), entretanto, até o presente momento, não existem cultivares com bom nível de resistência a esta doença disponíveis para os produtores. A busca por fontes de resistência à doença é incessante, trabalhos com o genótipo de trigo Thatcher indicaram a presença dos genes *Rmg2* e *Rmg3*, localizados nos cromossomos 7A e 6B que conferiram resistência à brusone do trigo (ZHAN et al., 2008). NGA et al. (2009) identificaram os genes *Rmg4* e *Rmg5*, nos cromossomos 4A e 6D, respectivamente. Os genes *Rmg4* e *Rmg5* foram descritos através de inoculações de um isolado de *P. grisea*, isolado de *Digitaria sanguinalis*, em genótipos de trigo. Hau et al. (2007) identificaram o gene *Rmg1(Pwt4)* no genótipo de trigo Norin 4, esse gerou resistência a isolados de *P. oryzae* Oat oriundos de aveia. Estudos de investigação genética e fenotípica com isolados de *P. oryzae* do trigo (avirulento em arroz, patotipo Triticum) e arroz (avirulento em trigo, patotipo Oryza) relataram a existência de três *loci* envolvidos nas reações de avirulência do isolado de arroz no genótipo de trigo Norin 4. O *locus Pwt2* condicionou a formação de papilas, o *Pwt1* condicionou a reação de hipersensibilidade e o último *loci*, que originou uma reação de hipersensibilidade, foi descrito com *Pwt5* (TOSA et al., 2006).

Em arroz, diferentemente do trigo, a incorporação de genes *R* em genótipos comerciais é recorrente, os principais genes presentes nas cultivares brasileiras de arroz de terras baixas e que são utilizados em programas de melhoramento para resistência à brusone são *Pi-b*, *Pi-ta* e *Pi-k* (NUNES et al., 2007). Os genes *Pib*, *Pita*, *Pik-h*, *Pi9*, *Pi2*, *Piz-t*, *Pid2*, *Pi36*, *Pi37*, *Pik-m*, *Pit*, *Pi5*, *Pid3*, *Pi21*, *Pb1*, *Pish*, *Pik*, *Pik-p*, *Pia*, *NLS1*, *Pi25* e *Pi54rh* são genes *R* que foram clonados e são utilizados em programas de melhoramento do mundo inteiro (LIU et al., 2010; YANG et al., 2008; SINGH et al., 2015). O gene *Pi54of*, ortólogo de *Pi54*, clonado a partir de espécies selvagens de arroz, apresentou elevado nível de resistência a isolados virulentos de *P. oryzae* Oryza (DEVANNA et al., 2014). Os genes *Pif*, *pi21*, *Pb1* e *Pi34* conferem resistência parcial à brusone do arroz (BALLINI et al., 2008).

Pyricularia oryzae Oryza apresenta uma alta variabilidade em arroz,

tendo sido já descrita a existência de vários grupos raciais formando a sua estrutura populacional (FILIPPI; PRABHU 2001; URASHIMA 2002; WANG et al., 2010). Ou & Ayad (1968), estudando a variabilidade de *P. oryzae* Oryza, diferenciaram raças do fungo originadas de uma mesma lesão. Quamaruzzaman & Ou (1970) descreveram mudanças de raças patogênicas em um viveiro de brusone durante o período de um mês, e em diferentes locais do mundo. Em trigo é recente a descrição de um padrão racial formando a estrutura populacional de *P. oryzae* Triticum (MACIEL et al., 2014, DANELLI 2015).

O principal fator que caracteriza a variabilidade da população *P. oryzae* Triticum é a instabilidade de resistência das cultivares novas de arroz que são lançadas, sua vida útil tem sido, em média de dois anos, pois surgem novas raças do patógeno, capazes de superar sua resistência (SANTOS et al., 2005; SANTOS et al., 2012). Destacam-se como mecanismos que podem estar gerando a variabilidade genética de *P. oryzae*, independente do patotipo: a recombinação sexual, a parassexual e a ocorrência de mutações (KANG et al., 1994; TEBEEST et al., 2007, MACIEL 2011; MACIEL et al., 2014).

A espécie *P. oryzae* é heterotática (heteros= dissemelhante), com um sistema de acasalamento controlado por dois alelos diferentes, MAT1-1 e MAT1-2 em um único locus, com genes adicionais controlando a sua fertilidade (ciclo sexual) (KANG et al., 1994; TEBEEST et al., 2007, MACIEL 2011; MACIEL et al., 2014). A recombinação sexual só ocorre na natureza entre isolados parentais e se estes indivíduos forem férteis e compatíveis (PRABHU; FILIPPI 2006).

Em trigo, trabalhos com isolados monospóricos do Paraná, mostraram predomínio de MAT1-1, e isolados do Mato Grosso do Sul, os dois alelos, 1 e 2 (BRUNO; URASHIMA, 2001). Este fato também foi descrito para a brusone do arroz, onde prevaleceu a ocorrência do tipo compatível MAT1-1 (KATO; YAMAGUCHI 1982; YAEHASHI; YAMADA 1986; NOTTEGHEM; SILUÉ 1992). Além disso, populações de *P. oryzae* infectantes de *Eleusine coracana* (L.) Gaertn., originadas do leste da África, revelaram um contínuo padrão de variação genética, não apresentando

linhagens clonais, com a presença de uma vasta gama de haplotipos. Nesse mesmo trabalho, a distribuição dos tipos de acasalamento MAT1-1 e MAT1-2 apresentaram distribuição que variou de 47,0 a 53,0 %, com fertilidade variando de 84,0 a 89,0 %, e a predominância de 64,0 % dos isolados hermafroditas, sugerindo assim alto risco de ocorrência da reprodução sexual (TAKAN et al., 2012). Entretanto, vale ressaltar que trabalhos descrevem que na natureza as populações do fungo, que ataca o arroz e o trigo, estão em desequilíbrio entre MAT1-1 e MAT1-2, comprometendo a existência da forma sexual (KATO; YAMAGUCHI 1982; YAEHASHI; YAMADA 1986; NOTTEGHEM; SILUÉ 1992; MEKWATANAKARN et al., 1999; BRUNO; URASHIMA 2001; MACIEL et al., 2014).

Nesse caso, a recombinação parassexual, juntamente com mutações, é apontada como a principal causa da variabilidade na patogenicidade de *P. oryzae* Oryza (NOGUCHI 2011). Mesmo que em relação a *P. oryzae* Triticum do trigo não se tenha informações da ocorrência de recombinação parassexual em *P. oryzae* Oryza, alguns autores citam o surgimento de haplotipos com padrões moleculares distintos em cultivos de isolados em *in vitro* e detecção na natureza de isolados oriundos de recombinação parassexual (XIA et al., 1993; ZEIGLER et al., 1997).

O fungo *P. oryzae* apresenta alta instabilidade genômica, e a presença de transposons em seu genoma é apontada como uma das causas dessas variações. Seu genoma é composto por 9,7 % de DNA repetitivo, em grande parte derivado de elementos transponíveis (CHADHA; SHARMA 2014). As mutações também podem influenciar no sistema de defesa da planta. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foi possível realizar a clonagem do *AVR-Pita*, sendo encontrado mutantes *AVR* com diversos tipos de alterações, mutações do tipo pontual, deleções de genes de avirulência e inserções de transposons (ORBACH et al., 2000; SILVA et al., 2004), o que pode estar contribuindo para a alta variabilidade do patógeno. Em estudo realizado por Kang et al. (2001), foi relatada a perda da função do gene *Avr* em *P. oryzae* Oryza, gerado pela ocorrência de uma mutação, e por consequência a inserção de um transposon da família *Pot-3*.

5 DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES RESISTENTES A DOENÇAS FÚNGICAS

Cultivares resistentes a doenças têm sido selecionadas por meio de melhoramento tradicional há mais de 100 anos. A primeira referência nesse sentido é baseada no trabalho desenvolvido por Biffen realizado no início do século XX, quando foram feitas ações de estudo sobre a herança à resistência à ferrugem amarela do trigo, causada pelo fungo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (BIFFEN 1905). No entanto, dessas primeiras ações, as atividades nos programas de melhoramento de diversas culturas agrícolas se restringiam a identificar fontes de resistência a doenças para serem usados em cruzamentos genéticos, sem muito entendimento do mecanismo de ação dos genes de resistência (R). Um passo fundamental para a compreensão das bases da resistência às doenças de plantas foi estabelecido no trabalho de Flor (1955), há mais de meio século, que definiu na teoria *gene-a-gene* a existência da complementariedade entre genes *Avr* do patógeno e *R* da planta, cujos princípios já foram mencionados neste capítulo.

Embora o primeiro gene *Avr* tenha sido clonado há mais de 30 anos (STASKAWICZ et al., 1984), a identificação e clonagem de loci de resistência única de genes *R* demorou um pouco mais. Em 1992, o primeiro gene *R*, o *Hm1*, foi localizado, isolado, sequenciado e sua função foi descrita a nível molecular. O *Hm1* confere resistência contra a raça 1 do agente causal da mancha foliar do milho, causada por *Cochliobolus carbonum* (fase anamorfa *Bipolaris (Helminthosporium) carbonum*). O chamado fator de virulência produzido pelo fungo é uma toxina denominada HC. Os genótipos que apresentam o gene *Hm1* produzem uma enzima denominada HC redutase que inativa a toxina HC produzida por isolados da raça 1 do patógeno. Um aspecto interessante observado nesse patossistema foi que quando isolados da raça 1 perderam o fator de virulência artificialmente também perderam a habilidade de infectar variedades de milho que não contêm o gene *Hm1*, observando-se, assim, que a genética dessa interação não segue o padrão estabelecido nos princípios de Flor. Quase na mesma época, o gene *R*, denominado de *Pto*, originário do tomateiro, também foi identificado e

clonado e usado no controle de isolados da bactéria *Pseudomonas syringae* que continham os genes de avirulência *AvrPto* e *AvrPtoB* (MARTIN et al., 1993; SCOFIELD et al., 1996; TANG et al., 1996; KIM et al., 2002). Realmente esses foram passos iniciais e a expectativa é que ocorra cada vez mais a intervenção de conceitos moleculares na criação de cultivares. Exemplos do uso de clonagem já foram descritos na Tabela 1.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P. et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, v. 4, p. 217-224, 2003.
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 5th ed., 2005. 922p.
- ARAUJO, B. J. O. R. Catalogação e descrição bibliográfica: Mapeamento genético de locos de resistência a *Magnaporthe grisea* em linhagens puras recombinantes de arroz (*Oryza sativa* L.). Brasília, DF, 2008. Originalmente apresentada como Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Brasília, 2008.
- BAHRIN, I. et al. Characterization of a wheat transcription factor, *TaWRKY45*, and its effect on *Fusarium* head blight resistance in transgenic wheat plants. *Breeding Science*, v. 61, p. 121-129, 2011.
- BALLINI, E. et al. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 21, p. 859-868, 2008.
- BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, v. 45, p. 399-436, 2007.

- BOYD, L. A. Can Robigus defeat an old enemy? Yellow rust in wheat. *The Journal of Agricultural Science*, v. 143, p.233-243, 2005.
- BIFFEN, R. H. Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *The Journal of Agricultural Science.*, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 4-48, 1905.
- BROMFIELD, K. R; HARTMIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. *Crop Science*, v. 20, p. 254-255, 1980.
- BRUEGGEMAN, R. et al. The barley stem rust-resistance gene *Rpg1* is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proceedings of National Academic Science of United State of America*, v. 99, p. 9328-9333, 2002.
- BRUN, H. et al. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*, v. 185, p.285-299, 2010.
- BRUNO, A. C.; URASHIMA, A. S. Inter-relação sexual de *Magnaporthe grisea* do trigo com a brusone de outros hospedeiros. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 21-26, 2001.
- BUZZELL, R. I.; HAAS, J. Inheritance of adult plant resistance to powdery mildew in soybeans. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 20, p. 151-153, 1978.
- CAMARGO, E. A. L. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Orgs.) *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. p. 119-132.
- CHADHA, S.; SHARMA, M. Transposable elements as stress adaptive capacitors induce genomic instability in fungal pathogen *Pyricularia oryzae*. *Plos One*, v. 9, p. 1-14, 2014.
- CHAVAN, S.; GRAY, J.; SMITH, S. M. Diversity and evolution of *Rp1* rust resistance genes in four maize lines. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 128, p. 985-998, 2015.

COLLINS N. C. et al. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, v. 425, p. 973-977, 2003.

CRUZ, M. F. A. et al. Resistência parcial à brusone de genótipos de trigo comum e sintético nos estádios de planta jovem e de planta adulta. *Tropical Plant Pathology*, v. 35, p. 24-31, 2010.

DANELLI, A. L. D. Catalogação e descrição bibliográfica: *Pyricularia oryzae*: virulência de isolados, densidade de conídios no ar e efeito do nitrogênio na suscetibilidade do trigo. Passo Fundo, RS, 2015. Originalmente apresentada como Tese de Doutorado em Agronomia- Área de Concentração em Fitopatologia- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, 2015.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, v. 411, 826-833, 2001.

DE WIT, P. J. G. M. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Science*, v. 2, p. 452-458, 1997.

DEMICHELLIS, M. et al. Identificación de genes *Lr* presentes em germoplasma argentino de trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.), mediante técnicas moleculares. In: VII CONGRESO NACIONAL DE TRIGO, 2008, Santa Rosa. Anais... Santa Rosa, INTA/Universidad Nacional de La Pampa, 2008.

DEVANNA, N. B.; VIJAYAN, J.; SHARMA, T. R. The Blast Resistance Gene *Pi54* of Cloned from *Oryza officinalis* Interacts with *Avr-Pi54* through Its Novel NonLRR Domains. *PLoS ONE*, v. 9, p. 1-16, 2014.

DJIAN-CAPORALINO, C. et al. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biology*, v. 22, p. 53, 2014.

DIXON, M. S. et al. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell*, v. 84, p.

451-459, 1996.

DYCK, P. L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome*, O v. 29, p. 467-469, 1987.

ELLIS, J. Insights into nonhost disease resistance: can they assist disease control in agriculture? *Plant Cell*, v. 18, p. 523-528, 2006.

ELMORE, J. M.; LIN, Z.-J. D.; COAKER, G. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 365-71, 2011.

EVERSMEYER, M.G.; KRAMER, C.L. Epidemiology of wheat leaf and stem rust in the central great plains of the USA. *Annual Review of Phytopathology*, v. 38, p.491-513, 2000.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S. Phenotypic virulence analysis of *Pyricularia grisea* isolates from Brazilian upland rice cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, p. 27-35, 2001.

FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*, v. 45, p. 680-685, 1955.

GALLUN, R.L.; KHUSH, G.S. Genetic factors affecting expression and stability of resistance. *Breeding Plant Resistance to Insects*. Edited by: Maxwell FG, Jennings PR. 1980, New York: Wiley, 63-68, 1980

GARCIA, A. et al. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 117, p. 545-553, 2008.

GERMÁN, S. et al. Are rust pathogens under control in the Southern Cone of South America? In: TECHNICAL WORKSHOP. Obregon, 2009. Anais... Obregon: Borlaug Global Rust Initiative (BGRI), 2009. p. 65-73.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 78, p. 51-

65, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. *Annal Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 48, p. 575-607, 1997.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; KANYUKA, K. Resistance genes (*R* genes) in plants. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

HAN, S. S. et al. Breakdown of resistant cultivars by new race KI-1117 and race distribution of rice blast fungus during 1999 – 2000 in Korea. *Research in Plant Disease*, v. 7, p. 86-92, 2001.

HARTIWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. *Crop Science*, v.26, p 1135- 1136, 1986.

HARTMAN, G. L.; MILES, M. R.; FREDERICK, R. D. Breeding for resistance to soybean rust. *Plant Disease*, v. 89, p. 664-666, 2005.

HAU, V. T. B. et al. *Rwt4*, a wheat gene for resistance to *Avena* isolates of *Pyricularia oryzae*, functions as a gene for resistance to *Panicum* isolates in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, v. 73, p. 22-28, 2007.

HEATH, M.C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, p. 315-319, 2000.

HE, R. et al. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 118, p. 1173-1180, 2009.

HITTALMANI, S. et al. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of three major genes for blast resistance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 100, p.1121-1128, 2000.

HOGENHOUT, S. A. et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 22, p. 115-122, 2009.

HUANG, N. et al. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 95, p.313-320, 2004.

IMBABY, I. A. et al Identification of Leaf Rust Resistance Genes in Selected Egyptian Wheat Cultivars by Molecular Markers. *Scientific World Journal*, v. 2014, Article ID 574285, 2014.

JOHAL, G. S.; BRIGGS, S. P. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science*, v. 258, p. 985-987, 1992.

JOHNSON, R. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 22, p.309-330, 1984.

JOHNSON, R. The concept of durable resistance. *Phytopathology*, v. 69, p.198-199, 1979.

KANAZIN, V.; MABEK, L.F.; SHOEMAKER, R.C. Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of National Academic Science of United State of America*, v. 93, p. 11746-11750, 1996.

KANG, S.; CHUMLEY, F. C.; VALENT, B. Isolation of mating type genes of the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea* using genomic subtraction. *Genetics*, v. 138, p. 289-296, 1994.

KANG, S.; et al. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. *Molecular Plant- Microbe Interaction*, v. 14, p. 671-674, 2001.

KATO, H.; YAMAGUCHI, T. The perfect stage of *Pyricularia oryzae* from rice plants in culture. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 98, p. 607-612, 1982.

KAWASHIMA, C. G. et al. A pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. *Nature Biotechnology*, v. 34, p. 661- 665, 2016.

KENDRICK, M. D. et al. Identification of a second Asian soybean rust resistance gene in Hyuuga soybean. *Phytopathology*, v. 101, p. 535-543,

2011.

KIM, Y. J.; LIN, N.-C.; MARTIN, G. B. Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell*, v. 109, p. 589- 598, 2002.

KRATTINGER, S. G. et al. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, v. 323, p. 1360-1363, 2009.

LANDEO, J. A. Breeding for Host Resistance. Durable resistance: Quantitative/Qualitative resistance. Proceedings of the global initiative on late blight conference 2002. Hamburg, Germany, 2002. pp. 29-36. https://research.cip.cgiar.org/confluence/download/attachments/37192047/Breeding_Landeo.pdf?version=2&modificationDate=1273383479000&api=v2. Acessado em 23/04/2017.

LANNA FILHO, R.; RESENDE, M. L. V. O papel do sistema de resistência guarda na interação Gene a Gene em Plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C (Orgs). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 17. ed. Passo Fundo, 2009. p. 189-210.

LEACH, J. E. et al. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology*, v. 39, p.187-224, 2001.

LIN, F. et al. Molecular mapping of two genes conferring resistance to *Phytophthora sojae* in a soybean landrace PI 567139B. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 126, p. 2177-2185, 2013.

LIPKA, V. et al. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, v. 310, p. 1180-1183, 2005.

LI, S. et al. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 125, p.133-142. 2012.

LIU, J. et al. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding*, v.119, p.21-24, 2000.

LIU, J. et al. Recent progress in elucidating the structure, function, and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 34, p. 765-776, 2007.

LIU, J. et al. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice *Magnaporthe oryzae* interaction. *Molecular Plant Pathology*, v. 11, p. 419-427, 2010.

LO IACONO, G.; VAN DEN BOSCH, F.; GILLIGAN, C.A. Durable Resistance to Crop Pathogens: An Epidemiological Framework to Predict Risk under Uncertainty. *PLoS Computational Biology*, v. 9, e1002870, 2013.

LO IACONO, G. VAN DEN BOSCH, F.; PAVELEY, N. The evolution of plant pathogens in response to host resistance: Factors affecting the gain from deployment of qualitative and quantitative resistance. *Journal of Theoretical Biology*, v. 304, p.152-163, 2012.

LUPTON, F. G. H.; MACER, R. C. F. Inheritance of resistance to yellow rust (*Puccinia glumarum* Erikss & Henn.) in seven varieties of wheat. *Transactions of the British Mycological Society*, v. 45, p. 21-45, 1962.

MACIEL, J. L. N. *Pyricularia oryzae*, the blast pathogen: current status and options for its control. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v. 6, p. 1-8, 2011.

MACIEL, J. L. N. et al. Population structure and pathotype diversity of the wheat blast pathogen *Pyricularia oryzae* 25 years after its emergence in Brazil. *Phytopathology*, v. 104, p. 95-107, 2014.

MAKANDAR, R. et al. Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, p. 123- 129, 2006.

MARTIN, G. B. et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, v. 262, p. 1432-1436, 1993.

MATIELLO, R. R.; BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. *Ciência Rural*, v.27, p.161-168, 1997.

- McCOUCH, S.R. et al. Mapping of blast resistance genes in rice. In ZEIGLER, R.S.; LEONG, S.A.; TENG, P.S. (Eds.). Rice Blast Disease. Wallingford: CAB International, 1994. p. 167-186.
- McDONALD, B.A.; MUNDT, C.C.; CHEN, R-S. The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: Evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. Euphytica, v. 92, p. 73-80, 1996.
- McHALE, L. et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biology, v. 7, p. 1-12, 2006.
- McLEAN, R. J.; BYTH, D.E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. Australian Journal of Research, v. 31, p. 951-956, 1980.
- McROSTIE, O.P. Inheritance of anthracnose resistance as indicated by a cross between a resistant and a susceptible bean. Phytopathology, v. 9, p. 141-148, 1919.
- MEKWATANAKARN, P. et al. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. Plant Disease, v. 83, p. 939-943, 1999.
- MOERSCHBACHER, B.; MENDGEN, K. Structural Aspects of Defense. In: SLUSARENKO, A. J.; FRASER, R. S. S.; VAN LOON, L. C. (Orgs.) Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. 1 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 231-277.
- MOREIRA, S. I.; CERESINI, P. C.; ALVES, E. Reprodução Sexuada em *Pyricularia oryzae*. Summa Phytopathologica, v. 41, p. 175-182, 2015.
- MYSORE, K.S.; RYU, C.M. Nonhost resistance: How much do we know? Trends in Plant Science, v. 9, p. 97-104, 2004.
- MUNDT, C.C.; COWGER, C.; GARRETT, K.A. Relevance of integrated disease management to resistance durability. Euphytica, v. 124, p. 245-252, 2002.

- NELSON, R.R. Stabilizing racial populations of plant pathogens by use of resistance genes. *Journal of Environmental Quality*, v. 1, p. 220-227, 1972
- NGA, N. T.; HAU V. T.; TOSA, Y. Identification of genes for resistance to a *Digitaria* isolate of *Magnaporthe grisea* in common wheat cultivars. *Genome*, v. 52, p. 801-809, 2009.
- NIKS, R.E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: How to explain specificity? *New Phytologist*, v. 182, p. 817-828, 2009.
- NIMCHUK, Z. et al. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, v. 37, p. 579-609, 2003.
- NOGUCHI, M. T. Parasexual recombination in *Magnaporthe oryzae*. *Japan Agricultural Research Quarterly*, v. 45, p. 39-45, 2011.
- NOTTEGHEM, J. L.; SILUE, D. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology*, v. 82, p. 421-424, 1992.
- NUNES, C. D. M. et al. Resistência genética de cultivares de arroz irrigado à raça IA-1abd de *Pyricularia grisea*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, p. 64-69, 2007.
- ORBACH, M. et al. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell*, v. 12, p. 2019-2032, 2000.
- OU, H.S.; AYAD, M.R. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. *Phytopathology*, v. 58, p. 179-182, 1968.
- PALLOIX, A; AYME, V.; MOURY, B. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, v. 183, p.190-199, 2009.
- PARLEVLIET, J. E. Durable resistance. In: HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. H. (Eds.). *Resistance of crop plants against fungi*. Gustav

Fisher, Jena, Germany. 1997. pp. 238-253.

PARLEVLIET, J.E.; ZADOKS, J.C. The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, v. 26, p. 5-21, 1977.

PIROZYNSKI, K.A.; HAWKSWORTH, D. L. Coevolution of fungi with plants and animals: introduction and overview. In: PIROZINSKY, K. A.; HAWKSWORTH, D.L. Coevolution of fungi with plants and animals. London: Academic Press, 1988. p. 1-29.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Brusone em arroz: controle genético, progresso e perspectivas. 1 ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

QUAMARUZZAMAN, M.; OU, H. S. Monthly changes of pathogenic races of *Pyricularia oryzae* in a blast nursery. *Phytopathology*, v. 60, p. 1266-1269, 1970.

RIBEIRO DO VALE, F. X.; PARLEVLIET, J. E.; ZAMBOLIM, L. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira*, v. 26, p. 577-589, 2001.

RIBEIRO, R.L.D.; HAGEDORN, D. J. Inheritance and nature of resistance in beans to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, v. 69, p. 859-861, 1979.

ROSIELLE, A.A.; BROWN, A. G. P. Inheritance, heritability and breeding behavior of three sources of resistance to *Septoria tritici* in wheat. *Euphytica*, v. 28, p. 385–392, 1979.

ROUSE, D.I. et al. Components of rate-reducing resistance in seedlings of four wheat cultivars and parasitic fitness in six isolates of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, v. 70, p. 1097-1100, 1980.

SANTOS, G. R. et al. Diversidade de *Magnaporthe grisea* em arroz de terras altas no sul do Estado do Tocantins, na safra 2008/09. *Revista Ceres*, v. 59, . 65-70, 2012.

SANTOS, G. R. et al. Reação a doenças e caracteres agronômicos de genótipos de arroz de várzeas no estado do Tocantins. *Revista Agropecuária Técnica*, v. 26, p. 51-57, 2005.

SCHWEIZER, P. Nonhost resistance of plants to powdery mildew: new opportunities to unravel the mystery. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 70, p. 3-7, 2007.

SCOFIELD, S. et al. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, v. 274, p. 2063-2065, 1996.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K.S. Nonhost resistance against bacterial pathogens: Retrospectives and prospects. *Annual Review of Phytopathology*, v. 51, p. 407-427, 2013.

SHANG, J. et al. Identification of a new rice blast resistance gene, *pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site–leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, v. 182, p. 1303-1311, 2009.

SHARMA, T. et al. Rice blast management through host-plant resistance: retrospect and prospects. *Agricultural Research*, v. 1, p. 37-52, 2012.

SILVA, J. C.; LORETO, E. L.; CLARK, J. B. Factors that affect the horizontal transfer of transposable elements. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 6, p. 57-71, 2004.

SINGH R. P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat. *Phytopathology*, v. 82, p. 835-838, 1992.

SINGH, A. K. et al. Molecular Screening of Blast Resistance Genes in Rice using SSR Markers. *Plant Pathology Journal*, v. 31, p. 12-24, 2015.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. *New Phytologist*, v. 132, p. 1-45, 1996.

SOUZA, T. L. P. O. et al. Characterization of the rust resistance gene present

in the common bean cultivar Ouro Negro, the main rust resistance source used in Brazil. *Plant Pathology*, v. 60, p. 839-845, 2011.

SPIELMEYER, W. et al. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 111, p. 731-735, 2005.

STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proceedings of National Academic Science of United State of America*, v. 81, n p. 6024-6028, 1984.

StCLAIR, D. A. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, v. 48, p.247-268, 2010

STEIN, M. et al. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*, v. 18, p.731-746, 2006.

STUTHMANN, D.D.; LEONARD, K.J.; MILLER-GARVIN, J. Breeding crops for durable resistances. In: Sparks DL, editor. *Advances in Agronomy*. Vol. 95. Amsterdam: Elsevier, 2007, pp. 319–367.

SUDAPAK, M. A.; BENNETZEN, J.; HULBERT, S. H. Unequal exchange and meiotic instability of disease-resistance genes in the *Rp1* region of maize. *Genetics*, v. 133, p. 119-125, 1993.

TAGUCHI, K.; KUBO, T.; TAKAHASHI, H.; ABE, H. Identification and precise mapping of resistant QTLs of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *G3 (Bethesda)*, v. 1, p. 283-291, 2011.

TAKAN, J. P. et al. *Pyricularia oryzae* populations adapted to finger millet and rice exhibit distinctive patterns of genetic diversity, sexuality and host interaction. *Molecular Biotechnology*, v. 50, p. 145-158, 2012.

TANG, X. et al. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, v. 274, p. 2060-2063, 1996.

- TEBEEST, D. O.; GUERBER, C.; DITMORE, M. Brusone (Piriculariose, pt) do arroz. 2007. Portuguese translation by Schwanck, A.A.; Del Ponte, E. M.; Urashima, A.S. 2009. *The Plant Health Instructor*. <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/RiceBlastPort.aspx>. Acessado em 23/04/2017.
- THOME, G. C. H. et al. Melhoramento para resistência parcial a moléstias fúngicas em cereais. *Ciencia Rural*, v. 29, p. 365-371, 1999.
- TOSA, Y. et al. Genetic analysis of host species specificity of *Pyricularia oryzae* isolates from rice and wheat. *Phytopathology*, v. 96, p. 480-484, 2006.
- TRIGIANO, R.N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. 2 ed. Porto Alegre, Artmed, 2010. 576 p.
- URASHIMA, A. S. Variation in virulence in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in São Paulo State. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, p. 109-115, 2002.
- VALENT, B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, v. 80, p. 33-36, 1990.
- VAN Der PLANK, J.E. Host-Pathogen Interaction in Plant Disease. New York: Academic Press. 1982.
- VAN Der PLANK, J.E. Principles of Plant Infection. Academic Press, New York. 1975.
- VAN Der PLANK, J. E. Plant Disease: epidemics and control. New York: Academic Press, 1963.
- VAN Der VOSSEN, E. A. G. et al. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant Journal*, v. 44, p. 208-222, 2005.
- WANG, X. et al. Characterization of *Pita* blast resistance gene in an

international rice core collection. *Plant Breeding*, v. 129, p. 491-501, 2010.

WOLFE, M.S.; BARRET, J.A. Can we lead the pathogen astray? *Plant Disease*, v. 70, p.148-155, 1980.

XIA, J. Q. et al. DNA fingerprint to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in Arkansas. *Phytopathology*, v. 83, p. 1029-1035, 1993.

XUE, M. et al. Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. *Plos Genetics*, v. 8, p. 1-12, 2012.

YAEGASHI, H.; YAMADA, M. Pathogenic race and mating type of *Pyricularia grisea* from Soviet Union, China, Nepal, Thailand, Indonésia and Colombia. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, v. 52, p. 225-234, 1986.

YAHIAOUI, N. et al. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal*, v. 37, p. 528-538, 2004.

YANG, B.; SUGIO, A.; WHITE, F. F. *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of National Academic Science of United State of America*, v. 103, p. 10503-10508, 2006.

YANG, J. Y. et al. Race specificity of major rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* isolates collected from indica rice in Guangdong. *Rice Science*, v. 15, p. 311-318, 2008.

YOUNG, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review Phytopathology*, v. 34, p. 479-501, 1996.

ZEIGLER, R. S. et al. Evidence of parasexual exchange of DNA in the rice blast fungus challenges its exclusive clonality. *Phytopathology*, v. 87, p. 284-294, 1997.

ZHAN, S. W.; MAYAMA, S.; TOSA, Y. Identification of two genes for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in wheat. *Genome*, v.

51, n. 3, p. 216-21, 2008.

Zhu, Y.; Chen, H.; Fan, J.; Wang, Y.; Li, Y.; Chen, J.; Fan, J.X.; Yang, S.; Hu, L.; Leung, H.; Mew, T.W.; Teng, P.S.; Wang, Z.; Mundt, C.C. Genetic diversity and disease control in rice. *Nature*, London, v. 406, p.718-722, 2000.

CAPÍTULO 9: RESISTÊNCIA DE PLANTAS A FITONEMATOIDES: IMPORTÂNCIA, TERMINOLOGIA & ASPECTOS BIOLÓGICOS

Jerônimo Vieira de Araújo Filho¹
Leandro José Dallagnol²

¹UFPEl - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Nematologia, Pelotas, RS, Brasil

²UFPEl - Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Fitossanidade, Laboratório de Interação Planta Patógeno, Pelotas, RS, Brasil

INTRODUÇÃO

Nematoides fitoparasitos são organismos usualmente filiformes (cilíndricos), multicelulares, pseudocelomados e, usualmente, microscópicos. Esses metazoários, embora próximos filogeneticamente de outros vermes (platelmintos e nematelmintos), pertencem a um filo próprio, denominado Nematoda ou Nemata (FERRAZ; BROWN 2016). Apesar desta relativa simplicidade conceitual, fitonematoides compreendem, na verdade, um grupo bastante diversificado, sob os mais variados aspectos biológicos, ecológicos e funcionais. Estes animais divergem, por exemplo, em tamanho, forma, dimorfismo sexual, nichos ecológicos (parasitas aéreos ou subterrâneos), tipos de parasitismo, mecanismos de sobrevivência, espectro de hospedeiros, entre outros inúmeros aspectos (AGRIOS 2005; SIDDIQI 2000; FERRAZ; MONTEIRO 2011).

De maneira geral, consoante o hábito de parasitismo, podem-se reconhecer três grupos principais de fitonematoides, a saber: (i) o primeiro grupo representado por espécies que não ingressam no tecido vegetal, alimentando-se externamente a raiz, sendo, por esta razão, designados nematoides ectoparasitos; as relações parasíticas neste grupo são, portanto, pouco especializadas. Entre os principais gêneros de importância econômica pontificam-se espécies de *Helicotylenchus*, *Rotylenchus*, *Longidorus*,

Paralongidorus, *Xiphidorus* e *Xiphinema*, *Tylenchorhynchus*; (ii) o segundo grupo colige espécies que, ao penetrar os tecidos do hospedeiro, injetam toxinas e enzimas digestivos no interior de células do hospedeiro, ingerindo seu conteúdo posteriormente; representantes deste grupo conservam permanentemente a forma esguia do corpo e, por este motivo, são conhecidos como endoparasitos migradores; estes vermes podem parasitar tanto o sistema radicular (*Pratylenchus* e *Radopholus*) quanto a parte aérea de plantas (*Ditylenchus* e *Aphelenchoides*) e, por fim, (iii) o último grupo reúne aquelas espécies que penetram o tecido vegetal, as expensas de golpes de estilete e liberação de enzimas, movimentam-se em direção ao cilindro central e induzem, via liberação de substâncias químicas de natureza bastante complexa, células adjacentes a região anterior do corpo a formarem um conglomerado de células hipertrofiadas, multinucleadas, metabolicamente ativas, que passam a carrear nutrientes e fotoassimilados em direção ao nematoide, o qual perde gradualmente a mobilidade do corpo, tornando-se obeso, sedentário; nematoides neste grupo exibem o mais elevado grau de parasitismo (relação muito íntima com o hospedeiro) entre os fitonematoides e, entre as espécies de maior importância econômica, encontram-se aquelas filiadas principalmente aos gêneros *Meloidogyne*, *Rotylenchulus*, *Tylenchulus*, *Heterodera* e *Globodera* (SIDDIQI 2000; MANZANILLA-LOPEZ et al., 2004).

Sob condições naturais, espécies parasitas encontram-se em baixos níveis populacionais, em consonância com a heterogeneidade de suas respectivas plantas hospedeiras, isto é, encontram-se naturalmente em equilíbrio dinâmico (homeostase) (BURDON 1993; VAN DER PUTTEN et al., 2006). Todavia, o modelo agrícola adotado nos últimos anos, sobretudo após a revolução verde, fundamentada, principalmente, na utilização de estreita base genética e no cultivo intensivo, resultou no aparecimento e/ou intensificação de problemas diversos em inúmeras regiões do mundo, incluindo-se naturalmente fitonematoides. Com efeito, a relevância destes patógenos para agricultura nacional (Brasil) é incontestável e tem sido reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), elegendo-os como uma das principais prioridades no que tange à

busca de registros para produtos e pesquisas pelo desenvolvimento de outras tecnologias de controle (ARAÚJO FILHO et al., 2017).

O manejo de fitonematoides não é apenas recomendável, mas sim imprescindível nos dias atuais. Diversas estratégias têm sido historicamente desenvolvidas e utilizadas visando à redução dos níveis populacionais destes parasitos nos mais diversos sistemas de cultivo em todo o mundo, seja em pequenas áreas (solanáceas e crucíferas), seja em largas extensões (oleaginosas e cereais) (VAN DER PUTTEN et al., 2006). Métodos químicos (moléculas nematicidas) e culturais (rotação e/ou sucessão de culturas), embora frequentemente muito eficientes, muitas vezes esbarram na sua disponibilidade e registro, questões econômicas e, no caso de alguns produtos químicos, mesmo em aspectos ambientais. Neste contexto, a resistência genética, embora não seja uma panaceia, assume papel fundamental no manejo destes parasitos, não apenas pela exequibilidade e elevada eficiência, mas também pelo seu custo relativamente baixo (STARR et al., 2002).

Atualmente, são várias as culturas nas quais esta ferramenta está amplamente disponível, destacando-se culturas como o tabaco, soja, feijão, amendoim, tomate, batata e algodão (Tabela 1). De maneira geral, percebe-se claramente que à medida em que a especialização do nematoide aumenta, maior é a disponibilidade por fontes de resistência (ROBERTS 1982). Simples buscas nos principais periódicos especializados internacionais facilmente comprovam as assertivas acima mencionadas.

Tabela 1 - Exemplos de culturas agrícolas nas quais fontes de resistência a nematoides foram identificadas e utilizadas.

Hospedeiro vegetal	Nematoide-alvo	Referência
Soja (<i>Glycine max</i>)	<i>Meloidogyne incognita</i>	Fourie et al. (2013)
Soja	<i>M. javanica</i>	Bruinsma & Antoniolli (2015)
Soja	<i>Heterodera glycines</i>	Mitchum (2016)
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	<i>M. incognita</i>	Ng’ambi et al. (1999)

Tabela continua na página a seguir

Continuação da tabela

Hospedeiro vegetal	Nematoide-Alvo	Referência
Tabaco	<i>Globodera tabacum</i>	LaMondia (2002)
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	<i>M. arenaria</i>	Bendezu & Starr (2003)
Algodão (<i>Gossypium hirsuntum</i>)	<i>M. incognita</i>	Wang et al. (2006)
Algodão (<i>Gossypium arboreum</i>)	<i>Rotylenchulus reniformis</i>	Stetina & Erpelding (2016)
Pepino (<i>Capsicum annuum</i>)	<i>M. incognita</i>	Chen et al. (2007)
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	<i>M. javanica</i>	Ali et al. (2014)
Pêssego (<i>Prunus persica</i>)	<i>M. incognita</i>	Gillen & Bliss (2005)
Videira (<i>Vtis</i> sp.)	<i>X. index</i>	Gutiérrez-Gutiérrez et al. (2011)
Café (<i>Coffea</i> sp.)	<i>M. exigua</i>	Noir et al. (2003)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>M. incognita</i>	Ho et al. (1992)
Tomate (<i>Solanum peruvianum</i>)	<i>Meloidogyne</i> spp.	Ammiraju et al. (2003)
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>Globodera palida</i>	Arntzen et al. (1993)
Batata	<i>G. rostochiensis</i>	Galek et al. (2011)
Feijão de Corda (<i>Vigna unguiculata</i>)	<i>M. incognita</i>	Huynh et al. (2015)
Feijão Guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	<i>R. reniformis</i>	Sharma (1995)
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	<i>Meloidogyne graminicola</i>	Dimkpa et al. (2015)
Arroz	<i>Aphelenchoides bessey</i>	Zhou et al. (2014)
Banana (<i>Musa</i> spp.)	<i>Radopholus similis</i>	Dochez et al. (2006)

Todavia, como será visto doravante, este simples termo resistência não traduz obviamente a sua complexidade e importância como fenômeno biológico. Diversos questionamentos são frequentemente endereçados por ingressos na Nematologia e demais especialidades relacionadas. Afinal, o que é a resistência de plantas a nematoides? Quais os mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos em seu estabelecimento? Quais as principais classificações e categorias desta característica? Há sobreposições entre estas classificações? Existem similaridades com terminologias adotadas para outros importantes patógenos, como fungos, bactérias e vírus?

Em face deste cenário, no presente capítulo, realizar-se-á não apenas um breve sumário acerca de aspectos terminológicos e conceituais básicos da resistência de plantas a fitonematoides, mas também uma abordagem acerca dos principais aspectos bioquímicos, fisiológicos e genéticos associados ao fenômeno da resistência e, no mais das vezes, implicações práticas destes conhecimentos em programas de melhoramento visando à resistência genética a fitonematoides.

1 ASPECTOS TERMINOLÓGICOS E A NATUREZA GENÉTICA DA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A NEMATOIDES

Em nematologia de plantas, a terminologia resistência pode ser utilizada em dois níveis dissimilares, embora mutuamente não exclusivos: a resistência de espécie hospedeira (REH) e a resistência de espécie não hospedeira (RNH). A primeira tem sido utilizada usualmente para designar a habilidade inerente de determinado genótipo da espécie vegetal hospedeira (acessos, híbridos, cultivares, linhagens) de suprimir, em graus variados, a penetração, o desenvolvimento e, conseqüentemente, a reprodução dos nematoides parasitos (COOK; EVANS 1987). A suscetibilidade, por seu turno, é caracterizada pela total ausência de mecanismos impeditivos ao ingresso e desenvolvimento do parasito, resultando, por conseguinte, na reprodução abundante do mesmo (BOERMA; HUSSEY 1992; ROBERTS 2002).

Plantas que apresentam RNH, por outro lado, exibem mecanismos

(bioquímicos e/ou estruturais) que impedem totalmente a infecção e/ou desenvolvimento, sendo denominadas frequentemente plantas imunes (TRUDGILL 1991). Inúmeros exemplos são citados na literatura nematológica, destacando-se principalmente espécies de *Crotalaria*, *Asparagus*, *Mucuna* e *Tagetes* (WEISCHER; BROWN 2001), as quais, inclusive, têm desempenhado, historicamente, papel crucial no manejo destes parasitos em campos infestados em todo o mundo (FERRAZ; FREITAS 2004).

Certo descompasso é, pois, frequentemente observado em relação à terminologia adotada para doenças causadas por outros importantes grupos de patógenos, tais como fungos, bactérias e vírus. Para estas doenças, a resistência é usualmente aferida consoante à magnitude de sintomas morfológicos exibidos (necróticos ou plásticos), ao invés da multiplicação (reprodução) da espécie parasita (STARR; ROBERTS 2004). Entre as principais razões para esta clara dicotomia, pontificam-se: (i) a inexistência, salvo algumas exceções, de sintomas específicos (diretos) para uma grande maioria de interações planta-nematoides; (ii) ao contrário do que ocorre para outros agentes fitopatogênicos, a função perda (produtividade) é mais fortemente correlacionada com as taxas de multiplicação do parasita do que em relação à magnitude dos sintomas causados pelos mesmos; (iii) populações de nematoides podem ser mensuradas com relativa facilidade, acurácia e precisão e, por fim, (iv) fitonematoides são relativamente imóveis e apresentam poucas gerações por estação de cultivo, não originando epidemias explosivas e, sim, epidemias que crescem muito lentamente (TRUDGILL 1991; STARR et al., 2002).

Com efeito, a resistência de espécies vegetais a nematoides é, na prática, aferida majoritariamente conforme critérios que traduzem não apenas a doença *per se*, mas principalmente a reprodução do parasita em apreço. Um destes critérios é o chamado índice reprodutivo (IR), o qual basicamente expressa a quantidade total de exemplares (juvenis, cistos, fêmeas imaturas, ovos) recuperados de determinada raiz parasitada, de cujo genótipo pretende-se caracterizar a reação (KARURI et al., 2017). A utilização de espécie hospedeira, sabidamente suscetível, faz-se necessária para estabelecer

comparações ao término de cada período experimental. Devido à natureza relativa dos dados obtidos, o confronto entre resultados distintos só pode ser efetuado se houver padronização do hospedeiro-controle; caso contrário os mesmos devem ser vistos com parcimônia.

Outros critérios triviais têm sido baseados na utilização de escala de notas de sintomas (0-5 ou 0-10), cujas categorias apresentam amplitudes variáveis de índice de massa de ovos (IMO) e, no caso de espécies de *Meloidogyne*, nodosidades radiculares (IG) (BRIDGE; PAGE 1980; ZHANG et al., 2007; HARTMAN; SASSER 1985; SEID et al., 2017). Entretanto, o critério de maior popularidade entre nematologistas é definido matematicamente por valores que traduzem a multiplicação da população inicial (P_i) da espécie parasita, conhecido popularmente por Fator de Reprodução ($FR = \text{população final } (P_f) / (P_i)$) (OOSTENBRINK 1966). Embora não adotada frequentemente, vê-se como muito desejável e interessante, sempre que factível, a aferição da resistência conforme sintomas e aspectos reprodutivos, sobretudo para aquelas espécies que exibem sintomas conspícuos, tais como espécies de *Meloidogyne*. Pollok et al. (2016), objetivando avaliar o efeito de dois genes de resistência (*Rk1* e *Rk2*) em tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) contra a raça 3 de *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, utilizou, coletivamente, três critérios (IMO, IG e FR) para caracterizar as reações dos genótipos em estudo, observando, inclusive, elevado alinhamento entre os parâmetros. É necessário enfatizar, entretanto, que, para outros patossistemas, fortes correlações entre sintomas e reprodução do parasito não foram observados, tais como na interação banana (*Musa* spp)-*Radopholus similis* (Cobb), 1893, Thorne, 1949 (MARIN et al., 2000).

Outro termo frequentemente citado em nematologia de plantas, assim como para outras especialidades da fitossanidade, é a tolerância. É necessário enfatizar que a adoção deste termo, no âmbito da nematologia, é utilizada para designar a capacidade de determinada espécie vegetal de suportar ou recuperar-se dos efeitos adversos causados pelo parasitismo de fitonematoides (BARKER 1993; STARR; ROBERTS 2004). Vê-se, portanto, que os controles genéticos da tolerância e resistência são distintos, embora não exclusivos. Determinados genótipos podem, desse modo, ser

tolerantes e suscetíveis ou resistentes e tolerantes. As possíveis combinações fenotípicas entre estas duas características podem ser vistas claramente na Tabela 2.

Tabela 2 - Interação Planta-nematoide: extremos de resistência e tolerância.

		Desenvolvimento da Planta	
		Bom	Fraco
Reprodução do Nematoide	Bom	Tolerante/ Não Resistente	Intolerante/ Não Resistente
	Fraco	Tolerante/ Resistente	Intolerante/ Resistente

Adaptado de Trudgill (1991).

Levando em consideração a REH, pode-se identificar, de modo geral, a resistência qualitativa, descontínua (efeito fenotípico total), mediada por genes *R* de efeito principal (*major genes*), e a resistência quantitativa, contínua (parcial), resultante da somatória das ações de vários genes de pequeno efeito (*minor genes*) (MCDONALD; LINDE 2002). Genótipos que exibem resistência qualitativa monogênica não apresentam sintomas e, via de regra, nenhuma reprodução do nematoide (FR=0), ao passo que genótipos com resistência quantitativa observam-se graus variados de sintomas e, evidentemente, reprodução. Ao estabelecer cruzamentos direcionados entre indivíduos parentais contrastantes, sabidamente resistente e suscetível, poder-se-ia obter duas configurações fenotípicas na população F2 segregante: uma caracterizada por indivíduos resistentes e suscetíveis, visivelmente distintos e em frequência muito próxima àquela observada por Mendel em seus trabalhos seminais; na segunda configuração, poder-se-ia obter indivíduos exibindo fenótipos variando desde elevada resistência até extrema suscetibilidade, numa curva simétrica, típica da distribuição normal (LANNOU 2012). Em outras palavras, visualiza-se um verdadeiro

continuum de fenótipos, com indivíduos que permitem apenas um ligeiro acréscimo populacional até genótipos que permitem profusa multiplicação do nematoide parasito.

À guisa de exemplificação, Fery & Thies (1998), baseando na análise fenotípica de populações F1 e F2, obtidas a partir do cruzamento direcionado dos genótipos PA-426 (parental resistente) e P-350 (parental suscetível), concluíram que os valores fenotípicos observados para resistência de pimenta, *Capsicum chinense* Jacq, a *M. incognita*, não difere estatisticamente das proporções mendelianas esperadas (3:1), sugerindo, portanto, que a resistência é, neste caso, mediada por um único gene de efeito dominante e completo. Outra importante resistência monogênica (gene *Mex-1*) comumente incorporada em cultivares comerciais é a resistência de café a *M. exigua* Goeldi, 1887, a qual é oriunda da espécie *Coffeae canefora* L (NOIR et al., 2003).

A resistência de videira a *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950, no entanto, é quantitativa e poligênica, mas com um QTL (*Quantitative trait loci*) de grande efeito no fenótipo (XU et al., 2008). Outro exemplo de resistência quantitativa extensivamente estudado diz respeito à herança da resistência de trigo (*Triticum aestivum* L.) a espécies de *Pratylenchus* (*P. thornei* Sher & Allen, 1953, e *P. neglectus* (RENSCH 1924) Filipjev & Schuurmans-Stekhoven, 1941). Sob este aspecto, Thompson et al. (2012), objetivando analisar a natureza genética da resistência, avaliaram as reações de populações derivadas do cruzamento de cinco linhagens resistentes de trigo com o padrão de suscetibilidade e, ao término do período experimental, observaram que números de espécimes recuperados foram contínuos para todas as populações estudadas. Concluíram, pois, ser ambas as resistências herdadas quantitativamente (4-7 genes), embora independentes entre si.

Resistência quantitativa também tem sido encontrada para nematoides sedentários. Na interação arroz (*Oryza sativa* L)-*M. graminicola* Golden & Birchfield, 1965, especificamente, Dimkpa et al. (2016) verificam a presença de, pelo menos, 11 QTLs envolvidos na resistência. Em genótipos de arroz resistentes a *M. graminicola* observam-se, histologicamente, não apenas menor taxa de penetração dos indivíduos J2, mas também menor

desenvolvimento e reprodução dos espécimes (CABASAN et al., 2012).

Estritamente associadas às terminologias dos hospedeiros vegetais, encontram-se naturalmente aquelas que caracterizam as populações de fitonematoides. Desse modo, é comum falar de patogenicidade, por exemplo, para designar a capacidade inerente de determinada espécie de nematoide em causar doença; é, sob este ponto de vista, um conceito qualitativo. Não obstante, as populações de fitonematoides podem ainda diferir substancialmente na sua capacidade de causar mais ou menos doença (conceito quantitativo). Neste caso, designa-se o termo agressividade. Diferentes isolados podem, ainda, apresentar a capacidade de causar doença em apenas determinados genótipos da espécie hospedeira. Esta habilidade é determinada pela capacidade de determinado isolado em vencer ou suprimir genes *R* do hospedeiro (PARIAUD et al., 2009). O termo virulência é utilizado para descrever este fenômeno e raça, o qual será visto em maiores detalhes, para designar isolados com espectros de hospedeiros diferenciais definidos *a priori* (SHANER et al., 1992). Percebe-se, assim, que virulência é o contraponto da resistência mediada por genes *R* (resistência qualitativa), ao passo que a agressividade é o contraponto da resistência quantitativa. Existe, ainda, na literatura nematológica, o termo aptidão reprodutiva (*reproductive fitness* ou *parasitic fitness*, em inglês) usada para designar a capacidade de determinado isolado de exibir taxas reprodutivas diferenciais conforme o genótipo da espécie hospedeira (ANDRIVON 1993; ANDRIVON 1995).

Assim como ocorre para outros patógenos, a resistência monogênica e qualitativa é raça-específica. As demais (oligogênica e poligênica), por outro lado, exibem fenótipos tipicamente parciais, deve concordar quantitativa e raça-inespecífico (VAN DER PLANK 1963). Ambos os tipos de resistência apresentam vantagens e desvantagens. A resistência monogênica apresenta a vantagem de ser facilmente incorporada em programas de melhoramento (simples retrocruzamentos), além de ser preferível pelos técnicos e produtores. Todavia, a utilização de genótipos com essa característica impõe, quando utilizados isoladamente e por longos períodos, acentuada pressão de seleção sobre as populações de nematoides, resultando, pois, na emergência de populações virulentas e na consequente perda da ferramenta de manejo em

apreço (WILLIAMSON; ROBERTS 2009). Deve-se enfatizar que, embora para muitas espécies de nematoides economicamente importantes o modo de reprodução seja predominantemente partenogenético obrigatório, muitas delas exibem expressiva plasticidade genética que, sob âmbito agrônomo, se traduz principalmente na sua notória capacidade de “*burlar ou transpor*” a ação de genes *R*, nas mais variadas regiões do globo (L:TRUDGILL; BLOK 2001; CASTAGNONE-SERENO 2006; CASTAGNONE-SERENO et al., 2013).

De fato, o surgimento de populações virulentas de *M. incognita* tem sido assinalado frequentemente em cultivares portadores de genes *R* em várias espécies vegetais, tais como feijão (gene *Rk*), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (gene *Mi*), pepino (*Cucumis sativus* L.) (gene *N*), batata (*Solanum tuberosum* L.) (gene *N*), entre outros (EDDAOUDI et al., 1997; PETRILLO et al., 2006; MCKENRY; ANWAR 2007). Situação análoga tem sido observada no setor do tabaco. Variedades de tabaco resistentes a meloidoginoses têm sido adquiridas, via métodos tradicionais de melhoramento, graças à inserção de um único gene, com efeito de dominância completa, denominado *Rk1*, transferido de *N. tomentosa*, espécie selvagem próxima (YI et al., 1998), o qual confere resistência a populações de *M. incognita*. Entretanto, em levantamento atual realizado por Araújo Filho (2016), nas principais regiões produtoras do Brasil, verificou-se que o padrão etiológico da enfermidade é caracterizado pelo largo predomínio de *M. incognita* raça 2 (raça virulenta); sugerindo, teoricamente, que o gene *Rk1* tenha atuado como fator de seleção em direção a estas formas virulentas, como previamente mencionado em outras regiões do mundo (FORTTNUM et al., 1984; RICH; GARCIA 1985; STANTON et al., 1992; SCHMITT 1988).

Deve-se ter em mente, todavia, que a simples presença de indivíduos variantes virulentos não significa necessariamente que o risco para suplantação da resistência seja sempre elevado. Afinal, tem sido verificada a ocorrência natural de populações virulentas de *M. incognita*, sem nunca terem sido sujeitas à pressão de seleção (ROBERTS et al., 1990). Considerações teóricas, suportadas por evidências experimentais sólidas, levam a inferir que a virulência pode ter um “peso” significativo no potencial adaptativo

do parasita/patógeno, de modo a dificultar-lhes sobremaneira a emergência bem-sucedida na população (CASTAGNONE-SERENO et al., 2015). Alguns estudos têm verificado, por exemplo, menor potencial reprodutivo (poucos ovos por massa) de isolados virulentos, perante gene *Mi*, de *M. incógnita*, quando comparados a isolados avirulentos na ausência da pressão de seleção (ROBERTS 1995). Alguns estudos recentes indicam que a possibilidade de suplantação de determinado gene de resistência depende também do *background* genético do genótipo utilizado (FOUNERT et al., 2013) e, obviamente, da modalidade reprodutiva do parasita (MONTARY et al., 2015). Partindo do princípio que a perda de eficiência desta ferramenta (resistência monogênica) é resultante principalmente de intensa pressão de seleção (direcional), a eficiência destas estratégias poderia ter sido assegurada pelo relaxamento desta mesma pressão. Dados experimentais conclusivos suportam, por exemplo, o efeito positivo de sistemas produtivos baseados em medidas simples, tais como a rotação de culturas, piramidamento de genes e alternância de cultivares com diferentes genes *R* de resistência (DJIAN-CAPORALINO et al., 2014).

Embora seja parcial, ao contrário da resistência monogênica, genótipos com resistência poligênica não impõem elevada pressão de seleção a favor de indivíduos variantes na população, sendo, portanto, mais estáveis perante à plasticidade genética de populações de fitonematoides. Diferentemente da resistência monogênica, quase sempre dominante e associada à reação de hipersensibilidade (HR), este tipo de resistência pode estar mais frequentemente disponível e ser efetivo também contra importantes espécies endoparasitas migradoras, interações menos especializadas (THOMPSON et al., 2012; QUÉNÉHERVÉ et al., 2009). A principal limitação diz respeito a sua difícil incorporação em programas de melhoramento e à influência das condições ambientais na manifestação da característica (LANNOU 2012). Os valores de herdabilidade, em sentido amplo e restrito, variam consideravelmente entre os diferentes patossistemas. É considerável o número de registros para os mais diversos patossistemas, envolvendo nematoides migradores, sejam eles ecto ou endoparasitas (JONES; FOSU-NYARKO 2014). Entre os principais nematoides contemplados, destacam-se *A. bessey*

(arroz), *D. dipsaci* [Trevo (*Trifolium pratense* L.) e alfafa (*Medicago sativa* L.)], *R. similis* (banana), *Bursaphelenchulus xylophilus* (Steiner & Buher, 1934) Nickle, 1970, (*Pinus*), *X. index* (*Vitis*), *P. thornei* (trigo), entre outros (PENG; MOENS 2003).

2 BASES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES DA INTERAÇÃO PLANTA-NEMATOIDE

A despeito da natureza complexa da resistência de plantas a nematoides parasitos (sistema multifatorial ou multicomponente), conforme os mecanismos envolvidos, pode-se reconhecer, embora mutuamente não exclusivas, duas categorias essenciais, são elas: mecanismos de resistência pré-infeccional (passivos ou constitutivos) e mecanismos de resistência pós-infeccional (ativos ou induzidos). Ambas as categorias podem exibir mecanismos fisiobioquímicos e/ou estruturais (MANZANILLA-LOPEZ et al., 2004).

Baseando-se no fato de que a grande maioria dos fitonematoides parasita órgãos subterrâneos, fica evidente pressupor quais seriam as características estruturais que atuariam para impedir e/ou restringir o ingresso de determinado espécime no tecido vegetal, são eles: espessura da parede celular, rigidez de células da endoderme e, por fim, o grau de lignificação e suberificação da parede celular. A primeira barreira mecânica é, sem dúvidas, uma das mais importantes, sendo representada por uma intrincada e complexa rede, composta primariamente por celulose (15-40%), hemicelulose (30-40%), lignina (20-30%) e polímeros de pectina imersos em uma matriz de proteínas (RAI et al., 2015). No que diz respeito aos mecanismos bioquímicos pré-formados, todavia, maior número de componentes é frequentemente observado em diversas pesquisas. Sabe-se, por exemplo, que algumas espécies vegetais não hospedeiras produzem e liberam substâncias tóxicas, nematicidas e/ou repelentes, de maneira constitutiva (HOLBEIN et al., 2016). Sob este aspecto, já foi mencionado que alguns genótipos de pepino carregando gene *bitter* (*Bi*) produzem compostos repelentes, denominados curcubitacinas, a diferentes espécies de

nematoides, além de serem tóxicos a insetos (HAYNES; JONES 1976). De forma geral, a natureza dessas substâncias ainda não é muito bem elucidada, mas se acredita que sejam substâncias oriundas, muito provavelmente, do metabolismo secundário, moléculas não protéicas, tais como terpenos, flavonoides e alcaloides (GIEBEL 1974).

No tocante aos mecanismos pós-infeccionais, apesar de mais extensivamente estudados, diversos questionamentos são endereçados, seja em relação aos mecanismos envolvidos na percepção do parasita desafiador, seja em relação às alterações bioquímicas envolvidas, seja em relação a mudanças na expressão gênica do hospedeiro. Afinal, quais seriam as principais linhas de defesa envolvidas na resistência de plantas a nematoides? Quais seriam as alterações bioquímicas do hospedeiro envolvidas nas reações de compatibilidade e, principalmente, incompatibilidade? As prováveis alterações bioquímicas resultariam em alterações histológicas visíveis?

A natureza das respostas pós-infeccionais, induzidas pelo reconhecimento do ingresso de determinado parasita, é consideravelmente bem mais sofisticada, complexa e tem sido parcialmente conhecida até o momento. São reconhecidas duas linhas de defesa vegetal. A primeira, conhecida comumente como resistência basal, localizada na superfície celular, é ativada pelo reconhecimento de epitopos imunogênicos relativamente conservados, mesmo entre táxons distantes, diretamente do parasita/patógeno desafiador [*Pathogen-associated molecular patterns*-(PAMPs)] ou mesmo a partir de algum sinal de sua atividade na célula vegetal [*Damage-associated molecular patterns*-(DAMPs)] (LEE et al., 2017). Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de dissecar, em detalhes, a natureza dessas assinaturas moleculares para os mais diversos agentes fitopatogênicos. No caso de fitonematoides, os candidatos mais prováveis parecem ser moléculas existentes na superfície da cutícula e excreções liberadas pelo nematoide, derivados de quitina, além de fragmentos da parede celular vegetal, oriundos de sua atividade (HOLBEIN et al., 2016). Manosalva et al. (2015), buscando a resolução da natureza da ativação da resistência ativada por PAMP (PTI – *PAMP triggered immunity*) contra nematoides, estudou o efeito da aplicação da substância ascaroside, molécula aparentemente conservada em

Nematoda, e verificou que Ascr#18 ativa o sistema de defesa não apenas em *Arabidopsis*, mas também em espécies cultivadas taxonomicamente não relacionadas, tais como espécies mono [cevada (*Hordeum vulgare* L.)] e dicotiledôneas (*S. lycopersicum* e *S. tuberosum*).

O espectro de respostas induzidas por esta primeira linha (PTI/DPI - *DAMP-triggered immunity*) é bastante amplo e envolve ativação de uma cascata de sinais dependentes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), influxo de Ca^{+2} , explosão oxidativa caracterizada pela formação de diferentes espécies reativas de oxigênio [ROS (O_2^- , $\cdot\text{HO}_2$, H_2O_2 , e OH^-)], produção de metabólitos antimicrobianos (fitoalexinas), enzimas hidrolíticas (proteases), lignificação de parede celular, depósito de calose, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas), aumento da atividade de enzimas-chave (peroxidases, superoxidases e fenilalanina amônia-liase) da defesa vegetal, entre outras (GOVERSE; SMANT 2014).

Após o nematoide desafiador vencer a PTI, ele encontra naturalmente a segunda linha de defesa, de natureza bem específica (*Host-specific resistance*), baseada no reconhecimento direto de moléculas efetoras (ver capítulo 1), ou de suas perturbações nas células do hospedeiro, por receptores proteicos localizados tanto no espaço extracelular (apoplasto) quanto citoplasmáticos, ativando a resistência desencadeada por efector (ETI - *Effector-triggered immunity*). Embora a natureza das respostas envolva grande parte dos mecanismos induzidas pela primeira linha de defesa, esta segunda linha está, quase sempre, associada resposta de hipersensibilidade (HR), também conhecida como morte celular programada. Apesar de algumas críticas severas, muitas interações planta-nematoide operam num típico sistema gene-a-gene (hipótese de Flor). Pressupõem-se, pois, que nestes sistemas o produto proteico oriundo do gene *R*, no hospedeiro, reconheça especificamente o produto proteico do gene *Avr* (efetores), liberado pelo nematoide, de maneira similar, senão idêntica, ao clássico modelo “*chave-fechadura*” usado para descrever interações enzima-substrato, disparando uma série intrincada e redundante de respostas fisiológicas e bioquímicas (TOMCZAK et al., 2009).

Estas respostas têm sido caracterizadas, em sua maioria, para interações

que envolvem nematoides endoparasitos sedentários, principalmente espécies filiadas aos gêneros *Meloidogyne*, *Globodera* e *Heterodera*. Em interações compatíveis, sabe-se que, sob condições ambientais favoráveis, e na presença de hospedeiro suscetível, juvenis de segundo estágio (J2), esbeltos, eclodem, migram em direção às raízes e, via golpes de estilete e com auxílio de substâncias digestivas, ingressam os tecidos do hospedeiro vegetal. Uma vez no interior das raízes, movimentam-se até chegarem próximo ao cilindro central. A partir desta etapa, os J2s liberam um coquetel de substâncias dentro de células adjacentes à região anterior do corpo, “transformando-as” em aglomerados de células gigantes, nutridouras (*nurse cells*), multinucleadas e fisiologicamente muito ativas, denominados cenócito (*Meloidogyne*) e sincícios (*Rotylenchulus*, *Globodera* e *Heterodera*). A partir deste momento, os espécimes iniciam sua alimentação, sofrem trocas de seus revestimentos cuticulares (ecdises), originando os juvenis de terceiro (J3s) e quarto estágio (J4s) e, por fim, as formas adultas (machos e fêmeas) (ABAD et al., 2003; ELLING 2013; RODIUC et al., 2014; MITKOWSKI; ABAWI 2003). Em interações incompatíveis, no entanto, restrições, em maior ou menor grau, principalmente no desenvolvimento desses sítios de alimentação são relatadas. Uma vez reconhecido pela ETI, pode-se observar, conforme o gene de resistência envolvido, três diferentes tipos de respostas histológicas: (i) Alguns genes de reconhecimento quando ativados induzem, via HR, o abortamento do tecido nutridouro, resultando, conseqüentemente, em morte do nematoide por inanição, (ii) outros desencadeiam menor desenvolvimento destes sítios de alimentação, pela formação de uma barreira necrótica ao redor dos mesmos, e, por fim, (iii) o terceiro tipo de resposta é caracterizado pela não transferência de quantidades adequadas de suprimentos para o sítio de alimentação (PROITE et al., 2008; DAS et al., 2008; GOVERSE; SMANT 2014).

No que concerne a estudos de expressão gênica, metodologias diferentes têm sido amplamente utilizadas para fomentar parte de indagações levantadas, seja em interações compatíveis, seja incompatíveis. Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular, tais como hibridização *in situ*, biblioteca subtrativa e, mais recentemente, microarranjos,

têm sido as principais ferramentas utilizadas na determinação destes genes diferencialmente expressos. De modo geral, entre as principais respostas ativadas pela ETI, incluem a ativação de MAPKs e fatores de transcrição (WRKY), expressão de genes relacionados à síntese fitoalexinas, síntese de PR proteínas, além de liberação de ROS e HR (BARBOSA et al., 2009; GUIMARÃES et al., 2010; LI et al., 2009; CASTAÑEDA et al., 2017). Schaff et al. (2007), visando a dissecar a resistência conferida pelo gene *Mi* em tomate, identificaram 58 genes diferencialmente expressos, incluindo também glicosil transferase. Para endoparasitas migradores, o volume é, de fato, bem menor e inclui, entre outras respostas, acentuada síntese de PR proteínas, incremento das concentrações de ROS, e ativação da via dos fenilpropanoides (JONES; FOSU-NYARKO 2014).

É necessário enfatizar que estes estudos, em sua maioria, não envolveram o confronto de isolados virulentos em cultivares portadores de genes *R*, não sendo, conseqüentemente, informativos no tocante ao fenômeno da suplantação da resistência *per se*. Com efeito, mesmo em relação ao gene *Mi* de tomate, o mais extensivamente estudado, informações desta natureza são aparentemente exíguas. Além disso, informações obtidas pela utilização de microarranjos devem ser vistas com algumas reservas; afinal, são diversas as limitações, que, entre outros aspectos negativos, leva à utilização de métodos complexos de normalização. Atualmente, com o largo desenvolvimento da biologia molecular e da bioinformática, técnicas mais sofisticadas, robustas e que dispensam a necessidade de conhecimentos genômicos *a priori* têm emergido em estudos de transcriptômica; trata-se, essencialmente, do sequenciamento de RNA total. Consequentemente, informações adicionais e precisas nestas relações podem ser obtidas. De posse destas repostas, o maior entendimento global poderá, por exemplo, subsidiar a manipulação prática de genes determinados essenciais para o estabelecimento do parasito e/ou desenvolvimento da moléstia, resultando, pelo menos em teoria, em resistência efetiva.

Tabela 3 – Exemplos de estudos de genes diferencialmente expressos em algumas interações planta-nematoide.

Espécie Hospedeira	Nematoide	Tipo de Interação Envolvida	Referências
Soja	<i>M. javanica</i>	Compatível e Incompatível	Beneventi et al. 2013
Soja	<i>M. incognita</i>	Compatível	Ibrahim et al. 2011
Soja	<i>H. glycines</i>	Compatível e Incompatível	Alkharouf et al. 2006; Klink & Matthews 2009
Alfafa	<i>M. incognita</i>	Compatível e Incompatível	Potenza et al. 2001
Tabaco	<i>M. incognita</i>	Compatível	Goellner et al. 2001
Algodão	<i>M. incognita</i>	Compatível e Incompatível	Wubben et al. 2008; Barbosa et al. 2009
Feijão Comum (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>M. incognita</i>	Compatível	Santini et al. 2016
Amendoim	<i>M. arenaria</i>	Incompatível	Guimarães et al. 2010
Batata	<i>Globodera rostochiensis</i> ; <i>G. pallida</i>	Compatível e Incompatível	Sobczak et al. 2005
Tomate	<i>M. javanica</i>	Compatível	Fosu-Nyarko et al. 2009
<i>Arabidopsis</i>	<i>M. incognita</i>	Compatível	Jammes et al. 2005; Fuller et al. 2007
<i>Arabidopsis</i>	<i>H. schachtii</i>	Compatível	Fuller et al. 2007

3 GENES DE PARASITISMO VERSUS GENES DE RESISTÊNCIA

Já foi capitulado previamente que fitonematoides encerram um grupo de patógenos deveras heterogêneo, com diferentes formas de sobrevivência, espectro de hospedeiros, entre outros aspectos (BLAXTER 2011). No que diz respeito aos fatores de patogenicidade, novamente observa-se grande diversidade de atributos. Em consonância com este fato, ao analisar as relações filogenéticas, baseadas em dados moleculares, no Filo Nematoda, torna-se evidente que o fitoparasitismo surgiu em pelo menos três momentos distintos. Trata-se, portanto, de um grupo polifilético, com três ordens estabelecidas, Dorylaimida Pearse 1942 (Classe Enoplea), Triplonchida Cobb 1920 e Tylenchida Thorne 1949 (Classe Chromadorea) (BALDWIN et al., 2004). E, aqui, importantes questões emergem naturalmente: Quais os mecanismos comportamentais, bioquímicos e/ou morfológicos tornaram o fitoparasitismo possível para estes vermes? Seriam estes mecanismos

compartilhados amplamente em Nematoda? Teriam estes mecanismos sido herdados a partir de ancestrais comuns ou evolução convergente teria atuado fortemente?

Um aspecto é razoavelmente claro e, talvez, bastante óbvio atualmente. O fitoparasitismo teria sido impossível sem a presença de uma estrutura rígida o suficiente para perfurar a intrincada e complexa parede que circunda e protege a célula vegetal. Esta rígida estrutura, conhecida como estilete, está presente, embora deveras variável em forma e tamanho, em todos os nematoides fitoparasitas (FERRAZ; MONTEIRO 2011). É importante salientar, entretanto, que a recíproca não é verdadeira. Isso não explica, de forma isolada, o advento do fitoparasitismo em Nematoda, fato que nos leva presumivelmente a outra pergunta de grande relevância acadêmica e mesmo filosófica: O que mais seria necessário para ocupar este vantajoso nicho ecológico?

Entre outros aspectos, a transição para o fitoparasitismo tornou-se possível também pelo desenvolvimento de mecanismos bioquímicos e/ou fisiológicos que precedem até mesmo a etapa de infecção, garantindo, por exemplo, a sincronização da eclosão com flutuações sazonais do hospedeiro vegetal. A dormência, estado fisiológico caracterizado pela redução do metabolismo ao nível basal, constitui um dos principais mecanismos de sobrevivência em fitonematoides. Algumas espécies retornam à atividade após serem expostos a determinadas condições ambientais, mormente temperatura e umidade (quiescência), ao passo que outras espécies exigem certos requerimentos de natureza muito específica (diapausa), tais como determinados sinais químicos (*hatching factors*) liberados pelo hospedeiro, o que lhes garantiriam maiores chances de sucesso (FERRAZ; BROWN, 2016). Inclusive, algumas espécies apresentam mais de um mecanismo. Em espécies de *Globodera* e *Heterodera*, por exemplo, J2s recém-formados encontram-se em estado de dormência no interior dos cistos. Segundo estudos recentes, elevada concentração da substância trealose parece estar envolvida neste fenômeno (DUCEPPE et al., 2017). Na espécie *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) Filipjev, 1936, espécie geralmente associada a bulbos e bulbilhos, verifica-se outro engenhoso e interessante mecanismo de

sobrevivência em fitonematoides. Nesta espécie, juvenis de quarto estágio (J4s) perdem paulatinamente a água do corpo (anidrobiose), se enrolam e aglomeram (*Coiling/clumping*) entre si, diminuindo sobremaneira a superfície de exposição ao ambiente adverso e, por conseguinte, aumentando as chances de sobrevivência na ausência de condições apropriadas (MOENS; PERRY 2009).

Além disso, na presença do hospedeiro, mecanismos capazes de reconhecê-lo, tais como desenvolvimento de órgãos sensoriais (anfídeos), e de se movimentar de maneira direcionada (quimiotaxia), ao invés de errática, tornaram-se igualmente imprescindíveis para o sucesso de fitonematoides. Outra importante característica diz respeito ao largo espectro de hospedeiros (polifagia) exibido por boa parte, senão maioria, das espécies fitoparasitas importantes economicamente, assegurando-lhes sobrevivência ativamente (BALDWIN et al., 2004).

No que concerne a outras alterações morfológicas adaptativas, ajustes em estruturas associadas ao estilete, principalmente esôfago (=faringe), estruturas dotadas de células glandulares bem desenvolvidas e ativas metabolicamente, fizeram-se necessárias para ocupação deste nicho. A partir de glândulas esofagianas, dorsais e ventrais, fitonematoides desenvolveram a capacidade de produzir e liberar um verdadeiro coquetel de substâncias químicas que auxiliam tanto no processo de infecção quanto no estabelecimento e manutenção do parasitismo *per se*. Ao analisar as características químicas e estruturais da parede celular (primeira barreira), torna-se razoavelmente fácil pressupor que, pelo menos, parte dessas substâncias é de natureza enzimática, celulase (poligalactonase e β 1-4 endoglucanase), pectinase, xilanase e protease (RAI et al., 2015).

Recentemente, com advento do sequenciamento e anotação dos genomas do nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, modelo biológico para animais, e, num segundo momento, de importantes espécies parasitas de plantas (*M. hapla*, *M. incognita* e *B. xylophilus*), tem sido observado, todavia, que a origem dos genes responsáveis pela síntese destas enzimas degradadoras divergem consideravelmente. Espécies de *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera* e *Pratylenchus*, por exemplo, sintetizam e liberam

celulases similares àquelas liberadas por procariotos, precisamente bactérias (STARE et al., 2011; PAGANINI et al., 2012), ao passo que espécies de *Bursaphelenchulus*, *Aphelenchus* e *Aphelenchoides* liberam celulases cujas sequências assemelham-se a de fungos (KIKUCHI et al., 2011). Embora algumas teorias tenham sido ventiladas, as hipóteses mais verossímeis para estes encontradas são: (i) adaptação de genes pré-existentes para codificar novas funções; (ii) duplicação gênica e divergência de parálogos e, principalmente, (iii) a transferência horizontal de genes (THG) a partir de organismos não relacionados taxonomicamente, em múltiplas instâncias (DANCHIN et al., 2010; HAEGEMAN et al., 2011). Interessantemente, segundo estes estudos, entre os candidatos mais prováveis como doadores destes genes, para nematoides subterrâneos, figuram candidatos putativos como bactérias que ocupam o mesmo nicho ecológico, inclusive notórios fitopatógenos, tais como *Ralstonia solanacearum*.

Outros genes de parasitismo podem ter sido adquiridos por THG. Genes responsáveis pela síntese da enzima corismato mutase, a qual exerce papel chave na supressão de sistema de defesa vegetal, e de proteínas responsáveis pela síntese de vitaminas, parecem ter sido adquiridos também por esta via (DAVIS et al., 2008; HAEGEMAN et al., 2011). Curiosamente, genes responsáveis pela síntese de fatores de nodulação, muito similares a genes encontrados em *Rhizobium* spp. (*NodL*), também têm sido encontrados em espécies de *Meloidogyne* (WILLIAMSOM; GLEASON 2003). Diversos modelos têm sido propostos para explicar o fenômeno da THG em relações nematoide-micróbios, mas o mais simples teoriza que ancestrais bacteriófagos tenham adquiridos este genes durante a alimentação a partir de bactérias fitopatogênicas. Outras teorias baseiam-se na aquisição de genes via bactérias parasitas de nematoides, tais como *Pasteuria* ou *Wolbachia* (BIRD; BIRD 2001). Outras substâncias têm sido consideradas importantes para o fitoparasitismo. Recentemente, Lu et al. (2016) observaram, via técnica do *knock-down*, que determinados fatores de transcrição, receptores nucleares, são requeridos para patogenicidade de indivíduos J2 de *M. incognita*. Além disso, moléculas efetoras, expressas na glândula esofagiana dorsal de indivíduos J2 de *M. incognita*, têm sido identificadas (XIE et al.,

2016). Projetos recentes identificaram, na espécie *G. pallida*, uma família de genes responsável pela quebra, invertase, de sacarose em frutose e glicose (DANCHIN et al., 2016).

Como visto em capítulos anteriores, invariavelmente todas as plantas superiores são expostas ao ataque de uma miríade de microrganismos patogênicos e pestes. Paradoxalmente, para se defender, as plantas desenvolveram, ao longo do processo coevolutivo, um “arsenal metabólico” mediado por genes *R* cujos produtos proteicos encerram, de modo geral, várias classes de proteínas, denominadas proteínas *R* (TAMELING; TAKKEN 2008). Depreende-se, portanto, que estas proteínas exibem um comportamento parcialmente degenerado, reconhecendo e conferindo, às vezes, resistência dual a inúmeros estressores, frequentemente distantes filogeneticamente, consoante corroborado em várias pesquisas em todo o mundo (ROSSI et al., 1998).

As proteínas *R* reconhecem moléculas efetoras produzidas e liberadas no citoplasma pelos nematoides. Englobam o maior, mais abundante e bem estudado grupo de proteínas de resistência a nematoides conhecidas até o presente momento. Compõem-se, basicamente, de uma estrutura tripartida típica, com três domínios proteicos principais, são eles: um domínio LRR fundido a um domínio de ligação de nucleotídeos (NBS) e, por último, a um agrupamento amino-terminal. Em função deste último, podem-se reconhecer duas classes distintas de proteínas NBS-LRR. A primeira exibindo um domínio similar ao da proteína citoplasmática Toll (*Drosophila*) e do receptor interleucina-1, sendo, por esse motivo, denominada proteínas NBS-LRR-TIR. A segunda classe compreende aquelas proteínas em que esse domínio, virtualmente, inexistente. Ao invés disto, possui um domínio similar a uma bobina enrolada (*coiled coil*), razão pela qual recebeu a denominação de proteínas NBS-LRR-CC (MARTIN et al., 2003).

Alguns dos mais importantes genes *R* envolvidos em interações planta-nematoide pertencem à família NBS-LRR, embora não contenham o domínio TIR, tais como o gene *Mi-1* (tomate), *Hero A* (batata) e *Gap2* (batata) (WILLIAMSON; GLEASON 2003; WILLIAMSON; KUMAR 2006). Em monocotiledôneas, o gene *Cre3*, segundo gene clonado, também

codifica putativa proteína da classe NBS-LRR. Ainda fazem parte deste grupo diversos genes *R* encontrados em espécies lenhosas, em especial os genes *RMia* e *RMja*, os quais conferem resistência de espécies de *Prunus* a *M. incognita* e *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, respectivamente (SAUCET et al., 2016). Proteínas NBS-LRR são responsáveis pela ativação da HR. Genes *R* com domínios *LRR* extracelular também têm sido encontrados em interações planta-nematoide. Na resistência de soja a *H. glycines* Ichinohe, 1952, a resistência está associada a dois locus, *Rhg1* e *Rhg4* (WILLIAMSON; KUMAR 2006). Interessantemente, primeiro gene de resistência a nematoides clonado e caracterizado, o gene *Hs1^{PRO-1}*, o qual confere resistência específica de beterraba (*Beta vulgaris* L) a *H. schachtii* Schmidt, 1871, não pertence a nenhuma das classes citadas acima; este gene codifica uma putativa proteína acida composta por 282 aminoácidos (CAI et al. 1997).

4 VARIABILIDADE DE POPULAÇÕES E SUAS IMPLICAÇÕES

Nematoides parasitos de plantas reproduzem-se por diferentes estratégias. Embora uma grande maioria seja composta por espécies anfimíticas (*outcrossing species*), algumas exibem reprodução partenogenética, obrigatória ou facultativa. Independentemente da modalidade reprodutiva, espécies de nematoides parasitas de plantas exibem expressiva variabilidade genética, o que resulta em diferentes atributos fenotípicos em relação à adaptação aos mais diversos ambientes e ao parasitismo de plantas (SEMBLAT et al., 2000; CASTAGNONE-SERENO 2002). O conhecimento da amplitude desta variabilidade fisiológica reveste-se de importância não apenas acadêmica, mas, sobretudo, prática, haja vista que a seleção e manutenção da eficiência de genes *R* prescindem desta informação (DROPKIN 1988). Consoante à interação nematoide-hospedeiro, três critérios principais podem ser destacados, a saber: (i) variações em relação a genes *R* de resistência do hospedeiro; (ii) variações em relação à resistência quantitativa e, no caso de espécies polífagas, (iii) variações no que diz respeito ao espectro de hospedeiros (TRUDGILL 1991).

A despeito desta notória variação fisiológica, não há, como capitulado anteriormente, consenso terminológico no que concerne à designação destas variações, sendo frequentemente confusos e, até mesmo, arbitrários (ROBERTS 2002). Não ocorre uniformidade de critérios e, frequentemente, depara-se com acentuadas discrepâncias mesmo entre nematologistas. De modo geral, os termos mais abundantes na literatura são patotipo, *strain*, biótipo e, sobretudo, raça (BARKER 1993; ROBERTS 2002). Patotipo, por exemplo, é utilizado para distinguir determinada população de nematoide pela sua capacidade de multiplicar em dado genótipo de espécie hospedeira com um ou mais genes de resistência. Não obstante, o termo raça também tem sido utilizado neste contexto. Outras vezes, o termo raça é utilizado para se referir à habilidade inerente de determinada população de reproduzir em determinadas espécies de plantas com ou sem genes *R* de resistência. Parece muito lógico, todavia, que a alternativa mais coerente seja alinhar, ao máximo, os critérios de especialidades coirmãs da fitopatologia, tais como fitomicologia. Esta é a proposta de raça advogada neste capítulo. Dada a relevância para agricultura brasileira, discutir-se-ão, a seguir, os testes de raças para espécies de *Meloidogyne* e *H. glycines*.

Espécies de *Meloidogyne* exibem acentuada variação genotípica e fenotípica marcante (CARNEIRO et al., 1998; HUGALL et al., 1999; TRUDGILL; BLOCK 2001). Por esta razão, esquemas foram desenvolvidos para classificar raças. Um dos mais antigos esquemas foi proposto por Taylor & Sasser (1978), no qual distingue as principais espécies (*M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* e *M. hapla*) e raças conforme suas respostas em determinado espectro de espécies hospedeiras contendo genes *R* (Tabela 4). Posteriormente, à medida que novas variações fisiológicas intraespecíficas foram sendo observadas em diversas regiões do mundo, novas raças e esquemas foram sendo paulatinamente propostos, embora os critérios tenham permanecido os mesmos (ROBERTSON et al., 2006; ROBERTSON et al., 2009).

Tabela 4 - Hospedeiros diferenciais usados na identificação de espécies e raças de *Meloidogyne*.

Variedades de hospedeiros diferenciais						
Espécie/raça de <i>Meloidogyne</i>	Fumo NC-95	Algodão Deltapine 16	Pimenta C. Wonder	Melancia C. Gray	Amendoim Floruner	Tomate Rutgers
<i>M. incognita</i>						
Raça 1	-	-	+	+	-	+
Raça 2	+	-	+	+	-	+
Raça 3	-	+	+	+	-	+
Raça 4	+	+	+	+	-	+
<i>M. arenaria</i>						
Raça 1	+	-	+	+	+	+
Raça 2	+	-	-	+	-	+
<i>M. javanica</i>	+	-	-	+	-	+
<i>M. hapla</i>	+	-	+	-	+	+

Adaptado de Taylor; Sasser (1978)

Conhecido como nematoide do cisto da soja, *H. glycines*, pertencente à família Hoplolaimidae, foi assinalado pela primeira vez no Brasil na safra 1991/1992 parasitando soja em regiões produtoras (FERRAZ; MONTEIRO 2011). A reprodução é anfimítica e a diversidade genética é, portanto, bastante elevada. Esta diversidade genética não garante apenas adaptação aos mais diversos ambientes (temperados, tropicais e subtropicais), mas também pela marcante ocorrência de variações fisiológicas, com grande número de raças; cada raça apresentando a capacidade de reproduzir em uma série linhagens diferenciais de soja (TURNER; ROWE 2006). No esquema original, os genótipos de soja ‘Peking’, ‘Pickett’, PI88788 e PI90763 foram utilizados. Neste sistema de classificação, a raça é definida conforme o número de fêmeas obtido em determinada linha diferenciadora em relação ao número de fêmeas encontrado na cultivar ‘Lee’, utilizada como padrão de suscetibilidade (NIBLACK et al., 2006). Com o uso intensivo de cultivares resistentes, não obstante, populações virulentas emergiram em

diversas regiões produtoras, surgindo a necessidade de ampliar o esquema anteriormente proposto (Tabela 5), permitindo o reconhecimento de 16 raças (DIAS et al., 2009; ARAUJO FILHO et al., 2017).

Tabela 5 - Série de linhagens diferenciais de soja para caracterização de populações de *Heterodera glycines*.

Linhagens Diferenciadoras				
Raça	‘Pickett’	‘Peking’	PI88788	PI90763
1	-	-	+	-
2	+	+	+	-
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	+	-	+	-
6	+	-	-	-
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+
9	+	+	-	-
10	+	-	-	+
11	-	+	+	-
12	-	+	-	+
13	-	+	-	-
14	+	+	-	+
15	+	-	+	+
16	-	+	+	+

Linhagens que apresentarem índice de fêmeas (IF) menor que 10% são consideradas resistentes (-); quando este índice for maior que 10%, suscetíveis (+). Adaptado de Riggs; Schmitt, 1988.

Outro sistema de classificação tem sido proposto, bem mais recente, no qual populações são caracterizadas por “tipos” (“*HG types*”, em inglês). Neste novo sistema, a cultivar ‘Lee 74’ é utilizada como padrão de suscetibilidade e sete linhagens são utilizadas como indicadoras, são elas: ‘Peking’, PI88788, PI90763, PI 437654, PI 209332, PI 89772 e PI548316. Para cada linhagem é calculado Índice de Fêmeas (*IF*), a partir do qual ela pode ser considerada resistente (*IF*<10%) ou suscetível (*IF*>10%). Determinada população será, desse modo, definida conforme o número de linhagens em que a mesma seja virulenta (NIBLACK et al., 2002; NIBLACK et al., 2006).

REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, v.4, p.217–224, 2003.

AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*, ed. 5. Elsevier – Academic Press, San Diego, 2005. 922p.

ALI, A., et al. Inheritance and mapping of *Mj-2*, a new source of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance in carrot. *Journal of Heredity*, v.105, p.288-291, 2014.

ALKHAROUF, N.W. et al. Timecourse microarray analysis reveal global changes in gene expression of susceptible *Glycine max* (soybean) roots during infection by *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode). *Planta*, 2006.

AMMIRAJU, J.S.S. et al. The heat-stable root-knot nematode resistance gene *Mi-9* from *Lycopersicon peruvianum* is located on the short arm of chromosome 6. *Theoretical Applied Genetics*, v.106, p. 478-484, 2003.

ANDRIVON, D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: Precision vs. Tradition. *Phytopathology*, v.85, p. 518-519, 1995.

ANDRIVON, D. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need

for precision. *Phytopathology*, v.83, p.889-890, 1993.

ARAÚJO FILHO, J. V. et al. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) parasitizing resistant tobacco cultivars in southern Brazil. *Plant Disease*, v. 100, p.1222-1231, 2016.

ARAUJO FILHO, J. V.; PAZDIORA, P. C.; SEGER, F. M. Nematoides na cultura da soja: importância econômica, aspectos biológicos e estratégias de manejo integrado. In: CARVALHO, I.R.; NARDINO, M.; SOUZA, V.Q (Org.). *Melhoramento e Cultivo da Soja*. 1ed. Porto Alegre: Ciudadela, p. 147-172, 2017.

ARNTZEN, F.K. et al. Inheritance, level and origin of resistance to *Globodera pallida* in the potato cultivar Multa, derived from *Solanum tuberosum* spp. *andigena* CPC 1673. *Fundamental Applied Nematology*, v.16, p.155-162, 1993.

BALDWIN, J.G. et al. Evolution of plant parasitism among nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.42, p.83-105, 2004.

BARBOSA, A.E.A.D. et al. Differentially expressed genes in cotton plant genotypes infected with *Meloidogyne incognita*. *Plant Science*, v.177, p.492-497, 2009.

BARKER, K. R. Resistance/tolerance and related concepts/terminology in plant nematology. *Plant disease*, v.77, p.111-113, 1993.

BELLAFIORE, S. et al. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *Plos Pathogens*, v.4, p.1-12, 2008.

BENDEZU, I.F.; STARR, J.L. Mechanism of resistance to *Meloidogyne arenaria* in the peanut cultivar COAN. *Journal of Nematology*, v.35, p.115-118, 2003.

BENEVENTI, M.A. et al. Transcription profile of soybean root knot nematode interaction reveals a key role of phytohormones in the resistance reaction. *BMC Genomics*, v.14, 2013.

- BENT, A.F. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell*, v.8, p.1757-1771, 1996.
- BIRD, D.M. et al. The genomes of root-knot nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.47, p.333-51, 2009.
- BIRD, D.M.; BIRD, A.F. Plant Parasitic Nematodes. In: *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*. KENNEDY, M.W.; HARNET, W (eds). CAB International, 2001.
- BLANC-MATHIEU, R. et al. Hybridization and polyploidy enable genomic plasticity without sex in the most devastating plant parasitic nematodes. *Plos Genetics*, v.13, p. 1-36, 2017.
- BLAXTER, M. Nematodes: the worm and its relatives. *Plos Biology*, v.9, p. 1-9, 2011.
- BOERMA, H.R.; HUSSEY, R.S. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, v.24, p.242-252, 1992.
- BRIDGE, J.; PAGE, S.L.J. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. *Tropical Pest Management*, v.26, p. 296–298, 1980.
- BRUINSMA, J.S.S.; ANTONIOLLI, Z.I. Resistance of *Meloidogyne javanica* in soybean genotypes. *Nematode*, v2. n.1, 2015.
- BURDON, J.J. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology*, v.31, p.305-323, 1993.
- CABASAN, M.T.N. et al. Comparision of migration, penetration, development and reproduction of *Meloidogyne graminicola* on susceptible and resistant rice genotypes. *Nematology*, v.14, p.405-415, 2012.
- CAI, D. et al. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, v. 275, p.832-834, 1997.
- CAILLAUDE, M.C. et al. Root-Knot nematodes manipulate plant cell

functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, v.165, p.104-113, 2008.

CARNEIRO, R.M.D.G. et al. Variability among four populations of *Meloidogyne javanica* from Brazil. *Fundamental Applied of Nematology*, v.21, p.319-326, 1998.

CASTAGNONE-SERENO, P. et al. Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of Phytopathology*, v.51, p.203-220, 2013.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability and adaptive evolution in parthenogenetic root knot nematodes. *Heredity*, v.96, p.282-289, 2006.

CASTAGNONE-SERENO, P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. *Euphytica*, v.124, p.193-199, 2002.

CASTAÑEDA, N.E.N. et al. Gene expression. Analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. *Annals of Botany*, v.119, p.915-930, 2017.

CASTAGNONE-SERENO, P., MULET, K., LACHIA, C. Tracking changes in life-history traits related to unnecessary virulence. *Ecology and Evolution*, v.5, p.3677-3686, 2015.

CHEN, R. et al. *CaMi*, a root knot nematode resistance gene from hot pepper (*Capsium annuum* L.) confers nematode resistance in tomato. *Plant Cell Reports*, v.26, p.895-905, 2007.

COOK, R.; EVANS, K. Resistance and tolerance. In: BROWN, R.H.; KERRY, B.R. (Eds). *Principles and practice of nematode control in crops*. Academic, Sydney, p.179-231, 1987.

DANCHIN, E.G.J. et al. Multiple lateral genes transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *PNAS*, v.107, p.17651-17656, 2010.

DANCHIN, E.G.J. et al. Horizontal gene transfer from bacteria has enabled

the plant-parasitic nematode *Globodera pallida* to feed on host-derived sucrose. *Molecular Biology Evolution*, v.33, p. 1571-1579, 2016.

DAS, S. et al. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany*, v.59, p.1305-1313, 2008.

DAVIS, E.L. et al. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, v.11, p.360-366, 2008.

DIAS, W.P. et al. Nematóides de cisto da soja: biologia e manejo pelo uso da resistência genética. *Nematologia Brasileira*, v. 33, p. 1-16, 2009.

DIMKPA, S.O.N. et al. A genome-wide association study of a global rice panel reveals resistance in *Oryza sativa* to root knot nematodes. *Journal of Experimental Botany*, v.67, p.1191-1200, 2016.

DJIAN-CAPORALINO, C. et al. Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biology*, v.14, p.1-13, 2014.

DOCHEZ, C. et al. New sources of resistance to *Radopholus similis* in *Musa* germoplasm from Asia. *Australasian Plant Pathology*, v.35, p.481-485, 2006.

DROPKIN, V.H. The concept of race in phytonematology. *Annual Review of Phytopathology*, v.26, p.145:161, 1988.

DUCEPPE, M-O. et al. Analysis of survival and hatching transcriptomes from potato cyst nematodes, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Scientific Reports*, v.7, 2017.

EDDAOUDI, M. et al. Identification of the resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundamental Applied of Nematology*, v.20, p.285-289, 1997.

ELLING, A.A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species.

Phytopathology, v.103, p.1092-1102, 2013.

FERRAZ, L.C.C.B. MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: L. AMORIM; J.A.M. REZENDE; A. BERGAMIN FILHO (Org.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 4ªed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v.1, p. 277-306, 2011.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: NORMA EDITORA, 251p, 2016.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. Use of Antagonistic Plants and Natural Products. In: Nematology: advances and perspectives. CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W (Eds.). 2004.

FERY, R.L.; THIES, J.A. Genetic analysis of resistance to the southern root-knot nematode in *Capsicum chinense* Jacq. J. Amer. Soc. Hort. Sci. v.123, p.1008-1011, 1998.

FORTNUM, B.A. et al. Increasing incidence of *Meloidogyne arenaria* on Flue-Cured Tobacco in South Carolina. Plant Disease, v.68, p.244-245, 1984.

FOSU-NYARKO, J. et al. Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. Molecular Plant Pathology, v.10, p.237-248, 2009.

FOSU-NYARKO, J.; JONES, M.G.K. Advances in understanding the molecular mechanisms of root lesion nematode host interaction. Annual Review of Phytopathology, v.54, p. 253-278, 2016.

FOURIE, H. et al. Host and yield responses of soybean genotypes resistant or susceptible to *Meloidogyne incognita* *in vivo*. International Journal of Pest Management, v.59, p.111-121, 2013.

FOURNET, S. et al. Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. Plant Pathology, v.62, p. 184-193, 2013.

FULLER, V.L. et al. Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant Pathology*, v.8, p.595-609, 2007.

GALEK, R. et al. Application of DNA markers linked to the potato *H1* gene conferring resistance to pathotype *Ro1* of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Applied Genetics*, v.52, p.407-411, 2011.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p.191-219, 2002.

GIEBEL, J. Biochemical mechanisms of plant resistance to nematodes: a review. *Journal of Nematology*, v.6, p.175-182, 1974.

GILLEN, A.M.; BLISS, F.A. Identification and mapping of markers linked to the *Mi* gene for root knot nematode resistance in peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, v.130, p.24-33, 2005.

GOELLNER, M. et al. Endo- β -1,4-Glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. *The Plant Cell*, v.13, p.2241-2255, 2001.

GOVERSE, A.; SMANT, G. The Activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.52, p.243-265, 2014.

GUIMARAES, P.M. et al. A study of gene expression in the nematode resistant wild peanut relative, *Arachis stenosperma*, in response to challenge with *Meloidogyne arenaria*. *Tropical Plant Biology*, v.3, p.183-192, 2010.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, C. et al. Host suitability of *Vitis* rootstocks to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the dagger nematode *Xiphinema index*, and plant damage caused by infections. *Plant Pathology*, v.60, p.575-585, 2011.

HAEGEMAN, A.; JONES, J.T.; DANCHIN, E.G.J. Horizontal gene transfer in Nematodes: A catalyst for Plant Parasitism? *Molecular Plant Microbe Interactions*, v.24, p.879-887, 2011.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J.N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R., CARTER, C.C.; SASSER, J.N (Eds). An advanced treatise on *Meloidogyne*. v.2: Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics. p. 115-123, 1985.

HAYNES, R.L., JONES, C.M. Effects of the *Bi* locus in cucumber on reproduction, attraction and response of the plant to infection by the southern root-knot nematode. J. Amer. Soc. Hort. Sci. v.101, p.422-4, 1976.

HO, J-Y. et al. The root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. The Plant Journal, v.2, p.971-982, 1992.

HOLBEIN, J.; GRUNDLER, F.M.W.; SIDDIQUE, S. Plant basal resistance to nematodes: an update. Journal of Experimental of Botany, p.2-13, 2016.

HUGALL, A. et al. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomitic *Meloidogyne*. Molecular Biology and Evolution, v.16, p.157-164, 1999.

HULBERT, S.H. et al. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annual Review of Phytopathology, v.39, p.285-312, 2001.

HUYNH, B-L. et al. A major QTL corresponding to the *Rk* locus for resistance to root-knot nematodes in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Theoretical Applied Genetics. v.129, p. 87-95, 2016.

IBRAHIN, H.M.M. et al. Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. BMC Genomics, v.12, 2011.

ITHAL, N. et al. Parallel genome-wide expression profiling of host and pathogen during soybean cyst nematode infection of soybean. Molecular Plant-Microbe Interactions. v.20, p.293-305, 2007.

JAMMES, F. et al. Genome-wide expression profiling of the host response

to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. The Plant Journal, v.44, p.447-458, 2005.

JONES, M.G.K.; FOSU-NYARKO, J. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. Annals of Applied Biology, v.164, p.163-181, 2014.

KARURI, H.W. et al. A survey of root-knot nematodes and resistance to *Meloidogyne incognita* in sweet potato varieties from Kenyan fields. Crop Protection, v.92, p.114-121, 2017.

KIKUCHI, T. et al. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchulus xylophilus*. PLOS Pathog, v.7, n.9, 2011.

KLINK, V.P.; MATTHEWS, B.F. Emerging approaches to broaden resistance of soybean to soybean cyst nematode as supported by gene expression studies. Plant Physiology, v.151, p.1017-1022, 2009.

LAMONDIA, J.A. Genetics of burley and flue-cured tobacco resistance to *Globodera tabacum tabacum*. Journal of Nematology, v.34, p.34-37, 2002.

LANNOU, C. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, v.50, p.319-338, 2012.

LEE, H.L. et al. Current understandings of plant nonhost resistance. Molecular Plant Microbe Interactions, v.30, p.5-15, 2017.

LI, Y. et al. Transcriptomic Analysis of Nematode Infestation. In: Cell Biology of Plant Nematode Parasitism. BERG, R.H.; TAYLOR, C.G (Eds). Springer, 2009.

LU, C-J. et al. Nuclear receptor *nhr-48* is required for pathogenicity of the second stage (J2) of the plant parasite *Meloidogyne incognita*. Scientific Reports, v.6, 2016.

MANOSALVA, P. et al. Conserved nematode signalling molecules elicit plant defense and pathogen resistance. Nature Communications, v.6, 2015.

MANZANILLA-LOPEZ, R.H. Plant diseases caused by nematodes. In: Nematology: advances and perspectives. CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W (Eds.). 2004.

MARIN, D.H. et al. Development and evaluation of a standard method for screening for resistance to *Radopholus similis* in Bananas. Plant disease, v.84, p. 689-693, 2000.

MARTIN, G.B. et al. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. Annual Review Plant Biology, v.54, p.23-61, 2003.

McDONALD, B.A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. Euphytica, v.124, p.163-180, 2002.

MCKENRY, M.V.; ANWAR, S.A. Virulence of *Meloidogyne* spp. and induced resistance in grape rootstocks. Journal of Nematology, v.39, p.50-54, 2007.

MEYERS, B.C. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. The Plant Cell, v.15, p. 809-834, 2003.

MITCHUM, M.G. Soybean resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*: an update. Phytopathology, v.106, p.1444-1450, 2016

MITKOWSKI, N.A., ABAWI, G.S. 2003. Root-knot nematodes. The Plant Health Instructor. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0917-01.

MOENS, M.; PERRY, R.N. Migratoy plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence. Annual Review of Phytopathology, v.47, p. 313-332, 2009.

MONTARRY, J. et al. Heterozygote deficits in cyst plant parasitic nematodes: possible causes and consequences. Molecular Ecology, v. 24, p.1654-1667, 2015.

NG'AMBI, T.B.S. et al. Identification of resistance to four species of root-knot nematodes in tobacco. Journal of Nematology, v.31, p.272-282, 1999.

NIBLACK, T.L. et al. A model plant pathogen from the kingdom animalia: *Heterodera glycines*, the soybean cyst nematode. Annual Review of Phytopathology, 44: 283-303, 2006.

NIBLACK, T.L. et al. A Revised Classification Scheme for Genetically Diverse Populations of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, v.34, p.279-288, 2002.

NIBLACK, T.L., LAMBERT, K.N., TYLKA, G.L. A model plant pathogen from the kingdom animalia: *Heterodera glycines*, the soybean cyst nematode. Annual Review of Phytopathology, v. 44, p.283-303, 2006.

NOIR, S. et al. Identification of a major gene (*Mex-1*) from *Coffea canephora* conferring resistance to *Meloidogyne exigua* in *Coffea arabica*. Plant Pathology, v.52, 97-103, 2003.

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Meded. Landbouwhoges. Wageeningen. 66: 1-46, 1966.

PAGANINI, J. et al. Contribution of lateral gene transfers to the genome composition and parasitic ability of root-knot nematodes. PLOS one, v.7, n. 11, 2012.

PARIAUD, B. et al. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathology. v.48, p.409-424, 2009.

PENG, Y., MOENS, M. Host resistance and tolerance to migratory plant-parasitic nematodes. Nematology, v.5, p.145-177, 2003.

PETRILLO, M.D. et al. Dynamics of *Meloidogyne incognita* virulence to resistance genes *Rk* and *Rk²* in cowpea. Journal of Nematology, v.38, p.90-96, 2006

POLLOK, J.R. Reproduction of *Meloidogyne incognita* race 3 on flue-cured tobacco homozygous for *Rk1* and/or *Rk2* resistance genes. Journal of Nematology, v.42, p.79-86, 2016.

POLLOR, J.R. et al. Reproduction of *Meloidogyne incognita* Race 3 on flue-cured tobacco homozygous for *Rk1* and/or *Rk2* resistance genes. *Journal of Nematology*. v.48, p.79-86, 2016.

POTENZA, C. et al. Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Science*, v.161, p.289-299, 2001.

PROITE, K. et al. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology*, v.57, p.974-990, 2008.

QUÉNEHERVE, P. et al. Nematode resistance in bananas: screening results on some wild and cultivated accessions of *Musa* spp. *Euphytica*, v.165, p.123-136, 2009.

RAI, K.M. et al. Genome wide comprehensive analysis and web resource development on cell wall degrading enzymes from phyto-parasitic nematodes. *BMC Plant Biology*, v.15, 2015.

RICH, J.R.; GARCIA, M.R. Nature of the root knot disease in Flórida Tobacco. *Plant Disease*, v.69, p.972-974, 1985.

RIGGS, R. D.; SCHMITT, D. P. Complete characterization of the race scheme for *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, v. 20, n. 3, p. 392-395, 1988

ROBERTS, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: J.L. STARR; R. COOK & J. BRIDGE (Eds.). *Plant resistance to parasitic nematodes*. CABI, Wallingford, p. 23-41, 2002.

ROBERTS, P.A. Conceptual and practical aspects of variability in root knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, v.33, p.199-221, 1995.

ROBERTS, P.A. et al. Resistance in *Lycopersicum peruvianum* to isolates of *Mi* gene-compatible *Meloidogyne* populations. *Journal of Nematology*, v.22, p.585-589, 1990.

ROBERTS, P.A. Plant resistance in nematode pest management. *Journal of Nematology*, v.14, p.24-33, 1982.

ROBERTSON, L. et al. Characterization of *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. hapla* populations from Spain and Uruguay parasitizing pepper (*Capsicum annum* L.). *Crop Protection*, v.25, p.440-445, 2006.

ROBERTSON, L. et al. New host races of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, and *M. javanica* from Horticultural regions of Spain. *Plant disease*, v.93, p.180-184, 2009.

RODIUC, N. et al. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*. v.5, n.160, 2014.

ROSSI, M. et al. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *PNAS*, v.95, p.9750-9754, 1998.

SANTINI, L. et al. Host transcriptional profiling at early and later stages of the compatible interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, v.106, p.282-294, 2016.

SAUCET, S.B. et al. Resistance root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in woody plants. *New Phytologist*. v.211, p.41-56, 2016.

SCHAFF, J.E. et al. Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in *Mi*-mediated nematode resistance. *Plant Physiology*, v.144, 2007.

SCHMITT, D.P. Incidence of plant parasitic nematodes in the coastal plain of north Carolina. *Plant Disease*, Saint Paul, v.72, p.107-110, 1988.

SEID, A. et al. Resistance screening of breeding lines and commercial tomato cultivars for *M. incognita* and *M. javanica* populations (Nematoda) from Ethiopia. *Ephytica*, 2017.

SEMBLAT, J-P. et al. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity*, v.84, p.81-89, 2000.

SHANER, G. et al. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, v.30, p.47-66, 1992.

SHARMA, S.B. Resistance to *Rotylenchulus reniformis*, *Heterodera cajani*, and *Meloidogyne javanica* in accessions of *Cajanus platycarpus*. *Plant disease*, v.79, p.1033-1035, 1995.

SIDDIQI, M.R. Tylenchida parasites of plants and insects. 2 ed. Wallingford, UK: CABI Publishing, p.852, 2000.

STANTON, J.M.; O'BRIEN, P.C.; SCHIPKE, L.G.; HUGALL, A.; MORITZ, C. Species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) affecting tobacco in north Queensland, including two new host races of *M. arenaria*. *Australasian Plant Pathology*, v.21, p.150-157, 1992.

STARE, B.G. et al. Molecular variability and evolution of the pectate lyase (pel-2) parasitismo gene in cyst nematodes parasitizing different Solanaceous plants. *J. Mol. Evol*, v.72, 2011.

STARR, J.L. et al. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use, and future potential. In: STARR, J.L., BRIDGE, J., COOK, R (Eds.). *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*, 261p. 2002.

STARR, J.L., ROBERTS, P.A. Resistance to plant parasitic nematodes. In: *Nematology: advances and perspectives*. Chen, Z.X., Chen, S.Y., Dickson, D.W. 2004.

STETINA, S.R.; ERPELDING. *Gossypium arboreum* accessions resistant to *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology*, v.48, p.223-230, 2016.

SWIECICKA, M. et al. Dynamics in the tomato root transcriptome on infection with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant Pathology*, v.10, p.487-500, 2009.

TAMELING, W.I.L.; TAKKEN, F.L.W. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *European Journal of Plant Pathology*, v.121, p.243-255, 2008.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Biology, identification, and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Cooperative Publication. Department of Plant Pathology, North, Raleigh, N.C. Carolina State University and U.S. Agency for International of Developmen, p.111, 1978.

TEILLET, A. et al. Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. PlosOne, v.8, p.1-11, 2013.

THOMPSON, J.P. et al. Inheritance of resistance to root-lesion nematodes (*Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*) in five doubled-haploid populations of wheat. Euphytica, v.188, p.209-219, 2012.

TOMCZAK, A. et al. Resistant Plant Responses. In: Cell Biology of Plant Nematode Parasitism. BERG, R.H.; TAYLOR, C.G. Springer, 2009.

TRUDGILL, D.L. Resistance to and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. Annual Review of Phytopathology, v.29, p.167-92, 1991.

TRUDGILL, D.L.; BLOCK, V.C. Apomitic, polyphagous root knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annual Review of Phytopathology, v.39, p.53-77, 2001.

TURNER, S.J., ROWE, J.A. Cyst Nematodes. In: PERRY, E.N., MOENS, M. (Org.). Plant Nematology. 463p. 2006.

VAN DER PLANK, J.E. Plant diseases: Epidemics and Control. Academic Press, London, 1963.

VAN DER PUTTEN, W.H. et al. Nematode interactions in nature: models for sustainable control of nematode pests of crop plants? Advances in Agronomy, v.89, p.227-260, 2006.

VAN OOIJEN, G. et al. Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. Annual Review of Phytpathology, v.45, p.43-72, 2007.

WANG, C. et al. Identification and mapping of microsatellite markers linked to a root-knot nematode resistance gene (*rkn1*) in Acala NemX cotton

(*Gossypium hirsutum* L.). Theoretical Applied Genetics, v.112, p.770-777, 2006.

WANG, K-H. et al. Crotalaria as a cover crop for nematode management: a review. Nematropica, v.32, p.35-57, 2002.

WEISCHER, B.; BROWN, D.J.F. An introduction to nematodes: General Nematology. Pensoft, Sofia, 2001, 187p.

WILLIAMSON, V.M., GLEASON, C.A. Plant-nematode interactions. Current Opinion in Plant Biology, v.6, p.1-7, 2003.

WILLIAMSON, V.M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. Trends in Genetics, v.22, n.7, 2006.

WILLIAMSON, V.M.; ROBERTS, P.A. Mechanisms and Genetics of Resistance. In: Root Knot Nematodes. PERRY, R.N.; MOENS, M.; STARR, J.L. CAB International, 2009.

WUBBEN, M.J. et al. Molecular characterization and temporal expression analysis indicate that the *MIC* (*Meloidogyne* induced Cotton) gene family represents a novel group of root-specific defense-related genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Planta. v.228, p.111-123, 2008.

XIE, J. et al. A novel *Meloidogyne incognita* effector *Misp12* suppresses plant defense response at later stages of nematode parasitism. Frontiers in Plant Science, v.7, 2016.

XU, K. et al. Genetic and *QTL* analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. Theoretical Applied Genetics, v.116, p. 305-311, 2008.

YI, H.Y.; RUFT, R.C.; WERNSMAN, E.A.; CONKLING, M.C. Mapping the root knot nematode resistance gene (*Rk*) in Tobacco with RAPD markers. Plant Disease, v.82, p.1319-1322, 1998.

ZHANG, J.F. et al. Diallel analysis of root knot nematode resistance based on galling index in upland cotton. Plant breeding, v.126, p. 164-168, 2007.

ZHOU, T. et al. Genetic analysis and QTL detection for resistance to white tip disease in rice. Plos One, v.9, p.1-6, 2014.

wp.ufpel.edu.br/editoraufpel/



Editora
UFPel

